

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14775

研究課題名(和文) 吸虫類のスポロシストにみられる形態および運動能の多様性

研究課題名(英文) Morphological diversity in sporocysts of trematoda species

研究代表者

佐々木 瑞希 (Mizuki, Sasaki)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：00632126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではロイコクロリディウム属吸虫の色素解析を行った。褐色色素は水溶性であり、カロテノイドと類似する400-500 nmをピークとする吸収波長を示した。ピーク部分においては4種以上のタンパク質が確認された。一方、緑色色素は水にも有機溶媒にも不溶だが、ProK処理によりアセトンに溶解した。よって、いずれの色素もタンパク質に結合していた。現在アミノ酸配列の解析中だが、その際に使用する本種の遺伝子配列データベース作成のため、ゲノムおよびmRNAの解析を行った。今後はアミノ酸シーケンスデータとの照合意外にも、幼虫と成虫、あるいは幼虫の有色部と無色部の遺伝子発現量の違いなどを解析する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Leucochloridium属については、形態にもとづいた分類が行われてきたが、遺伝子学的同定が可能な種はわずかである。また、成虫のみならず幼虫の特徴的な色彩からも同定が試みられてきたが、その色素や運動能についてはほとんど研究がなされて来なかった。本研究では日本における本属吸虫の種および分布を明らかにし、形態学および分子学的同定を可能にしたのみでなく、その色素を解析することで「擬態」とも考えられる本属吸虫の特徴を追求した。これにより、寄生生活への適応機構の解明や吸虫類の多様性の証明につながると考えている。

研究成果の概要(英文)：Two species of genus Leucochloridium are distributed in Hokkaido, Japan. The sporocysts of these species appear as a colorful broodsac to the antenna of land snail, genus Succinea. The pigment components of Leucochloridium perturbatum and Leucochloridium paradoxum were analyzed. As a result, brown pigment in *L. perturbatum* was water soluble, with a peak absorption in 400-500 nm. This pigment was revealed to bind to some proteins by SDS-PAGE of peak fraction. The green pigment in *L. paradoxum* was insoluble to water and organic solvent, however, became soluble to acetone after treatment by proteinase K. Therefore, both pigment bind to proteins. To determine amino acid sequences of them, genome and transcriptome data were analyzed using NGS.

研究分野：寄生虫学

キーワード：吸虫 スポロシスト ロイコクロリディウム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

吸虫類の成虫はおもに脊椎動物に寄生し、糞便とともに排出された虫卵もしくは孵化した幼虫が第1中間宿主に取り込まれ、無性的に増殖してスポロシストとなる。このスポロシストの形態は吸虫の種によって多様である。中でも *Leucochloridium* 属吸虫のスポロシストは中間宿主であるオカモノアラガイの触角において、まるで節足動物の幼虫のような色彩と動きを示す(図1)ことで知られており、これは終宿主である鳥類に捕食されやすいよう適応した結果の『擬態』と考えられている。『擬態』と考えられる形態、色彩並びに運動性を示す寄生虫は *Leucochloridium* 属吸虫のみであるが、進化の過程においてその形態、色彩および運動性をどのようにして獲得したかは不明である。



図1

2. 研究の目的

Leucochloridium 属吸虫のスポロシストを形態学および分子学的に解析することにより、本属吸虫の『擬態』と思わざるをえない形質が生じたメカニズムを知ることである。

3. 研究の方法

(1) *Leucochloridium* 属吸虫2種のサンプリングと色素解析

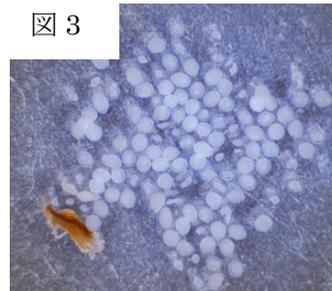
北海道に分布する *Leucochloridium perturbatum* (褐色色素をもつ) ならびに *Leucochloridium paradoxum* (緑色色素をもつ) を採集し、色素の抽出を試みた。色素は図2および3のように broodsac と呼ばれる袋状の部位にのみ存在していた。褐色および緑色色素の解析を試みた。

図2



オカモノアラガイより抽出した broodsac

図3



broodsac を切開したところ。中に入っているメタセルカリアには色はついていない。

(2) 日本における *Leucochloridium* 属吸虫の分布

日本における *Leucochloridium* 属吸虫の分布については、これまで偶発的な発見の報告があるに過ぎず、何種存在するかも不明であった。そこでサンプリングの際に採集場所と形態(おもに broodsac の色)、DNA バーコードとして核 28S リボソーム RNA 遺伝子(28SrDNA) およびミトコンドリア cytochrome c oxidase I 遺伝子(*cox1*) 配列を決定し日本における本属吸虫の分布を明らかにした。

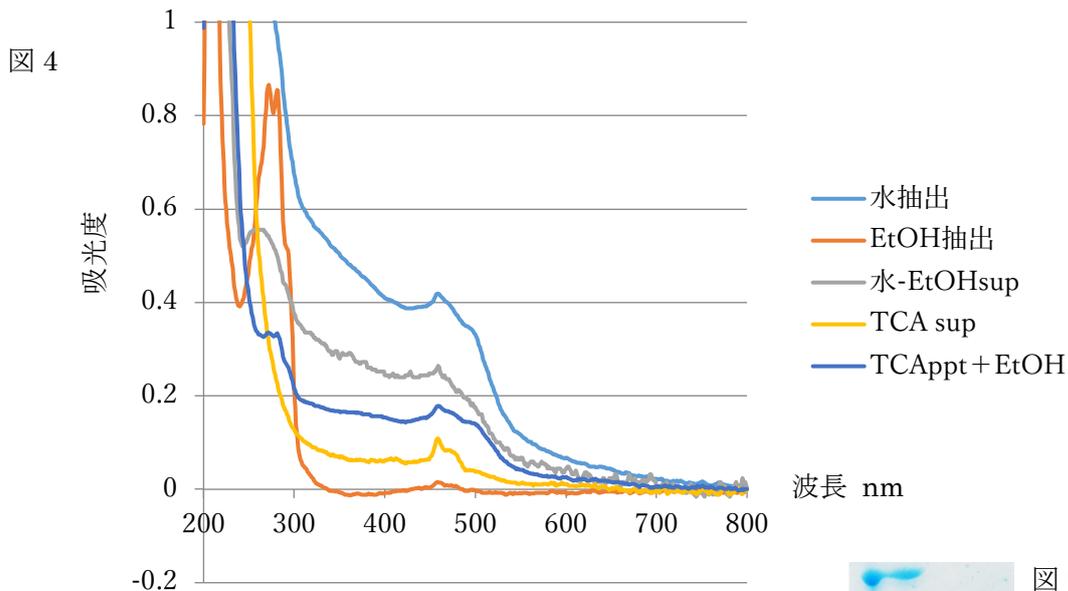
(3) ゲノム解析

これまで数種の吸虫類についてすでにゲノム解読が行われてきたが、*Leucochloridium* 属については行われていない。そこで、北海道で比較的入手しやすい *L. perturbatum* の幼虫よりゲノム DNA および mRNA を回収し、次世代シーケンサーによる解析およびアノテーション付与を行った。解析には先進ゲノム支援プロジェクトの協力を頂いた。

4. 研究成果

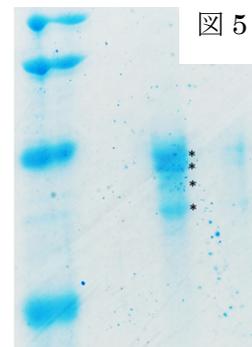
(1) *Leucochloridium* 属吸虫2種の色素解析

2色の broodsac より色素の抽出を試みたところ、褐色色素は水溶性であるのに対し、緑色色素は水に不溶であった。まず、褐色色素について、溶解後 native page により泳動すると、色素はほぼゲルのフロントラインとともに移動した。さらに、この部分を切り出してゲルろ過クロマトグラフィーにて分離し、同時に吸収波長を測定した。その結果、460 nm 付近にピークが観察された(図4)。これは水に溶解した場合に最も高くなり、エタノールにはほぼ溶解しないため、ピークは低くなった。



ピークを示したフラクションについて、SDS-PAGE により展開したところ、4 本のバンドとして確認された (図 5)。ゲル内において褐色は確認できなかった。しかしながらこれらのタンパク質が褐色色素に結合している可能性が高い。このバンドを切り出し、現在、質量分析によりアミノ酸配列の特定を試みている。

一方、緑色色素は水に不溶であったが、その他の有機溶媒にも溶解しなかった。したがって、薄層クロマトグラフィーによる展開が不可能であった。しかしながら、Proteinase K 処理を行った後にアセトン/メタノールにより展開された。現在、色素が分離される条件を検討中である。



(2) 日本における *Leucochloridium* 属吸虫の分布

北海道における採集の過程で、*Leucochloridium* 属吸虫 2 種を検出した。その道内における分布について、実際に採集すると同時に SNS を用いて目撃情報を募った。本属吸虫の幼虫は吸虫の中では例外的に色と柄を有しており、その特徴により種同定が可能である (図 6)。一般の方からの画像などの情報ならびに我々の研究グループによる採集から、北海道各地で 2 種が分布していることが明らかとなった。これら 2 種はヨーロッパで報告されているものと 28S rDNA およびミトコンドリア *cox1* 配列において高い相同性を示した (図 7)。さらに、沖縄から情報が得られ、北海道の 2 種とは別種であることが判明した。沖縄の種はその形態 (色柄) から、台湾などで見られる *Leucochloridium passeri* の可能性が高い。

図 6

日本産 *Leucochloridium* 属吸虫 3 種の broodsac. A. *L. perturbatum*, B. *L. paradoxum*, C. *L. cf. passeri*

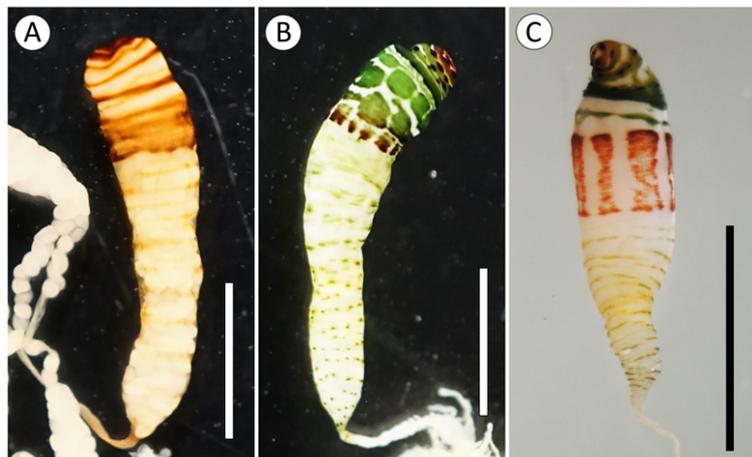
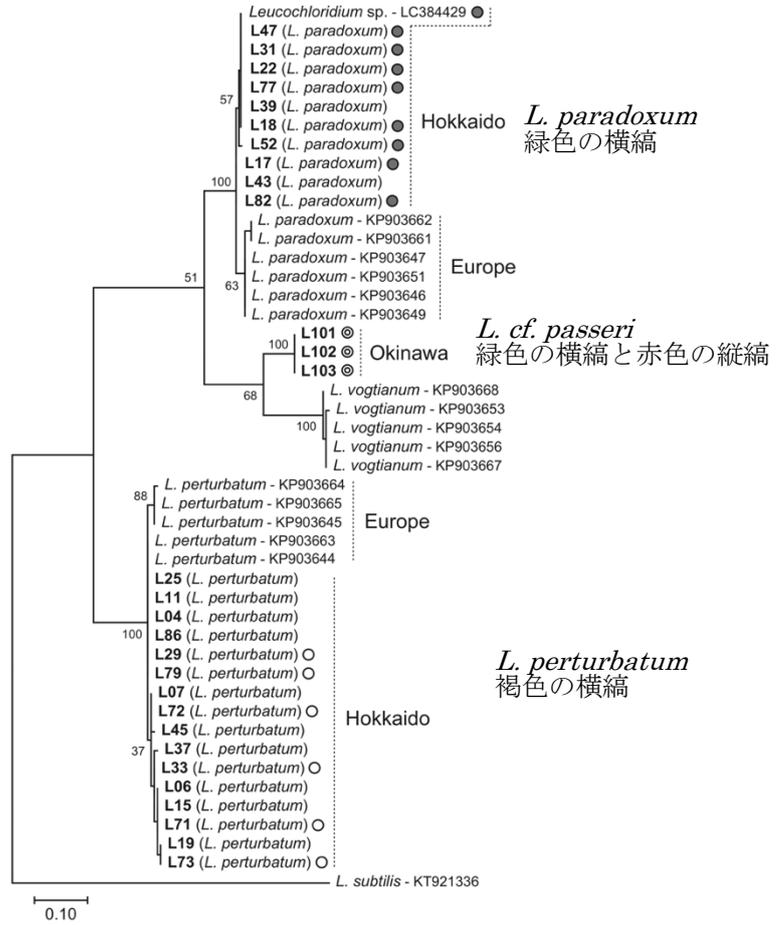


図 7

Leucochloridium 属吸虫 *cox1* 配列に基づく系統樹 (ML 法)。日本に 3 種が認められた。



(3) ゲノム解析

先進ゲノム支援の援助により *L. perturbatum* ゲノム解析を行った。旭川市のオカモノアラガイより採集した幼虫を用いた。*L. perturbatum* の推定ゲノムサイズは 134 Mb であり、ゲノムが解読されている他の吸虫類と比較して低い値であったが、BUSCO による完成度評価の結果、高い完成度が示された。さらに、同じ産地の *L. perturbatum* 幼虫由来の mRNA をシーケンスし、ゲノムシーケンスに対するアノテーションの付与を試みた。その結果、1 万を超える遺伝子が推定され、他の吸虫類および条虫類と比較しても遜色のない、完成度の高いデータが得られた (表)。

以上のことから、本研究で得られたゲノムおよび mRNA 配列データは今後の解析に利用可能なクオリティであった。今後、(1) で得られたアミノ酸シーケンスデータとの照合に利用する。さらに、幼虫と成虫、あるいは幼虫の有色部と無色部の遺伝子発現量の違いなどを解析する予定である。

	<i>S. mansoni</i>	<i>S. japonicum</i>	<i>C. sinensis</i>	<i>E. granulosus</i>	<i>L. perturbatum</i>
遺伝子数	10,144	12,738	13,634	10,245	10,005
遺伝子数/exon数	7.5	5.3	6.9	6.8	7.3
single exon gene数	1,174	1,200	1,716	1,304	531
平均exon長 (bp)	235	222	232	219	218
平均CDS長 (bp)	1,766	1,172	1,591	1,486	1,587
平均intron長 (bp)	2,475	2,058	2,755	685	805
GT-AG splicing site	99.2%	98.3%	99.5%	97.9%	98.7%

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakao Minoru, Sasaki Mizuki, Waki Tsukasa, Iwaki Takashi, Morii Yuta, Yanagida Kazumi, Watanabe Megumi, Tsuchitani Yoshikazu, Saito Takumi, Asakawa Mitsuhiro	4. 巻 72
2. 論文標題 Distribution records of three species of Leucochloridium (Trematoda: Leucochloridiidae) in Japan, with comments on their microtaxonomy and ecology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 101936 ~ 101936
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.parint.2019.101936	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐々木瑞希・中尾稔・巖城隆・脇司・渡辺恵・森井悠太・浅川満彦
2. 発表標題 日本産オカモノアラガイ科陸貝にみられるLeucochloridium属吸虫3種の分布
3. 学会等名 日本寄生虫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木瑞希・中尾稔・巖城隆・脇司・渡辺恵・柳田和美・森井悠太・浅川満彦
2. 発表標題 日本産オカモノアラガイ科陸貝にみられるLeucochloridium属吸虫3種の分布
3. 学会等名 日本動物分類学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----