

学 位 論 文 要 旨

氏名 草木迫 浩大

題 目 : Studies on the functions of *Haemaphysalis longicornis* 2-Cys peroxiredoxin, and its application for tick control

フタトゲチマダニ由来 2-Cys ペルオキシレドキシンの機能とマダニ制御への応用に関する研究

論文要旨 :

活性酸素種 (ROS) であるヒドロキシルラジカルは、特に強い酸化力を有し、生体高分子に酸化障害を引き起こすが、生体内での半減期は短い。このため、ROS の中で半減期が比較的長く、かつ、その前段階の ROS である過酸化水素を制御の方が生物にとって効率的である。マダニは偏性吸血性節足動物で、宿主由来血液には鉄が大量に含まれ、その鉄分子とマダニ体内に存在する酸素分子が反応し、多量の ROS の発生が予想される。したがって、マダニ体内における過酸化水素の制御は、マダニの発育に必須である。そこで、過酸化水素消去への関与が考えられるペルオキシレドキシシン (Prx) に着目し、第一章では Prx の生化学的解析、第二章ではマダニの吸血並びに産卵における Prx の役割を解明した。さらに、第三章ではマダニ細胞を用いた Prx と過酸化水素の関係を解析した。最後に、第四章ではマダニ制御への応用としてワクチン効果の検証を行った。

まず、フタトゲチマダニ cDNA ライブラリーより Prx の相同遺伝子と考えられる配列 (*H1Prx2*) を単離・同定し、大腸菌による組換え体 (*H1Prx2* 野生型) を作製した。また、他生物の Prx のアミノ酸配列との比較により、保存されている二箇所の Cys 残基を推定し、これらの残基を一箇所または両方を一塩基置換により Ser 残基に変換した変異体を作製し [Cys51Ser; Cys172Ser; Cys51Ser/Cys172Ser]、抗酸化活性への影響を比較した。Mixed-Function Oxidation アッセイを用いて抗酸化活性を測定したところ野生型と変異体 Cys172Ser で抗酸化活性が認められた。また、ジスルフィド結合による二量体形成の有無を確認したところ野生型のみ二量体を形成した。さらに、他生物の 2-Cys 型 Prx は多量体を形成するため、同定した *H1Prx2* の多量体形成をゲルろ過クロマトグラフィーにより調べたところ、作製したすべての組換え体で多量体形成を示すピークが確認され、特に野生型のみ二量体の分子量付近にピークが検出された。これらの結果から、推定された二つの保存された Cys 残基は *H1Prx2* の二量体形成に必須であり、特に 51 番目の Cys 残基は抗酸化活性に重要な残基であることが明らかとなった。

次に、マダニ体内での *H1Prx2* 遺伝子および蛋白質の発現動態並びに局在を明らかにするために定量的 PCR および抗血清を用いたウェスタンブロット法並びに間接蛍光抗体法を行った。その結果、マダニの吸血に伴い *H1Prx2* の発現量が増加し、特に中腸と卵巣において顕著であった。また、中腸の基底膜および卵巣の細胞膜に局在が認められた。さらに、RNA 干渉法による *H1Prx2*

(別紙様式第3号)

遺伝子ノックダウンを行い、H1Prx2 のマダニ体内での吸血・産卵に果たす役割並びに過酸化水素濃度への影響を解析した。その結果、H1Prx2 遺伝子をノックダウンしたマダニでは、飽血体重、卵重量並びに孵化率が対照群に比べ有意に減少し、マダニ体内の過酸化水素濃度も増加傾向を示した。これらの結果から、H1Prx2 は、中腸並びに卵巣において抗酸化応答への関与が推察され、マダニの吸血・産卵および過酸化水素濃度の制御に重要な分子であることが考えられた。

第三章では、マダニ Prx と過酸化水素の関係を解析するためにマダニ細胞を用いて、実験を行った。マダニ細胞の Prx は、フタトゲチマダニの Prx と相同性のある遺伝子を BLAST 解析により同定した。同定した遺伝子の二本鎖 RNA を作製し、RNA 干渉法によるマダニ細胞の遺伝子ノックダウンを行った。その後、マダニ細胞を活性酸素種誘導物質であるパラコートに暴露し、過酸化水素の発生変化を細胞内過酸化水素に対する特異的な蛍光プローブ BES-H₂O₂-Ac を用いて観察した。RNA 干渉法により、Prx 遺伝子のノックダウンが確認され、これらの細胞を用いてパラコート暴露による過酸化水素の発生変化を観察したところ、Prx をノックダウンしたマダニ細胞で過酸化水素に対する特異的な蛍光の増加が観察された。この結果から、マダニにおける Prx は細胞レベルでの過酸化水素消去による抗酸化応答へ関与することが示唆された。

最後に、組換え H1Prx2 (rH1Prx2) で免疫したマウスでマダニを吸血させ、マダニに対する rH1Prx2 のワクチン効果を検証した。BALB/c マウス 1 匹あたり、同量のフロイント不完全アジュバント (IFA) と混合した 30 µg の rH1Prx2 (rH1Prx2+IFA) または rH1Prx2 のみをそれぞれ皮下に 3 週間間隔で 2 回免疫を行った。コントロール群には IFA と混合したリン酸緩衝液 (PBS) または PBS のみを投与した。各群 6 匹のマウスを実験に供した。ELISA によって抗原特異的抗体応答を確認したところ、rH1Prx2 のみまたは rH1Prx2+IFA を免疫した群において、rH1Prx2 に対する顕著な抗体価の増加が認められた。特に、rH1Prx2 免疫群では、Th2 免疫経路のマーカーである IgG1 を特異的に誘導した。さらに、2 回目免疫後のマウスで若ダニを吸血させたところ、rH1Prx2 のみを免疫した群において特異的抗体価の増加が認められたが、若ダニへの顕著な影響は認められなかった。これらの結果から、rH1Prx2 のマダニに対するワクチン効果は認められなかったが、高免疫原性であったことから生物由来アジュバントとしての応用の可能性が考えられる。

以上の結果から、マダニ Prx は、マダニの吸血・産卵および過酸化水素濃度の制御に重要な分子であることが考えられ、生物由来アジュバントとしての応用の可能性も見出された。マダニの吸血における酸化ストレス応答に Prx が関与しているが、他の抗酸化分子との関係などを含めて網羅的に解析することで、マダニの抗酸化機構の解明につながると思われる。

(和文 2,000 字又は英文 800 語程度)

学位論文審査の結果の要旨

氏名	草木迫 浩大
審査委員	主査： 鹿児島大学 准教授 田仲 哲也
	副査： 鹿児島大学 教授 藤田 秋一
	副査： 鹿児島大学 教授 宮本 篤
	副査： 鹿児島大学 教授 遠藤 泰之
	副査： 山口大学 准教授 高野 愛
題目	Studies on the functions of <i>Haemaphysalis longicornis</i> 2-Cys peroxiredoxin, and its application for tick control (フタトゲチマダニ由来 2-Cys ペルオキシレドキシンの機能とマダニ制御への応用に関する研究)
<p>審査結果の要旨：</p> <p>活性酸素種 (ROS) であるヒドロキシラジカルは、特に強い酸化力を有し、生体高分子に酸化障害を引き起こすが、生体内での半減期は短い。このため、ROS の中で半減期が比較的長く、かつ、その前段階の ROS である過酸化水素を制御する方が生物にとって効率的である。マダニは偏性吸血性節足動物で、宿主由来血液には鉄が大量に含まれ、その鉄分子とマダニ体内に存在する酸素分子が反応し、多量の ROS の発生が予想される。したがって、マダニ体内における過酸化水素の制御は、マダニの発育において必須である。そこで、過酸化水素消去への関与が考えられるペルオキシレドキシシン (Prx) に着目し、第 1 章では Prx の生化学的解析、第 2 章ではマダニの吸血並びに産卵における Prx の役割を解明した。また、第 3 章ではマダニ細胞を用いた Prx と過酸化水素の関係を解析した。さらに、第 4 章ではマダニ制御への応用として、Prx のワクチン効果について検証を行った。</p> <p>第 1 章では、フタトゲチマダニ cDNA ライブラリーから Prx の相同遺伝子と考えられる配列 (<i>H1Prx2</i>) を単離・同定し、大腸菌による組換え体 (<i>H1Prx2</i> 野生型) を作製した。また、他生物の Prx のアミノ酸配列との比較により、保存されている二箇所の Cys 残基を推定し、これらの残基を一箇所または両方を一塩基置換により Ser 残基に変換した変異体を作製し [Cys51Ser; Cys172Ser; Cys51Ser/Cys172Ser]、抗酸化活性への影響を比較した。Mixed-Function Oxidation アッセイを用いて抗酸化活性を測定したところ野生型と変異体 Cys172Ser で抗酸化活性が認められた。また、ジスルフィド結合による二量体形成の有無を確認したところ野生型のみ二量体を形成した。さらに、他生物の 2-Cys 型 Prx は多量体を形成するため、同定した <i>H1Prx2</i> の多量体形成をゲルろ過クロマトグラフィーにより調べたところ、作製したすべての組換え体で多量体形成を示すピークが確認され、特に野生型のみ二量体の分</p>	

子量付近にピークが検出された。これらの結果から、推定された二つの保存された Cys 残基は H1Prx2 の二量体形成に必須であり、特に 51 番目の Cys 残基は抗酸化活性に重要な残基であることが明らかとなった。

第 2 章では、マダニ体内での *H1Prx2* 遺伝子および蛋白質の発現動態並びに局在を明らかにするために定量的 PCR および抗血清を用いたウェスタンブロット法並びに間接蛍光抗体法を行った。その結果、マダニの吸血に伴い H1Prx2 の発現量が増加し、特に中腸と卵巣において顕著であった。また、中腸の基底膜および卵巣の細胞膜に局在が認められた。さらに、RNA 干渉法による *H1Prx2* 遺伝子ノックダウンを行い、H1Prx2 のマダニ体内での吸血・産卵に果たす役割並びに過酸化水素濃度への影響について解析した。その結果、*H1Prx2* 遺伝子をノックダウンしたマダニでは、飽血体重、卵重量並びに孵化率が対照群に比べ有意に減少し、マダニ体内の過酸化水素濃度も増加傾向を示した。これらの結果から、H1Prx2 は、中腸並びに卵巣において抗酸化応答への関与が推察され、マダニの吸血・産卵および過酸化水素濃度の制御に重要な分子であることが考えられた。

第 3 章では、マダニ Prx と過酸化水素の関係を解析するためにマダニ細胞を用いて、実験を行った。マダニ細胞の Prx は、フタトゲチマダニの Prx と相同性のある遺伝子を BLAST 解析により同定した。同定した遺伝子の二本鎖 RNA を作製し、RNA 干渉法によるマダニ細胞の遺伝子ノックダウンを行った。その後、マダニ細胞を活性酸素種誘導物質であるパラコートに暴露し、過酸化水素の発生変化を細胞内過酸化水素に対する特異的な蛍光プローブを用いて観察した。RNA 干渉法により、*Prx* 遺伝子のノックダウンが確認され、これらの細胞を用いてパラコート暴露による過酸化水素の発生変化を観察したところ、Prx をノックダウンしたマダニ細胞で過酸化水素に対する特異的な蛍光の増加が観察された。この結果から、マダニの Prx は過酸化水素消去による抗酸化応答へ関与することが示唆された。

第 4 章では、組換え H1Prx2 (rH1Prx2) で免疫したマウスでマダニを吸血させ、マダニに対する H1Prx2 のワクチン効果を検証した。BALB/c マウス 1 匹あたり、同量のフロイント不完全アジュバント (IFA) と混合した rH1Prx2 または rH1Prx2 のみをそれぞれ皮下に 3 週間間隔で 2 回免疫を行った。ELISA によって抗原特異的抗体応答を確認したところ、rH1Prx2 のみまたは rH1Prx2+IFA を免疫した群において、rH1Prx2 に対する顕著な抗体価の増加が認められた。特に、rH1Prx2 免疫群では、Th2 免疫経路のマーカーである IgG1 を特異的に誘導した。さらに、2 回目免疫後のマウスで若ダニを吸血させたところ、rH1Prx2 のみを免疫した群において特異的抗体価の増加が認められたが、若ダニへの顕著な影響は認められなかった。これらの結果から、マダニに対するワクチン効果は認められなかったが、rH1Prx2 は抗免疫原性であったことから生物由来アジュバントとしての応用の可能性が考えられた。

以上の結果から、マダニ Prx が、マダニの吸血・産卵および過酸化水素濃度の制御に重要な分子であることが考えられ、生物由来アジュバントとしての応用の可能性も見出された。今後はマダニの吸血における酸化ストレス応答について、Prx と他の抗酸化分子との関係を含めて網羅的に解析することで、マダニの抗酸化機構の解明につながる事が考えられる。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。