

学 位 論 文 要 旨

氏名 前田 大輝

題 目 : Studies on the functions of *Haemaphysalis longicornis* C-type lectin,
and its relationship with *Babesia* parasites
(フタトゲチマダニ由来 C 型レクチンの機能とバベシア原虫との
関連性に関する研究)

論文要旨 :

レクチンは免疫や代謝など生体内で重要な機能を担う蛋白質で、糖と結合して生体内の情報伝達や生理活性の機能を保つことが知られている。その中でも C 型レクチンは Ca^{2+} 依存・非依存的に糖鎖を認識することで、極めて大きなサブファミリーを形成していることが知られている。近年、C 型レクチンが病原体特有の多糖構造を認識しシグナルを発信するという多数の知見があり、Toll 様受容体などとは異なる新たな自然免疫受容体ファミリーを形成すると考えられている。そこで、申請者はフタトゲチマダニにおいても C 型レクチンが吸血や病原体感染防御において重要な役割を担っていると考え、EST データベースより、フタトゲチマダニから新規の病原体認識受容体として C 型レクチン (*Haemaphysalis longicornis* C-type lectin : *HICLec*) の同定および機能解析することを試みた。

第一章においては、実際に同定した *HICLec* の機能解析を行った。多くの C 型レクチンが 1~2 個の糖認識ドメイン (CRD) を有しているのに対して、同定した *HICLec* は非常に興味深いことに、異なる 3 つの CRD (CRD1, CRD2, CRD3) を保存していることが明らかとなった。*HICLec* 遺伝子をノックダウンした成ダニにおいては、対照群に比べて有意に飽血体重が減少し、飽血直後の死亡率が高かった。産卵数については、減少傾向にあったものの有意差は認められなかった。また各々、大腸菌を用いて発現させた CRD1~3 の組み換え蛋白質を用いて、細菌に対する影響を調べたところ、すべての CRD がグラム陰性菌 *Escherichia coli*、グラム陽性菌 *Staphylococcus aureus* 両方に結合する能力があるが、いずれの組み換え蛋白質も *E. coli* と *S. aureus* の増殖を抑制しないことが明らかとなった。*HICLec* 遺伝子ノックダウン後に細菌を経皮接種した際のマダニの生存率の検証においては、*E. coli* 経皮接種群において、*HICLec* ノックダウン群の方が有意な死亡率の増加が認められたが、*S. aureus* 経皮接種群においては死亡率に有意な差が認められなかった。以上の結果より、*HICLec* はマダニの生存、特にグラム陰性菌の感染防御において重要な役割を担っている可能性が示唆された。

第二章においては、このマダニの媒介原虫である *Babesia ovata* に着目した。この原虫は大型動物であるウシを宿主とし、感染実験が簡単にできないことなどの理由から、フタトゲチマダニ体内における *B. ovata* の知見については不明な点が多い。そこで実際に *B. ovata* を用いて *HICLec* との関連性を検証する前に、フタトゲチマダニ体内における *B. ovata* の挙動を明ら

かにすることを試みた。多種のマダニと異なり、フタトゲチマダニについては口器の構造の違いなどから人工吸血法が難しく確立されていなかったが、このマダニについてマウスを用いた半人工吸血法が開発され、本実験系を用いて *B. ovata* 感染マダニの作出を行った。マダニ体内におけるバベシア原虫を検出するために、*B. ovata* β -tubulin 遺伝子を標的として PCR による検出を行った。人工吸血により *B. ovata* を経口的に摂取させ飽血させたマダニを、飽血後 0～4 日目まで経口的に回収し解剖した後、臓器ごとに DNA を抽出し、PCR およびリアルタイム PCR による解析を行った。その結果、中腸においては飽血後 0 日目にはほぼすべてのサンプルにおいて原虫遺伝子断片が検出されたのに対し、飽血後 4 日目に向けて検出率が減少した。対照的に、卵巣およびその他の臓器においては飽血後 0 日目ではほとんど検出されなかったが、飽血後 4 日目に向けて検出率が増加した。一方で、原虫細胞骨格蛋白質 P29 蛋白質を標的とした、間接蛍光抗体法によるマダニ体内およびマダニ卵内の *B. ovata* の可視化にも成功した。本実験感染モデルにより、飽血後 24 時間以内に中腸バリアを突破したバベシア原虫が、マダニベクターにおける経卵巣伝播の成立に寄与する可能性が明らかとなった。

B. ovata はマダニに感染する際に中腸内において形態変化を伴うステージシフトを起こしていると考えられるが、未だ成ダニにおいて検証した報告はない。そこで第三章では成ダニ中腸内における *B. ovata* の形態変化を *in vitro* 培養系で検討した。人工飽血させたフタトゲチマダニ成ダニの中腸内容物を、*in vitro* 培養系 *B. ovata* 感染赤血球に添加した後、原虫の形態観察を行った。その結果、通常の *in vitro* 培養系と異なる形態の原虫が観察され、その形態変化は 12 時間以内に完了することが明らかとなった。これらの知見は第二章で得られた、*B. ovata* はマダニ中腸を飽血後 24 時間以内に突破するという仮説を支持するものと考察された。

第四章においては、未だ予備試験の段階であるが、確立した本実験感染モデルを用いて、実際に HICLec と *B. ovata* の関連性の検証を行った。その結果、*HICLec* 遺伝子ノックダウン群においては、飽血後 4 日目においてもマダニ中腸内に *B. ovata* 原虫遺伝子が検出されたが、その他の臓器で検出されなかった。従って、HIClec はマダニ中腸内における *B. ovata* 原虫の伝播機構に関与している可能性が示唆された。

以上、本論文はフタトゲチマダニより新規の C 型レクチンを同定し、病原体との関与を検証したものであり、また確立したマダニバベシア実験感染モデルと併せ、今後のマダニベクター研究の発展に寄与するものであると考えられる。

学位論文審査の結果の要旨

氏名	前田大輝
審査委員	主査： 鹿児島大学 准教授 田仲 哲也
	副査： 山口大学 教授 佐藤 宏
	副査： 鹿児島大学 教授 遠藤 泰之
	副査： 鹿児島大学 教授 藤田 秋一
	副査： 鹿児島大学 准教授 松尾 智英
題目	Studies on the functions of <i>Haemaphysalis longicornis</i> C-type lectin, and its relationship with <i>Babesia</i> parasites (フタトゲチマダニ由来 C 型レクチンの機能とバベシア原虫との関連性に関する研究)

審査結果の要旨：

レクチンは免疫や代謝など生体内で重要な機能を担うタンパク質で、糖と結合して生体内の情報伝達や生理活性の機能を保つことが知られている。その中でも C 型レクチンが病原体特有の多糖構造を認識しシグナルを発信するという多数の知見があり、Toll 様受容体などとは異なる新たな自然免疫受容体ファミリーを形成すると考えられている。そこで、本論文ではフタトゲチマダニにおいても C 型レクチンが吸血や病原体感染防御において重要な役割を担っている可能性を前提に、EST データベースより、フタトゲチマダニから新規の病原体認識受容体として C 型レクチン (*Haemaphysalis longicornis* C-type lectin: *HICLec*) の同定および機能解析を行うことを試みた。

第 1 章では、実際に同定した *HICLec* の機能解析を行った。多くの C 型レクチンが 1~2 個の糖認識ドメイン (CRD) を有しているのに対して、同定した *HICLec* は、異なる 3 つの CRD (CRD1, CRD2, CRD3) を保存していることが明らかとなった。*HICLec* 遺伝子をノックダウンした成ダニにおいては、対照群に比べて有意に飽血体重が減少し、飽血直後の死亡率が高かった。また、大腸菌で発現させた CRD1~3 の組換え体を用いて、細菌に対する影響を調べたところ、すべての CRD がグラム陰性菌 *Escherichia coli*、グラム陽性菌 *Staphylococcus aureus*、両方に結合する能力があるが、いずれの組換え体も *E. coli* と *S. aureus* の増殖を抑制しないことが明らかとなった。*HICLec* 遺伝子ノックダウン後に細菌を経皮接種したマダニの生存率については、*E. coli* 経皮接種群において、*HICLec* ノックダウン群の方が有意な死亡率の増加が観察されたが、*S. aureus* 経皮接種群においては死亡率に有意な差が認められなかった。以上の結果より、*HICLec* はマダニのグラム陰性菌に対して重要な感染防御

を担っている可能性が示唆された。

第 2 章では、フタトゲチマダニの媒介原虫である *Babesia ovata* に着目した。この原虫は大型動物であるウシを宿主とし、感染実験が簡単にできないことなどの理由から、フタトゲチマダニ体内における *B. ovata* の知見については不明な点が多い。そこで、フタトゲチマダニ体内における *B. ovata* の挙動を明らかにすることを試みた。フタトゲチマダニについてはマウスを用いた半人工吸血法が開発され、本実験系を用いて *B. ovata* 感染マダニの作出を行った。人工吸血により *B. ovata* を経口的に摂取させ飽血させたマダニを、飽血後 0～4 日目まで経口的に回収した後、臓器ごとに DNA を抽出し、*B. ovata* β -*tubulin* 遺伝子を標的とした PCR およびリアルタイム PCR による解析を行った。その結果、中腸においては飽血後 0 日目にはほぼすべてのサンプルにおいて原虫遺伝子断片が検出されたのに対し、飽血後 4 日目に向けて検出率が減少した。対照的に、卵巣およびその他の臓器においては飽血後 0 日目ではほとんど検出されなかったが、飽血後 4 日目に向けて検出率が増加した。一方、原虫細胞骨格蛋白質 P29 蛋白質を標的とした、間接蛍光抗体法によるマダニ体内および卵内の *B. ovata* の可視化にも成功した。本実験感染モデルにより、飽血後 24 時間以内に中腸バリアを突破したバベシア原虫が、マダニベクターにおける経卵巣伝播の成立に寄与する可能性が明らかとなった。

B. ovata はマダニに感染する際に中腸内において形態変化を伴うステージシフトを起こしていると考えられるが、いまだ成ダニにおいて検証した報告はない。そこで第 3 章では、成ダニ中腸内における *B. ovata* の形態変化を *in vitro* 培養系で検討した。人工飽血させたフタトゲチマダニ成ダニの中腸内容物を、*in vitro* 培養系 *B. ovata* 感染赤血球に添加した後、原虫の形態観察を行った。その結果、通常の *in vitro* 培養系とは異なる形態の原虫が観察され、その形態変化は 12 時間以内に完了することが明らかとなった。これらの知見は第 2 章で得られた、*B. ovata* はマダニ中腸を飽血後 24 時間以内に突破するという仮説を支持するものと考察された。

第 4 章では、確立した *B. ovata* 感染マダニモデルを用いて、H1CLec と *B. ovata* の関連性の検証を行った。その結果、H1CLec 遺伝子ノックダウン群においては、飽血後 4 日目においてもマダニ中腸内に *B. ovata* 原虫遺伝子が検出されたが、その他の臓器で検出されなかった。従って、H1CLec はマダニ中腸内における *B. ovata* 原虫の伝播機構に関与している可能性が示唆された。

以上をまとめると、本論文はフタトゲチマダニより新規の C 型レクチンを同定し、病原体との関与を検証したものであり、また確立したマダニ-バベシア実験感染モデルと併せ、今後のマダニベクター研究の発展に寄与するものであると考えられる。以上により、本論文は博士（獣医学）の学位論文として十分な価値を有するものと判定した。