

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15043

研究課題名(和文)新規抗ワクモワクチン開発のためのワクモ中腸特異的抗原の網羅的解析

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of molecules expressed on the midgut of poultry red mites for the development of new anti-mite vaccines

研究代表者

大橋 和彦(OHASHI, Kazuhiko)

北海道大学・獣医学研究科・教授

研究者番号：90250498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：養鶏業に多大な被害をもたらしているワクモに対する新規ワクチンの開発を目指して、その候補抗原としてワクモ中腸に発現する分子の探索を行い、3種の分子を同定し、これら分子がワクモの中腸や卵巣で発現していることを確認した。また既に我々が同定した候補抗原であるカテプシンD様タンパク質について解析した結果、この分子が発育ステージ等に関わらず恒常的に発現し、吸血鶏由来の血清に反応しないことから非暴露型抗原であることが示された。今回同定した分子のより詳細な性状解析を行い、ワクチン抗原として有用性を評価していく必要がある。

研究成果の概要(英文)：For the development of new vaccines against poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*, a search was made for novel vaccine candidates expressed on the cell membrane of the midgut of the mite. Three kinds of molecules, whose expressions are predicted on the cell membrane, were identified, and their expressions on the midgut were confirmed by laser capture microdissection and RT-PCR. In addition, cathepsin D-like molecule, catD2, which was already identified in the course of the comprehensive analysis of genes expressed in the red mites done in our laboratory, was shown to be expressed in protonymph, deutonymph and adult and expressed regardless engorgement or starvation. The recombinant catD2 protein was not recognized by the sera from chickens fed by the red mites, suggesting that catD2 is a concealed antigen. Further analyses, including the detailed functions, the expression sites in red mites and the evaluation as vaccine antigens, are required to develop effective vaccines.

研究分野：獣医学

キーワード：ワクモ

### 1. 研究開始当初の背景

ワクモ (*Dermanyssus gallinae*) は、鶏など鳥類に寄生する体長 1mm の外部寄生虫で全世界の温帯から寒帯にかけて分布しており、近年、世界各地の近代鶏舎において通年の大量発生により、吸血による養鶏の貧血 (特に若齢ヒナでは重度寄生で死亡例あり) や消瘦、また採卵鶏における産卵率低下やワクモ死骸による汚卵の発生など大きな被害を出している。さらにワクモの寄生は、種々のワクチンの効果低減や、鶏痘ウイルスやサルモネラ菌を含む一部細菌などの病原体の媒介にも関与していることや、ヒトでも、その吸血による皮膚炎やアレルギーを引き起こすことが報告されている。このようにワクモは、養鶏場における衛生管理では、最も重要な防除対象となっており、ワクモ防除対策は産業動物生産のみならず公衆衛生領域においても重要な問題となっている。ワクモ (成ダニや若ダニ) は、一般に夜間に鶏体上を移動して吸血するが、吸血は短時間であり (約 1 時間以内)、鶏舎内の棲み家では吸血しなくても、(産卵はできないが) 長期間生存できることが報告されており、鶏舎からの防除は困難を極める。

現在、鶏舎におけるワクモの防除には、カーバメイト系など市販の駆虫剤が使用され有効であると考えられてきたが、最近では薬剤耐性 (多剤耐性) ワクモの出現が世界各地で数多く報告され、駆虫剤の効果減少や駆虫剤残存による動物衛生環境の悪化などが問題となっており、駆虫剤以外の新規防除法の開発が急務となっている。そのひとつの方法として抗ワクモワクチンにより、ワクモの吸血を阻害する方法がある (暴露型抗原に対するワクチン)。しかしながらワクモは、吸血時間が数分~60 分以内と非常に短く、吸血時間が長いマダニに対する抗ダニワクチンのような吸血を阻止する抗ワクモワクチンは効果が不十分であることが予想される。さらにワクチン候補抗原などワクモ由来の分子やその発現プロファイルに関する情報はほとんど報告されていない。以上より、ワクモの新規防除法開発の第 1 段階として、ワクモの組織・臓器別の発現遺伝子群の網羅的解析による情報基盤の確立や中腸などに発現して、血液の分解や栄養吸収に機能するワクモの生命維持に重要な非暴露型抗原の探索する必要がある。そして得られた情報を活かして、吸血は阻止できないが、吸血したワクモに致死的に作用し、鶏舎内のワクモ個体数を持続的に減少できる新規抗ワクチンの開発が必要であると考えられる。

これまで申請者らは、抗ワクモワクチンの開発を目的として、ワクモ由来分子の網羅的解析を実施し、種々の分子の性状解析を行ってきた。これまで cathepsin L 様および D 様分子の同定を行ってきた。しかし非暴露型抗原を特異的な探索は未だ不十分であり、今後より多くの分子を同定して、抗ワクモワ

クチンへの応用を検討する必要があると思われる。

### 2. 研究の目的

本研究では、ワクモの新規防除法開発のための基礎的情報基盤を確立し、非暴露型ワクチンの候補抗原を探索するために、国内養鶏場で採取したワクモ材料より、レーザーマイクロダイセクション法を用いて中腸など種々の組織ごとの試料を調製し、それぞれにおいて発現配列タグ (EST) 解析を行い、中腸などで特異的に発現する遺伝子群を同定する。そして中腸特異的に発現する分子に関しては、その組換え体を調製して、*in vitro* feeding システムによるワクモ吸血攻撃試験により、新規非暴露型抗ワクモワクチンの候補抗原の探索を行うこととした。さらに既に申請者らがワクモ由来分子として同定した cathepsin D 様分子である catD1 および catD2 について、そのワクモにおける発現など、より詳細な性状解析を行い、ワクチン候補抗原としての検討を行った。

### 3. 研究の方法

国内の異なる複数の養鶏場においてトラップ等を用いて採取したワクモ個体材料より、全細胞 RNA やゲノム DNA を抽出して解析材料とした。なお、ワクモ個体毎の吸血の有無について虫体の色を基準として判別した。抗ワクモワクチン新規ワクチン抗原候補として非暴露型抗原と考えられワクモ中腸細胞膜に発現が予想される遺伝子群の検索を行った。既に NCBI のデータベースに登録されており、ワクモと近縁と考えられているオクシデンタリスカブリダニ (*Galendromus occidentalis*) の遺伝子情報およびその予想される機能に基づいて対象遺伝子を選択した。そしてその遺伝子配列をもとに (特に高度保存領域から) プライマーを設計し、ワクモ全細胞 RNA より RT-PCR 法にて目的遺伝子の部分断片の増幅を行った。増幅された遺伝子の塩基配列を決定し、カブリダニ由来遺伝子との相同性を比較した。相同性が高いものについては、5' -および 3' -RACE 法にて全長遺伝子のクローニングを実施した。得られた遺伝子群の全長遺伝子配列を決定し、さらにワクモ発育ステージ別、吸血の有無およびレーザーマイクロダイセクション法を用いて採取した中腸などワクモ臓器別における発現解析を行った。

申請者らは既にワクモ中腸などに発現する分子として、cathepsin L 様および D 様分子等の同定を行っている。そこでこれらの分子の中で cathepsin D 様分子やダニ種間で高度に保存されているフェリチン 2 等について、同様にその全長遺伝子の配列を決定し、ワクモ発育ステージ別、吸血の有無およびワクモ臓器別における発現解析を行った。さらにこれらの分子の組換え抗原を大腸菌発現系などで調製して、それらの機能解析を行った。

そして鶏に調製した組換え抗原を免疫して高度免疫血清を調製して、in vitro feeding assay にてワクチン候補抗原としての評価を行った。またワクモにより頻回吸血を受けた鶏の血清を採取して(ワクモ由来分子に対する抗体が存在していると予想される) 同定した分子が非暴露型抗原であるかどうかについて検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 新規抗ワクモワクチン抗原候補の探索

新規抗ワクモワクチン抗原候補として、これまでに同定されたワクチン抗原候補に比べ、より直接的にワクモ組織に損傷を与えるため、ワクモの中腸における発現が予想される遺伝子の検索を行った。本研究ではワクモに形態が近いオクシデンタリスカブリダニの遺伝子情報をもとに、3種類の遺伝子同定した(なお、今後ワクチン候補抗原として特許申請を予定しているため、分子名は不掲載とした)。

本研究で同定した遺伝子断片について既知の遺伝子との相同性検索および系統樹解析を行った結果、これらの分子は、オクシデンタリスカブリダニ由来分子と最も近縁であり、その他の節足動物類由来分子とも近縁であったが、ニワトリ由来分子とは疎遠であった。いずれの分子もその遺伝子構造から、複数回の膜貫通型構造を有しており、細胞膜上での発現が予想され、有用な非暴露型ワクチン抗原候補と考えられた。

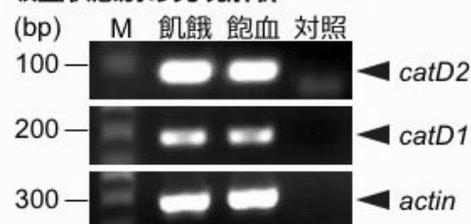
中腸はワクモが吸血した際に、血液に暴露される部位であるため、中腸の細胞膜上に発現している分子をワクチン抗原とし、その機能を阻害することで高いワクチン効果が期待できる。そこで、今回同定した分子について、ワクモの中腸、唾液腺、卵巣組織における発現解析を行った。その結果、これらの分子はワクモの中腸や卵巣においては発現していることが確認された。一方で、唾液腺では、いずれの分子も発現していなかった。以上のことより、これらの分子は中腸における発現が確認され、有用なワクチン抗原候補であることが示唆された。今後、さらに詳細な発現解析を行い、これらの分子の組換え体を調製して、in vitro feeding assay 等でワクモ吸血に対する防御効果を検討する予定である。

##### (2) ワクモ cathepsin D 様分子の同定および抗ワクモワクチン抗原候補としての検討

我々の研究室において、以前より expression sequence tag (EST) 解析などの網羅的な発現遺伝子解析により、抗ワクモワクチン抗原候補因子の検索を行い、抗酸化酵素や薬剤代謝関連酵素など複数のワクチン抗原候補因子を同定してきた。これまでに同定された抗ワクモワクチン抗原候補として、アスパラギン酸プロテアーゼの一種であるカテプシン D 様タンパク質 (catD) が挙げられる。カテプシン D は、多くのカテプシン群

と同様に、生物全般に発現しており、主にリソソーム内で細胞内タンパク質の代謝を行いオートファジーやアポトーシスに参与していることが知られている。他の多くの動物種においても catD が同定され、吸血性の節足動物において catD がヘモグロビンの消化に参与していることが示されている。これまでに catD を標的としたワクチン試験により、住血吸虫では感染虫数の減少やそのカテプシン D の働きを阻害することが示されており、オウシマダニ (*Rhipicephalus microplus*) では飽血ダニ数や飽血時のダニの体重減少、産卵率の低下、卵の重量の減少などが観察された。このように、ワクチン抗原としてカテプシン D は期待される分子であり、ワクモにおいては、catD は二種類、catD1 及び catD2 が報告されており、我々が同定した catD2 について、詳細に解析を行った。ワクモ catD2 遺伝子の ORF 全長は 1,167 bp であり、N 末端側の 18 アミノ酸にシグナルペプチド、その下流にアスパラギン酸ペプチダーゼドメインが認められた。ワクモ catD2 は、ワクモ catD1 やオクシデンタリスカブリダニやオウシマダニなどが持つアスパラギン酸プロテアーゼと高い相同性を示した。

#### 吸血状態別の発現解析



#### 発育ステージ別の発現解析

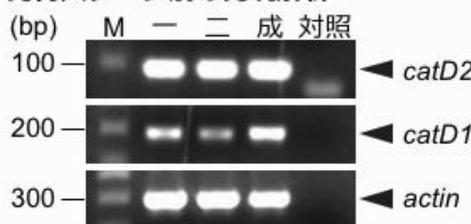


図 1. catD2 および catD1 遺伝子の発現解析

一：第一若ダニ、二：第二若ダニ、成：成ダニ

RT-PCR 法による発現解析の結果、ワクモ catD2 は、ワクモのいずれの発育ステージ(第一若ダニ、第二若ダニ、成ダニ)においても、さらに飢餓状態、飽血状態を問わず発現が認められた(図 1)。なお、対照として用いたワクモ catD1 についても、同様の発現様式であった。これらの結果から、ワクモ catD2 は、catD1 とともに吸血状態や発育ステージに関わらず、恒常的に発現していると考えられた。

次に大腸菌発現系を用いて組換え catD2 および組換え catD1 を調製し、そのカテプシン D 酵素活性の解析を行った結果、陽性対照の

ウシ脾臓由来カテプシンDに比べて著しく低いものの、酵素活性を有していることが示された。また調製した組換えcatD2およびcatD1は、ウェスタンブロット法による解析で、ワクモ吸血鶏由来の血清とは反応せず、catD2およびcatD1は共に非暴露型抗原であることが示唆された。また組換えcatD2および組換えcatD1を鶏に免疫し、高度免疫血清を調製して *in vitro* feeding assay により、ワクモ吸血阻止能を検討したが、対照の鶏血清と比べて有意な吸血阻止能は観察されなかった。今後他の候補抗原との併用等、さらに詳細な解析が必要と思われる。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件)

Seixas, A., Alzugaray, M.F., Tirloni, L., Parizi, L.F., Pinto, A.F.M., Githaka, N.W., Konnai, S., Ohashi, K., Yates Iii, J.R., Termignoni, C., and da Silva Vaz, I. Jr. 2018. Expression profile of *Rhipicephalus microplus* vitellogenin receptor during oogenesis. *Ticks Tick Borne Dis.* 9: 72-81. 査読有, doi: 10.1016/j.ttbdis.2017.10.006.

Machida, A., Murata, S., Matsuyama-Kato, A., Isezaki, M., Taneno, A., Sakai, E., Konnai, S., and Ohashi, K. 2017. Isolation and purification of *Gallid herpesvirus 2* strains currently distributed in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 79: 115-122. 査読有, DOI:10.1292/jvms.16-0329.

Rangel, C.K., Parizi, L.F., Sabadin, G.A., Costa, E.P., Romeiro, N.C., Isezaki, M., Githaka, N.W., Seixas, A., Logullo, C., Konnai, S., Ohashi, K., and da Silva Vaz, I. Jr. 2017. Molecular and structural characterization of novel cystatins from the taiga tick *Ixodes persulcatus*. *Ticks Tick Borne Dis.* 8 :432-441. 査読有, doi: 10.1016/j.ttbdis.2017.01.007.

Costa, E.P., Façanha, A.R., Cruz, C.S., Silva, J.N., Machado, J.A., Carvalho, G.M., Fernandes, M.R., Martins, R., Campos, E., Romeiro, N.C., Githaka, N.W., Konnai, S., Ohashi, K., Vaz, I.S. Jr., and Logullo, C. 2017. A novel mechanism of functional cooperativity regulation by thiol redox status in a dimeric inorganic pyrophosphatase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1861: 2922-2933. 査読有, doi: 10.1016/j.bbagen.2016.09.017.

Ochirkhuu, N., Konnai, S., Odbileg, R., Murata, S., and Ohashi, K. 2017. Molecular epidemiological survey and genetic characterization of *Anaplasma* species in Mongolian livestock. *Vector*

*Borne Zoonotic Dis.* 17: 539-549. 査読有, doi: 10.1089/vbz.2017.2111.

Sharav, T., Konnai, S., Ochirkhuu, N., Ts, E.O., Mekata, H., Sakoda, Y., Umemura, T., Murata, S., Chultemdorj, T., and Ohashi, K. 2017. Detection and molecular characterization of equine infectious anemia virus in Mongolian horses. *J. Vet. Med. Sci.* 79: 1884-1888. 査読有, doi: 10.1292/jvms.17-0202.

Ochirkhuu, N., Konnai, S., Odbileg, R., Murata, S., and Ohashi, K. 2017. Molecular epidemiological survey and genetic characterization of ovine gammaherpesvirus-2 in Mongolian livestock. *J. Vet. Med. Sci.* 79: 2040-2042. 査読有, doi: 10.1292/jvms.17-0203.

Toyomane, K., Konnai, S., Niwa, A., Githaka, N., Isezaki, M., Yamada, S., Ito, T., Takano, A., Ando, S., Kawabata, H., Murata, S., and Ohashi, K. 2016. Identification and the preliminary *in vitro* characterization of IRIS homologue from salivary glands of *Ixodes persulcatus* Schulze. *Ticks Tick Borne Dis.* 7: 119-125. 査読有, doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.09.006.

Maekawa, N., Konnai, S., Okagawa, T., Nishimori, A., Ikebuchi, R., Izumi, Y., Takagi, S., Kagawa, Y., Nakajima, C., Suzuki, Y., Kato, Y., Murata, S., and Ohashi, K. 2016. Immunohistochemical analysis of PD-L1 expression in canine malignant cancers and PD-1 expression on lymphocytes in canine oral melanoma. *PLoS One.* 11: e0157176. 査読有, DOI:10.1371/journal.pone.0157176.

[学会発表](計4件)

青山珠里愛、村田史郎、伊勢崎政美、種子野章、酒井英史、今内覚、大橋和彦。マレック病ウイルス弱毒株を用いた新規抗ワクモワクチン開発に向けた基礎研究。第160回 日本獣医学会学術集会 鹿児島大学(鹿児島)、2017年9月15日

村田史郎、種子野章、酒井英史、町田柚香、松山あゆ美、伊勢崎政美、今内覚、大橋和彦。日本に分布するマレック病ウイルス野外株の病原性の検討。第160回 日本獣医学会学術集会 鹿児島大学(鹿児島)、2017年9月15日

伊勢崎政美、村田史郎、酒井英史、矢吹卓也、種子野章、市居修、伊東拓也、今内覚、大橋和彦。抗ワクモ(*Dermasyssus gallinae*)ワクチン開発に向けたワクモ由来フェリチン2の性状解析。第159回 日本獣医学会学術集会 日本大学(藤沢)、2016年9月8日

村田史郎、町田柚香、伊勢崎政美、今内覚、  
大橋和彦. マレック病ウイルス日本分離  
株の全ゲノム解析. 第 159 回 日本獣医  
学会学術集会 日本大学(藤沢)、2016  
年 9 月 8 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大橋 和彦 (OHASHI, Kazuhiko)  
北海道大学・大学院獣医学研究科・教授  
研究者番号：9 0 2 5 0 4 9 8

### (2) 研究分担者

今内 覚 (KONNAI, Satoru)  
北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授  
研究者番号：4 0 3 9 6 3 0 4

村田 史郎 (MURATA, Shiro)  
北海道大学・大学院獣医学研究科・助教  
研究者番号：1 0 5 7 9 1 6 3