

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450404

研究課題名(和文) ワクモ制御の新展開 薬剤耐性機構の解明とワクチン候補分子の探索

研究課題名(英文) Development of novel control procedures for chicken red mite -studies on molecular mechanism of emergence of acaricide resistant mite and exploration of vaccine candidate molecules-

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：鳥類を宿主とし、養鶏産業に重大な影響を与えている吸血性外部寄生虫であるワクモの新たな防除法確立のため、薬剤抵抗性機構の解明およびワクモに対するワクチン候補分子の探索を行った。ワクモで抵抗性集団が出現している各種薬剤の標的分子遺伝子全領域の塩基配列を解読、抵抗性との関与が推察されるアミノ酸置換の存在を示した。また、次世代シーケンサーによるワクモ各発育ステージのトランスクリプトーム解析により、ワクチン候補分子をコードする遺伝子の塩基配列を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The chicken red mite is known as one of the most problematic blood-sucking ectoparasite in poultry industry. Usually, acaricides are mainly used for prevention of the mite. However, acaricide resistant mites has been emerged worldwide, and development of another effective control procedure for the mite is expected. In the present study, to dissolve the problem, molecular mechanism of drug resistance of the mite was studied and vaccine candidate molecule against the mite were investigated. The nucleotide sequences of the entire coding regions corresponding to the target molecules of each acaricide were determined, and amino acid substitutions involved in the resistance were revealed. Furthermore, transcriptome analysis of all stages of the mite performed with next-generation sequencing revealed nucleotide sequences of transcripts which code vaccine candidate molecules.

研究分野：獣医衛生学

キーワード：ワクモ 制御 薬剤抵抗性 ワクチン 鶏病

1. 研究開始当初の背景

ワクモ (*Dermanyssus gallinae*) は、ダニ目、中気門亜目のワクモ科に属する外部寄生虫で、吸血による生産性への影響から世界の養鶏産業に甚大な被害を与えている。また、ヒトでの寄生例も報告されておりワクモに汚染された養鶏場では従業員離職の一因にもなっている。ワクモの防除には一般に殺ダニ剤が広く使用されるが、主要な薬剤であるピレスロイド、有機リンおよびカーバメイト系薬剤のすべてで、薬剤抵抗性を示すワクモの出現が問題になっている。一方、ワクモの薬剤抵抗性の分子機構については、いずれの薬剤に対しても報告が無く、その詳細は不明である。薬剤抵抗性機構の解明は、将来における新たな防除法確立や抵抗性集団の摘発に不可欠であり、薬剤抵抗性機構の解明は喫緊の問題となっている。また、薬剤に代わるワクモ制御の新たな方法として、ワクモ全虫体抽出物やマダニで効果が報告されている虫体抗原の免疫 (ワクチン) によるワクモ防除について、その可能性が検討され始めている。しかしその効果は未だ限定的で、実用化には至っていない。ワクモの基礎研究はマダニなど他のダニ類に較べ著しく遅れており、上述した薬剤抵抗性機構の解明やワクチン開発の基盤となる遺伝情報も限定的であり、研究発展の障害になっている。

2. 研究の目的

養鶏産業におけるワクモの防除や汚染農場の清浄化は、薬剤抵抗性集団の出現や近年の鶏舎構造複雑化により極めて困難になっている。本研究では、こういったワクモ制御の問題解決とワクモ制御技術の新展開に向けた基盤構築を目的として、1. ワクモにおけるピレスロイド、カーバメイトおよび有機リン系薬剤抵抗性の分子機構解明、および、2. ワクモ制御のための新たな防除法としてダニワクチンに注目、将来のワクモワクチン開発のため、ワクモ各ステージにおけるトランスクリプトーム解析を行い、ワクチン候補分子を探索する。

3. 研究の方法

(1) 発育環各ステージのトランスクリプトーム解析

ワクモの卵、幼ダニ、第一若ダニ、第二若ダニ、飽血成ダニおよび飢餓成ダニから常法によりトータル RNA を抽出し、*de novo* アセンブリーにより得られた配列を BLASTx 解析に供し、各ステージで発現される遺伝子とその発現状況を網羅的に解析する。

(2) ワクチン候補分子の探索

網羅的遺伝子発現解析で得られた配列情報と既報の節足動物配列情報を基に、生命維持との関連が推察されるプロテアーゼ群、プロテアーゼ阻害因子群、その他、生命維持に重要な役割が推定される分子の遺伝子を探索

し、その塩基配列を明らかにする。また吸血や産卵など、ワクモの生命維持に重要な役割を担いワクチン候補となる可能性のある遺伝子を明らかにするため、成ダニについては、吸血後間もない飽血状態と吸血後 1 週間以上放置した飢餓状態で転写産物を比較解析する。

(3) 薬剤抵抗性の分子機構解明

ワクモ野外材料を対象に、有機リン、カーバメイトおよびピレスロイド系薬剤に対する感受性および耐性個体を収集する。

アセチルコリンエステラーゼ遺伝子のクローニング

得られた網羅的配列情報を基に、有機リンおよびカーバメイト系薬剤の標的分子であるコリンエステラーゼ遺伝子や薬剤代謝に重要な CYP450 およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 遺伝子の塩基配列を明らかにする。

ピレスロイド系薬剤の標的分子である電位依存ナトリウムチャンネルを真核細胞発現ベクターにクローニングし機能解析を行う。

4. 研究成果

(1) トランスクリプトーム解析

発育環全ステージで 268,233 の転写産物を検出し、その塩基配列を明らかにした。BLASTx 解析で、55,488 配列が既報の配列と相同性を示し、多くは、カブリダニの一種である *Metaseius occidentalis* の配列と比較的高い相同性を示した。BLASTx 解析で既報の配列との相同性が認められた配列のうち、機能との関係が示された配列について、その概要を図 1 に示す。

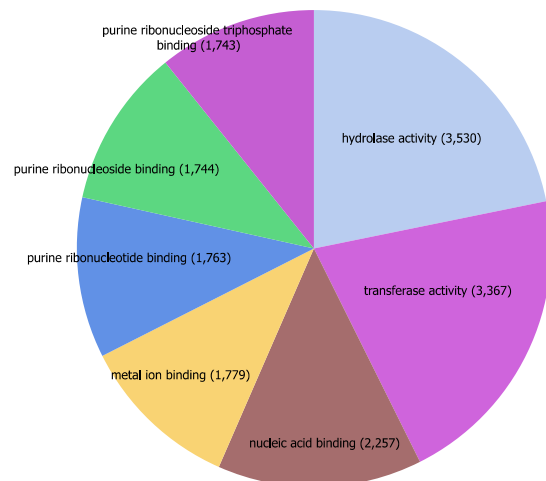


図 1. Sequence Distribution [Molecular Function]

転写産物の各発育ステージでの検出数は、卵 53,235、幼ダニ 67,685、第一若ダニ 72,151、第二若ダニ 63,881、飢餓状態の成ダニ 43,889、飽血状態の成ダニ 56,365、成ダニ 62,741 であった。また、飢餓状態および飽血状態の成ダニの比較では、飢餓状態で発現し、飽血状態で発現が認められなかった転

写産物が少なくとも 5,170、逆に飢餓状態で発現が認められず飽血状態で発現が認められた転写産物が少なくとも 11,612 認められた。これらのうち飽血後の発現量が飢餓状態の 2 倍以上を示した転写産物が 698 存在した。これら転写産物の機能の概要を図 2 に示した。

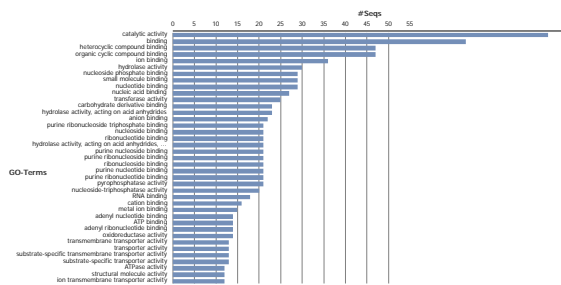


図 2. Sequence Distribution [Molecular Function] - Top 50

このうち飽血状態での発現量が飢餓状態の 100 倍以上を示した転写産物が 32 認められ、これら転写産物の多くは他の節足動物でペプチダーゼ活性を有する分子と比較的高い相性を示し、吸血後に必要となる血液消化との関連が推察された。また飽血状態で飢餓状態と比較して 100 倍以上減少した転写産物は 15 認められた。

(2) ワクチン候補分子の探索

トランスクリプトーム解析の成績を基に、ワクチン候補分子の探索を行った。特に飢餓状態の成ダニ および飽血状態の成ダニにおけるトランスクリプトーム解析から、血液の消化・吸収や抗血液凝固活性などワクモの生命維持との関連が推察されるプロテアーゼ、プロテアーゼインヒビター、チャネル分子など、複数の転写産物塩基配列を明らかにし、ワクチン開発に道を拓いた。

ワクチン候補分子として、蛋白質の立体構造構築に重要な役割を担う protein disulfide isomerase (PDI)に着目、その塩基配列および推定アミノ酸配列の解析からワクモの PDI-2 オルソログと推定される分子を明らかにした。また、この分子が各発育ステージ全てで発現していることを明らかにした。さらに、大腸菌で発現した PDI-2 オルソログを用いた機能解析で、当該分子にジスルフィド結合還元活性のあることを示し、この PDI-2 オルソログ分子が実際に PDI としての機能を有することが示唆され、ワクチン候補としての可能性が示された。

(3) 薬剤耐性の分子機構解明

ピレスロイド、カーバメイトおよび有機リン系薬剤標的分子の解析

各薬剤に感受性および抵抗性を示した各ワクモ集団からピレスロイド系薬剤の標的分子である Na チャネルとカーバメイト系および有機リン系薬剤の標的分子であるアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 遺伝子コー

ド領域の全塩基配列を解読し、抵抗性および感受性集団から得た配列の比較と発現ベクターへのクローニングを行った。

AChE では、推定アミノ酸配列の解析で AChE 共通に認められるコリンエステラーゼモチーフ、カルボキシルエステラーゼ B 活性部位、カタリティックトリアッド、コリン結合部位、オキシアニオンホール、アシルポケットおよび末梢陰イオン結合部位の存在が予測された。また、分子系統解析によりこの遺伝子がクモ綱の AChE1 に近縁であり、ワクモの AChE1 オルソログであることが示唆された。

抵抗性および感受性ワクモ由来の AChE1 推定アミノ酸配列を比較・解析したところ、抵抗性への関与が推察されるアミノ酸置換が 2 ヶ所に認められた。各置換は AChE の末梢イオン部位およびオキシアニオンホールに相当する領域にそれぞれ認められた。これらの領域はいずれも他の節足動物で薬剤抵抗性に関与するアミノ酸変異が報告されている領域に一致し、ワクモにおいてもこれらの変異が薬剤抵抗性に関与することが推察された。

AChE に認められた上記 2 ヶ所のアミノ酸残基および過去の解析で Na チャネルに認められピレスロイド系薬剤抵抗性への関与が推察される 1 箇所のアミノ酸残基について、抵抗性との関係を確認するため、それぞれのコード領域を発現ベクターにクローニングし、抵抗性および感受性配列の各分子について薬剤存在下での機能解析を試みた。各遺伝子について適切にクローン化されたことは確認できたが、残念ながら発現産物の機能確認には至らず、この点についての確認はできなかった。

P450 および GST 遺伝子の塩基配列決定

トランスクリプトーム解析で得られた配列から薬剤代謝に主要な役割を果たす節足動物の P450 および GST 遺伝子と比較的高い相性を示す転写産物の存在を明らかにした。P450 と相性を示す転写産物が 144、GST と相性を示す転写産物が少なくとも 10 存在した。GST については推定アミノ酸配列の解析により、これらがデルタおよびシグマなど既報の各 GST クラスに属することが明らかになった。これにより、ワクモの薬剤抵抗性発現における P450 および GST の機能解析が可能となった。

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)

〔学会発表〕(計 3 件)

石原亜美, 村野多可子, 矢野愛美, 北村夕子, 田中亜依, 西本鉄平, 笛吹達史, 山口剛土: ワクモ *Dermapyssus gallinae* のアセチルコリンエステラーゼ遺伝子の同定. 第 158 回日本獣医学会学術集会. 2015 年 9 月 8 日 (十和田).

北村夕子, 村野多可子, 小川恵実香, 田中亜依, 西本鉄平, Chu Thi Thanh Huong, 笛吹達史, 山口剛士: ワクモ *Dermanyssus gallinae* プロテインジスルフィドイソメラーゼ 2 遺伝子の同定と各発育ステージにおける発現状況解析. 第 67 回日本衛生動物学会大会. 2015 年 3 月 29 日 (金沢).

北村夕子, 村野多可子, 小川恵実香, 田中亜依, 西本鉄平, Chu Thi Thanh Huong, 笛吹達史, 山口剛士: ワクモ *Dermanyssus gallinae* プロテインジスルフィドイソメラーゼ(PDI)遺伝子のクローニングと発現解析. 157 回日本獣医学学会学術集会. 2014 年 9 月 11 日(札幌).

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

村野 多可子 (MURANO, Takako)

北村 夕子 (KITAMURA, Yuko)

田中 亜依 (TANAKA, Ai)

石原 亜美 (ISHIHARA, Tsugumi)