

令和元年6月5日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08454

研究課題名(和文) グルコース摂取機構から探るエキノкокスの寄生適応戦略

研究課題名(英文) Molecular and functional characterization of glucose transporter genes of the fox tapeworm *Echinococcus multilocularis*

研究代表者

松本 淳 (MATSUMOTO, Jun)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：70296169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：エキノкокス(Em)は、北半球の広い地域で人獣に被害をもたらしている寄生虫である。成虫期には犬科動物の腸管内、幼虫期にはげっ歯類の肝臓に寄生する。幼虫はヒトにも寄生してがんのように増殖し、致死的な被害をもたらす。Emは、宿主体内で活発に発育・増殖するための主要なエネルギー源としてグルコースを宿主から横取りしているが、その分子機構は不明であった。本研究では、Emのグルコース摂取に関与すると推測される3種類のトランスポーター遺伝子を見出し、そのグルコース輸送特性の一端を明らかにした。また、Emが、発育期や寄生環境に応じて複数の異なるトランスポーターを使い分けていることを示唆する知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エキノкокス(Em)の人獣に対する主要な病害は、幼虫期の活発な増殖に起因する。Emのグルコース摂取機構は、虫体の活発な増殖を支えるエネルギー代謝機構の根幹をなすものであり、したがって、虫体増殖による疾病を制御するためのアキレス腱であると考えられる。そのグルコース摂取に関わる分子機構の一部を初めて明らかにした点に、本研究の学術的意義がある。本研究で対象としたEmとその近縁寄生虫類は、人体のみならず様々な家畜や伴侶動物にも寄生し、世界中で深刻な被害をもたらしている。本研究により得られた知見は、近縁寄生虫類による疾病の制御への波及効果も期待される。

研究成果の概要(英文)：Echinococcus multilocularis is a zoonotic parasite, causing serious health problems in animals and humans. The parasite lacks a digestive tract and absorbs essential nutrients, including glucose, across the syncytial tegument on its external surface. We characterized glucose transporter homologues from *E. multilocularis*. As a result, we obtained full-length sequences of 2 putative glucose transporter genes (EmGLUT1 and EmGLUT2). Functional expression analysis using *Xenopus* oocytes demonstrated clear uptake of glucose by EmGLUT1, but not by EmGLUT2. Further analyses revealed that glucose uptake of EmGLUT1 did not depend on the presence of Na⁺ nor H⁺, respectively. Immunoblot analyses demonstrated that both EmGLUTs were stably expressed during each developmental stage of the parasite. We conclude that EmGLUT1 is a simple facilitated glucose transporter and possibly plays an important role in glucose uptake by *E. multilocularis* throughout its life cycle.

研究分野：寄生虫学

キーワード：エキノкокス グルコース トランスポーター 寄生虫 蠕虫

1. 研究開始当初の背景

エキノкокクス *Echinococcus multilocularis* (以下、Em) は、北半球の広い地域に分布する人獣共通寄生虫である。自然界の Em は、その虫卵を摂取したげっ歯類の肝臓に寄生して幼虫へと成長し、この感染げっ歯類を捕食した犬科動物の消化管内で成虫へと発育することで、生活環を維持している (図1)。幼虫期の Em はヒトにも偶発的に感染し、その体内で悪性腫瘍のように組織浸潤性に無性増殖する。このような Em の特殊な増殖様式が、人体に致死的な病害を及ぼす要因となっている。Em 症に対する有効な治療薬はなく、感染症法が定める四類感染症として、その制御法の確立が急がれている。

Em は、その活発な増殖を維持するために、多量のエネルギーを消費する。種々ある栄養素の中で、グルコースは生体にとって最も普遍的なエネルギー源として利用されており、Em もグルコースを主要なエネルギー源として利用することが明らかにされている。Em を含む条虫類は、消化管を持たず、発育・増殖に必要な栄養素を虫体表面から吸収している。したがって、Em の体表面には、高機能な輸送分子群が存在すると推測されるが、Em のグルコース摂取に関わる分子機構については、これまで報告がない。

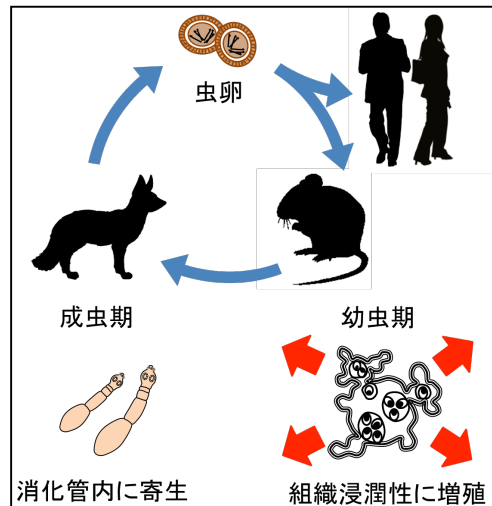


図1. エキノкокクスの生活環

2. 研究の目的

本研究では、Em によるグルコース摂取に関わる分子としてグルコーストランスポーターに着目し、その基質輸送能の特性を明らかにするとともに、虫体の寄生環境の変化にともなう遺伝子発現パターンの転換を明らかにすることにより、図2に示す作業仮説の検証を目指した。具体的には、次の3項目の解明を主な目的とした。

(1) アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて、トランスポーターによる基質輸送機能の特性を明らかにする。特に、種々の単糖類に対する輸送基質特異性および輸送活性、能動輸送型/受動輸送型の機能タイプ、種々の阻害剤に対する感受性を明らかにする。

(2) 成虫期および幼虫期虫体における各トランスポーターの発現レベルを、転写 (mRNA) レベルおよび翻訳 (タンパク) レベルで比較定量する。これにより、各発育期の虫体によるグルコース摂取に主要な役割を担うトランスポーター分子種の転換を明らかにする。

(3) グルコース濃度の異なる環境で培養した虫体を用いた解析をおこない、グルコース環境と各トランスポーターの発現パターンの関連を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Em 由来グルコーストランスポーター遺伝子のクローニングと全長塩基配列の解読：

既に構築していた Em の cDNA ライブラリーから、近縁条虫種 (有鉤条虫) 由来の受動輸送型グルコーストランスポーター遺伝子 (以下、GLUT) およびマガキ (二枚貝) 由来の Na^+ 濃度依存的に糖を輸送する能動輸送型のグルコーストランスポーター遺伝子 (以下、SGLT) に相同性の高い塩基配列 (部分配列) をそれぞれ選出した。これらの配列を参考にプライマーを設計し、RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法およびプライマーウォーキングにより、Em 由

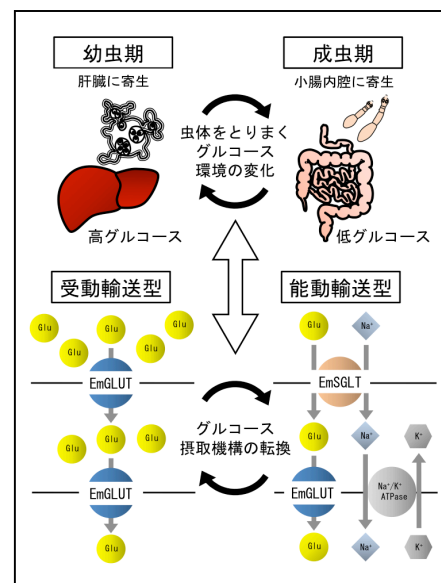


図2. 作業仮説：
寄生環境の変化にともなう
グルコース摂取機構の転換

来の各トランスポーター遺伝子の全長を解読した。

(2) グルコーストランスポーターの基質輸送機能特性の解析：

Em から取得したグルコーストランスポーター遺伝子の cDNA を、アフリカツメガエル卵母細胞発現用のプラスミドベクターに挿入し、これを鋳型として相補的 RNA を合成した。この相補的 RNA をマイクロインジェクターで注入することにより、トランスポーター遺伝子を発現したカエル卵母細胞を作製し、基質輸送機能特性の解析に供した。評価項目は、グルコースを含む種々の単糖類に対する基質特異性、主要基質であるグルコースの輸送能力、グルコース輸送における Na^+ イオン依存性（能動輸送型/受動輸送型の機能タイピング）およびプロトン依存性、種々の阻害剤に対する感受性とした。また、グルコース以外の糖による競合阻害の有無を観察することにより、トランスポーターの輸送基質特異性を評価した。

(3) 虫体発育期別のトランスポーター発現レベルの比較：

リアルタイム PCR 法により、成虫期および幼虫期における各トランスポーターの mRNA 発現レベルを定量的に評価した。さらに、特異抗体を用いたウエスタンブロット法により、発育期別のタンパク発現レベルを評価した。本解析で使用したポリクローナル抗体は、各トランスポーターの遺伝子情報をもとに合成したポリペプチドをウサギに免疫することにより作製した。これらの解析により、各発育期の虫体によるグルコース摂取に関与するトランスポーター分子種の転換について検討した。

4. 研究成果

(1) Em 由来グルコーストランスポーター遺伝子のクローニングと全長塩基配列の解読：

解析の結果、受動輸送型トランスポーター遺伝子 2 種類 (EmGLUT1・EmGLUT2)、および能動輸送型トランスポーター遺伝子 1 種類 (EmSGLT) のクローニングに成功し、各遺伝子の全長塩基配列を取得した。EmGLUT1 および EmGLUT2 はそれぞれ 509 個および 500 個のアミノ酸をコードしており、予測された構造上の特徴は、一般的な哺乳動物由来 GLUT と一致した。一方、EmSGLT は 698 個のアミノ酸をコードし、14 回膜貫通領域を有するなど、予測された構造上の特徴は一般的な哺乳動物の SGLT と一致した。以上から、Em によるグルコース摂取には、GLUT と SGLT の両タイプのトランスポーターが機能していることが示唆された。

全長アミノ酸配列に基づく系統解析の結果、2 種類の EmGLUT は、いずれもヒト由来および有鉤条虫由来の GLUT と同じグループを形成した。一方、EmSGLT はヒト由来およびマガキ由来の SGLT と同じグループを形成した。以上のように、今回取得した 3 種類のトランスポーター遺伝子は、他種生物の機能的グルコーストランスポーターと高い相同性を示した。

(2) グルコーストランスポーターの基質輸送機能特性の解析：

EmGLUT1 および EmGLUT2 を発現させたカエル卵母細胞を用いてグルコースの取り込みを観察した結果、EmGLUT1 では明らかなグルコース取り込みが確認されたのに対して、EmGLUT2 では取り込みが観察されなかった (図 3A)。次に、EmGLUT1 について、同じくカエル卵母細胞発現系を用いてグルコース輸送能の特性を解析した。その結果、

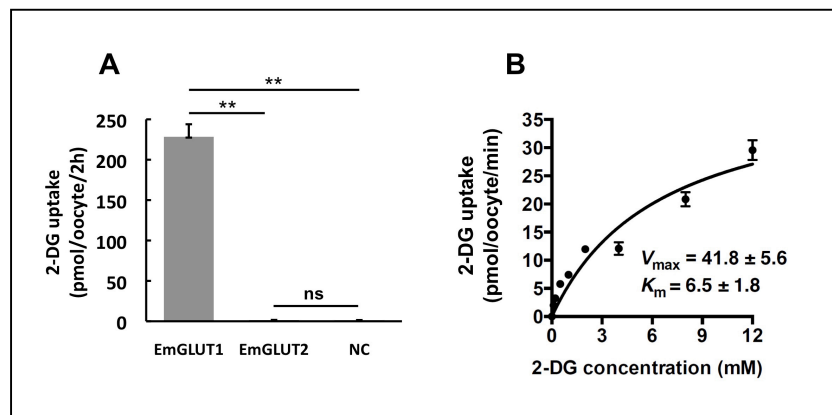


図 3. EmGLUT1 および EmGLUT2 のグルコース輸送能
A : EmGLUT1 および EmGLUT2 によるグルコースの取り込み
B : EmGLUT1 によるグルコース取り込みの動態

EmGLUT1 とグルコースの親和性を示す K_m は $6.5 \pm 1.8 \text{mM}$ 、EmGLUT1 によるグルコースの最大輸送速度 V_{max} は $41.8 \pm 5.8 \text{mM}$ であった (図 3B)。次に、 Na^+ およびプロトンに対する依

存性を検討した結果、EmGLUT1 によるグルコース輸送はいずれのイオンにも依存しないことが明らかとなった。さらに、促進拡散型グルコーストランスポーターに対する阻害剤サイトカラシン B による阻害試験では、グルコース輸送が有意に阻害された。以上の輸送特性から、EmGLUT1 は促進拡散型のグルコーストランスポーターであると考えられる。各種の糖を用いた阻害試験では、単糖類であるマンノース・フルクトース・ガラクトースが EmGLUT1 によるグルコースの吸収を競合的に阻害した。一方、2 糖類であるマルトースはグルコースの吸収を阻害しなかった。以上の結果から、EmGLUT1 はグルコースを含む複数種の単糖類を輸送する機能を持つと考えられる。なお、EmSGLT によるグルコース輸送機能特性については、今後解析していく予定である。

(3) 虫体発育期別のトランスポーター発現レベルの比較：

リアルタイム PCR 法により、成虫期および幼虫期における各トランスポーターの mRNA 発現レベルを評価した。その結果、EmGLUT1 および EmGLUT2 の発現量には、成虫期と幼虫期との間に明らかな違いはなく、両発育期で安定して発現されていることが確認された。一方、EmSGLT の発現レベルは幼虫期に高く、成虫期に対して 10 倍以上の発現が観察された。次に、EmGLUT1 および EmGLUT2 のタンパク発現をウエスタンブロット法により評価した。その結果、両トランスポーターの発現にはタンパクレベルでも明らかな違いはなく、両発育期で安定して発現されていた。以上の結果から、受動輸送型の EmGLUT1 および EmGLUT2 は、成虫期および幼虫期を通して安定して発現され、Em によるグルコース輸送に恒常的に関与していることが示唆された。一方、能動輸送型の EmSGLT は、特に幼虫期のグルコース輸送に関わっていることが示唆された。本解析の結果から、Em は輸送特性の異なる複数のグルコーストランスポーターを有しており、発育期や寄生環境に応じて使い分けて必要なグルコースを摂取していると推測される。

トランスポーター発現レベルを質量分析法によりタンパクレベルで定量するための方法についても検討を進めた。これまでに、上述した 3 種類 (EmGLUT1・EmGLUT2・EmSGLT) のトランスポーターを定量するための標準ペプチドを設計して予備実験をおこない、定量のための適切な条件を決定した。この方法により、虫体の発育やグルコース環境の変化にともなう各トランスポーターの発現パターンの転換についても検討する予定だったが(「2. 研究の目的(3)」)、これについては実施できなかった。今後、これらの課題について検討を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Kuroki, K., Morishima, Y., Neil, J., Beerntsen, B., Matsumoto, J., and Stich, B. (2019): Intestinal echinococcosis in a pet dog from Missouri. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 印刷中. (査読あり)
- ② 松本 淳 (2019) : 人体エキノコックス症に対する治療薬開発研究の現状と展望. *病原微生物検出情報*, 40(3): 7-8. (査読なし)
- ③ Kashiide, T., Kikuta, S., Yamaguchi, M., Irie, T., Kouguchi, H., Yagi, K., and Matsumoto, J. (2018): Molecular and functional characterization of glucose transporter genes of the fox tapeworm *Echinococcus multilocularis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 225: 7-14. (査読あり)
- ④ Masuda, A., Sumiyoshi, T., Ohtaki, T., and Matsumoto, J. (2018): Prevalence and molecular subtyping of *Blastocystis* from dairy cattle in Kanagawa, Japan. *Parasitology International*, 67: 702-705. (査読あり)
- ⑤ Kouguchi, H., Irie, T., Matsumoto, J., Furuoka, H., Ishiwata, K., Nakao, R., and Yagi, K. (2018): Gene expression profiles of the small intestinal mucosa of dogs repeatedly infected with the cestode *Echinococcus multilocularis*. *Data in Brief*, 17: 180-183. (査読あり)
- ⑥ 松本 淳 (2017) : 人獣共通寄生虫エキノコックス : 国内の多包条虫を中心に. *MP アグロジャーナル*, 28: 38-41. (査読なし)
- ⑦ Kouguchi, H., Irie, T., Matsumoto, J., Nakao, R., Sugano, Y., Oku, Y., Yagi, K. (2016): The timing of worm exclusion in dogs repeatedly infected with the cestode *Echinococcus multilocularis*. *Journal of Helminthology*, 90(6): 766-772. (査読あり)

⑧ Armua-Fernandez, M.T., Joekel, D., Schweiger, A., Eichenberger, R.M., Matsumoto, J., and Deplazes, P. (2016): Successful intestinal *Echinococcus multilocularis* oncosphere invasion and establishment in resistant RccHanTM:WIST rats after pharmacological immunosuppression. *Parasitology*, 143(10): 1252-1260. (査読あり)

⑨ Hyuga, A., and Matsumoto, J. (2015): A survey of gastrointestinal parasites of alpacas (*Vicugna pacos*) raised in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 78(4): 719-721. (査読あり)

〔学会発表〕 (計 8 件)

① 松本 淳. エキノコックスとの遭遇に備えて ～知っておくべき 大切なポイント～. 第 15 回日本獣医内科学アカデミー学術大会, 2019 年 2 月, 神奈川県・横浜市.

② 松本 淳. エキノコックス症対策における獣医師の役割. 平成 29 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会, 2018 年 2 月, 大分県・別府市.

③ 田中優美, 檜出拓哉, 山谷吉樹, 亘 敏広, 松本 淳. 国内飼養犬への *Mesocestoides vogae* (syn. *M. corti*) 寄生例について. 第 160 回日本獣医学会学術集会, 2017 年 9 月, 鹿児島県・鹿児島市.

④ 今里裕平, 中尾 亮, 入江隆夫, 孝口裕一, 松本 淳, 八木欣平, 片倉 賢. *Echinococcus multilocularis* 根室株の虫卵感染マウスにおけるマイクロ RNA 解析. 第 86 回日本寄生虫学会大会, 2017 年 5 月, 北海道・札幌市.

⑤ 山口美咲, 松本 淳. 多包条虫のグルコース摂取・代謝機構解明を目指して - PEPCK のクローニングと機能解析 -. 第 10 回 蠕虫研究会, 2016 年 11 月, 静岡県・熱海市.

⑥ 今里裕平, 中尾 亮, 入江隆夫, 孝口裕一, 松本 淳, 八木欣平, 片倉 賢. 幼虫期 *Echinococcus multilocularis* 根室株の miRNA 解析. 第 159 回日本獣医学会学術集会, 2016 年 9 月, 神奈川県・藤沢市.

⑦ Kashiide, T., Kikuta, S., Yamaguchi, M., Kato, T., Irie, T., Kouguchi, H., Yagi, K., Matsumoto, J. Characterization of glucose transporter genes from fox tapeworm *Echinococcus multilocularis*. *Molecular and Cellular Biology of Helminth Parasites IX*, 2015 年 9 月, ギリシャ・イドラ.

⑧ Kashiide, T., Kikuta, S., Yamaguchi, M., Kato, T., Irie, T., Kouguchi, H., Yagi, K., Matsumoto, J. Molecular and functional characterization of glucose transporter genes from *Echinococcus multilocularis*. 25th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 2015 年 8 月, イギリス・リバプール.

〔図書〕 (計 5 件)

① 松本 淳 (分担), 動物寄生虫病学 (四訂版), 朝倉書店, 2019 年. 368.

② 松本 淳 (分担), 最新 獣医寄生虫学・寄生虫病学, 講談社, 2019 年. 384.

③ 松本 淳 (分担), 犬と猫の検査・手技ガイド 2019, インターブー, 2019 年. 822.

④ Enkai, S., Sakamoto, K., Kaneko, M., Kouguchi, H., Irie, T., Yagi, K., Matsumoto, J., Oku, Y., Katakura, K., Fujita, O., Nozaki, T., and Kita, K. Medical treatment of *Echinococcus multilocularis* and new horizons for drug discovery: Characterization of mitochondrial complex II as a potential drug target. In: *Echinococcosis* (Tnay Inceboz, ed.), InTechOpen, 2017 年. 69.

⑤ 松本 淳 (分担), 寄生虫病学 改訂版, 緑書房, 2017 年. 232.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

日本大学・獣医学科・医動物学研究室ホームページ (<http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~vetpara/index.html>) にて、研究成果の一部を公開。

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：孝口 裕一
ローマ字氏名：KOUGUCHI, Hirokazu
所属研究機関名：北海道立衛生研究所
部局名：その他部局等
職名：主査
研究者番号：50435567

研究分担者氏名：上家 潤一
ローマ字氏名：KAMIIE, Junichi
所属研究機関名：麻布大学
部局名：獣医学部
職名：准教授
研究者番号：10400269

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：八木 欣平
ローマ字氏名：YAGI, Kinpei

研究協力者氏名：樫出 拓哉
ローマ字氏名：KASHIIDE, Takuya

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。