帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2024 年 5 月 20 日

採択番号	2023-共同-9		
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	組換えアクアポリンを用いた抗マダニワクチンの構築		
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	2023 年 4 月 1 日　～　2024 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	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 AQP ペプチドをモルモットに免疫することによって、マダニ AQP を標的とした抗マダニワクチンとしての可能性を検討す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。		
研究経過の概　要	**1. 研究目的** 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。吸血節足動物の吸血行動においてアクアポリン(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。一方で、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、AQP ペプチドを用いた抗マダニワクチンとしての可能性について検討することを目的とした。 **2. 材料と方法** **①フタトゲチマダニにおける AQP の特性解明** フタトゲチマダニおける AQP の特性を解明するために、*AQP* 遺伝子の同定および		

	AQP の分子特性を解析した。また、AQP の分子特性および *AQP* 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。さらに、RNA 干渉法による *AQP* 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 AQP の役割について検討した。 **②AQP ペプチドによる免疫実験** 我々は AQP のアミノ酸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、AQP 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。そのため、MODELAGON による抗体に対する AQP のエピトープ予測を行った。次に、AlphaFold2 によるエピトープとなりうる AQP ペプチドの予測構造の解析を行った。これらの解析結果に基づいて、ワクチン抗原として相応しい 2 種類の AQP ペプチドを合成した。合成された AQP ペプチドはモルモットに 3 回免疫を行い、抗血清を回収した。得られた抗血清については、AQP ペプチドおよびフタトゲチマダニの抽出抗原に対する抗体価を測定した。
研究成果の 概　要	**3. 結果** **①フタトゲチマダニにおける *AQP* 遺伝子の同定および AQP の分子特性** 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 AQP cDNA を得、塩基配列解析を行ったところ、3,341 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。 **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 *AQP* 遺伝子の発現動態を調べたところ、*AQP* 遺伝子発現レベルは、中腸では未吸血期と緩慢吸血期で高く、急速吸血期から徐々に低下した。唾液腺では吸血開始から徐々に上昇し、急速吸血期をピークに徐々に低下した。マルピーギ管では急速吸血期まで発現は低く、飽血時に急激に上昇した。 RNA 干渉法による *AQP* 遺伝子発現の抑制を行ったところ、飽血時体重、産卵準備期間、卵重量/飽血時体重、卵期には有意な差は認められなかった。しかし、*AQP* 遺伝子抑制群のマダニを解剖したところ、コントロール群に比べて、体の黄色化、中腸の直径減少、マルピーギ管の直径の減少、外皮の軟化、中腸と直腸嚢の脆弱化、成熟卵母細胞数の減少、異常な形態の卵母細胞の出現、ジェネ氏器官の形態異常が観察された。 **③AQP ペプチドに対する抗体価の変化** 2 種類の AQP ペプチドに対する抗体価の変化を調べるために、ELISA を行ったところ、AQP(AQP#122-132)および(AQP#202-214)に対する各々の抗体価は、免疫後上昇した。しかし、各々の AQP から得られた抗体はマダニ抽出抗原に対する反応性は弱かった。 **4. 考察** AQP 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、AQP 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。一方、免疫した AQP ペプチドに対する抗体価の上昇は確認できたが、マダニ抽出物に対する抗体の反応性は弱かった。この原因として、全タンパク量中の AQP の含量および AQP ペプチドの構造が、実際の AQP 構造を模倣していないことによる影響も推測された。今後は抗 AQP 抗体を用いて、唾液腺、中腸、マルピーギ管、卵巣における AQP の局在を調べることで、AQP の詳細な特性解明が期待される。

研究成果の 発　表	**学会発表** 佐藤萌子，佐藤成子，水野寛太，田仲哲也，玄 学南，鈴木宏志，白藤(梅宮)梨可，フタトゲチマダニにおけるアクアポリンの機能解析，第 32 回日本ダニ学会大会，北海道立道民活動センターかでる 2･7, 2023 年 9 月(北海道)