

氏名(本籍)	なか しま よし ろう 中 島 由 郎 (茨城県)
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	博 甲 第 3335 号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	Identification, Characterization and Gene Regulation of Antibacterial Defense Peptides in the Soft Tick, <i>Ornithodoros moubata</i> (Acari : Argasidae) (カズキダニ <i>Ornithodoros moubata</i> における抗細菌性ペプチドの特性に関する研究)
主 査	筑波大学併任教授 理学博士 山 川 稔
副 査	筑波大学教授 農学博士 河 野 義 明
副 査	筑波大学助教授 農学博士 本 田 洋
副 査	筑波大学教授 理学博士 藤 村 達 人

論 文 の 内 容 の 要 旨

吸血性節足動物は、病原微生物の媒介者としてヒト、家畜等に甚大な害を及ぼしている。マダニはカともにも最も重要な衛生動物であるにも関わらず、その生理機能、特に生体防御機構についての情報が乏しいのが現状である。抗細菌性ペプチドは先天的な免疫反応のみによって微生物等の外敵から身を守っている無脊椎動物の免疫反応において重要な働きをしており、マダニにおいても体液から抗細菌性ペプチドであるディフェンシンが単離されている。本研究においては、マダニの一種であるカズキダニ *Ornithodoros moubata* の生体防御機構における抗細菌性ペプチドの役割を解明した。

まずカズキダニから4つのディフェンシンアイソフォームのcDNAをクローニングし、それら全てのcDNAが19残基のシグナルペプチド、17残基のプロセグメント、そして37残基の成熟ペプチドをコードしていることを明らかにした。カズキダニディフェンシンは、それらの成熟ペプチドのアミノ酸配列から無脊椎動物のディフェンシンファミリーに属し、昆虫よりもサソリや貝のディフェンシンに高い相同性を示した。

カズキダニディフェンシンは、恒常的な遺伝子発現を示し、特に中腸において強い発現が観察された。ディフェンシンの遺伝子発現は、宿主の吸血によって中腸において増強された。さらにディフェンシンは中腸ルーメンに分泌されており、吸血後における中腸ルーメン内のディフェンシン濃度の上昇がみられた。このような吸血刺激による免疫反応の活性化は、これまでにカズキダニおよびサシバエの2種の吸血性節足動物でのみ確認されており、吸血時に中腸に侵入する微生物に対する効率的な防御反応であると考えられる。マダニでは、宿主血液を数ヶ月間という長時間をかけて徐々に消化・吸収することから、中腸における防御反応は微生物による血液成分の分解を防ぐ役目を担っていることも推察される。

一方、細菌の接種によってカズキダニディフェンシン遺伝子の発現が増強され、ディフェンシンが体液中へ分泌され、濃度が増加することが明らかとなった。ディフェンシンの遺伝子発現を制御している機構を探るために、プロモーター領域の解析を行った結果、カズキダニディフェンシンのプロモーター領域には、Rel/NF- κ Bファミリーの転写因子が認識する配列が存在した。Rel/NF- κ B転写因子は昆虫だけでなく

脊椎動物の免疫遺伝子の発現を制御している。カズキダニにおいても Rel/NF- κ B ファミリーのタンパク質 (OmRel) が存在し、そのクローニングに成功した。さらに OmRel が *in vitro* においてディフェンシンのプロモーター領域に作用してその転写を活性化させたことから、OmRel がディフェンシン遺伝子の発現を制御している因子の一つであると思われる。これらの結果は、免疫に関わるシグナル伝達経路が種を越えて保存されている可能性を強く示唆するものである。

次に、カズキダニディフェンシンの機能を、化学合成したディフェンシンを用いて解析した。その結果、カズキダニディフェンシンが MRSA を含むグラム陽性細菌に対して強い抗菌活性を示し、殺菌的に働いていることを解明した。しかし、グラム陰性細菌に対する強い抗細菌活性は認められなかった。カズキダニディフェンシンの主な殺菌機構は、細菌細胞膜に損傷を与え細胞質内容物を流出させることであることが電子顕微鏡を用いた形態学的な解析等から明らかとなった。一方、カズキダニディフェンシンはヒトやウサギの赤血球に対してほとんど溶血を示さず、哺乳動物の細胞に対する毒性が極めて低いことがわかった。

本研究によってカズキダニの生体防御反応においてディフェンシンが重要な役割を果たしていることが明らかとなった。今回、カズキダニから得られた生体防御機構における様々な知見が、衛生動物マダニの防除や医薬あるいは畜産分野における治療薬としての応用に繋がることが期待される。

審査の結果の要旨

本研究は、ヒトや家畜に病原微生物を媒介するダニの生体防御機構における抗細菌性ペプチドの生理作用と遺伝子発現を分子生物学的に明らかにすることを目的に行われている。ダニ類の抗細菌性ペプチドに関する研究は極めて少なく、cDNA のクローニングとその塩基配列から推測される完全鎖長のアミノ酸配列が明らかにされた例はない。本研究においてはカズキダニから4つのディフェンシンアイソフォーム cDNA クローニングと塩基配列の決定を行いアミノ酸配列を明らかにした。さらにダニの吸血時や細菌感染時におけるこれらディフェンシン遺伝子発現の誘導を解析すると共に、ディフェンシン遺伝子のプロモーター領域を解析し Rel/NF- κ B 認識配列の重要性を明らかにした。またこの Rel/NF- κ B 認識配列に作用する転写因子 OmRel の cDNA をクローニングしその機能を確認した。本研究の特徴の一つは、抗細菌性ペプチドのアミノ配列を明らかにすると共にその遺伝子発現様式を詳細に解析し、シグナル伝達的一端を明らかにしていることである。

一方、ディフェンシンのアミノ酸配列の情報を基にそのペプチドを化学的に合成し、さらにジスルフィド結合による架橋を正確に行わせることにより天然のものと同じ折りたたみ構造をもつものを作出した。この合成ペプチドは天然のものと同様の抗細菌活性をもつことが確認された。人工合成ペプチドを用い、グラム陽性細菌のみに作用することを明らかにした。またこのペプチドがどのようなメカニズムで細菌を殺すのかを明らかにするため、電子顕微鏡観察を行い細菌の膜に異常が生ずることを見出した。ディフェンシンが細菌の膜に直接作用することは、物理化学的手法でも確認された。この抗細菌性ペプチドはもともとダニ血液中にわずかしかな分泌されないので、体系的な研究を行うには量の確保が重要である。本研究においては、その問題を化学合成することにより解決しており、きめ細かな説得力のあるデータが得られている。以上の一連の成果はそれ自体高く評価されると共に、病原微生物を媒介するダニ類の防除やペプチド性抗生物質のような新規薬剤の創製に役立つものと思われる。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。