

学 位 論 文 要 旨

氏名 TALACTAC MELBOURNE RIO

題 目 : Studies on the survival dynamics of tick-borne viruses in the hard tick *Haemaphysalis longicornis* and the effects of tick antimicrobial peptides on viral replication

(フタトゲチマダニにおけるダニ媒介性ウイルスの媒介能とマダニ由来抗微生物ペプチドのウイルス増殖に与える影響)

論文要旨 :

Ticks are important vectors of disease-causing microorganisms, rickettsiae, spirochaetes, protozoa and viruses affecting humans, livestock, wild and companion animals. Among the important pathogens that ticks transmit, viruses form a major constituency of the transmitted pathogens and remain to be a big threat to both human and animal populations as they can produce diseases with high morbidity and mortality. Although the role of ticks in the transmission of viruses has been known for over a century, the diversity of tick-borne viruses has been less thoroughly studied than that of mosquito-borne viruses. Even until now, detection of new pathogenic viruses are still being reported and known viruses continuously spread to new geographical locations. Moreover, as carriers of several pathogenic microorganisms, ticks need broad spectrum innate immunity mechanisms that will allow them to maintain the pathogens and commensal microbes without impairing their viability and further development; however, our understanding of the tick-virus interaction still remains at an early stage. Here, I studied the survival dynamics of tick-borne viruses in the hard tick *Haemaphysalis longicornis* and the effects of tick antimicrobial peptides in viral replication

In Chapter 1, I presented evidences which showed that *H. longicornis* can be efficiently infected with Langat virus (LGTV) through anal pore microinjection. One of the most important determinants of vector competence is the susceptibility of midgut cells to virus infection and in this study, the tick's midgut was observed to be the primary replication site. The virus also remained detectable for at least 120 days post-inoculation of the virus. More importantly, infected ticks can effectively transmit LGTV to a susceptible host. However, demonstration of LGTV transmission through co-feeding between an infected adult and immature naïve ticks are needed to demonstrate the possible mechanism on how LGTV can circulate in the tick population, especially that no transovarial transmission was observed in the study using anal pore microinjection.

In Chapter 2, I demonstrated that *H. longicornis* is a competent vector or possibly the main tick carrier of the Thogoto virus (THOV) recently isolated in Japan as shown by the successful transfer of the virus to mice. I also observed that the virus inoculated via anal pore microinjection, readily transfers from the midgut to the salivary gland during feeding to

facilitate the transmission of the virus to the host. The current study also managed to establish that naïve nymphs can be infected by THOV through natural routes of infections, particularly via co-feeding the naïve nymphs with an infected adult. However, additional studies are needed to identify which animals potentially serve as the reservoir host of the virus and to elucidate animal susceptibility and the geographic distribution of THOV infections in Japan.

In Chapter 3, I established the extracellular virucidal activity of longicin P4 against LGTV *in vitro*, and to our knowledge, this is the first report of an antiviral activity of a native or synthetic antimicrobial peptide derived from *H. longicornis*. However, co-incubation of the peptide with an adenovirus failed to reduce infectivity and virus yield as compared with the control group. Moreover, no significant difference in mortality and virus titer in general was observed on both *longicin* gene-silenced and *Luc* dsRNA-injected ticks subsequently challenged with LGTV, suggesting that the role of the endogenous tick longicin in the antiviral defense of *H. longicornis* still remains to be demonstrated. Nonetheless, longicin P4 can be a potential therapeutic agent for tick-borne pathogens.

In Chapter 4, I characterized the recently identified HEdefensin gene from the hemolymph EST database of *H. longicornis*. The predicted amino acid sequence of *HEdefensin* showed the conserved cysteine residues normally found in arthropod defensins and was shown to have high amino acid sequence identity with some known tick defensins using BLAST analysis. The co-incubation of the LGTV with HEdefensin peptide at 37°C for 2 hours produced a 99.2% foci reduction and a five-fold lower virus yield as compared to cells infected with a medium-treated virus. However, the HEdefensin peptide has no antiviral activity against a non-enveloped virus and *HEdefensin* gene silencing showed no significant effect on tick mortality and virus titer after LGTV challenge. Nevertheless, the significant extracellular antiviral activity of the peptide against LGTV *in vitro* offers a new potential therapeutic agent for tick-borne pathogens, particularly flaviviruses.

Taken altogether, the results in this dissertation indicate that *H. longicornis* is a competent vector of LGTV and the most likely vector of the Japanese isolate THOV. Moreover, the results of the evaluation of the antiviral activity of longicin and HEdefensin peptides elucidated the possible role of antimicrobial peptides in the innate antiviral immunity of ticks. The novel methods and evidences in my studies provided additional information to our current understanding of tick-virus interaction and will hopefully provide new control strategies against ticks and alternative therapeutic agents against tick-borne viruses.

学位論文審査の結果の要旨

氏名	TALACTAC MELBOURNE RIO
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 前田 健
	副査： 鹿児島大学 教授 小原 恭子
	副査： 鹿児島大学 教授 浅野 淳
	副査： 鹿児島大学 准教授 正谷 遼膳
題目	Studies on the survival dynamics of tick-borne viruses in the hard tick <i>Haemaphysalis longicornis</i> and the effects of tick antimicrobial peptides in viral replication (フタトゲチマダニにおけるダニ媒介性ウイルスの媒介能とマダニ由来抗微生物ペプチドのウイルス増殖に与える影響)
審査結果の要旨： マダニはウイルス、リケッチャ、細菌、原虫などの病原体を人や動物に媒介する重要なベクターである。マダニが媒介するこれらの病原体の中でも、ウイルスは特に重篤な症状と高い死亡率を引き起こし、人や動物にとって大きな脅威となっている。マダニがウイルスを媒介することは昔から知られているが、マダニによって媒介されるウイルスの多様性については、蚊によって媒介されるウイルスに比べて徹底的に研究が行われていない。今までに病原性のある新種ウイルスが様々な場所で拡散していることが報告されている。また、病原体のキャリアーとして、マダニは幅広い初期免疫機構を必要としており、それはマダニの発育や産卵に関係なく、病原体と共生関係を維持することへとつながっている。しかし、マダニとウイルスの相互関係については疑問点が多く残っている。そこで本論文では、マダニによって媒介されるウイルスのフタトゲチマダニにおける媒介能並びにマダニ由来抗微生物ペプチドのウイルス増殖に与える影響について検討を行った。 第1章では、ランガットウイルスをマダニ中腸内へ接種を行い、ランガットウイルスがフタトゲチマダニに感染するか否かを検証した。その結果、ランガットウイルスはマダニ体内で増殖し、それは主に中腸細胞内に局在し、マダニ体内に少なくとも 120 日間保持されていた。また、これら感染マダニをマウスへ吸血させたところ、マウスからランガットウイルスに対する抗体の検出により、ランガットウイルスのマウスへの伝播が確認された。しかし、血液プールを介した感染成マダニから非感染若ダニへのランガットウイルスの伝播の可能性については示唆されたが、中腸内接種によって感染したマダニの卵への介卵感染は観察さ	

れなかった。

第 2 章では、フタトゲチマダニを用いて日本で分離されたトゴトウイルスに対するベクターの可能性について検証した。トゴトウイルスを中腸内接種したところ、吸血によってトゴトウイルスが中腸から唾液腺への移行が観察されたことから、マダニのトゴトウイルスは宿主への伝播が容易になることが示唆された。また、血液プールを介した感染成ダニから非感染若ダニへのトゴトウイルスの伝播の可能性についても確認することができた。

第 3 章と第 4 章では、マダニ体内でのウイルス免疫応答への抗微生物ペプチドの関与を調べるため、フタトゲチマダニ由来抗微生物ペプチドである中腸由来ロンギシン並びにヘモリン由来 HE ディフェンシンを用い、ウイルス増殖に及ぼす影響について検証した。フタトゲチマダニにおいて、二本鎖 RNA を用いた抗微生物ペプチド遺伝子ノックダウンを行った後、ランガットウイルスを体内接種したところ、マダニの生存並びに体内のウイルス増殖にほとんど影響を及ぼさなかった。したがって、マダニ生体内では、これらの抗微生物ペプチドがランガットウイルスに対する抗ウイルス免疫応答への関与の可能性が低いことが考えられた。一方、*in vitro* において、これら合成抗微生物ペプチドは、非エンベロープ型のアデノウイルスではなく、エンベロープ型のランガットウイルスに対し、抗ウイルス活性を示した。以上の結果から、合成抗微生物ペプチドが、*in vitro* でのランガットウイルスに対する顕著な抗ウイルス活性を示したことから、ダニ媒介性病原体、特にフラビウイルスに対する新規の治療薬としての応用が期待された。

以上の結果をまとめると、フタトゲチマダニはランガットウイルスとトゴトウイルスのベクターになる可能性が考えられる。また、抗微生物ペプチドであるロンギシンと HE ディフェンシンはマダニの初期免疫において抗ウイルス活性として働くことも考えられる。本論文の研究成果はマダニとウイルスの関係を理解するうえで有益な情報を与え、マダニのコントロールあるいはダニ媒介性ウイルスの新たな治療法の開発につながる可能性が示された。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。