

学 位 論 文 要 旨

氏名 Hernandez Emmanuel Pacia

題目: Oxidative stress-related molecules in ticks and potential utilization of their characteristics for tick control strategies

(マダニ制御に向けたマダニの酸化ストレス関連分子の特性利用)

論文要旨:

Ticks are important arthropod vectors of domestic and wild animal diseases, due to their obligate blood-feeding behavior. They are increasingly becoming resistant to chemical acaricides, the main current agents of tick control, leading scientists to explore alternative strategies such as tick vaccination and the introduction of transgenic tick strains.

Oxidative stress-related molecules are promising targets for novel tick control strategies, since the oxidative stress-coping mechanism is indispensable to tick survival, development, and reproduction due to the high exposure to reactive oxygen species (ROS) during blood feeding. These molecules are potential targets for novel vaccines to evaluate for their effects on tick infestation, blood-feeding, development, reproduction, and acaricide resistance, and they could also be harnessed to develop innovative control strategies against ticks and tick-borne pathogens as their characteristics are better understood.

I have addressed a range of themes associated with oxidative stress-related molecules: the identification and characterization of two oxidative stress-related glutathione S-transferases (GSTs) active in ticks (Chapter 1); the role of the two GSTs in acaricide resistance (Chapter 2); the roles of these GSTs and an oxidative stress-related ferritin in tick embryogenesis (Chapter 3), the role of another ferritin in iron regulation (Chapter 4), and the development of an iron-inducible promoter for production of transgenic ticks (Chapter 5).

In Chapter 1, I identify glutathione S-transferase (HIGST2), a GST active in the Asian longhorned tick *Haemaphysalis longicornis*, and characterize HIGST2 and HIGST, a previously identified similar GST. This characterization was performed *in silico*, *in vitro* (investigating enzymatic activity and kinetics), and *in vivo* (investigating systemic and organ-level expression during blood-feeding). I demonstrated that HIGST and HIGST2 are positively correlated with oxidative stress, both in terms of degree and localization, thus suggesting that they play a role in coping with oxidative stress during blood-feeding.

In Chapter 2, I focus on the roles of HIGST and HIGST2 in detoxifying acaricides in ticks, and my findings were as follows: HIGST is implicated in flumethrin detoxification, with observable inhibition of enzymatic activity. HIGST gene expression is also induced by sublethal doses of flumethrin, and the knockdown of HIGST results in increased susceptibility

of larvae and male ticks to flumethrin. HIGST2 is implicated in the metabolism of chlorpyrifos, which inhibited the GST activity of recombinant HIGST2, and then induced HIGST2 gene expression at sublethal doses. Larval susceptibility to chlorpyrifos increased upon HIGST2 knockdown. I also revealed a possible sex difference in acaricide-induced GST expression. The specific GSTs were shown to play a key role in ticks' acaricide metabolism.

In Chapter 3, I focus on the roles of HIGST, HIGST2, and secretory ferritin (Fer2) in tick embryogenesis, which involves the formation of ROS despite the absence of direct blood feeding. I demonstrated that HIGST, HIGST2, and Fer2 play similar oxidative stress-coping roles in embryogenesis to that seen during blood feeding, demonstrating that these molecules are potentially vital for the development of *H. longicornis* ticks.

In Chapter 4, I focus on the role of intracellular ferritin (Fer1) in iron regulation. I utilized the *I. scapularis* embryo-derived cell line (ISE6) to elucidate the phenomenon, since Fer1 had not been expressed in embryos (Chapter 3). The iron regulation is hypothetically driven by the interaction of iron-responsive elements in the Fer1 mRNA and iron regulatory protein (IRP), and the addition of ferrous sulphate was used to liberate the IRP. I induced the expression of the Fer1 protein in ISE6 cells after exposure to ferrous sulphate (2 mM) for 48 h, and the protein's ferroxidase activity resembled that seen in ticks *in vivo*. These findings advance our knowledge of iron metabolism in ticks and the induction of intracellular ferritin.

In chapter 5, I focus on development of an iron-inducible promoter in a tick cell line, based on the findings described in Chapter 4. Transgenic tick development requires a blood-feeding-inducible tick promoter because tick-borne pathogens are acquired during blood-feeding. An increased iron environment is a promising method for simulating the increased iron intake in blood feeding, which is difficult to recreate in cells. Such an iron-inducible promoter could be a valuable tool developing transgenic ticks as a tick control strategy, and could be used in cell lines to study the effects of antimicrobial peptides against tick-borne pathogens expressed during blood-feeding.

In the above research, I have demonstrated that oxidative stress-related molecules, specifically GSTs, are important for the survival of ticks during blood-feeding, acaricide metabolism, and embryonic development, and thus promising targets for tick control and arresting acaricide resistance. Among other oxidative stress-related molecules, ferritins also possess unique characteristics rendering them inducible by blood-feeding. Utilizing such characteristics could form a basis for the development of transgenic ticks, exploiting spatial and temporal characteristics in the quest to combat ticks and tick-borne diseases.

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	HERNANDEZ EMMANUEL PACIA
審査委員	主 査：鹿児島大学 教授 田仲 哲也
	副 査：鳥取大学 教授 山口 剛士
	副 査：鹿児島大学 教授 小原 恭子
	副 査：鹿児島大学 教授 白石 光也
	副 査：鹿児島大学 准教授 松尾 智英
題 目	Oxidative stress-related molecules in ticks and potential utilization of their characteristics for tick control strategies (マダニ制御に向けたマダニの酸化ストレス関連分子の特性利用)
<p>審査結果の要旨：</p> <p>マダニは、吸血行動によって、家畜や野生動物の病気を媒介する重要な節足動物である。マダニは、マダニ駆除の主な薬剤である化学的殺ダニ剤に対して抵抗力を増しており、研究者は化学的殺ダニ剤に代わる抗マダニワクチンやトランスジェニックマダニ系統の導入などの新たなマダニに対する制御戦略を模索している。</p> <p>マダニの生存、脱皮、生殖において、吸血中の活性酸素種 (ROS) によって生じる酸化ストレスを対処する酸化ストレス関連分子は、マダニの制御戦略に有望な標的分子である。酸化ストレス関連分子の機能を解明することで、マダニおよびマダニ媒介性病原体に対する革新的な制御戦略を開発できることが予想される。</p> <p>申請者は、酸化ストレス関連分子に関するテーマに取り組んでおり、その内容として、マダニのグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) の同定とその特性 (第 1 章)、殺ダニ剤に対する GST の役割 (第 2 章)、マダニの胚発生における GST とフェリチン (Fer) の役割 (第 3 章)、鉄調節における Fer の役割 (第 4 章)、鉄によって誘導される新規プロモーターの探索 (第 5 章) が挙げられる。</p> <p>第 1 章では、申請者はフタトゲチマダニのグルタチオン S-トランスフェラーゼ 2 (GST2) を同定し、GST2 の特性について、すでに同定されている GST と比較検討した。この特性評価は、<i>in silico</i> (構造解析)、<i>in vitro</i> (酵素活性の解析)、<i>in vivo</i> (吸血中のマダニ組織における遺伝子・タンパク質の発現解析) の比較によって行われた。その結果、GST と GST2 は遺伝子・タンパク質の発現量において、吸血中の酸化ストレスと正の相関があることが示されたため、GST と GST2 は酸化ストレスへの対処に重要な役割を果たすことが示唆された。</p> <p>第 2 章では、申請者はフタトゲチマダニの殺ダニ剤に対する GST と GST2 の役割に焦点をお</p>	

き、以下のような結果を得た。フルメトリンは組換え GST の酵素活性を阻害し、フルメトリン致死量で GST 遺伝子の発現を誘導した。また、GST のノックダウンにより、フルメトリンに対する幼ダニおよび雄成ダニの感受性が増加した。一方、クロルピリホスは組換え GST2 の酵素活性を阻害し、クロルピリホス亜致死量で GST2 遺伝子の発現を誘導した。また、GST2 のノックダウンにより、クロルピリホスに対する幼ダニの感受性が増加した。このように、殺ダニ剤によって誘発された GST と GST2 の発現量はマダニの発育ステージや性の違いによって、殺ダニ剤に対する感受性が異なることが明らかとなった。以上の結果から、GST と GST2 は殺ダニ剤の代謝に対し重要な役割を果たすことが示された。

第 3 章では、申請者はフタトゲチマダニの胚発生における GST、GST2、分泌型フェリチン (Fer2) の役割に焦点を当てた。胚発生において、GST、GST2、Fer2 は、吸血中のマダニと同様に酸化ストレスへの対処に重要な役割を果たし、これらの分子がマダニの胚発生において不可欠であることが示された。

第 4 章では、申請者は鉄の調節において重要な役割を果たす細胞内型 Fer (Fer1) に焦点をおき、シカダニ胚由来細胞株 (ISE6) を用いて実験を行った。すなわち、鉄の調節は、Fer1 mRNA の鉄応答エレメントと鉄調節タンパク質 (IRP) との相互作用によって制御されており、IRP の制御を解放するために硫酸鉄を使用した。その結果、ISE6 を 2 mM 硫酸鉄で 48 時間曝露したところ、ISE6 は Fer1 タンパク質の発現を誘導した。これらの結果は、マダニの鉄代謝と Fer1 の誘導に関するこれまでの知見を前進させた。

第 5 章では、第 4 章で得られた知見に基づいて、ISE6 を用いて鉄によって誘導されるプロモーターの探索を行い、新規に鉄誘導性プロモーター領域を同定した。マダニ媒介性病原体は吸血中にマダニに獲得されるため、トランスジェニックマダニの開発には吸血誘導性マダニプロモーターは不可欠である。このような鉄誘導性プロモーターは、マダニ制御戦略におけるトランスジェニックマダニを開発するための貴重なツールとなることが予想される。

本研究では、酸化ストレス関連分子、特に GST は、吸血、殺ダニ剤の代謝、胚発生の過程において、マダニの生存に重要であり、マダニや殺ダニ剤抵抗性マダニを駆除するための有望な標的分子であることを実証した。また、他の酸化ストレス関連分子の中でも、吸血における鉄代謝に重要な役割をもつ Fer は、鉄濃度の増加によってタンパク質発現を誘導するユニークな特性を備えている。このように、マダニやマダニ媒介性病原体の制御戦略を模索するうえで、GST と Fer の特性を利用することは、抗マダニワクチンやトランスジェニックマダニの開発に有用である。

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。