

氏名(本籍)	俞 詔 朝 (大韓民国)		
学位の種類	博士(獣医)		
学位記番号	獣医博甲第127号		
学位授与年月日	平成15年3月13日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻		
研究指導を受けた大学	帯広畜産大学		
学位論文題目	Molecular Characterization of Major Bioactive Molecules from the Hard Tick <i>Haemaphysalis longicornis</i> and Their Application for Novel Tick Control (フタトゲチマダニの免疫学的防除に関する主要抗原の分子生物学的研究)		
審査委員	主査	帯広畜産大学	教授 藤崎幸蔵
	副査	帯広畜産大学	教授 五十嵐郁男
	副査	岩手大学	教授 品川 隼 汎
	副査	東京農工大学	教授 本多英一
	副査	岐阜大学	教授 平井克哉

論文の内容の要旨

本論文は、フタトゲチマダニに対して有効な防御免疫を誘導しうる抗原(ワクチン候補抗原)を分子生物学的に探索することを主要な目的として、行われたものである。

1. フタトゲチマダニに頻回吸血されたウサギ免疫血清を用いたイムノスクリーニング法によって、フタトゲチマダニの卵の cDNA ライブラリーから分子量27/30 kDaの蛋白質をコードする cDNAのクローニングを行い、この遺伝子をP27/30遺伝子と命名した。P27/30遺伝子の推定アミノ酸配列はショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* のトロポニン I のクローンと69%の高い相同性を示し、P27/30遺伝子はアミノ酸配列の128-148番目にアクチン結合性ドメインを有することから、P27/30遺伝子の発現蛋白質はトロポニン I様であると結論した。このトロポニン I様蛋白質は、抗組換え体P27/30蛋白質免疫マウス血清を用いたイムノブロットによって、フタトゲチマダニ成ダニの全身抽出物に対する主要構成抗原として検出され、成ダニの筋肉、表皮、中腸、唾液腺における局在が確認されるとともに、同血清を用いた免疫組織染色法では、とくに筋肉で強い反応が示された。これらのことからP27/30遺伝子の発現するトロポニン I様蛋白質が筋肉に豊富に存在することが明らかとなった。

2. degenerate PCRとブラックスクリーニング法を用いて、フタトゲチマダニの卵の cDNA ライブラリーからキチナーゼクローンを得て、この遺伝子をCHT1遺伝子と命名した。CHT1遺伝子は、推定アミノ酸配列930残基をコードする2,790 bp のORFを持ち、1個のキチン結合性ペリトロピンAドメインと2個のグリコシル加水分解酵素ファミリー18ドメインを持つ多領域構

造を示した。CHT1蛋白質は抗組換え体CHT1蛋白質マウス免疫血清を用いたイムノブロットによって、分子量113 kDa であることが示されたが、バキュロウイルス発現系で作成された組換え体CHT1は糖修飾されており、そのキチン分解活性は用量依存的にアロサミジンによって阻害されるfamily 18に属するキチナーゼであることが明らかとなった。CHT1蛋白質はケモカイン仲介性の血管形成誘導に関与するELRモチーフを有することから、ケモカインファミリーに属することも示唆された。抗組換え体CHT1蛋白質マウス免疫血清を用いた局在部位の分析では、フタゲチマダニのキチナーゼは表皮および中腸に大量に発現していることが明らかになった。

3. フタゲチマダニから同定されたトロポニンIとキチナーゼの組換え体蛋白質を用いてマウスを免疫し、マダニ寄生と吸血に対す抵抗性(防御免疫)の誘導の存否を検討し、トロポニンI免疫マウスを吸血した成ダニでは吸血前期間が有意に延長するとともに、吸血期間が幼ダニと成ダニでは有意に延長することを明らかにするとともに、キチナーゼ免疫マウスを吸血した若ダニでは、脱皮率が有意に低下することと、マダニの変態・脱皮に抗キチナーゼ抗体が阻害作用を示すことを示唆した。

4. 本研究によって新規に発見し特性を解明したフタゲチマダニのトロポニン Iとキチナーゼは、ワクチン抗原として新たなマダニ防除手段確立のために今後の応用が可能であると結論した。

審 査 結 果 の 要 旨

わが国を始めとするアジア諸国で重要な人獣の疾病媒介者となっているフタゲチマダニに対しては、いまだ完璧な防圧法が確立されていない。本研究は、フタゲチマダニの寄生を阻止するための防御免疫を誘導する抗原(ワクチン候補抗原)を、分子生物学的に探索することを主要な目的として行われたものである。

1. フタゲチマダニに頻回吸血されたウサギ免疫血清を用いたイムノスクリーニング法によって、フタゲチマダニの卵の cDNA ライブラリーから分子量27/30 kDaの蛋白質をコードする cDNAのクローニングを行い、この遺伝子をP27/30遺伝子と命名し、P27/30遺伝子の発現蛋白質はトロポニン I様であると結論した。トロポニン I様蛋白質は、成ダニの表皮、中腸、唾液腺に局在するとともに、とりわけ筋肉に豊富に存在し、成ダニの全身抽出物中の主要構成抗原として検出された。

2. degenerate PCRとブラックスクリーニング法を用いて、フタゲチマダニの卵の cDNA ライブラリーからキチナーゼクローンを得て、この遺伝子をCHT1遺伝子と命名した。CHT1遺伝子は、1個のキチン結合性ペリトロピンAドメインと2個のグリコシル加水分解酵素ファミリー18ドメインを持つ多領域構造を示す、分子量113 kDaの糖タンパクであり、表皮および中腸に大量に発現するとともに、そのキチン分解活性は用量依存的にアロサミジンによって阻害され、family 18に属するキチナーゼであることが明らかとなった。また、CHT1蛋白質はケモカインファミリーに属することも示唆された。

3. フタゲチマダニから同定されたトロポニンIとキチナーゼの組換え体蛋白質を用いてマウスを免疫し、トロポニン Iの免疫によってマウスはフタゲチマダニのとくに成ダニの吸血を抑制することを明らかにした。また、キチナーゼ免疫マウスを吸血した若ダニではまた、脱皮率が有意に低下し、マダニの変態・脱皮に抗キチナーゼ抗体が阻害作用を示すことが推察された。これらのことから、トロポニン Iとキチナーゼは、ワクチン抗原として新たなマダニ防除手段確立のために今後の応用が可能であると考察した。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Molecular characterization of a troponin I-like protein from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*
著者名 : YOU, Myungjo XUAN, Xuenan TSUJI, Naotoshi KAMIO, Tsugihiko IGARASHI, Ikuo NAGASAWA, Hideyuki MIKAMI Takeshi and FUJISAKI, Kozo
学術雑誌名 : Insect Biochemistry and Molecular Biology
巻・号・頁・発行年 : 32(1) : 67 ~ 73, 2001
- 2) 題 目 : Identification and molecular characterization of a chitinase from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*
著者名 : YOU, Myungjo XUAN, Xuenan TSUJI, Naotoshi KAMIO, Tsugihiko TATLOR, Demar SUZUKI, Naoyoshi and FUJISAKI, Kozo
学術雑誌名 : Journal of Biological Chemistry
巻・号・頁・発行年 : () : ~ , 2003 (発表予定)

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Molecular evidence of *Babesia caballi* (Nuttall and Strickland, 1910) parasite transmission from experimentally-infected SCID mice to the ixodid tick, *Haemaphysalis longicornis* (Neuman, 1901)
著者名 : RODRIGUEZ, Bautista Jose Luis, IKADAI, Hiromi YOU, Myungjo BATTSETSEG, Badgar IGARASHI, Ikuo NAGASAWA, Hideyuki and FUJISAKI Kozo
学術雑誌名 : Veterinary parasitology
巻・号・頁・発行年 : 102(3) : 185 ~ 191, 2001
- 2) 題 目 : Comparison of macrophage scavenger receptor-A knockout mice with wild type ones in the immune response against repeated infestation with *Haemaphysalis longicornis*
著者名 : KABAMOTO, Satoshi BHAGAT, Negi A SUZUKI, Hiroshi, YOU, Myungjo, KAMIO, Tsugihiko TSUJI, Naotoshi CLAVERIA, Florencia G., NAGASAWA, Hideyuki and FUJISAKI, Kozo
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : 64(4) : 355 ~ 359, 2002