

氏名(本籍)	白藤梨可(岩手県)
学位の種類	博士(獣医)
学位記番号	獣医博甲第246号
学位授与年月日	平成20年3月13日
学位授与の要件	学位規則第3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	Studies on Homologues of a Macrophage Migration Inhibitory Factor and Autophagy-related Genes from a Hard Tick <i>Haemaphysalis longicornis</i> (フタトゲチマダニ由来マクロファージ遊走阻止因子およびオートファジー関連遺伝子に関する研究)
審査委員	主査 帯広畜産大学 教授 鈴木宏志 副査 帯広畜産大学 教授 西村昌数 副査 岩手大学 教授 品川邦汎 副査 東京農工大学 教授 岩崎利郎 副査 岐阜大学 教授 石黒直隆 副査 鹿児島大学 教授 藤崎幸蔵

論文の内容の要旨

マダニの最も重要な生存基盤は吸血である。マダニは宿主側に唾液を分泌して吸血しやすい環境を作る。吸血によってマダニ中腸内腔に取り込まれた宿主血液は、中腸上皮細胞内で緩慢に消化され、変態や産卵のための栄養分として活用されるとともに、一時的に貯蔵される。したがって、唾液腺と中腸はマダニの生存において特に重要な器官であると考えられ、マダニの吸血生理機構を解明するためには、これらの器官における遺伝子の発現動態に関する情報が不可欠である。そこで、本研究では、唾液中に分泌される分子、ならびに血液消化による栄養分獲得に関わる分子に着目し、フタトゲチマダニ *Haemaphysalis longicornis* の EST (Expressed Sequence Tag) データベースを用いることにより、唾液中に分泌され、円滑な吸血を行うために大きな役割を担うと考えられるマクロファージ遊走阻止因子、ならびに栄養分獲得に重要と推測される4つのオートファジー関連遺伝子を分離し、これらの特性を解析した。

第1章では、ウサギで4日間吸血させた部分飽血成ダニの唾液腺および中腸由来の cDNA ライブラリーから構築された EST データベースを用いて、マクロファージ遊走阻止因子 (macrophage migration inhibitory factor; MIF), オートファジー関連 (autophagy-related; ATG) 遺伝子の相同遺伝子を検索し、MIF, ATG8, および ATG12 の相同遺伝子をそれぞれ単離・

同定した。さらに、同様の手法で構築された胚および部分飽血成ダニ卵巣の EST データベースを用いて *ATG3* および *ATG4* の相同遺伝子を得て、これらについても単離・同定を行った。

第2章では、*H. longicornis* のマクロファージ遊走阻止因子 *MIF* (*HIMIF*) について、臓器別の発現パターンを調べ、組換え体 (recombinant *HIMIF*; r*HIMIF*) を作製してその機能解析を行った。RT-PCR により、雌成ダニにおける *HIMIF* の発現レベルは、未吸血時に比べて吸血時に増大することが明らかになった。また、*HIMIF* はほとんどのマダニ臓器で発現が認められたが、免疫組織化学染色によって、内在性 *HIMIF* は、唾液腺細胞、中腸上皮細胞、外皮細胞の細胞質内に強く発現していることが示された。加えて、4-5日間吸血させた成ダニから回収した唾液中に *HIMIF* が検出され、また、成ダニに吸血させたウサギの血清を用いた ELISA では、吸血後に *HIMIF* に対する抗体価の上昇が認められたことから、*HIMIF* は吸血時に宿主側に唾液成分として分泌されると考えられた。さらに、r*HIMIF* は、濃度依存的にヒト末梢血単核球の遊走を阻止するとともに、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞の管腔形成を阻害した。これらの結果は、*HIMIF* が、吸血部位における (1) 宿主単核球の遊走阻止、(2) 血管新生阻害の両機能を有することを示すものと理解された。本章で得られた知見は、マダニの唾液中に分泌される *HIMIF* が発揮する単核球遊走阻止や血管新生阻害機能によって、マダニの吸血が円滑に行われていることを明らかにするものであった。

第3章では、オートファジー関連遺伝子ホモログ (*HIATG3*, *HIATG4*, *HIATG8*, *HIATG12*) について、それらの発育期別 (若ダニ~成ダニ) ならびに臓器別の発現パターンを検索した。RT-PCR による解析では、これら4遺伝子の発現は若ダニの吸血が始まると低下し、宿主動物から飽血・離脱後10日目 (脱皮前) の若ダニでは増大した。次いで、飽血・離脱後20日目 (脱皮後) にはそれらの発現は再び低下し、飽血・離脱後3ヵ月目の未吸血期成ダニでは増大することが明らかになった。また、これらの遺伝子は未吸血成ダニのすべての臓器で発現していた。*Atg12* タンパクはオートファゴソーム形成の初期段階に形成される隔離膜に局在することがモデル生物において明らかにされていることから、未吸血成ダニの中腸細胞における *H. longicornis* の *Atg12* タンパク (*HIAtg12*) の局在を免疫電顕により調べたところ、内在性 *HIAtg12* は中腸細胞質内の顆粒様構造物の周囲に局在していることが認められた。以上の知見から、*HIATG12* が主として未吸血期の個体において機能すると考えられるとともに、*HIATG3*, *HIATG4*, *HIATG8* も *HIATG12* と同様に栄養飢餓状態の未吸血期において機能を発揮すると推察された。

本研究で解析した *H. longicornis* の新規5遺伝子がコードする分子は、いずれもマダニの生存に必須な吸血行動の基盤に関わる重要分子であると結論された。本研究は、マダニの吸血生理の解明を大きく前進させ、将来のマダニ防圧法の開発につながる有用な知見を提示したものである。

審 査 結 果 の 要 旨

マダニの生存基盤は吸血であり、唾液を分泌して吸血が容易な環境を作る。マダニ中腸内腔に取り込まれた宿主血液は、中腸上皮細胞内で緩慢に消化され、変態や産卵のための栄養分として貯蔵、利用される。したがって、マダニの吸血生理機構を解明するためには、唾液腺や中腸における遺伝子の発現動態に関する情報が不可欠である。本研究では、フタトゲチマダニ *Haemaphysalis longicornis* の唾液中に分泌され、円滑な吸血を行うために機能すると考えられるマクロファージ遊走阻止因子、

ならびに栄養分の獲得に重要と思われる4つのオートファジー関連遺伝子を同定し、これらの特性を明らかにした。

第1章では、*H. longicornis* の EST データベースを用いて、マクロファージ遊走阻止因子 (macrophage migration inhibitory factor; *MIF*)、オートファジー関連 (autophagy-related; *ATG*) 遺伝子の相同遺伝子を検索し、*MIF*、*ATG3*、*ATG4*、*ATG8*、および *ATG12* の相同遺伝子を単離・同定した。

第2章では、*H. longicornis* のマクロファージ遊走阻止因子 *MIF* (*HIMIF*) について、臓器別の発現パターンを調べ、組換え体 (r*HIMIF*) を作製してその機能解析を行った。雌成ダニにおける *HIMIF* の発現レベルは、未吸血時に比べて吸血時に増大することを明らかにするとともに、*HIMIF* はほとんどのマダニ臓器で発現が認められるが、内在性 *HIMIF* は、唾液腺細胞、中腸上皮細胞、外皮細胞の細胞質内に強く発現していることを示した。加えて、吸血中の成ダニの唾液中には *HIMIF* が検出されること、成ダニに吸血されたウサギの血清では、*HIMIF* に対する抗体価の上昇が認められることから、*HIMIF* は吸血時に宿主側に唾液成分として分泌されることが考えられた。さらに、r*HIMIF* は、濃度依存的にヒト末梢血単核球の遊走を阻止するとともに、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞の管腔形成を阻害した。これらの結果は、*HIMIF* の吸血部位における (1) 宿主単核球の遊走阻止、(2) 血管新生阻害機能を示すものと理解され、吸血の円滑化を促すものと考えられた。

第3章では、オートファジー関連遺伝子ホモログの4遺伝子 (*HIATG3*、*HIATG4*、*HIATG8*、*HIATG12*) は、すべての臓器で発現しているが、吸血期に低下し未吸血期では増大することが明らかにした。また、*Atg12* タンパクはオートファゴソーム形成の初期段階に認められる隔離膜に局在することが知られていることから、未吸血期中腸細胞における *H. longicornis* の *Atg12* タンパク (*HIAtg12*) の局在を免疫電顕により調べたところ、内在性 *HIAtg12* は中腸細胞質内の顆粒様構造物の周囲に局在していることが認められた。したがって、オートファジー関連タンパクは、栄養飢餓状態の未吸血期において機能を発揮すると推察された。

以上のことから、本研究で解析した *H. longicornis* の新規5遺伝子がコードする分子は、いずれもマダニの生存に必須な吸血行動の基盤に関わる重要分子であると結論された。本研究の成果は、マダニの吸血生理の解明を大きく前進させ、将来のマダニ防圧法の開発につながることを期待される。

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 : *Haemaphysalis longicornis*: Molecular characterization of a homologue of the macrophage migration inhibitory factor from the partially fed ticks

著 者 名 : Umemiya, R., Hatta, T., Liao, M., Tanaka, M., Zhou, J., Inoue, N. and Fujisaki, K.

学術雑誌名 : Experimental Parasitology

巻・号・頁・発行年 : 115 (2) : 135-142, 2007

- 2) 題 目 : Cloning and characterization of an autophagy-related gene, *ATG12*, from the three-host tick *Haemaphysalis longicornis*
 著 者 名 : Umemiya, R., Matsuo, T., Hatta, T., Sakakibara, S., Boldbaatar, D. and Fujisaki, K.
 学術雑誌名 : Insect Biochemistry and Molecular Biology
 卷・号・頁・発行年 : 37 (9) : 975-984, 2007
- 3) 題 目 : Autophagy-related genes from a tick, *Haemaphysalis longicornis*
 著 者 名 : Umemiya, R., Matsuo, T., Hatta, T., Sakakibara, S., Boldbaatar, D. and Fujisaki, K.
 学術雑誌名 : Autophagy
 卷・号・頁・発行年 : () : - , 2008

既発表学術論文

- 1) 題 目 : A secreted cystatin from the tick *Haemaphysalis longicornis* and its distinct expression patterns in relation to innate immunity
 著 者 名 : Zhou, J., Ueda, M., Umemiya, R., Battsetseg, B., Boldbaatar, D., Xuan, X. and Fujisaki, K.
 学術雑誌名 : Insect Biochemistry and Molecular Biology
 卷・号・頁・発行年 : 36 (7) : 527-535, 2006
- 2) 題 目 : Identification and characterisation of a leucine aminopeptidase from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*
 著 者 名 : Hatta, T., Kazama, K., Miyoshi, T., Umemiya, R., Liao, M., Inoue, N., Xuan, X., Tsuji, N. and Fujisaki, K.
 学術雑誌名 : International Journal for Parasitology
 卷・号・頁・発行年 : 36 (10-11) : 1123-1132, 2006
- 3) 題 目 : *Babesia* parasites develop and are transmitted by the non-vector soft tick *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae)
 著 者 名 : Battsetseg, B., Matsuo, T., Xuan, X., Boldbaatar, D., Chee, S. H., Umemiya, R., Sakaguchi, T., Hatta, T., Zhou, J., Verdida, A. R., Taylor, D. and Fujisaki, K.
 学術雑誌名 : Parasitology
 卷・号・頁・発行年 : 134 (Pt 1) : 1-8, 2007
- 4) 題 目 : RNA interference of cytosolic leucine aminopeptidase reduces fecundity in the hard tick, *Haemaphysalis longicornis*
 著 者 名 : Hatta, T., Umemiya, R., Liao, M., Gong, H., Harnnoi, T., Tanaka, M., Miyoshi, T., Boldbaatar, D., Battsetseg, B., Zhou, J., Xuan, X., Tsuji, N., Taylor, D. and Fujisaki, K.
 学術雑誌名 : Parasitology Research
 卷・号・頁・発行年 : 100 (4) : 847-854, 2007
- 5) 題 目 : Molecular characterization of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* *Bm86* homologue from *Haemaphysalis longicornis* ticks

著者名 Liao, M., Zhou, J., Hatta, T., Umemiya, R., Miyoshi, T., Tsuji, N.,
Xuan, X. and Fujisaki, K.

学術雑誌名 Veterinary Parasitology

巻・号・頁・発行年 : 146 (1-2) : 148-157, 2007

- 6) 題 目 : Identification of three protein disulfide isomerase members from
Haemaphysalis longicornis tick

著者名 : Liao, M., Hatta, T., Umemiya, R., Huang, P., Jia, H., Gong, H., Zhou,
J., Nishikawa, Y., Xuan, X. and Fujisaki, K.

学術雑誌名 : Insect Biochemistry and Molecular Biology

巻・号・頁・発行年 : 37 (7) : 641-654, 2007

- 7) 題 目 : Characterization of a carboxypeptidase inhibitor from the tick
Haemaphysalis longicornis

著者名 : Gong, H., Zhou, J., Liao, M., Hatta, T., Harnnoi, T., Umemiya, R.,
Inoue, N., Xuan, X. and Fujisaki, K.

学術雑誌名 : Journal of Insect Physiology

巻・号・頁・発行年 : 53 (10) : 1079-1087, 2007