

学 位 論 文 題 名

ダニ唾液腺由来有用分子の探索

学位論文内容の要旨

ダニは吸血時に唾液腺において様々な生理活性物質を産生し、宿主へ注入することによって最適な吸血環境を作り出している。これらの物質は宿主の生理反応に影響を与えるだけでなく、ダニが媒介する病原体の伝播を助けている可能性があると言われている。そこでダニの唾液腺において産生されているタンパク質に関して、発現している遺伝子を調べることによって解析を試みた。

吸血中のフタトゲチマダニ (*Haemaphysalis longicornis*) の唾液腺より cDNA ライブラリーを作製し、ランダムに選んだクローンの配列を blastx による相同性検索等により解析したところ、約 4 割は既知のタンパク質配列と相同性を示したが、残りの 6 割では類似の配列がなく、新規のタンパク質をコードしていると考えられた。相同性検索で機能の予測ができた配列のほとんどは、ハウスキーピングタンパク質であり、また、機能不明なタンパク質配列の多くが分泌シグナルを持ち、宿主に注入されて何らかの生理活性を示す物質であることが示唆された。更に、ほとんどの遺伝子由来配列に重複はなく、発現している遺伝子の多様性がうかがえた。機能が予測されたタンパク質の中には、血液凝固阻害因子類似のタンパク質を含めたプロテアーゼインヒビターやメタロプロテアーゼ、他のダニで分離されている免疫抑制物質に類似したタンパク質等があった。

機能不明な配列が多かったため、類似性の検索項目や手法を増やして再度検索を行い、新たに機能予測された配列を得た。これらの中から、トロンビン阻害作用を持っていると推測されたタンパク質を発現し、その機能を調べたところ、新規のトロンビンインヒビターであることが確認された。このタンパク質 (chimadanin と命名) は 93 アミノ酸残基よりなり、分泌シグナルを持つ。組み換えタンパク質は、血液凝固系の検査である活性化部分トロンボプラスチン時間及びプロトロンビン時間の両試験において、濃度依存的に明らかな凝固時間延長作用を示した。また、トロンビンによる蛍光ペプチド基質の分解も濃度依存的に抑制し、トロンビンの酵素活性中心を阻害することが示された。

ダニの唾液腺 cDNA ライブラリー中には、この他にも機能未解明の新規の生理活性タンパク質配列が多数存在すると考えられる。これらのタンパク質は、ダニの吸血において何らかの役割を果たしていると考えられるため、更なる解明によりダニと宿主との係わり合いについての新たな

な知見を得ることができるであろう。さらには、これらの機能分子をターゲットとしたダニ媒介性病原体制御のためのワクチン開発や、抗凝固剤のような医薬品や試薬の開発のための材料となることが期待できる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	小沼	操
副査	教授	片倉	賢
副査	助教授	大橋	和彦
副査	講師	野中	成晃

学位論文題名

ダニ唾液腺由来有用分子の探索

ダニは吸血時に唾液腺において様々な生理活性物質を産生し、宿主へ注入することによって最適な吸血環境を作り出している。これらの物質は宿主の生理反応に影響を与えるだけでなく、ダニが媒介する病原体の伝播を助けている可能性がある。そこでダニの唾液腺において産生されているタンパク質に関して、発現している遺伝子の解析を試みた。

吸血中のフタトゲチマダニ (*Haemaphysalis longicornis*) の唾液腺より cDNA ライブラリーを作製し、ランダムに選んだクローンの配列を blastx による相同性検索等により解析したところ、約 4 割は既知のタンパク質配列と相同性を示したが、残りの 6 割では類似の配列がなく、新規のタンパク質をコードしていると考えられた。相同性検索で機能の予測ができた配列のほとんどは、ハウスキーピングタンパク質であり、また、機能不明なタンパク質配列の多くが分泌シグナルを持ち、宿主に注入されて何らかの生理活性を示す物質であることが示唆された。更に、ほとんどの遺伝子由来配列に重複はなく、発現している遺伝子の多様性がうかがえた。機能が予測されたタンパク質の中には、血液凝固阻害因子類似のタンパク質を含めたプロテアーゼインヒビターやメタロプロテアーゼ、他のダニで分離されている免疫抑制物質に類似したタンパク質等があった。

機能不明な配列が多かったため、類似性の検索項目を増やして再度検索を行い、新たに機能予測された配列を得た。これらの中から、トロンビン阻害作用を持つと推測されたタンパク質を発現し、その機能を調べたところ、新規のトロンビンインヒビターであることが確認された。このタンパク質 (chimadanin と命名) は 93 アミノ酸残基よりなり、分泌シグナルを持つ。組み換えタンパク質は、血液凝固系の検査で、濃度依存的に凝固時間延長作用を示した。また、トロンビンによる蛍光ペプチド基質の分解も濃度依存的に抑制し、トロンビンの酵素活性を阻害することが示された。

本研究により、フタトゲチマダニの唾液腺 cDNA ライブラリーから抗ダニ

ワクチン候補として有用な多くの分子が明らかとなった。よって、審査委員一同は、中島千絵君の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。