

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 アニスザマン

吸血性節足動物のマダニは、獣医畜産領域において最も加害性の大きい外部寄生虫である。そのため、吸血の被害から動物を守るマダニ防除対策の成否は畜産物の生産性を大きく左右する。本論文では、マダニ吸血の分子機構に着目し、抗マダニ薬やマダニワクチンなどの新規マダニ防除対策を開発する上での標的分子と成り得るロンギスタチンの機能探索を実施し、マダニ吸血行動における役割を明らかにすることを目的として研究を行っている。

第1章では、国内最優占種マダニのフタトゲチマダニ成ダニ唾液腺 cDNA ライブラリーよりロンギスタチン遺伝子を分離し、塩基配列等の遺伝子解析の結果から、遺伝子1次、2次構造を明らかにしている。また、蛋白質として高次構造解析及び類似性検索から、ロンギスタチンは既存蛋白質データベースにはない新規の蛋白質であることを見出している。さらに、異種細胞でのロンギスタチン発現系を構築し、組換えロンギスタチンの精製標品の作製に成功している。加えて、申請者が独自に構築したマダニ個体内での局在解析、発現変動を調べ、ロンギスタチンの産生挙動を明らかにし、カルシウムまたはエチレンジアミン四酢酸の存在下でロンギスタチンの蛋白質電気泳動での移動度に、2つの EF-hand Ca^{2+} binding ドメインが関与することを実証し、ロンギスタチンが分泌性のカルシウム結合蛋白質であることを明らかにしている。

第2章では、大腸菌発現の組換えロンギスタチンを用いて生化学的に酵素性状を解析している。各種加水分解解析系を構築して、定型セリンプロテアーゼ触媒部位が未保存であるロンギスタチンから、セリンプロテアーゼ特異的合成蛍光基質に対して顕著な加水分解活性を見出している。同時に、その活性は、セリンプロテアーゼ特異基質の P1 部位に存在することを示し、至適温度および pH、阻害剤試験などを重ねて、ロンギスタチンは非定型セリンプロテアーゼであると提唱するに至っている。

第3章では、繊維素溶解系におけるロンギスタチンの生理活性を検討し、プラスミンと同様に、フィブリノゲンの α 、 β および γ 鎖の加水分解能を突き止め、同時にフィブリンとの結合能を確認している。また、ロンギスタチンには組織プラスミノゲンアクチベーター (t-PA) と同様に、フィブリン塊結合性のプラスミノゲンをプラスミンへと活性化させることにより、フィブリン塊や多血小板血栓を溶解することが見出されたことから、ロンギスタチンは t-PA と抗凝固因子の両方の機能を保有し、吸血部位の宿主皮下に構築される blood pool (血液プール) の形成・維持に重要な役割を果たしていると結論づけている。

第4章ではさらに、ロンギスタチンの機能解析を実施している。プラスミノゲンアクティベーター

ターインヒビター1 (PAI-1) は t-PA と複合体を形成し、t-PA の除去によりプラスミンの産生が減少され繊維素溶解系が抑制されるが、ロンギスタチンは PAI-1 に対する親和性が低く、PAI-1 の存在下でもプラスミノゲンを活性化し、線維素溶解を惹起することを結合試験の結果から示している。実際に、20nM 濃度 PAI-1 の存在下においても、ロンギスタチンはフィブリン塊を完全に分解させ、t-PA など他の PA とは異なり、PAI-1 の複合体が未形成であったことから、ロンギスタチンは PAI-1 耐性の PA であると述べている。

第5章では、逆遺伝学的手法である RNA 干渉法を用いて、ロンギスタチンノックダウンマダニを作製し、これをウサギの耳に付着させて *in vivo* 機能解析を行っている。ノックダウンマダニでは表現型として、著しい吸血阻害作用が惹起され、吸血開始6日後における対照群との平均体重の比較では、大きな有意差が認められ、結果的に吸血不全に陥ることが示されている。また、吸血部位の組織標本では、対照群で血液プール内に赤血球が充満しているのに対して、ノックダウンマダニでは出血性の変化を伴わない炎症性細胞の集積と血液プールの形成不全が惹起されることを見出している。

以上の結果より、唾液腺で作られるロンギスタチンは吸血時、唾液と共に分泌されて宿主組織皮下内に注入され、血液プール内において本研究で新たに発見された抗血液凝固経路を惹起させながら持続的かつ大量に宿主の血液を搾取可能になっていることを見出し、マダニ吸血行動において、ロンギスタチンは不可欠な分子であることを導き出した。以上の成果はマダニの生理・生態に立脚した安全で環境に優しい新たな抗マダニ薬の開発に結実するもので、化学的殺ダニ剤に全面依存した現行法に代わる新規防除技術の開発に大きく貢献するものである。よって、審査委員全員一致で本論文が博士（農学）の学位論文として十分価値があると認めた。