

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08104

研究課題名(和文) 新たなワクモ制御技術の確立 - 実用化への新展開 -

研究課題名(英文) Establishment of novel techniques for the control of chicken red mite -New developments for the practical application-

研究代表者

山口 剛士 (YAMAGUCHI, Tsuyoshi)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：70210367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ワクモは鳥類を宿主とする吸血性外部寄生虫で養鶏産業に甚大な被害を与えている。近年、殺ダニ剤抵抗性のワクモが出現し防除が困難になっている。この問題を解決するため、各種薬剤標的分子の遺伝子を同定し抵抗性化に関与する変異の存在を解明、これを特異的に検出する遺伝子診断技術確立した。本技術は多くの検査機関等で実施可能であり、特別な技術や設備と時間を要する現行の薬剤感受性試験を補完する新たな技術として今後の実用化が期待される。また、薬剤に代わる新たなワクモ防除の技術として期待されるワクモワクチンの標的分子として、節足動物の消化等に重要な役割を果たすPMP様分子の有用性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ワクモ制御に用いられる各種薬剤標的分子の遺伝子を同定し、薬剤抵抗性に関与する変異の存在を初めて明らかにした。これにより、遺伝子診断による迅速で簡便な薬剤感受性の鑑別に道を拓いた。現行の薬剤感受性試験と異なり多くの検査機関で実施可能な遺伝子診断による鑑別は、科学的根拠に基づく薬剤選択に必須となる薬剤感受性試験を補完する技術として有用であり、今後のワクモ防除にきわめ有用と考えられた。また、薬剤に代わる新たなワクモ防除技術として期待されるワクモワクチンの標的分子として、節足動物の消化等に重要な役割を果たすPMP様分子の虫体内分布と有用性を初めて示し、将来におけるワクチン開発に道を拓いた。

研究成果の概要(英文)：The chicken red mite is a blood-sucking ectoparasite that hosts avian species and is causing enormous damage to the poultry industry. In recent years, the emergence of acaricide-resistant mites has made control difficult. To solve this problem, the genes of various drug target molecules, and their mutations involved in the resistance were identified. In addition, a genetic diagnosis technique to specifically detect these mutations were established. This technology can be employed in many laboratories, and is expected to be a practical technique in the future to complement the current drug susceptibility tests, which require special techniques, equipment, and time. Furthermore, PMP-like molecules, which play an important role in arthropod digestion, were suggested to be effective targets for vaccines against the mite.

研究分野：動物衛生学

キーワード：鶏病 ワクモ *Dermanyssus gallinae* ワクチン 薬剤感受性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ワクモ (*Dermanyssus gallinae*) は、主に鳥類を宿主とする吸血性の外部寄生虫で、多くの国や地域に分布する。養鶏産業では、家禽の貧血死、ストレスによる産卵率低下やワクチン応答の低下など、その生産性に様々な影響を与えることが知られている。ワクモの防除には、有機リン、カーバメート、ピレスロイド、エトキサゾールを主成分とする昆虫成長制御 (IGR) 剤など多様な薬剤が用いられるが、国内では近年、薬剤抵抗性ワクモの出現が問題になり (鶏病研究会報, 48. 30-31, 2012)、ワクモ防除の新たな技術開発が期待されている。

2. 研究の目的

本研究は、ワクモ防除における上述の問題を解決する新技術の確立と実用化への新展開実現のため、薬剤抵抗性に関する各薬剤標的分子の変異と代謝酵素の解明、薬剤抵抗性に関する変異検出のための遺伝子診断技術確立、確立した遺伝子診断技術を活用した疫学調査による抵抗性ワクモ集団の分布実態の解明およびワクモワクチンの確立を当初の目的とした。

3. 研究の方法

(1) ワクモにおける多様な殺ダニ剤に対する抵抗性関連変異と代謝酵素群の解明

各薬剤標的分子における抵抗性関連変異の解明

ワクモ用殺ダニ剤として国内外で広く使用されているピレスロイド、有機リン、カーバメートおよび国内で使用されている IGR 剤の主成分であるエトキサゾールのうち、先行研究で標的分子であるワクモの電位依存性ナトリウムチャネル (*DgVSSC*) に抵抗性化に伴う変異部位が示されているピレスロイド系薬剤を除く他の 3 剤について、各薬剤標的分子をコードする遺伝子の塩基配列を決定し、抵抗性に関する変異部位の解明を行った。

有機リンおよびカーバメート系薬剤

共通の標的分子であるワクモのアセチルコリンエステラーゼ遺伝子 (*DgAChE1*) は、未解読だった 5' 端側の塩基配列を 5' RACE 法により解読した。次に薬剤抵抗性に関する責任部位を明らかにするため、ワクモの薬剤抵抗性集団および感受性集団から *DgChE1* コード領域を PCR 法により増幅、塩基配列を決定し、塩基配列および推定アミノ酸配列を比較・解析した。

エトキサゾール

ワクモと同じダニ目のナミハダニ (*Tetranychus urticae*) で、キチン合成酵素 (*CHS1*) に本剤抵抗性化に伴うアミノ酸置換が報告されていることから (P. Natl. Acad. Sci. USA., 109. 4407-4412, 2012)、先行研究のワクモ RNA-Seq 解析で得た配列から *CHS1* 遺伝子相同配列を探索、エトキサゾール抵抗性および感受性ワクモ集団由来 RNA から対象領域を PCR で増幅、抵抗性に関する責任部位解明のため、その塩基配列および推定アミノ酸配列を比較・解析した。

薬剤代謝酵素群の解明

先行研究のワクモ RNA-Seq 解析で得た全配列を対象に BLAST 検索を実施、薬剤の代謝に関するグルタチオン S-トランスフェラーゼ (*GST*) およびシトクロム P450 (*P450*) と相同性を示す配列を探索した。得られた配列のうち、相同率が 99%以上を示す塩基配列は同一遺伝子とし、既知のワクモ *GST* 塩基配列と 99%以上一致する配列は新規 *GST* の候補から除外した。次に、得られた塩基配列の推定アミノ酸配列について、*GST* および *P450* の機能ドメインが認められた配列を選択、他種節足動物の *GST* および *P450* 遺伝子との分子系統学的解析により、ワクモ由来各分子の属性を決定した。

(2) 薬剤抵抗性関連変異の検出による薬剤感受性遺伝子診断技術の確立

ピレスロイド系薬剤抵抗性変異検出技術の確立

ピレスロイド系薬剤抵抗性および感受性ワクモ間で、*DgVSSC* 遺伝子に認められピレスロイド系薬剤に対する抵抗性化との関連が示されている 1 塩基の相異を鑑別するため、TaqMan プローブ法による RT-PCR での検出を試みた。プローブの設計および合成は、Integrated DNA Technologies (California, USA) に依頼し、感受性 (野生) 型および抵抗性 (変異) 型検出用プローブを作成した。TaqMan プローブ法による 1 塩基多型検出の条件検討には、野生型および変異型の標的配列を持つ合成 DNA を用いた。

有機リンおよびカーバメート系薬剤抵抗性変異検出技術の確立

DgAChE1 では、抵抗性化に関連する変異部位検出のため、野生型および変異型の各塩基配列に特異的なプライマーを設計、コンベンショナル PCR による各配列の鑑別を試みた。また、市販の有機リン系およびカーバメート系薬剤に異なる感受性を示すワクモ集団について PCR 法による鑑別を行い、両薬剤に対する感受性試験成績との関係を検討した。

エトキサゾール抵抗性変異検出技術の確立

抵抗性および感受性ワクモ由来 *DgCHS1* 遺伝子に認められ、エトキサゾール抵抗性との関与が推察された塩基の相異を検出するため、ピレスロイド系薬剤での抵抗性変異検出と同様に TaqMan プローブ法による RT-PCR での検出を試みた。

(3) ワクモワクチンの確立

ワクモ制御のためワクモワクチン候補分子として、蛋白質の立体構造形成に重要なプロテインジスルフィドイソメラーゼ (*PDI*)、節足動物の中腸に分布し消化等に重要な peritrophic

matrix protein (PMP)、およびセリンプロテアーゼ阻害を主な機能とし宿主血液の凝固抑制等に重要な serpin に着目し、これら遺伝子の探索と分子性状解析およびワクモワクチンとしての可能性を検討した。

ワクモの PDI 遺伝子として *DgPDI-2* 遺伝子の ORF 全長を発現ベクター pET-21b(+) にクローン化し、大腸菌で発現した組換え *DgPDI-2* (rec *DgPDI-2*) を精製後、S-S 結合還元活性の有無および PDI 阻害剤のバシトラシン添加による活性への影響をインスリン還元アッセイにて検討した。また、S-S 結合還元の活性中心とされる CGHC モチーフに変異を導入した *DgPDI-2* (mut *DgPDI-2*) を作出、同様の機能解析を行った。また、*DgPDI-2* の虫体内分布を免疫組織化学的検索により解析した。次に、PDI のワクモ防除における薬剤標的分子としての可能性を検討するため、ワクモのバシトラシン暴露による、成ダニ雌の生存率および卵の孵化率と孵化後の幼ダニおよび第一若ダニの生存率を観察した。また、ワクチン標的分子としての可能性を検討するため、マウス抗 *DgPDI-2* 抗体の *DgPDI-2* 活性抑制能を評価した。

ワクモの PMP および serpin は、先行研究のワクモ RNA-Seq 解析で得た塩基配列から BLAST 検索により探索した。得られた各配列の推定アミノ酸配列について、PMP に必須の chitin-binding domain 2 (ChtBD2) および serpin に共通の reactive center loop (RCL) の有無を確認、このうち吸血直後の発現量が比較的高く、吸血との関連が推察された一部遺伝子をクローン化後に大腸菌で発現、得られた組換えタンパク質をニワトリに免疫し、ワクモに対するワクチン効果を検証するため、*in vitro* 吸血における吸血率および吸血後生存率を評価した。また、各分子のワクモの虫体内分布解明のため免疫組織化学的検索を実施した。

4. 研究成果

(1) 薬剤抵抗性関連変異の解明と遺伝子診断技術の開発

ピレスロイド抵抗性関連変異診断技術の開発

先行研究でワクモのピレスロイド抵抗性との関連が示された *DgVSSC* 遺伝子の塩基配列は、配列既知の合成 DNA を用いた検証で、Taq-Man プローブ法による RT-PCR で検出できることが明らかになり、ワクモのピレスロイド抵抗性と感受性の鑑別に有用であることが示された。

有機リンおよびカーバメート抵抗性関連変異診断技術の開発

有機リンおよびカーバメート抵抗性を決定する *DgAChE1* における変異部位を明らかにするため、未決定だった 5' 端を含む *DgAChE1* 全長について塩基配列および推定アミノ酸配列を比較、近接する 2ヶ所に野生型および変異型に特異的なアミノ酸残基の存在が示された。これら各アミノ酸残基をコードする塩基配列を検出するため、変異部位を認識する特異プライマーを設計し塩基配列が既知のワクモを対象に PCR を実施したところ、感受性および抵抗性に特異的な塩基配列を簡便に検出できることが示され、有機リンおよびカーバメート系薬剤に対する感受性および抵抗性の簡便かつ迅速な鑑別に有用であることが示された。一方、薬剤暴露による感受性試験と遺伝子診断の成績とが必ずしも一致しない例が認められ、これら薬剤に対する抵抗性の獲得が今回明らかになった変異だけでなく、薬剤代謝活性の変化などその他の機構が関与する可能性が推察された。

エトキサゾール抵抗性関連変異診断技術の開発

エトキサゾール抵抗性および感受性ワクモ由来の *DgGHS1* 遺伝子由来の PCR 産物と *DgGHS1* 全長塩基配列の比較で、2ヶ所にアミノ酸残基の相違を伴う塩基配列の相異が認められ、うち1ヶ所がエトキサゾール抵抗性と良く相関していることが示された。この塩基配列の違いは、各配列を持つ合成 DNA を用いた検証で TaqMan プローブ法による RT-PCR で検出可能であることが示された。薬剤暴露による感受性試験でエトキサゾールに対する感受性が既知のワクモを対象に実施した RT-PCR では、薬剤感受性試験と RT-PCR の成績が完全には一致せず、この点については実用化に向け、更なる検討が必要と考えられた。

疫学調査による抵抗性ワクモ集団の分布実態の解明

本研究で、ワクモの防除に広く使用される複数の薬剤について、ワクモにおける標的分子と抵抗性化との関与が推察される変異部位を明らかにし、その検出に有用な遺伝子診断技術を確立、遺伝子診断によるワクモの薬剤感受性試験の実用化に道を拓いた。一方、薬剤暴露による現行の感受性試験と遺伝子診断の成績とが一致しない例が認められ、当初の目的に挙げていた遺伝子診断技術による疫学調査の実施と抵抗性ワクモ集団の分布実態解明には至らなかった。

(2) ワクモにおける薬剤代謝酵素群の解明

新規のワクモ GST および P450 遺伝子の候補配列として、GST 11 配列および P450 35 配列を得た。分子系統学的解析の結果、GST のうち 6 配列が Mu、4 配列が Delta、1 配列が Sigma 各クラスに分類され、P450 のうち 9 配列がクラン 2、14 配列がクラン 3、11 配列がクラン 4、1 配列がクラン M に分類された。他の節足動物では、GST の Mu および Delta クラスの分子の他、P450 のクラン 3 および 4 に属する分子が、殺虫効果を持つ薬剤の代謝および解毒に関与し得ることが報告されており、本研究で見出されたワクモの GST および P450 についても、薬剤抵抗性との関連が推察された。

(3) ワクモワクチンの確立

rec DgPDI-2 はインスリン還元活性を示し、その活性はバシトラシンの添加で濃度依存性に低下した。mut DgPDI-2 では、インスリン還元活性が有意に低下し ($p < 0.005$) DgPDI-2 がワクモの PDI として S-S 結合還元活性を有することが示された。免疫染色の結果、DgPDI-2 は、唾液腺、卵巣、消化管上皮、気管およびシンガングリオンに分布が認められ、DgPDI-2 がワクモの消化・吸収、繁殖などで何らかの役割を担う可能性が推察された。バシトラシンへの暴露では、成ダニ雌の 70%~100%が死亡、卵では孵化率が 78.9%に低下、孵化後の幼ダニおよび第一若ダニの 60%が死亡し ($p < 0.05$) バシトラシンの殺ダニ効果が示され、PDI が薬剤標的分子として有用である可能性が示された。一方、抗 DgPDI-2 抗体に DgPDI-2 の S-S 結合還元活性抑制能は確認されず、ワクチン標的分子としての可能性については、今後更なる検討が必要と考えられた。

BLAST 解析により、PMP 様 6 遺伝子 (DgCBP1~6) および serpin 様 5 遺伝子 (DgSp1~5) を得た。免疫染色では、DgCBP1 および 2 が中腸の上皮細胞、管腔側表面および管腔内に認められた。PMP は一般に節足動物の中腸上皮細胞から分泌され、中腸管腔側に peritrophic matrix を形成、一部は糞便と共に排泄されることから、DgCBP1 および 2 はワクモの PMP であることが強く示唆された。これら 2 遺伝子は、他の吸血節足動物と同様、吸血後に発現量の上昇傾向が認められ、ワクモにおいても血液消化に関与する可能性が推察された。DgSp1~5 は、全てに RCL が予測され、ワクモの新たな serpin 分子と考えられた。ワクチン効果の評価で、DgCBP2 免疫ニワトリ 3 羽中 1 羽の血液を給与したワクモで吸血後生存率の低下が認められた。DgSp1 免疫ニワトリの血液を給与したワクモでは、吸血後の生存率低下は認められなかったが、3 羽中 2 羽の血液給与群で吸血率が低下し、DgCBP2 および DgSp1 のワクチンとしての可能性が示された。

(4) 得られた成果のインパクト

ワクモの防除には様々な殺ダニ剤が広く使用され、野外では薬剤抵抗性ワクモが出現している。このため、薬剤使用時には事前の薬剤感受性試験による感受性評価と有効な薬剤の選択が極めて重要である。生きたワクモの薬剤暴露による現行の薬剤感受性試験は信頼性が高い一方、一般の試験機関では実施困難なことも多く、その普及は十分ではない。本研究で確立した遺伝子診断技術は、現行の感受性試験と成績が一致しない例が散見されるなど、今後解決すべき点はあるが、一般的な試験機関での実施が容易で、比較的短時間で結果が得られるなど実用性が高く、防除対象ワクモに対する薬剤選択において現行の感受性試験を補完する新たな技術として極めて有用と考えられた。ワクチンの標的として、ワクモの生存に重要な複数の分子の遺伝子を同定し、その機能や虫体内の分布状況を明らかにした。ワクチンとして実用化に直結する明確な成果は得られなかったが、限定的ながら一部候補分子を免疫した鶏から吸血したワクモに、生存率や吸血率の低下が認められ、ワクチンとしての可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡田逢江, 村野多可子, 富岡幸子, 北村夕子, 豊嶋愛, 笛吹達史, 山口剛士
2. 発表標題 ワクモ (<i>Dermanyssus gallinae</i>) におけるPeritrophic Matrix Proteinsの探索
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 豊嶋愛, 村野多可子, 富岡幸子, 北村夕子, 笛吹達史, 山口剛士
2. 発表標題 ワクモ <i>Dermanyssus gallinae</i> プロテインジスルフィドイソメラーゼ2遺伝子オルソログの機能解析
3. 学会等名 第160回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----