

—最近における動物衛生研究情報 (Ⅷ)—

マダニの吸血調節物質

辻 尚利† (動物衛生研究所人獣感染症研究チーム主任研究員)



マダニ防除対策は家畜の生産性向上を図る上で極めて重要な課題であり、マダニ駆除のために新しい制御技術の開発が常に求められている。著者らは、現行殺ダニ剤に代わる、マダニの生理・生態に立脚した安全で環境に優しい新たな抗マダニ薬の開発を目指し、マダニの『吸血』に注目し、現在その分子基盤の解明を進めている。

1 はじめに

吸血性節足動物のマダニは4つの発育ステージ(卵—幼ダニ—若ダニ—成ダニ)を保有するが、この特徴ある

生活環を維持するためには栄養源を獲得するために宿主からの『吸血』が欠かせない(図1)。しかし、生存基盤とも言える『吸血』の分子機構についてはほとんど未解明のままである。著者らはマダニが保有する吸血調節物質の構造と機能を基に、マダニワクチンや抗マダニ薬さらにマダニ媒介性感染症の予防・治療薬を開発することを目指して、マダニの器官別完全長cDNAデータベース、マダニアレイ及び遺伝子操作によって特定の物質を作り出せないノックダウンマダニなど分子論的解析に必要な研究基盤整備を行い、多様に富んだ吸血の仕組みを解き明かす研究プロジェクトを開始した [1]。

マダニは外部寄生虫として体表に付着後、宿主に気づかれられないよう実に巧みに吸血を進行させている。この間に唾液腺からは宿主に付着して固着する際に必要なセメ

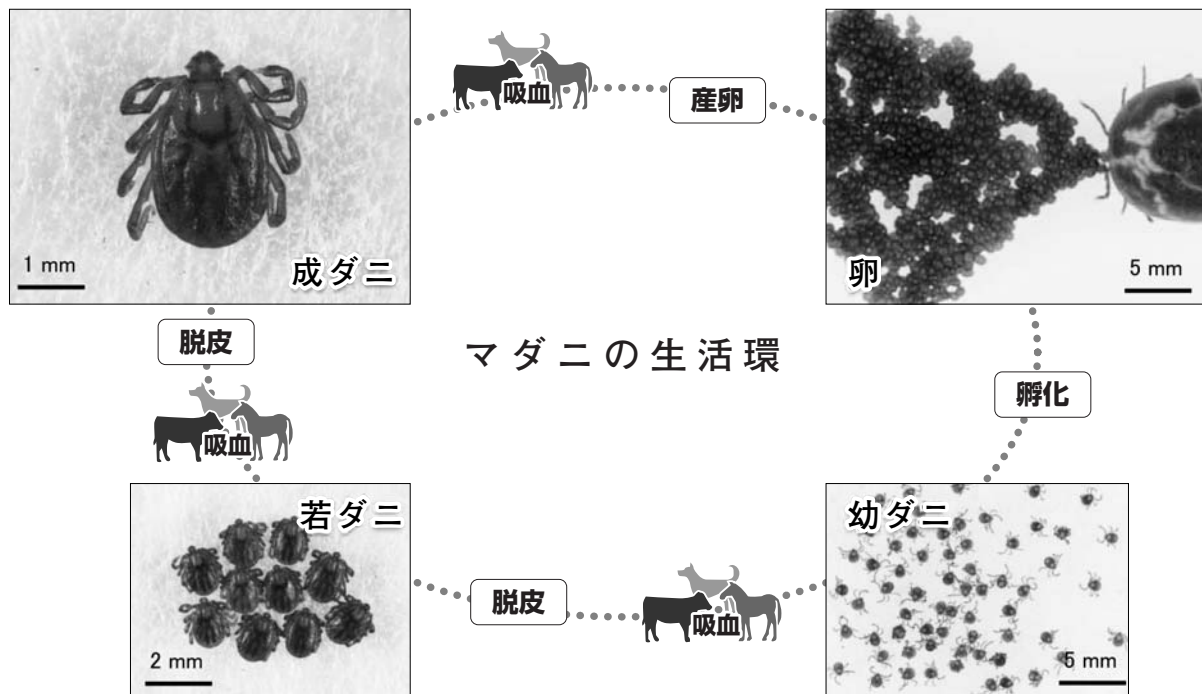


図1 わが国最優占種マダニのフタトゲチマダニの生活環

マダニの発育と産卵には吸血が必要である。我々が研究に用いている国内最優占種マダニのフタトゲチマダニは、ベクターとして動物・人の病原体を伝播する。牛・犬バベシア症の病原虫であるバベシア原虫は、吸血によって成ダニ体内に入ると、中腸から卵巣・産下卵に移行するため、幼ダニが汚染源となる。(原図は三好猛晴博士提供)

† 連絡責任者：辻 尚利 (独農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所人獣感染症研究チーム)

〒305-0856 つくば市観音台3-1-5 ☎029-838-7749 FAX 029-838-7880 E-mail: tsujin@affrc.go.jp

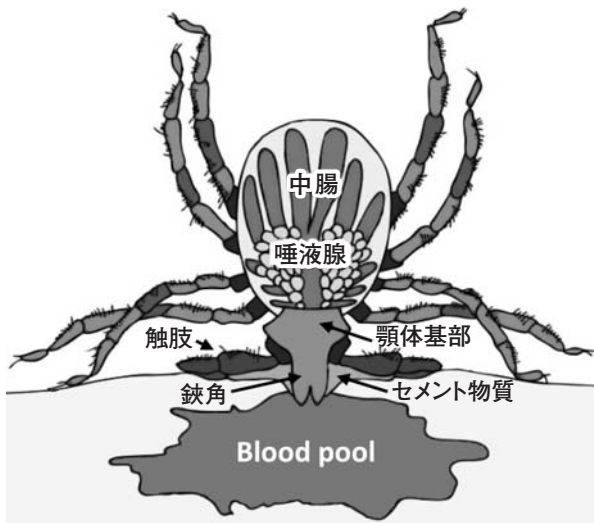


図2 マダニの唾液腺、中腸及び吸血部位の模式図

宿主皮膚に固着後、破綻した血管から宿主血液が Blood pool に溜められ、唾液腺から産生される抗血液凝固物質など多種多様な薬理物質によって、大量かつ長時間に及ぶ吸血を可能にしている (Pool feeding 型)。比較対照されやすい蚊などの吸血昆虫は毛細血管に直接刺入された口器を通して吸血する (vessel feeding 型)。

ント様物質などを分泌し、抗止血物質、血管新生抑制物質などの物質を宿主内に放出しながら、宿主血液を中腸内に取り込んでいることが分かってきた。一方、中腸には血液構成成分をアミノ酸へと分解する発達した細胞内消化機構が備わっており、未吸血時体重の数百倍にも及ぶ宿主血液を取り入れることが可能となっている。このようにマダニの吸血は、多種多様なマダニ吸血調節物質が唾液腺や中腸で産生され、細胞・器官レベルの連携・協調の相互作用によって営まれていることが分かってきた (図2)。本稿では、マダニ唾液腺及び中腸で産生される吸血調節物質の役割について、著者らの最新知見を取り入れて紹介したい。

2 唾液腺から分泌される吸血調節物質

(1) 吸血プロセスに参画する多種多様な吸血調節物質

マダニの吸血様式は、蚊などの吸血昆虫とは大きく異なる。マダニは宿主皮下を破壊して、Blood pool と呼ばれる一種の血液貯留庫を作り上げ、ここから長期にわたり大量の宿主血液を摂取する [2]。当然、止血を防ぐために、これまでにマダニ唾液腺からは抗血小板物質、抗血液凝固物質、抗血管収縮物質などの止血阻害物質 [3] が産生されていることが分かっていたが、著者らはこれらの物質だけでは付着・吸血部位における宿主の炎症・創傷反応を未然に防ぐことは難しいものと考えている。著者らはノックダウンマダニの作製により、宿主毛細血管の新生を抑制し、大量かつ持続吸血を可能にする

ヘマンギン
ノックダウンマダニ

対照マダニ

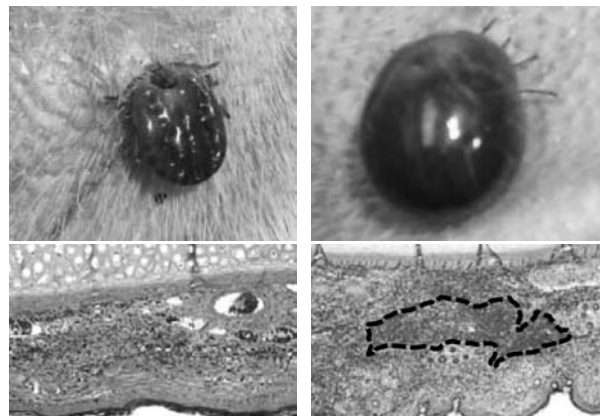


図3 ヘマンギンをノックダウンしたフタトゲチマダニにおける吸血不全

上図：吸血が進まないヘマンギンノックダウンマダニ (付着後6日目)。

下図：皮下組織に形成された Blood pool (波線部内、HE 染色)

ノックダウンマダニ：マダニの吸血調節物質の役割を明らかにする上で、特定の遺伝子を発現できないマダニを準備することが必要であるが、著者らは、改良を重ねた結果、マダニ研究分野では世界に先駆けて特定の遺伝子発現を抑制する『ノックダウンマダニ』の作出に成功している。このマダニをウサギなどの実験動物に付着・吸血させることで、吸血調節物質がどのように吸血行動に影響を及ぼすかを明らかにすることができるようになった。実際、ノックダウンマダニを活用すると、*in vitro* の実験系では解明できないマダニに特有の機能が見出されてきた。

新規の血管新生抑制物質、ヘマンギンを見出した [4]。

(2) Blood pool の形成・維持に必要な吸血調節物質

ヘマンギンは発見当初、そのアミノ酸構造から加水分解酵素のセリンプロテアーゼを特異的に阻害する内在性阻害剤として同定された。しかし、ヘマンギンノックダウンマダニを耳袋法によりウサギに付着させると、著しい吸血阻害とともに、宿主皮下における Blood pool の形成不全が惹起されていることが吸血部位の組織切片において認められた (図3)。そこで、著者らは炎症・創傷治癒の阻害に働くヘマンギンの役割を想定し、正常培養条件下では増殖・接合により血管形成像を呈するヒト臍帯静脈内皮細胞を用いて機能を検証した。その結果、添加したヘマンギンの濃度依存的に内皮細胞の増殖が抑制され、血管形成が阻害されることが分かった。次いで、ニワトリ絨毛尿膜を用いて、内皮細胞の増殖抑制効果を検証したところ、ヘマンギンは *in vivo* でも毛細血管の増殖を顕著に抑制することが分かった (図4)。創傷治癒アッセイによっても、濃度依存的に血管内皮細胞の増殖を抑制し、傷の修復を遅延させることが観察され、ノッ

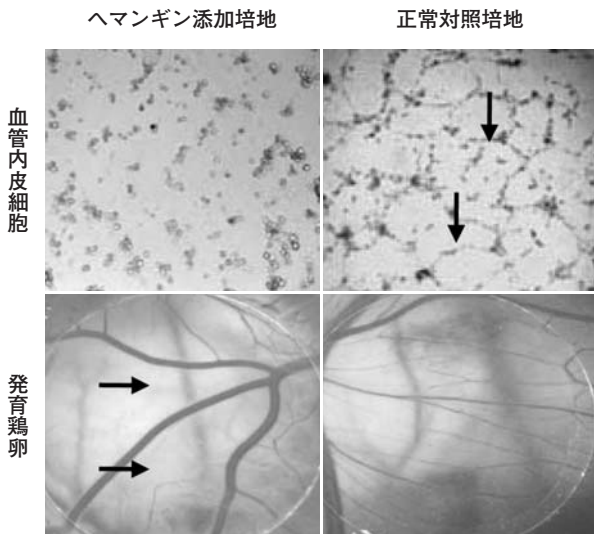


図4 ヘマンギンによる血管新生抑制作用

上図：正常ヒト臍帯静脈内皮細胞を用いた *in vitro* 解析。

対照培地では内皮細胞の管腔形成（矢印）が認められたのに対し，ヘマンギン添加によってそれが阻止された。

下図：絨毛尿膜を用いた *in vivo* 解析．ヘマンギンによって血管新生の抑制が確認された（矢印付近）

クダウマダニとウサギの実験系の活用によって，新たに血管新生・創傷治癒を阻害する役割を担う吸血調節物質を見出すことに至った．また，最近ではBlood poolの形成に不可欠なロンギスタチンに，フィブリノーゲン α ， β 及び γ 鎖を加水分解し，フィブリンクロット形成を遅延させる作用があることを突き止め，新たな抗血液凝固経路が見出されている [5, 6]．興味深いことに，ヘマンギンやロンギスタチンの産生は，吸血開始から飽血直前まで増加するものの，飽血時には完全に停止することから，宿主から落下した後は吸血調節物質としての役割は終了すると思われる．一方，こうした魅力的な薬理物質を数多く保有するマダニは，人医療に応用する分子ハンティングの対象としてたいへん注目されている [3]．マダニはこれまで節足動物界最強の Pharmacologist [7] であると言われていたが，将来，マダニ唾液腺由来の血液・循環器薬が誕生するかもしれない。

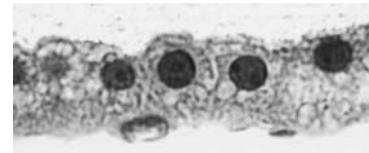
3 中腸で産生される吸血調節物質

(1) 緩慢な血液消化を支える蛋白分解酵素群

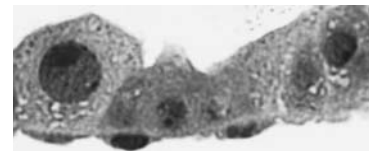
中腸に取り込んだ血液の消化機構についても吸血昆虫とマダニでは大きく異なる．蚊は中腸内腔部で宿主血液を迅速に消化するのに対し，マダニでは中腸上皮細胞内で行われる細胞内消化によってアミノ酸へと分解される [2]．実際に，中腸上皮細胞は血液の取り込み開始時から摂取した血液量に応じて成長し，飽血時には何十倍にも巨大化する (図5)．著者らは，マダニのアミノ酸供給



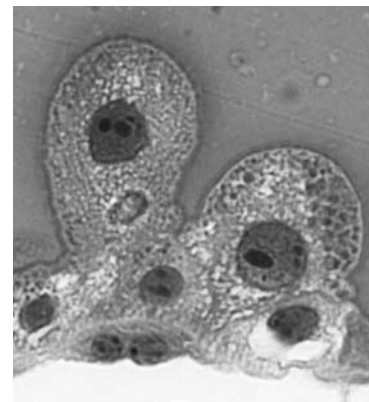
未吸血



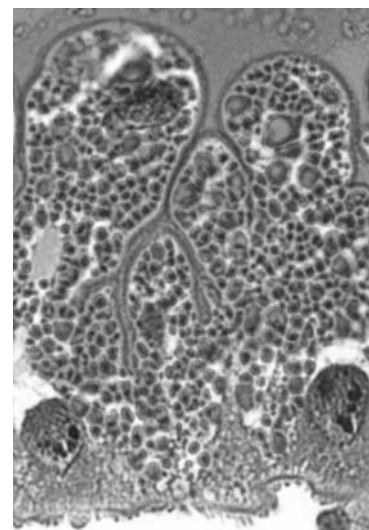
吸血開始後24時間



吸血開始後72時間



吸血開始後96時間



飽血時

図5 吸血プロセス・飽血における中腸上皮細胞の変化

未吸血時には平坦な上皮細胞は吸血とともに発育し，吸血開始後約72時間より中腸内腔に向かって隆起する．吸血開始後約96時間以降になるとヘモグロビンを活発に取り込む貪食像が観察される．

(原図は三好猛晴博士提供)

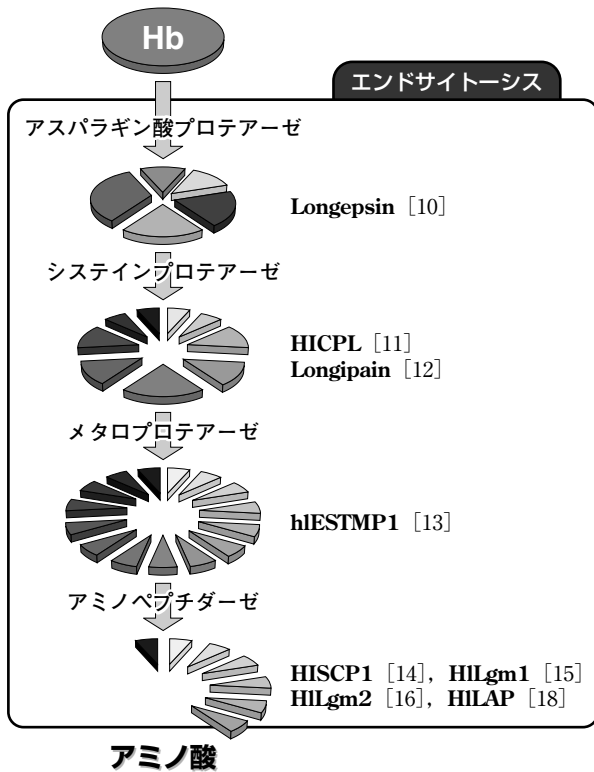


図6 マダニ中腸上皮細胞におけるヘモグロビン分解経路
各種加水分解酵素の協調的働きによって宿主ヘモグロビンはアミノ酸へと分解される。

源は主に宿主血液の主要構成成分であるヘモグロビン(Hb)であることに着目し、中腸上皮細胞における分解経路を探った。まずHbは中腸内腔において、セリンプロテアーゼ [8, 9] による赤血球の溶血作用から生じ、ファゴサイトーシスによって中腸上皮細胞に取り込まれる。その後Hbはリゾソームに移動し、ロンゲプシン [10], HICPL [11], ロンギパイン [12], hESTMP1 [13], HISCP [14] などの加水分解酵素によってペプチド断片化され、次いで細胞質内のレグマイン [15-17] やHILAP [18, 19] によって、アミノ酸へと分解されることが判明し、図6の『ヘモグロビン分解経路』の発見に至っている。また、フィードフォワードに働くこれら加水分解酵素に対して、三好ら・山地らはフィードバック的に作用するシスタチンなどの内在性阻害剤の存在を明らかにしている [20-22]。定量PCRやマダニアレイを用いてヘモグロビン分解経路参画遺伝子の発現を調べてみると、あたかもプログラムされているように、吸血の時間軸に沿って実に精妙に発現が制御されていることが分かった。また、それらの発現は空間的にも局在が刻々と変化することから、中腸上皮細胞におけるHb分解は加水分解酵素と内在性阻害剤の連携・協調からなることが強く示唆されている。実際に、吸血不全に陥ったHICPLノックダウンマダニにおけるヘモグロビン分解経路参画分子の発現プロファイルを調べてみると、統制

を欠いた著しく不規則な発現状態が認められ、ヘモグロビン分解経路の破綻が招来されたことが確認されている (Yamaji et al, 未発表)。

(2) 血液消化と病原体伝播の2役を果たすヘモグロビン分解経路

マダニは吸血と同時にウイルスから寄生虫までの動物・人の病原体を伝播するが、伝播される病原体側からすると、外界との境界である中腸は生存・増殖する上で最大のバリエーションであると言える。著者らはすでに中腸上皮細胞で産生されるマダニ自然免疫のエフェクター、抗菌ペプチドの一種であるロンギシン [23, 24] が、牛・馬・犬のバベシア原虫に対して殺原虫作用を示すことを報告したが、新たに、ヘモグロビン分解経路参画分子もバベシア原虫の分化・増殖に影響を及ぼすことを見出した。犬バベシア原虫 *Babesia gibsoni* 感染イヌに付着させたロンギパインノックダウンマダニは、吸血不全や産卵数低下に陥り、吸血量が著しく減少するにもかかわらず、介卵伝播される *B. gibsoni* 数は顕著に増加することが確認された [12]。すなわち、ロンギパインノックダウンマダニにおいて、吸血障害や繁殖障害をきたすと同時に、介卵伝播における *B. gibsoni* の過剰伝播が惹起されることを見出した。また、ヘモグロビン分解経路の下流で働くロイシンアミノペプチダーゼをノックダウンしたマダニでも *B. gibsoni* の過剰な介卵伝播が惹起されることが確認されている [25]。これらの結果から、著者らは中腸上皮細胞内に存在するヘモグロビン分解経路は、Hb分解と病原体伝播の2役 (Dual function) を果たしていると結論づけている。また、こうした役割を果たす吸血調節物質は、著者らの共同研究者である藤崎ら [26] によって、卵黄合成に必要なピテロジェニンレセプターのノックダウンマダニでも認められている。したがって、マダニの吸血と病原体伝播は、吸血調節物質間の連携と協調によるクロストーク・ネットワークによって営まれているものと考えられ、ヘモグロビン分解経路は栄養代謝としてだけでなく、マダニ体内を移行する病原体伝播の恒常性維持に深く関わっていることが想定される。

4 おわりに

著者らは、マダニ吸血プロセスで働く、吸血調節物質の存在を明らかにしてきたが、決してこれらは単独で働くものではない。すなわち、マダニの吸血は細胞・組織・器官内でネットワーク化された極めて巧妙な吸血システムであると見なすことができる。マダニの吸血の仕組みをしっかりと論理的に説明できるようになれば、吸血昆虫を含め家畜や伴侶動物の害虫となっている吸血動物に普遍的な特性が見出されると考える。マダニ吸血調節物質は宿主が保有しないため、格好の薬剤の標的となり

える。今後、構造生物学やケミカルバイオロジー [27]などを広く取り入れることにより、吸血調節物質の機能を逆手に取ったマダニワクチンや、吸血調節物質の生理機能を特異的に阻害する Structure-based drug design による抗マダニ剤が誕生し、実際の畜産・動物医療の場
に供されることを強く願っている。

この研究は、生研センター・基礎研究推進事業、文部科学省科学研究費補助金によるものであり、多くの共同研究者の皆様
に感謝する。

参 考 文 献

- [1] 藤崎幸蔵：創薬開発のマダニ生物活性分子，マダニ特有の吸血・消化の分子機構の解明を中心として，日本獣医寄生虫学雑誌，8，23-35 (2009)
- [2] Obenchain F, Galun R : Physiology of Ticks, Pergamon Press, Oxford (1982)
- [3] Hovius JW, et al : Salivating for knowledge : potential pharmacological agents in tick saliva, PLoS Med, 5, e43 (2008)
- [4] Islam MK, et al : The Kunitz-like modulatory protein, Haemangin, is vital for hard tick blood feeding success, PLoS Pathog, 5, e1000497 (2009)
- [5] Anisuzzaman, et al : Longistatin, a novel EF-hand protein from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*, is a potent plasminogen activator and is required for anticoagulation of host blood-meals, Int J Parasitol, 40, 721-729 (2010)
- [6] Anisuzzaman, et al : Longistatin from the haematophagous tick is a fibrin clot-bound plasminogen activator and is key to the feeding of hosts' unclotted blood-meals, PLoS Pathog, in press (2011)
- [7] Ribeiro JM : Blood-feeding arthropods : live syringes or invertebrate pharmacologists? Infect Agents Dis, 4, 143-152 (1995)
- [8] Miyoshi T, et al : Molecular and reverse genetic characterization of serine proteinase-induced hemolysis in the midgut of the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*, J Insect Physiol, 53, 195-203 (2007)
- [9] Miyoshi T, et al : A set of serine proteinase paralogs are required for blood digestion in the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*, Parasitol Int, 57, 499-505 (2008)
- [10] Boldbaatar D, et al : Molecular cloning and functional characterization of an aspartic protease from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*, Insect Biochem Mol Biol, 36, 25-36 (2006)
- [11] Yamaji K, et al : Hemoglobinase activity of a cysteine protease from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*, Parasitol Int, 58, 232-237 (2009)
- [12] Tsuji N, et al : A cysteine protease is critical for *Babesia* spp. transmission in *Haemaphysalis* ticks, PLoS Pathog, 4, e1000062, 1-14 (2008)
- [13] Harnnoi T, et al : Molecular characterization and comparative study of 6 salivary gland metalloproteases from the hard tick, *Haemaphysalis longicornis*, Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 147, 93-101 (2007)
- [14] Motobu M, et al : Molecular characterization of a blood-induced serine carboxypeptidase from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*, FEBS J, 274, 3299-3312 (2007).
- [15] Alim MA, et al : Legumains from the hard tick *Haemaphysalis longicornis* play modulatory roles in blood feeding and gut cellular remodeling and impact on embryogenesis, Int J Parasitol, 39, 97-107 (2009)
- [16] Alim MA, et al : HILgm2, a member of asparaginyl endopeptidases/legumains in the midgut of the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis* is involved in blood-meal digestion, J Insect Physiol, 54, 573-585 (2008)
- [17] Alim MA, et al : Characterization of asparaginyl endopeptidase, legumain induced by blood feeding in the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*, Insect Biochem Mol Biol, 37, 911-922 (2007).
- [18] Hatta T, et al : Identification and characterisation of a leucine aminopeptidase from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*, Int J Parasitol, 36, 1123-1132 (2006)
- [19] Hatta T, et al : Leucine aminopeptidase, HILAP, from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*, plays vital roles in the development of oocytes, Parasitol Int, 59, 286-289 (2010)
- [20] Miyoshi T, et al : A Kunitz-type trypsin inhibitor from the midgut of the ixodid tick and its endogenous target serine proteinase, Mol Biochem Parasitol, 170, 112-115 (2010)
- [21] Yamaji K, et al : Hlcyst-1 and Hlcyst-2 are potential inhibitors of HICPL-A in the midgut of the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*, J Vet Med Sci, 72, 599-604 (2010)
- [22] Yamaji K, et al : A salivary cystatin, HISC-1, from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis* play roles in the blood feeding processes, Parasitol Res, 106, 61-68 (2009)
- [23] Tsuji N, et al : Babesial vector tick defensin against *Babesia* sp. parasites, Infect Immun, 75, 3633-3640 (2007)
- [24] Tsuji N, Fujisaki K : Longicin plays crucial role for the transmission of *Babesia* parasites in the vector tick *Haemaphysalis longicornis*, Future Microbiol, 2, 575-578 (2007)
- [25] Hatta T, et al : Leucine aminopeptidase in the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis* : endogenous expression profiles in midgut, J Vet Med Sci, 71, 589-594 (2009)
- [26] Boldbaatar D, et al : Tick vitellogenin receptor reveals critical role in oocyte development and transovarial transmission of *Babesia* parasite, Biochem Cell Biol, 86, 331-344 (2008)
- [27] 北潔ら：核酸およびレドックス調節パスウェイを標的とする抗トリパノソーマ薬の開発，蛋白質核酸酵素，54，1676-1683 (2009)