

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2023年6月5日

採択番号	2022-共同-14		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	白藤 梨可
研究課題名	フタトゲチマダニから同定されたアクアポリンの特性解明		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	たなか てつや 田仲 哲也	鹿児島大学共同獣医学部・教授	
研究分担者	みやた たけし 宮田 健	鹿児島大学農学部・准教授	
	しらふじ りか 白藤 梨可	帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授	
研究期間	2022年4月1日 ~ 2023年3月31日		
目的・趣旨	<p>マダニの吸血行動は、幼・若・成ダニ期に約1週間ずつ、生涯で計3回行なわれる一大イベントである。マダニの吸血行動において、細胞膜に発現するアクアポリン(AQP)は細胞膜を介して水分子を輸送し、血液を濃縮していることが考えられる。そこで、本研究は化学的殺ダニ剤にかわる抗マダニワクチンに着目し、そのワクチン候補分子として、AQPの特性を調べることを目的とした。すなわち、本研究の成果は、マダニの生存基盤である吸血消化を根本的にたたき、環境にやさしいAQPを標的とする抗マダニワクチンの開発につながる可能性が高い。</p>		
研究経過の概要	<p>1. 研究目的</p> <p>マダニは脊椎動物の血液を栄養源とし、その生活史は「未吸血」と「飽血」で成り立っている。マダニの吸血行動は、幼・若・成ダニ期に約1週間ずつ、生涯で計3回行なわれる一大イベントである。</p> <p>吸血節足動物の吸血行動においてAQPは重要な分子である。細胞膜に発現するAQPは水分子を水チャネルによって細胞膜を介して輸送する。そのため、マダニは大量の血液を吸血する時に、体内でAQPを通じて水分を排出し、血液を濃縮していることが考えられる。</p> <p>化学的殺ダニ剤のほぼ全ては、農薬の転用・流用にすぎない実態が世界的に半世紀以上も継続しているため、薬剤耐性マダニや残留問題などの弊害を招いている。そこで、化学的殺ダニ剤にかわる抗マダニワクチンに着目し、そのワクチン候補分子として、水分調節機構を担うAQPに焦点を絞り、本研究ではAQPの特性を調べることを目的とした。</p>		

	<p>2. 材料と方法</p> <p>①酵母による組換え AQP の発現 フタトゲチマダニの唾液腺の cDNA ライブラリーから <i>AQP</i> 遺伝子をクローニングし、遺伝子解析を行った。その後 RT-PCR 法によって増幅した <i>AQP</i> の cDNA を酵母発現用ベクターに組み込んだ後、エレクトロポレーターを用いて酵母(<i>Pichia pastoris</i>)に導入した。</p> <p>②フタトゲチマダニにおける AQP の特性解明 フタトゲチマダニにおける <i>AQP</i> の特性を解明するために、<i>AQP</i> 遺伝子の発現を臓器別、吸血日数別にそれぞれ RT-qPCR によって発現動態を調べた。また、RNA 干渉法による <i>AQP</i> 遺伝子発現の抑制を行い、マダニの吸血時間、体重変化、生存率、産卵、孵化などの変化を観察し、マダニの吸血・繁殖生理における <i>AQP</i> の役割について検討した。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>3. 結果</p> <p>①フタトゲチマダニにおける AQP 遺伝子の同定および AQP の特徴 フタトゲチマダニの唾液腺の cDNA ライブラリーから完全長 <i>AQP</i> cDNA を得、塩基配列解析を行ったところ、3341 bp で、ORF は 876 bp であり、その推定産物は 291 アミノ酸であった(推定分子量 30.9 kDa)。これらのアミノ酸から 6 回膜貫通型のタンパク質であり、1箇所の N-型糖鎖結合部位が存在することが推定された。我々はこの配列情報を基に酵母を用いて組換え体の作製を行ったが、<i>AQP</i> が膜タンパク質であるため、発現および精製することができなかった。</p> <p>②フタトゲチマダニにおける AQP 遺伝子の発現ならびに AQP 遺伝子抑制の及ぼす影響 フタトゲチマダニの臓器における <i>AQP</i> 遺伝子の発現動態を調べたところ、吸血に従って、唾液腺、中腸、マルピーギ管で発現レベルが増大した。しかし、中腸では未吸血状態でも発現レベルが高かった。</p> <p>RNA 干渉法による <i>AQP</i> 遺伝子発現の抑制を行ったところ、飽血時まで <i>AQP</i> 遺伝子抑制群はコントロール群に比べて表現型の差に大きな違いはなかった。しかし、<i>AQP</i> 遺伝子抑制群を解剖したところ、コントロール群に比べて、飽血後の中腸内容物は白く、中腸とマルピーギ管の形態が変化していた。また、<i>AQP</i> 遺伝子抑制群はコントロール群に比べて産卵数も低下した。</p> <p>4. 考察 <i>AQP</i> は推定されたアミノ酸配列から細胞膜に発現している可能性が示唆された。また、RNA 干渉法の結果から、<i>AQP</i> は中腸やマルピーギ管において水分調節や排せつに重要な分子であり、吸血中の血液濃縮に関与していることが考えられた。</p> <p>今後は抗 <i>AQP</i> 抗体を用いて、唾液腺、中腸、マルピーギ管における <i>AQP</i> の局在を調べる必要がある。さらに、<i>AQP</i> 遺伝子抑制群の唾液腺、中腸、マルピーギ管、卵巣の変化について組織レベルで観察することによって、マダニの吸血における <i>AQP</i> の役割がより明確になることが予想される。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>特になし</p>