

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02725

研究課題名(和文) 寄生虫の分子同定と系統解析のための統一標準法の確立

研究課題名(英文) Development of a universal genomic method for the species identification and phylogenetic analysis of parasitic worms

研究代表者

丸山 治彦 (Maruyama, Haruhiko)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：90229625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Caenorhabditis属線虫、Strongyloides属線虫、そしてSpirometra属条虫の精密な系統関係の決定をゲノムシーケンスにより確定させることを目的とした。Caenorhabditis属線虫ではリボソームDNAの塩基配列を用いた系統解析と97個のシングルコピー遺伝子を用いた系統解析の結果はよく一致し、Strongyloides属線虫でも大きく3つの亜種群をタンパク質コード配列により同定することができた。ただしSpirometra属条虫では解析対象数が十分でなく、Spirometra属全体と芽殖孤虫との関係も不明なままであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNAシーケンスの発達により、現在では少量のサンプルから大量の塩基配列情報を比較的容易に得ることができる。これまで、配列情報に基づいた種の同定にはPCRベースでリボソームITS領域やミトコンドリアcox-1等の数百塩基対程度を用いていたが、未知配列を新種とすべきか亜種とすべきか、あるいは系統的な位置づけを決めるには十分なデータ量ではなかった。われわれの研究では未だ後生動物全体に適用できる遺伝子セットを決定するに至っていないが、少なくとも線虫類においては一定数のシングルコピー遺伝子によって正確な系統的な位置を決定できる見通しがあった。フィールド研究・希少種の研究に応用できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present research project, we determined intra-genetic phylogenetic relationships with sets of coding genes in Caenorhabditis, Strongyloides, and Spirometra worms. In Caenorhabditis nematodes, a phylogenetic tree generated with ribosomal DNA matched well with that generated with 97 single copy genes, covering 49 nominal species. In Strongyloides parasites, we partially sequenced nearly 20 species to find three large clades in the genus. They were identified with a set of coding gene sequences as well as ribosomal DNA sequences. In Spirometra tapeworm, however, we could not clarify the intra-genus phylogeny and the phylogenetic position of a bizarre species, Sparganum proliferum, because of the small number of samples we could analyze. Based on the nematode data, we are going to select sets of genes for the evaluation of species/subspecies identification.

研究分野：寄生虫学

キーワード：系統分類 寄生虫 ゲノム情報 糞線虫 マンソン孤虫

1. 研究開始当初の背景

近年、寄生虫の系統分類・同定にはゲノムの塩基配列が重視される。塩基配列は客観的であり、系統的に遠ければ塩基配列の違いが大きくなるので、隔離の程度を定量的に表すことができる。上位分類単位の系統解析には 18S リボソーム遺伝子が用いられ、例えば動物界では脱皮動物と冠輪動物という前口動物を二分する分類群が認識された。線虫類でも、かつての双器綱と双腺綱という形態的な分類に代わって、現在はクレード I ~ クレード V に大きく再編されている。

ところが、属や種のレベルでは塩基配列が却って混乱を招いていることがある。例えば、孤虫症の原因である *Spirometra* 属条虫では、*S. erinaceieuropaei* から *S. decipiens* を独立させるべきだという意見と *S. decipiens* は種として無効とする意見が並立している。また、人体内で増殖し致命的な転帰をもたらす芽殖孤虫 *Sparganum proliferum* が、*Spirometra* とは明らかに別種であるにも関わらず *Spirometra* のグループ内に入ってしまった解析も存在する。細菌では 16S リボソームの塩基配列が 1.5%以上が異なればほぼ別種とされるが、寄生虫は真核生物であり、全体的な相補性やリボソーム配列の違いで機械的に種を定義することは現実的ではない。

以上より、より正確な同定分類のためには現在の方法とは異なったアプローチが必要である。現在は、18S リボソーム遺伝、リボソーム ITS 領域、ミトコンドリア *cox-1* 等が用いられているが、解析長はせいぜい数百塩基対程度であり、線虫で 42~700Mb、吸虫・条虫で 104~1,259Mb に達する寄生虫ゲノムからすると短い。さらに、種内・種間系統を議論する場合に、「こういう遺伝子のこれだけの塩基配列を解析すれば十分である」というコンセンサスが存在していないため、それぞれの研究グループによる解析結果を一定の視点から評価することができず、豊富に存在する塩基配列データを十分有効に活用し切れていない。

2. 研究の目的

多細胞性の寄生虫が門や綱、あるいはもっと高位の分類単位で共通して保有している相同遺伝子の中から、全ゲノム情報を用いた精密な系統解析と同等の結果が得られる遺伝子セットを抽出し、18S リボソーム遺伝子では解析できない属から亜種のレベルでの系統関係を幅広い寄生虫に対して高い信頼性で明らかにできる標準法を確立する。

3. 研究の方法

出発点の全ゲノム系統解析は概要ゲノムが存在する *Strongyloides* 属線虫と *Spirometra* 属条虫で実施する。最初に 200 個程度の相同遺伝子を用いてそれぞれで信頼できる系統樹を作製し、次いで同様の解析結果が得られるような、線虫または条虫に共通する遺伝子セット、さらに蠕虫全てが共通して持つセットと、より高次の分類群を対象を広げていく。

1) 材料

[*Caenorhabditis* 属線虫]

もっともゲノム情報が充実している本属の線虫を用い、シングルコピー遺伝子による系統解析の有効性を検討する。

[*Strongyloides* 属線虫]

これまでに、ヒト、イヌ、ネコ、その他の肉食獣から、糞便培養によって得られた多数のサンプルを用い、ニホンザルに由来する *S. fuelleborni* などを必要に応じて追加する。

[*Spirometra* 属条虫]

アジア産と新大陸産でそれぞれグループを形成する可能性が指摘されていることから、当初は日本、ミャンマー、ペルーで虫体を採取して用いる予定であったが、新規に得られた虫体は日本国内の人体寄生例から得られたもののみであった。

2) DNA シーケンスとリファレンスゲノムへのマッピング

糞線虫類では単一虫体から得られる DNA 量が少ないので、線虫溶解液から全ゲノム増幅を実施しシーケンスに用いる。マンソン孤虫では虫体から得られた DNA を増幅せずにそのまま用いる。DNA からは定法にしたがってライブラリを作製し、ショートリードとロングリードを併用する。取得データ量は 2Gb/サンプル、~40x の depth でゲノム全体をカバーする。

リードのマッピングには *Smalt* を用いる。ミトコンドリア配列についてはシーケンスデータからミトコンドリアリードを抽出し、作製済み *de novo* ミトコンドリアゲノムアセンブリパイプラインでゲノム配列を再構築してミトコンドリア遺伝子すべて (12 protein coding と 2 rRNA) の塩基配列を決定する。

3) 相同遺伝子群を用いた系統解析

[*Caenorhabditis* 属線虫]

モデル生物 *Caenorhabditis elegans* を含む *Caenorhabditis* 属はこれまでに 49 種が記載されており、仮記載種を含めると総種数は 90 以上になる。近年全ゲノム配列の解読が進み、約 60 種についてはゲノム情報が利用可能である。本研究では、これら全ゲノム配列が利用可能なものうち

35種の塩基配列を用いて、様々な遺伝子配列セット（代謝、構造、細胞機能等）による系統解析をおこない、その結果を形態学的分類、生物学的分類と比較する。

[*Strongyloides* 属線虫]

われわれはこれまでに、ミトコンドリア *cox-1* 遺伝子や 18S リボソーム遺伝子等の解析により、糞線虫 *S. stercoralis* の中にいくつかのサブグループがあること、肉食獣由来の *Strongyloides* 属線虫には未記載種の可能性のある糞線虫グループがあることを明らかにしてきた。本研究では、全ゲノム情報が明らかになっている糞線虫属 4種と近縁種 2種の配列情報核から、比較的保存された 13個のシングルコピー遺伝子を選択した。最尤法、ベイズ推定法を導入した分子系統樹推定、集団間の関係の推定をおこなう (RAxML, MrBayes, SplitsTree4)。

[*Spirometra* 属条虫]

Spirometra 属条虫に関しては、これまでに日本 (岡山) 産 *S. erinaceiueuropaei* と、その近縁種であるベネズエラ産芽殖孤虫 *S. proliferum* の概要ゲノムを決定している。そこで、新規のマンスン孤虫サンプルを加えて、上記線虫類と同様にリボソーム DNA とシングルコピー遺伝子を用いて系統解析を実施する。

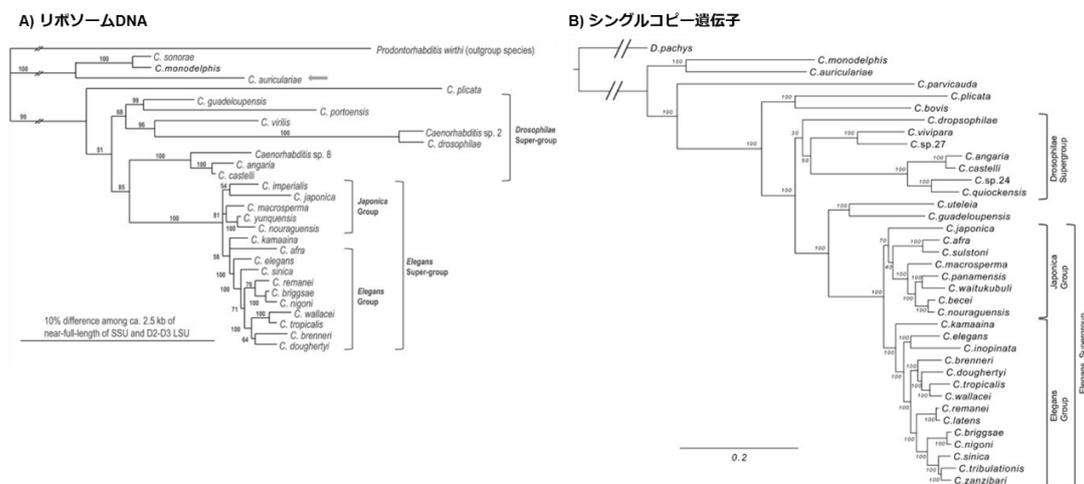
4. 研究成果

[*Caenorhabditis* 属線虫]

これまでの分子のおよび形態学的研究により、*Caenorhabditis* 属線虫にはふたつのスーパーグループ (*elegans* スーパーグループと *drosophila* スーパーグループ) があり、その他これらに属さず両スーパーグループの形態学的特徴を併せ持ついくつかの種は、仮に基部グループとされてきた。今回、愛知県で採集、再記載された基部グループに属する *C. auriculariae* の全ゲノムシーケンスを実施し、系統的な位置を確定させた。

最初に 28種の *Caenorhabditis* 属線虫の 18S rRNA の全長と 28S rRNA D2-D3 領域を用いて系統樹を作成したところ、従来報告されていた系統樹とよく一致することを確認した (図 1A)。次に全ゲノム配列が利用可能な種のうち 35種について 97のシングルコピー遺伝子を用いて系統樹を作成した (図 1B)。基本的なトポロジーはリボソーム DNA と一致しており、ふたつのスーパーグループと基部グループをみとめた。これにより、少なくとも線虫においては、種の識別はリボソーム DNA とシングルコピー遺伝子で安定した結果を得られることがわかった。

図1 *Caenorhabditis* 属線虫の系統樹



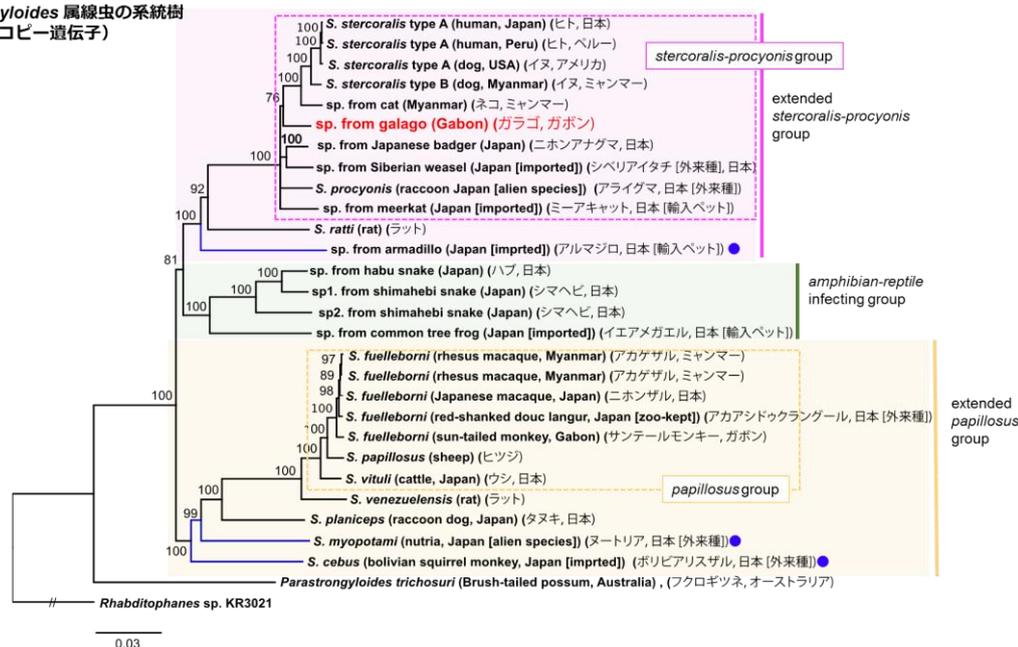
[*Strongyloides* 属線虫]

糞線虫属線虫においては、主にネコ目の宿主腸管から得られた虫体から得られた 18S rRNA、28S rRNA、ミトコンドリア *cox1* 遺伝子 (一部はミトコンドリア全長) の塩基配列から、ヒトに感染する *S. stercoralis* を含む *stercoralis/procyonis* グループと、*planiceps* グループのふたつが存在することを明らかにしていた。本研究では宿主動物の幅を広げ、非哺乳類では両生類と爬虫類、哺乳類では霊長類から虫体を得て配列解析を実施した。系統樹の作成には、イルミナシーケンサで得られたショートリードを用い、ミトコンドリアゲノムと 13個の核ゲノムシングルコピー遺伝子により解析した。

その結果、これまで知られていた *stercoralis/procyonis* グループと *planiceps* グループに加えて、あらたに爬虫類・両生類グループの存在を明らかにすることができた (図 2)。過去に報告されている 18S rRNA 遺伝子配列を用いた解析は解像度が低く、結果の不安性が指摘されてきたが、この手法により信頼性の高い系統解析を実施することが可能になった。

さらに、霊長由来の糞線虫に関して、ガボンのガラゴ *Galagoideus thomasi* から分離された糞線虫はこれまで記載されたことがなく、*stercoralis/procyonis* グループに属するものの *S. stercoralis* とは系統的に別であることがわかった。すなわち、*stercoralis/procyonis* グループの糞線虫は基本的には食肉目動物の寄生虫として種分化をとげているところ、ヒトおよび、ガラゴの祖先において、霊長目動物への寄生性を独立して獲得したことが示唆された。今後は、本研究で用いた遺伝子セットが他の分類群においても有効であるかの検討をすすめる。

図2 *Strongyloides* 属線虫の系統樹
(シングルコピー遺伝子)



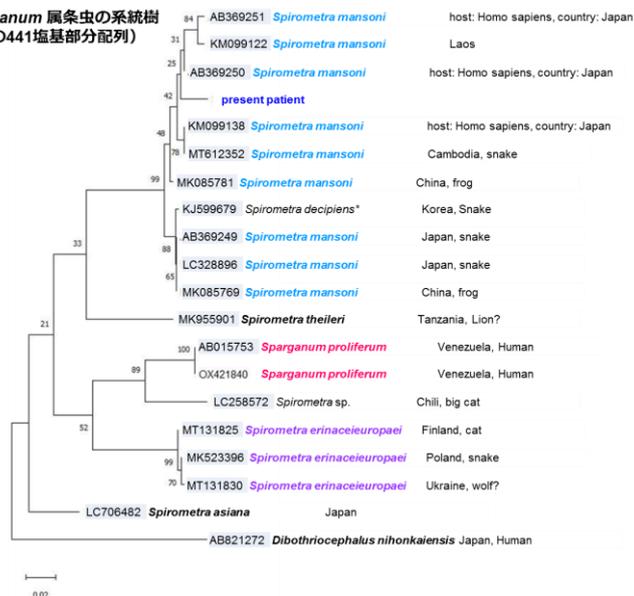
〔*Spirometra* 属条虫〕

Spirometra 属条虫ではミャンマーの政情不安等が影響して海外でのサンプル採取を進めることができなかった。しかしながら、国内において臨床的に通常と異なるヒトの症例があり、虫体を得ることができた。

症例は70代男性で、腹部の皮下硬結を触れる紅斑で発症した。生検を繰り返すが再発し、腹部・腰背部・両大腿に多数の紅斑があり、腹部・腰背部・大腿部から虫体が採取された。通常の Manson 孤虫症との違いは、再発を繰り返すことと摘出された虫体が小さく形態的に芽殖孤虫に近似していたことであった。しかしながらミトコンドリア *cox1* の部分配列 441 塩基の配列による分子系統解析では、本患者から得られた虫体は *S. mansoni* 内のクレードに入った (図3)。

Spirometra 属条虫の *cox1* 系統解析では、図3のように明らかに *Spirometra* 属ではない芽殖孤虫も *Spirometra* 属内に入ってしまう。上記線虫類と同様に核ゲノムのシングルコピー遺伝子を用いてさらなる解析を予定している。

図3 *Spirometra* / *Sparganum* 属条虫の系統樹
(ミトコンドリア *cox1* の441塩基部分配列)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ko Phoo Pwint, Haraguchi Misaki, Hara Takashi, Hieu Duong Duc, Ito Ayaka, Tanaka Ryusei, Tanaka Mio, Suzumura Takafumi, Ueda Miya, Yoshida Ayako, Maruyama Haruhiko, Nagayasu Eiji	4. 巻 92
2. 論文標題 Population genetics study of <i>Strongyloides fuelleborni</i> and phylogenetic considerations on primate-infecting species of <i>Strongyloides</i> based on their mitochondrial genome sequences	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102663 ~ 102663
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2022.102663	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Sun Simo, Kanzaki Natsumi, Dayi Mehmet, Maeda Yasunobu, Yoshida Akemi, Tanaka Ryusei, Kikuchi Taisei	4. 巻 23
2. 論文標題 The compact genome of <i>Caenorhabditis niphades</i> n. sp., isolated from a wood-boring weevil, <i>Niphades variegatus</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Genomics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12864-022-09011-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Lee Yi-Chien, Lee Hsin-Han, Ke Huei-Mien, Liu Yu-Ching, Wang Min-Chen, Tseng Yung-Che, Kikuchi Taisei, Tsai Isheng Jason	4. 巻 -
2. 論文標題 Single worm long read sequencing reveals genome diversity in free-living nematodes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2023.04.17.537128	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Lai Cheng Kuo, Lee Yi Chien, Ke Huei Mien, Lu Min R., Liu Wei An, Lee Hsin Han, Liu Yu Ching, Yoshiga Toyoshi, Kikuchi Taisei, Chen Peichen J., Tsai Isheng Jason	4. 巻 23
2. 論文標題 The <i>Aphelenchoides</i> genomes reveal substantial horizontal gene transfers in the last common ancestor of free living and major plant parasitic nematodes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Ecology Resources	6. 最初と最後の頁 905 ~ 919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1755-0998.13752	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 該当する

1. 著者名 Takaki Y, Kadekaru S, Takami Y, Yoshida A, Maruyama H, Une Y, Nagayasu E	4. 巻 84
2. 論文標題 First demonstration of Strongyloides parasite from an imported pet meerkat - Possibly a novel species in the stercoralis/procyonis group	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitol Int	6. 最初と最後の頁 102399
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2021.102399.	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 -

1. 著者名 Nagayasu Eiji, Takaki Youki, Takami Yoshinori, Yoshida Ayako, Une Yumi, Maruyama Haruhiko	4. 巻 40
2. 論文標題 Strongyloidiasis in recently arrived captive-bred meerkats imported to Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Exotic Pet Medicine	6. 最初と最後の頁 10~11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.jepm.2021.10.002	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 -

1. 著者名 Kikuchi Taisei, Dayi Mehmet, Hunt Vicky L., Ishiwata Kenji, Toyoda Atsushi, Kounosu Asuka, Sun Simo, Maeda Yasunobu, Kondo Yoko, de Noya Belkisyole Alarcon, Noya Oscar, Kojima Somei, Kuramochi Toshiaki, Maruyama Haruhiko	4. 巻 4
2. 論文標題 Genome of the fatal tapeworm Sparganum proliferum uncovers mechanisms for cryptic life cycle and aberrant larval proliferation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 6720
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02160-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Dayi M, Kanzaki N, Sun S, Ide T, Tanaka R, Masuya H, Okabe K, Kajimura H, Kikuchi T	4. 巻 11
2. 論文標題 Additional description and genome analyses of Caenorhabditis auriculariae representing the basal lineage of genus Caenorhabditis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 6720
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-85967-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Eiji Nagayasu, Youki Takaki, Yoshinori Takami, Haruhiko Maruyama
2. 発表標題 Early phylogenetic separation between amphibian/reptile- and mammalianinfecting species of Strongyloides
3. 学会等名 第92回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 [2]Kensei Kinoshita, Yasunobu Maeda, Asuka Kounosu, Yoko Kondo, Kenji Ishiwata, Haruhiko Maruyama, Taisei Kikuchi
2. 発表標題 Secretome analysis of the fatal tapeworm Sparganum proliferum with cryptic life cycle and aberrant larval proliferation
3. 学会等名 第92回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長安 英治, Phoo Pwint Ko, 丸山 治彦
2. 発表標題 Placement of Strongyloides sp. obtained from Myanmar domestic cats in a sister taxon position to Strongyloides stercoralis based on almost full-length mitochondrial genome data
3. 学会等名 第90回日本寄生虫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸山治彦
2. 発表標題 寄生虫血症血清診断の現場からみた食品媒介寄生虫症
3. 学会等名 第70回日本感染症学会東日本地方会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021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
研究 分担者	菊地 泰生 (Kikuchi Taisei) (20353659)	東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授 (12601)	
研究 分担者	長安 英治 (Nagayasu Eiji) (20524193)	宮崎大学・医学部・准教授 (17601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
トルコ	Duzce University			
英国	University of Bath			
ベトナム	Vietnam National Univ of Agriculture			
ミャンマー	University of Medicine 1			
その他の国・地域	Academia Sinica	National Taiwan University		
ベネズエラ	Central University of Venezuela			
トルコ	Duzce University			
英国	University of Bath			