

## 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5月20日現在

機関番号：11301  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22590381  
 研究課題名（和文） マダニ抗菌ペプチドの立体構造の意義と野生動物モニタリングシステムへの応用  
 研究課題名（英文） Structure-related activity of tick defensin and antibody monitoring system in wildlife  
 研究代表者  
 磯貝 恵美子（EMIKO ISOGAI）  
 東北大学・大学院農学研究科・教授  
 研究者番号：80113570

### 研究成果の概要（和文）：

節足動物は全動物種の8割以上を占めるまでに繁栄しているが、この要因のひとつに感染防御における自然免疫機構があげられる。本研究では、共生微生物・病原体の選択性に関与するマダニの抗菌ペプチド構造と機能を明らかにした。立体構造を構築したペプチドとリニア構造のペプチドの比較において、立体構造を構築したペプチドのほうが有意に強い抗菌活性を示した。野生動物におけるマダニ抗菌ペプチドに対する抗体を調べることでマダニ媒介性感染症の地域浸潤を知ることができた。

### 研究成果の概要（英文）：

Defensins are major group of antimicrobial peptides and are found widely in vertebrates, invertebrates and plants. Invertebrate defensins have been identified in ticks. In this study, chemically synthesized tick defensins were used to investigate the activity spectrum against bacteria isolated from the midgut. Synthetic tick defensin showed antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* but not *Borrelia garinii* and symbiotic *Stenotrophomonas maltophilia*. The results demonstrate that the activity of antimicrobial peptides from tick is important for selection and reservation of specific bacteria such as Lyme disease spirochetes in the midgut. The tertiary structure brought more potent activity to *S. aureus* than primary one in short-time killing. The killing activity is related to the structure of tick defensin. Antibody against tick defensin in wildlife monitoring system can useful to know the risk of tick-borne diseases.

### 交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 800,000   | 240,000 | 1,040,000 |
| 2011年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2012年度 | 900,000   | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 2,700,000 | 810,000 | 3,510,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：マダニ、デフェンシン、野生動物、モニタリング、ライム病

### 1. 研究開始当初の背景

(1) マダニはライム病をはじめとする

様々な感染症を媒介する。マダニと野生動物間での病原体維持機構が存在するだけでなく、マダニそのものにも病原体を選択する機構があることが示唆されてきた。申請者はマダニ抗菌ペプチドに着目し、その抗菌活性が共生微生物の選択制に関与する可能性を示した。たとえば、ライム病ボレリアはマダニ由来の抗菌ペプチドに対して抵抗性を示した (Exp Appl Acarol, 49(3), 221-228, 2009)。抵抗性を示す細菌はマダニや皮膚から分離できるが、感受性細菌はそれが皮膚の常在菌であってもマダニ中腸から分離できない。

(2)野生動物に発生した感染症は、その動物群の個体減少を引き起こすだけでなく、周囲の地域における、畜産業や社会に少なからず影響を及ぼす場合もある。野生動物の感染症をモニタリングする意義としては、大きく分けて次の3つが考えられる。①野生動物における感染症は、その個体数の減少に極めて大きな要因となる。感染症が発生した動物種が希少種や絶滅危惧種であれば種の絶滅を引き起こす。②野生動物由来の感染症が家畜に感染すると、畜産業や社会的経済的損失を生じる。③野生動物から人へ伝達される感染症は近年増加している。人獣共通感染症の伝播を防止するために、動物側の感染症の定期的モニタリングを実施することは意義がある。野生動物の感染症が人に伝播される場合、幾つかのパターンがある。ライム病は早期に診断、治療を行えば問題ないが、慢性化すると関節炎、心臓障害、脳神経炎が引き起こされ致命的となることさえある。ボレリアはマダニ類が媒介し、げっ歯類、シカ類などの野生動物も人と共に感染環に入っ

おり、森林の再生に伴いシカなどマダニの吸血源が増えたために、世界的に患者が増加傾向にあると考えられている。ナショナルジオグラフィックが2008年度に発表した地球環境変化に伴う「死に至る12の病」のうち、少なくとも5つはライム病をはじめとする節足動物媒介性感染症である。

(3)生態系は近年大きく変化している。野性生物保護の恩恵を受け、天敵となる狼が存在しないことから野性のシカは著しく増加し、ヒトとの接点が近接した状態にある。大形野生動物はマダニ個体群維持だけでなく、その増加にマダニの増加にも関連していると考えられる。北海道では、一時期絶滅に追い込まれたエゾシカが全道に分布し、マダニの吸血対象となっている。本州では、生息地拡大のため、尾瀬の湿原が食害を受けている。シカに注目した理由はこうした環境変化ともリンクさせて調査が可能である。

## 2. 研究の目的

(1)抗菌ペプチドは広く植物、無脊椎動物、脊椎動物に存在し、重要な自然免疫のキープクターとなっている。ダニにはダニデフェンシンが存在し、感染防御だけでなくマダニに共生できる細菌をふるい分けしていると考えられる。たとえば、カメムシでは共生細菌は一般的に母子間伝播され、母虫が産卵時に自分の持つ共生細菌の一部を卵のそばに排出し、孵化幼虫がこれを摂取する。節足動物のデフェンシンに注目すると、6個のシステムによって立体構造を構築している。この構造がマダニデフェンシンの活性に重要であるという仮説を立てた。ヒトにおけるデフェンシンファミリー ( $\beta$ シートはあるが $\alpha$ ヘリックスはない) およびカセリシジンファ

ミリー ( $\alpha$ ヘリックスのみ) 両者の基本構造がマダニデフェンシンには存在し、無脊椎-脊椎動物の違いが構造と機能分化を説明しうると考えた。本研究では立体構造を推定し、立体構造を構築したマダニデフェンシンと2次構造のみのペプチドを合成し、その活性の違いを明らかにする。特に、共生細菌のふり分け機構と抗菌メカニズムについてフローラ解析過程で分離した細菌を用いて調べる。

(2) マダニ吸血によって、種々の唾液成分ともにマダニデフェンシンは寄生対象の動物に注入される。そこで、マダニ暴露状況を知るために、野生シカのマダニデフェンシンに対する抗体応答を調べた。日本は南北に長く、ブラキストンラインで生物相が大きく異なるため、北海道と東北での比較を重点化し調査した。

### 3. 研究の方法

#### ペプチド合成

ペプチドの合成は固相法で合成し、最終標品は高速液体クロマトグラフィー (逆相液体クロマトグラフィー) で精製する。HPLC カラムとしては YMC A-302: ODS, 150 X 4.6 mm I. D. を用い、設定温度は 40 あるいは 60 ° C とした (Exp Appl Acarol, 2009, Isogai E et al.)。マダニデフェンシンに特徴的な 6 つのシステインは S S 結合していると考えられる。すでに、立体構造の解析が終了している昆虫のリンケージと同様に最も安定した分子内構造が推測される。そこで、S S 結合は Aerial Oxidation による。3 D 構造体と考えられる最終産物はマススペクトロメトリーによって確認した。シュルツエマダニ (日本のライム病媒介マダニ) 由来のデフェンシンについて 3 D 構造を持たないデフェンシンもあわせて作成した。マダニデフェンシンとの比較

のため、哺乳類由来の抗菌ペプチドを合成した。

ホモロジーモデリングによる立体構造の推定:

モチーフの情報、および、S-S架橋の情報からホモロジーモデルで初期構造を作成し、10nsecのシミュレーションを実行した。シミュレーション後に構造サンプリングを行い、得られた構造 (架橋の有無についてそれぞれ10,000件程度を

想定) を、交差RMSDを計算してクラスタリングし、代表的な構造を数個 (個数はクラスタリング結果に依存) 取得して計算結果とした。対象動物: 北海道の野性エゾシカおよび東北地方の野性日本シカを対象動物とする。これらの血清サンプルは 1975 年から現在に至るまで集めたものである (Microbiol Immunol, 1994 および 1996, Isogai E et al., Appl Environment Microbiol, 1995, Kimura K et al.)。東北地方では、青森県十和田コロニー、岩手県三陸コロニー、宮城県川渡コロニーを対象とする。エゾシカの調査によってマダニ分布の情報を得る。

マダニデフェンシンに対する抗体応答は E L I S A で調べる。種々のマダニのデフェンシンはペプチドコーティングキットで 9 6 穴マイクロプレートにコーティングする。血清中の抗体はペルオキシダーゼ標識プロテイン G で検出した。

### 4. 研究成果

構造推定はホモロジーモデリングによった。ホモロジーモデリングの結果から18個の代表構造を得た。アミノ酸配列のみで S-S 結合を持たない構造ではサンプリングされた構造はいずれも  $\alpha 1 \beta 1$  モチーフを取っておらず、ペプチド鎖はランダムな構造を取っていることがわかった。ヘリックス構造の一部はシ

ミュレーション過程で比較的構造が保持されているが、シート構造はシミュレーション過程ではほぼ観察できず、ランダムコンフォメーションをとることがわかった。S-S結合を持った構造では全体の形状としてはやや折れ曲がったラグビーボール状の構造を取っていた。構成する残基のうち、Arg (13, 16, 20, 21, 38) はヘリックス末端からシート構造にかかる部分に集中して存在し、親水性が非常に高い領域を形成していた(図1)。この領域の対極にあたる部分には、Phe2、Leu28、Phe29などの疎水性の残基が集まり、疎水性の高い領域を形成しており、構造全体としては一方の端点は親水性、もう一方の端点は疎水性となっている。こうした特徴は脂質分子と類似しており、生体膜に対する親和性のある程度持つのではないかと考えられる。なお、本研究はアクセルリス社との共同研究による。

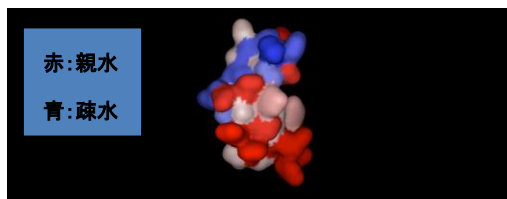


図1. マダニデフェンシンの構造

S-S結合をもつ構造体ともたない構造体で抗菌活性を比較したところ、有意に抗菌活性はS-S結合をもつ構造体のほうが高かった。図2にCumulative inhibition rateを示す。このことから、マダニデフェンシンの活性発現に立体構造は重要な役割を演じていることが分かった。

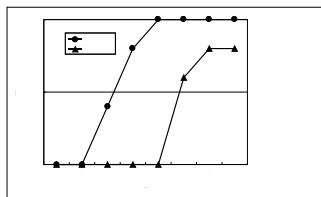


図2. 指標菌を用いた2種類の構造体の抗菌活性の違い (Exp Appl Acar, 53, 71-77, 2011)

北海道の野性エゾシカおよび東北地方の野性日本シカにおけるマダニデフェンシンの対する抗体価を調べたところ、シュルツェマダニ由来のデフェンシンに対する抗体価および抗体陽性率は有意に北海道で高かった。東北地方の野生シカではフタトゲチマダニ由来のデフェンシンに対する抗体価および抗体陽性率は有意に高かった。ライム病ボレリアに対する抗体価とマダニデフェンシンに対する抗体を調べたところ、相関がみられた。以上のことから、合成マダニデフェンシンに対する抗体を吸血対象である野生動物を用いて調べることは地域におけるマダニ媒介性感染症のリスクを知るために有用であろうと考えられた。

## 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4件)

- ① 磯貝恵美子、磯貝 浩、脊椎動物と無脊椎動物の抗菌ペプチド、無菌生物 (J. germfree life gnotobiol) 42 (1), 42-45, 2012 (総説、査読なし)
- ② Isogai E, Isogai H, Okumura K, Hori H, Tsuruta H, Kurebayashi Y. Tertiary structure-related activity of tick defensin (persulcatusin) in the taiga tick, *Ixodes persulcatus*. Exp Appl Acar, 53, 71-77, 2011 Doi: 10.1007/s10493-010-9379-3 (査読あり)
- ③ 磯貝恵美子、秋葉敬斉、関 翔太、堀 初

弘、磯貝 浩、小林美智子、奥村一彦、マダニデフェンシンの中腸由来細菌に対する抗菌活性、無菌生物 41 (2)、113-116、2011 (査読なし)

- ④ 磯貝恵美子、米山 裕、磯貝 浩、ライム病感受性に関する遺伝的要因の解析、遺伝育種研究 39(1)、26-30、2011 Doi: <http://dx.doi.org/10.5924/abgri.39.26> (総説、査読なし)

[学会発表] (計 5件)

- ① 磯貝恵美子、磯貝 浩、ライム病ボレリアと宿主 (招待講演)、日本ブラキスピラ学会 (特別講演)、2012.7.28 栃木県・自治医科大学
- ② 磯貝恵美子、磯貝 浩、脊椎動物と無脊椎動物の抗菌ペプチド (特別講演)、第45回日本無菌生物ノートバイオロジー学会、2012, 1.12-13、岐阜
- ③ Isogai H, Isogai E. Correlation between levels of antibody against Lyme disease *Borrelia* and tick defensin in wild deer. 3<sup>rd</sup> International Symposium on Antimicrobial Peptides (Amp2012), June 13-15, 2012, Lille, France.
- ④ Isogai E, Isogai N, Sato K, Yoneyama H, Fukuda T, Deguchi Y, Matsubara K, Murata H, Tuboi T, Haritani M, Miyamoto T, Isogai H, Wild deer have antibodies recognizing tick defensin with tertiary structure, Joint Meeting of the 17th International Symposium on Gnotobiology (ISG) and the 34th Congress of Society for Microbial Ecology and Disease (SOMED) (第17回国際無菌生物シンポジウム、第34回国際医学微生物生態学会合同会議), Nov. 20-23, 2011, Yokohama.

- ⑤ Isogai E, Saito T, Ohmura T, Isogai H, Okumura K, Hori H, Yoneyama H, Tsuruta H, Kurebayashi Y. Homology modeling and tertiary structure-related activity of tick defensin (persulcatusin) in the taiga tick, *Ixodes persulcatus*, IUMS, Sept. 6-10, 2011, Sapporo.

[図書] (計 2件)

- ① 磯貝恵美子 : 犬のライム病、動物の感染症 (第3版、共著分担)、247-247、近代出版、2011
- ② 磯貝恵美子 : ライム病、動物病理学各論 (共著分担)、文永堂出版、464-464、2010

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

磯貝 恵美子 (EMIKO ISOGAI)  
東北大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号 : 80113570

##### (2) 研究分担者

磯貝 浩 (HIROSHI ISOGAI)  
札幌医科大学・医学研究科・准教授  
研究者番号 : 50137436

##### (3) 連携研究者 なし