

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月4日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580058

研究課題名（和文） マダニ抗菌ペプチド Defensin の生理機能と合成誘導機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of physiological functions and regulatory mechanisms of the tick antimicrobial peptide defensin.

研究代表者 Taylor De Mar (Taylor De Mar)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：50261772

研究成果の概要（和文）：

吸血性のマダニにおいて抗微生物ペプチド Defensin は生体防除に大きな役割を持っている。本研究では Defensin の転写制御機構の明らかにするため、Toll 経路下流の転写因子である NF- κ B、Rel (OmRel) の Defensin 転写制御における役割を明らかにした。マダニ *Ornithodoros moubata* は Defensin A、B、C 及び D の 4 つを持ち、吸血後全ての Defensin の発現上昇に先行して OmRel の発現量の上昇がみられた。レポータージーンアッセイ及びゲルシフトアッセイの結果から、OmRel が少なくとも Defensin C の発現を直接的に誘導することを証明した。さらに RNAi 結果からは、OmRel が生体内で Defensin の転写制御に影響し、実際に生体防御機構に影響することも示唆された。また、Defensin の制御因子となる可能性がある、NF- κ B、Relish の同定や、栄養刺激とのかかわりについても検証を開始することができた。Defensin の転写制御の解明や、さらに上流の制御系とのつながりを検証することで、マダニの生体防御に関わる因子の新たな生合成機構の解明に寄与したと考えている。

研究成果の概要（英文）：

The antimicrobial peptide defensin plays a significant role in the immune responses of blood feeding ticks. The objective of this research was to elucidate mechanisms regulating defensin genes and clarify the role of NF- κ B Rel regulatory factors (OmRel) in these regulatory mechanisms. OmRel appears to upregulate all four defensins (defensins A, B, C, D) identified from the soft tick *Ornithodoros moubata*. Based on luciferase transfection assays and gel shift assay OmRel directly regulates the expression of Defensin C. RNAi knockdown of OmRel showed a reduction in the expression of all defensin genes. However, OmRel alone can not regulate all defensin genes so we identified an IMD Pathway NF- κ B Relish regulatory factor and investigated whether the nutrient pathway may play a role in the regulation of immune responses in the soft tick *O. moubata*. Future studies are underway to confirm the roles of Relish and the nutrient pathway in regulating the immune system of ticks.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	1,700,000	510,000	2,210,000
平成23年度	800,000	240,000	1,040,000
平成24年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：昆虫生理、マダニ

1. 研究開始当初の背景

大型のダニであるマダニは哺乳類から吸血しその際に病気を媒介するため、家畜生産の分野のみならず、最近では衛生害虫として非常に警戒されている節足動物である。蚊などと比べてもマダニは原虫からウイルスまで多様な微生物の宿主となりうるため、その免疫系に注目が集まっている。

マダニを含む節足動物は脊椎動物のような獲得免疫は持たず、自然免疫がその生体防御の主体である。自然免疫における重要な防御因子には抗菌作用を持つペプチドが含まれ、様々な種類の抗微生物ペプチドが同定されている。抗微生物ペプチドの一つである *Defensin* は節足動物に幅広く存在し、グラム陽性菌に発現が強く誘導され、その細胞膜を破壊することで細菌を死滅させる。我々はこれまでに、カズキダニの一種 *Ornithodoros moubata* から *Defensin* を単離しており、マダニの *Defensin* の発現もグラム陽性菌の投与によって誘導され、抗菌活性を持つことを明らかにしている (Nakajima et al., 2003)。中腸は摂食や吸血によって外部からの微生物の侵入を受ける器官であり、本種マダニは吸血後に *Defensin* を中腸内に分泌することから (Nakajima et al., 2002)、*Defensin* の生合成・分泌は、マダニの唯一の栄養摂取である吸血を介した病原体への感染を防ぐための効率的な機構だと考えられる。

抗微生物ペプチドの発現誘導は主にグラム陽性菌と真菌類の侵入により活性化される Toll 経路と、主にグラム陰性菌により活性化される Imd 経路の 2 つに分かれ、それぞれ下流のエフェクター分子 (含抗微生物タンパク質) の発現には、Rel/NF κ B ファミリーの転写因子が関わるということが知られている。*Defensin* の発現はグラム陽性菌により強く

誘導され、Toll 経路下流の NF κ B、Rel が *Defensin* の転写因子であると考えられている。さらに、ホルモンや栄養依存的な制御も抗微生物タンパク質の発現に関わるという報告もなされている。しかし、マダニ *Defensin* の発現制御において、実際にどういった分子が働き、ホルモンや栄養刺激による制御が関与しているかの知見はほとんど存在していなかった。

2. 研究の目的

本研究ではマダニの生体防御の要の一つである抗微生物タンパク質 *Defensin* の転写制御機構を分子レベルで明らかにし、マダニ免疫機構の一端を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 吸血後の *Defensin* 及び *OmRel* の発現プロファイリング

O. moubata 吸血雌個体における 4 つの *Defensin* (*Defensin A-D*) 及び *OmRel* について、発現変動を Real-time PCR を用いて測定した。

(2) *OmRel* による *Defensin* の発現誘導

OmRel による *Defensin* の転写活性を明らかにするため、レポータージーンアッセイを行った。*Defensin A-D* はその上流に NF κ B が結合する κ B サイトを有している。4 つの *Defensin* それぞれの κ B サイトの下流にルシフェラーゼをレポーターとして組み込んだレポーターベクター、また *OmRel* の発現ベクターを作成し、Bm-N4 細胞に共に導入した。その後ルシフェラーゼ活性を測定することで κ B サイトの活性を検証した。また *Defensin A-D* それぞれの κ B サイトと *OmRel* の結合をゲルシフトアッセイにて確

認した。アッセイには OmRel を GST 融合タンパク質として大腸菌に発現させたものを用いた。

(3) 生体内における OmRel の機能の確認

OmRel が実際にマダニ体内で *Defensin* の発現に関わることを明らかにするため、*OmRel* の二本鎖 DNA (dsRNA) を作成し、未吸血の雌マダニに投与した。マダニを吸血させたのち、*OmRel* 及び *Defensin A-D* の発現変動を Real-time PCR を用いて測定した。また、*OmRel* の dsRNA 投与による発現抑制個体にライム病ボレリア菌を感染させ、細菌数の増加を調査した。

(4) その他の NF- κ B 遺伝子の探索

節足動物の抗微生物タンパク質の生合成は大きく分けて Toll 経路と Imd 経路の 2 つに分かれ、最終的に Toll 経路では Rel、Imd 経路では Relish と呼ばれる NF- κ B が抗微生物タンパク質の発現を正に制御すると考えられている。そこで、Imd 経路の NF- κ B である Relish のクローニングを行った。Degenerate primer を作成して PCR を行い、部分配列を決定したのち、さらに RACE を行って全長配列を同定した。

(5) 抗微生物タンパク質発現に関わる刺激メカニズムの探索

マダニにおいて、吸血は唯一の栄養摂取であり、その後に働く栄養センシングメカニズムが様々な生理現象の重要な刺激となると考えられる。特にマダニでは TOR (Target of Rapamycin) 経路が吸血による生理学的変化の引き金となると考えられたため、本種マダニにおける TOR の働きを検証した。TOR の阻害物質であるラパマイシンを雌個体に投与したのちに吸血させ、その重要性を検証

した。TOR の働きを最も検証しやすい卵形成をモデルとして評価系を確立し、ラパマイシン投与による阻害効果の検証を行った。

4. 研究成果

(1) 吸血後の *Defensin* 及び *OmRel* の発現プロファイリング

4 つの *Defensin* のうち *Defensin A*、*B* はそれぞれ吸血直後 (CFS、吸血開始から 2 時間以内) にいったん上昇し、その後緩やかに上昇を続けて吸血 3 日以降に高い発現を維持していた。*Defensin C*、*D* も吸血後に上昇を見せ、4 日以降も上昇を続けることが明らかになった (図 1)。一方 *OmRel* の発現は、吸血によって上昇し、吸血後 6 時間でピークを向かえその後緩やかに減少した。Toll 経路における NF- κ B の活性化は遺伝子発現を伴わない反応であり、吸血直後の *Defensin* の発現はすでにマダニ体内に存在していた *OmRel* の活性化による速い反応の結果と推測される。その後の *Defensin* 発現の上昇は *OmRel* の発現上昇に遅れて現れるため、吸血に刺激される *OmRel* の発現上昇がその後の長期間にわたる *Defensin* 発現増加を正に制御すると考えられる。

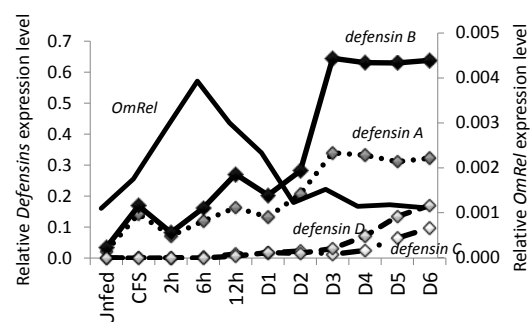


図1 吸血後の *OmRel* 及び *Defensin* の発現変動
Unfed: 未吸血、CFS: coxal fluid secretion、2-12h: 吸血開始から2-12時間、D1-6: 吸血1-6日後

(2) OmRel による *Defensin* の発現誘導

Defensin A-D についてそれぞれレポーター遺伝子アッセイを行った結果、OmRel は *Defensin C* のプロモーター活性を著しく上昇させた (図 2)。その他 3 つの *Defensin* のプロモーター領域を用いた場合はコントロールとの差は見られなかった。一方ゲルシフトアッセイの結果からは、4 つの *Defensin* の κB サイトと OmRel の結合が認められた。以上から *Defensin C* については OmRel によってその発現が直接制御されることが証明され、その他の *Defensin* についても OmRel がその発現に関与する可能性が示された。

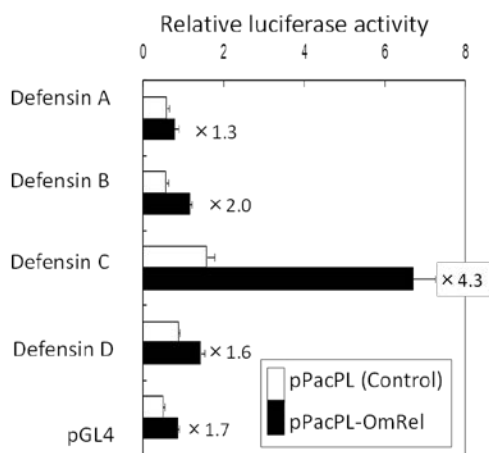


図2 *Defensin* κB サイトのレポーター遺伝子アッセイ

(3) 生体内における OmRel 機能の確認

OmRel の dsRNA をマダニ未吸血雌に投与し、*OmRel* の抑制効果を検証した。*OmRel* の発現は吸血 6 日後において、コントロールと比較し 84% の抑制効果がみられたため、本来 *Defensin* の発現が上昇する時期において長く dsRNA による発現抑制効果が続くことを確認した。*OmRel* 発現抑制個体において、*Defensin A* では 60%、*Defensin C* では 72%、*Defensin C* では 94% の発現低下がみられた。*Defensin B* に関しては *OmRel* の抑制により発現が低下する傾向にあったが、コントロールとの有意な差は認められなかった。レポ-

ーターアッセイ及びゲルシフトアッセイの結果と合わせて、少なくとも *Defensin C* は *OmRel* の制御下にあり、*Defensin A*、*D* についても OmRel により影響を受けると考えられる。

また、*OmRel* の発現抑制個体にボレリア菌を投与したところ、発現抑制を行わなかった個体と比較して菌数の増加がみられた。そのため、OmRel による *Defensin* の制御が実際のマダニの生体防御に大きな役割を担っていると考えられる。

(4) その他の NF- κB 遺伝子の探索

Defensin B の発現には OmRel 以外の因子が必要である可能性が高いため、Rel 以外の NF- κB である Relish の同定を試み、その同定に成功した。本種で同定した Relish は昆虫などで一般にみられる Relish とは異なりアンキリンリピートを持たなかったものの、系統樹解析の結果等から、Relish に分類される NF- κB であった。甲虫などの進化的に古い種の研究からは Toll 経路と Imd 経路は複雑に補完し合っていることが示唆されており、グラム陽性菌に誘導される *Defensin* についても、従来言われてきたような Toll 経路のみならず、Imd 経路からの制御が行われている可能性がある。今後 OmRelish と *Defensin* (特に *Defensin B*) との相互関係を明らかにすることでマダニ *Defensin* の転写制御系をさらに明らかにできるものと期待している。

(5) 抗微生物タンパク質発現に関わる刺激メカニズムの探索

ラパマイシンをマダニに投与し、TOR 経路を阻害した結果、マダニの卵黄タンパク質の生合成が阻害され、産卵数の減少も見られた。よって本種のマダニにおいても TOR が吸血後の様々な生理現象に大きな影響を持つこ

とが示唆される。OmRel の発現が吸血後に上昇することからも (図 1)、OmRel の制御にも栄養刺激 (特に TOR) が関わっている可能性が高い。本研究で構築した TOR の評価系を抗微生物タンパク質の発現誘導に今後適用することで、実際の *Defensin* 転写制御の解明に加えてより上流の制御メカニズムの研究に役立てられると考えている。

以上より、本研究においては、マダニの抗微生物ペプチド *Defensin* の転写制御に OmRel が直接的にかかわることを明らかにした。また、Rel 以外の *Defensin* の直接的な制御因子となりうる *Relish* の同定や、より上流の制御系である栄養刺激とのかかわりについても検証を開始することができた。

Defensin はマダニの生体防除において非常に重要な防御因子であり、この転写の詳細なメカニズム、また更なる制御系の解明に踏み込むことで、マダニの生体防御に関わる因子の新たな生合成機構の解明に寄与したと考えている。これらの成果については国内・国際学会にて発表を行い、現在投稿論文を準備中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① 高野 愛、坪川理美、D. Taylor, 川端寛樹、ボレリア属細菌のマダニ伝播機構、*Med. Entomol. Zool.* 64(1): 11-15、2013、査読有、DOI: 10.7601/mez.64.11。

[学会発表] (計 9 件)

① 手島悠、荻原麻理、D. Taylor、マダニの卵黄形成に対する TOR 経路の阻害による影響、第 6 5 回日本衛生動物学会大

会、北海道酪農学園大学、平成 25 年 4 月 6-7 日。

② 高野 愛、坪川理美、D. Taylor, 川端寛樹、マダニとボレリアの共種分化説におけるパラダイム・シフト、第 6 4 回日本衛生動物学会大会、長野、平成 24 年 3 月 30-31 日。

③ Tsubokawa, S., M.H. Ogihara, Y. Nakajima, H. Tanaka, D. Taylor, Rel transcription factor that regulates expression of defensin genes in the soft tick *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae), Sixth International Symposium on Molecular Insect Science, Amsterdam, The Netherlands, October 2-5, 2011.

④ 坪川理美、中島由郎、荻原麻理、田中博光、Taylor, D., マダニ抗菌ペプチドの転写制御、第 2 0 回日本ダニ学会大会、高知市城西館、平成 23 年 9 月 9-11 日。

⑤ Tsubokawa, S., D. Taylor, Rel transcription factor regulates defensin gene expression in the soft tick *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae), International Conference on Ticks and Tick-borne Pathogens, Zaragoza, Spain, August 28 to September 2, 2011.

⑥ 坪川理美、中島由郎、荻原麻理、田中博光、Taylor, D., マダニの抗菌ペプチド遺伝子の転写制御、第 6 3 回日本衛生動物学会大会、学術総合センター(一橋記念講堂) 東京、平成 23 年 4 月 16-17 日。

⑦ 坪川理美、荻原麻理、中島由郎、田中博光、Taylor, D.、マダニの抗菌ペプチド遺伝子の転写制御、第 5 5 回日本応用動物昆虫学会大会、九州大学箱崎キャンパス、平成 23 年 3 月 28-30 日。

- ⑧ 坪川理美、中島由郎、堀金麻理、田中博光、Taylor、D.、転写因子 Rel によるマダニ Defensin 遺伝子の制御、第 6 2 回日本衛生動物学会日本支部大会、順天堂大学さくらキャンパス、平成 22 年 10 月 16-17 日。
- ⑨ 坪川理美、中島由郎、堀金麻理、田中博光、Taylor、D.、転写因子 R e l によるマダニ抗菌ペプチド遺伝子の転写制御、第 1 9 回日本ダニ学会大会、宮城教育大学、平成 22 年 9 月 10-12 日。

[その他]

ホームページ等

<http://www.agbi.tsukuba.ac.jp/~odoken/dtaylor>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

Taylor De Mar (Taylor De Mar)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：50261772

(2) 研究協力者

川端 寛樹 (KAWABATA HIROKI)

国立感染症研究所・細菌第一部・第 4 室長