

学位論文題名

A STUDY TOWARDS DEVELOPMENT
OF A TICK VACCINE

(ダニワクチン開発に関する研究)

学位論文内容の要旨

動物寄生性の各種病原体のベクターとなるマダニを免疫学的な方法で防除しようとする試み、すなわち抗ダニワクチン開発は、薬剤使用に代わるベクターコントロール法として有望であるとされている。本研究はダニの侵襲に対するワクチン開発を目的としてフタトゲチマダニ (*Haemaphysalis longicornis*) -ウサギモデルを使用し、候補となる分子の探索と精製、遺伝子解析を行った。

ダニの吸血時に宿主体内に分泌される分子に関する報告は今までほとんどなされていなかった。そこで、本研究においてはフタトゲチマダニの分泌性分子を2種類同定し、その性状を明らかにした。まず、分子量 84 kDa の分子

(p84) を精製しアミノ酸配列の一部を解析した結果、本分子はトリプシン様分子であり、ダニ吸血で感作したウサギに即時型過敏反応を誘導する活性を持つことが明らかとなった。一方、ダニ感作ウサギの血清抗体に強く認識される分子量 29kDa の分子(p29)はセメント物質の形成に関与する細胞外マトリックス様分子であることが遺伝子クローニングの結果明らかにされた。セメント物質はダニ唾液腺から分泌される複数の蛋白質から成り、ダニの吸血部位への固着に重要な役割を果たすことが知られている。大腸菌で発現させた組換え p29 を用いてウサギを免疫しダニを吸血させたところ、飽血時の成ダニ重量の減少や幼ダニおよび若ダニの死亡（死亡率はそれぞれ 40%および 56%）が観察され、ダニに対するワクチン効果があることが明らかとなった。

ワクチン開発の観点から考えると、ダニに存在する分子は、ダニ吸血時に宿主体内に分泌される暴露型と分泌されない非暴露型に分類される。非暴露型抗原による免疫は一般に暴露型抗原よりもワクチン効果が強く発揮されると考えられている。すなわち、ダニと宿主間で進化してきた宿主寄生体関係から、生体反応と暴露型抗原との間では免疫学的バランスが成立しており、暴露型抗原による防御免疫誘導能は十分でないと考えられてきた。しかし、今回組換え p29 を用いた免疫実験から、暴露型抗原である p29 によって強い抗ダニ免疫が誘導されることが明らかにできた。本研究で得られた成績および他の研究にて示されている成績から、1種類の抗原を用いたワクチンによるダニ排除は完全ではないと考えられる。これに加え、未成熟および成熟ダニは宿主免疫反応に対してそれぞれ異なる感受性を示すことから、数種の抗原をカクテルとして用いたワクチンがより有効であると考えられたため、さらに標的分子の探索を進めた。

ダニワクチンの標的抗原として蛋白質分解酵素の有用性が多くの研究者によって指摘されてきたにも関わらず、その解析はあまり行われてこなかった。本研究において、分子生物学的手法を用いて *H. longicornis* のセリンプロテアーゼおよびシステインプロテアーゼ遺伝子をクローニングしその構造解析を行った。すなわち、各蛋白質分解酵素の活性中心部に保存されているアミノ酸配列を基にプライマーを設計し、polymerase chain reaction (PCR) により遺伝子の一部を増幅、クローニングした。さらに得られた PCR 産物の塩基配列を決定後、各遺伝子に特異的なプライマーを設計し 5' および 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法を用いて全長 cDNA をクローニングし、遺伝子全長の塩基配列を決定した。クローニングした 2 種のセリンプロテアーゼ遺伝子 (HLSG-1 および-2) は、それぞれ分子量 37.7 および 31.2kDa のポリペプチド鎖をコードしていた。また、2 種のシステインプロテアーゼ遺伝子 (HLCG-1 および-2) はそれぞれ 33.7 および 37.0kDa のポリペプチド鎖をコードしていた。HLSG-1 および-2 を大腸菌で発現させ、家兎免疫血清を作製し、免疫プロット法によりダニ乳剤と反応させたところ、予想される分子量の位置にバンドが検出された。このことから、クローニングした遺伝子産物がダニで発現されていることが確認された。また、前者は唾液腺、後者は中腸で発現されていることが示唆された。しかし、HLSG-1 あるいは-2 免疫によるワクチン効果は認められなかった。

本研究はダニに対するワクチン開発に重要かつ基礎的な情報を提供するものである。ウサギにおける組換え p29 を用いたワクチン試験により、唾液腺抗原による免疫がダニ排除に有効であることが示された。今後そのワクチン効果を増強するため、免疫方法や他の抗原分子の添加など検討する必要がある。また、蛋白質分解酵素クローニングに関する研究は、ダニワクチンとして効果が期待できる抗原を分子生物学的アプローチにより得ることが可能であることを示している。今後、得られた蛋白質分解酵素がダニ体内のどの部位で発現しており、いかなる生物学的活性を担っているのか明らかにする必要がある。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 沼 操
副 査 教 授 神 谷 正 男
副 査 教 授 高 島 郁 夫
副 査 助 教 授 杉 本 千 尋

学 位 論 文 題 名

A STUDY TOWARDS DEVELOPMENT OF A TICK VACCINE

(ダニワクチン開発に関する研究)

動物寄生性の各種病原体のベクターとなるマダニを免疫学的な方法で防除しようとする試み、すなわち抗ダニワクチン開発は、薬剤に代わるベクターコントロール法として有望視されている。本研究はフタトゲチマダニ (*Haemaphysalis longicornis*)—ウサギの系を使用し、候補となる蛋白質の探索と精製、遺伝子解析を行った。

まずフタトゲチマダニの分泌性蛋白質を2種類同定し、その性状を明らかにした。一つは分子量 84kDa の分子 (p84) であり、精製シアミノ配列の一部を解析した結果、p84 はトリプシン様蛋白質であり、ダニ吸血で感作したウサギに即時型過敏反応を誘導した。もう一つは、ダニ感作ウサギの血清抗体に強く認識される分子量 29kDa の分子 (p29) である。p29 は遺伝子クローニングの結果から、セメント物質の形成に関与する細胞外マトリックス様蛋白質であることが明らかになった。セメント物質はダニ唾液腺から分泌される複数の蛋白質から成り、ダニの吸血部位への固着に重要な役割を果たすことが知られている。大腸菌で発現させた組換え p29 を用いてウサギを免疫しダニを吸血させたところ、飽血時の成ダニ重量の減少や幼ダニ及び若ダニの死亡 (死亡率はそれぞれ 40% および 56%) が観察され、ダニに対するワクチン効果があることが明らかとなった。

ダニワクチンの標的抗原としてこれまで蛋白質分解酵素の有用性が示唆されている。そこで次にダニのセリンプロテアーゼおよびシステインプロテアーゼ遺伝子をクローニングし、その構造解析を行った。クローニングした2種類のセリンプロテアーゼ遺伝子 (HLSG -1 および -2) は、それぞれ分子量 37.7 および 31.2kDa のポリペプチド鎖をコードしていた。また、2種のシステインプロテアーゼ遺伝子 (HLSG -1 および -2) はそれぞれ 33.7 および 37.0kDa のポリペプチド鎖をコードしていた。HLSG -1 および -2 を大腸菌で発現させ、ウサギ免疫血清を作製し、免疫プロット法によりダニ乳剤と反応させたところ、予想される分子量の位置にバンドが検出された。このことから、クローニングした遺伝子がダニで発現されていることが確認された。しかし、HLSG-1 あるいは-2 免疫によるワクチン効果は認められなかった。

本研究はダニに対するワクチン開発に重要かつ基礎的な情報を提供するものである。よって審査員一同は、Mulenga Albert 氏が博士（獣医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。