

# ダニ由来分子を用いた抗ダニワクチンによるダニ媒介性伝染病の防除

小沼 操 [北海道大学大学院獣医学研究科/教授]

川本 哲 [北海道立畜産試験場/代謝生理科長]

畠山 英樹 [バイエル・ジャパン(株)研究開発事業部/リーダー]

大橋 和彦 [北海道大学大学院獣医学研究科/助教授]

## 背景・目的

ダニ類は熱帯から温帯にかけ広く分布しており、日本でもヒトをはじめ多くの動物に被害を与えている。そこで、宿主にダニ抵抗性を賦与し、ダニの吸血を阻害することにより感染ダニから動物への病原体の感染を阻止しようと考えた。

ウサギにダニ(フタゲチマダニ)を吸血させるとウサギは抵抗性を獲得し、2回目以降のダニの吸血に抵抗する。すなわちダニは吸血を阻害され落下し死亡する。そこでこの抵抗性を獲得したウサギ血清が認識するダニの分子を同定し、その遺伝子のクローニングすることによりワクチンに利用しようと考えた。本研究はダニ由来の有効成分(免疫抑制分子など)を同定し、種々のステージ(幼、若、成ダニ)のダニならびに多種のダニの吸血を阻止するワクチンを目指すものである。これにより原虫をはじめウイルスなどダニ媒介性感染症の伝播を阻止しようとするものである。

## 内容・方法

申請者はこれまでにダニ抵抗性を示すウサギ血清と反応するダニ抗原の検出を行い、分子量29kDaの抗原をコードする遺伝子クローニングに成功し、大腸菌で組換えp29を大量に作出した。p29はダニ唾液のセメント物質に含まれる分子でダニの吸血の際、宿主体表に固着するのに必要な蛋白である。p29免疫ウサギに幼ダニ、若ダニを吸血させたところ約半数のダニは吸血が阻害され死亡し、明らかなワクチン効果を認めた。これ以外に皮内反応誘導タンパク、細胞間接着タンパクなど得ている。吸血刺激により新たに発現する唾液腺由来分子の遺伝子クローニングを行い、血液凝固阻害物質、血管拡張物質、セリンプロテアーゼ・インヒビター(セルピン)、免疫抑制物質など有効な分子の探索を行う。

ダニは動物に付着し吸血を始めるときわめて長い(10~14日間)吸血時間をもつ。この長い吸血の間にダニの唾液腺由来成分が動物体内に入り動物の免疫を攪乱させることが知られている。そこで、別の方法としてダニ唾液腺cDNAライブラリーをつくり、吸血前とくらべて有意に発現している遺伝子をサブトラクション法により検出し、その中より有用生理活性分子を得る。

## 結果・成果

吸血刺激に関連して発現するダニ由来分子としてセリンプロテアーゼインヒビター(セルピン)に注目し、これを標的としRACE法を用いて検出を試みたところ、C末端に分泌シグナル、N末端にポリA付加シグナルを含む全長1400bpのcDNAクローニングに成功した。シーケンズから予想されるORFのアミノ酸配列解析では、既知セルピンの保存アミノ酸モチーフと活性中心部位において高い相同性を示した。活性中心部位の予想アミノ酸配列はヘパリンコファクター

IIと類似性が高いことから、血液凝固系に関連した機能を有するセルピンであることが予想された。RT-PCRによりダニのステージ、吸血時期、組織でのmRNA発現を検討した所、若ダニと成ダニの吸血中および吸血後に発現が確認できたことから、吸血量の少ない幼ダニステージでは発現せず、吸血量の上昇に伴って発現することが考えられる。また、未吸血期のダニには発現せず、吸血刺激により発現を開始する分子であると考えられる。組織においては唾液腺・中腸での発現はみられず、ヘモリンフでの発現が確認された。ヘモリンフは、ダニの唾液成分や、接種宿主血液の有害作用を除去する分子を豊富に含む部位である。検出遺伝子を大腸菌組換え発現系を用いて発現させた所、SDS-PAGEにおいて予想分子量に大腸菌組換えタンパク質が得られた。この組換えタンパク質をカラム精製し機能解析を行った結果、トロンビン阻害活性に加えて顕著な内因性血液凝固時間の延長が認められた。以上により分離・同定したダニ由来遺伝子は、宿主から吸血した血液の凝固阻害と密接に関与するセルピンであることが考えられ、抗ダニワクチン候補抗原として有用であると考えた。

ダニ体内で発現している遺伝子を解析し、新規の医薬品として応用可能な物質を検索することを目的に吸血中のダニ(*Haemaphysalis longicornis*)より唾液腺を採取し、発現している遺伝子(mRNA)を抽出して、そのcDNAライブラリーを作成した。これらの遺伝子の中には、吸血の維持に必要な物質、すなわち宿主体内に注入され、何らかの影響を与える物質をコードする遺伝子が含まれていると考えられる。そこで、これらのライブラリー遺伝子の配列を順次解読し、既存のデータベースと照らし合わせる(相同性検索、機能予測等)により、興味深い機能を持つと思われる遺伝子を検索している。

現在までのところ、約200の発現遺伝子の解析を終えている。このうち、blastX(NCBI)による相同性検索により機能予測ができたものは全体の3割以下であり、そのほとんどは細胞の生存に必要な遺伝子(ハウスキープングジーン)であった。また、機能不明な遺伝子の約半数は分泌シグナルを持っており、宿主体内に注入され、何らかの機能を発揮している物質であることが推測された。

相同性検索により機能予測がなされた遺伝子のうち、宿主に影響を与えていると思われる物質(現在9遺伝子)の大半が、プロテアーゼインヒビターであった。これは、吸血昆虫等が宿主の血液凝固等を阻害する酵素阻害物質(プロテアーゼインヒビター)を分泌し、吸血時に注入しているという種々の報告と一致している。

## 今後の展望

血液凝固阻害に関連したセルピン遺伝子が分離されたのでこの遺伝子の組み替え分子で動物を免疫し、ダニの吸血阻害と同時に、ダニ媒介性病原体(例えば、タイレリア原虫やライム病細菌)の伝播阻害をこころみるべく、現在はこの分子を用いてウサギの免疫を開始し、ダニの吸血阻害実験を行う段階である。

またダニ唾液腺由来の有用生理活性物質の検索については、機能予測がなされた遺伝子の中から、抗ダニワクチンあるいは新規医薬品候補として興味深い遺伝子を大腸菌等に組み込んで蛋白発現し、得られた蛋白質の機能を解明する。また、相同性検索等では機能が判明しなかった遺伝子については、まったく新規の物質であると考えられるので、他の機能予測プログラムの使用やin vitro発現系等の新たな手法により、その機能の予測を試みる。