

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790393

研究課題名（和文） 日本住血吸虫宿主RNA取り込み関連遺伝子に関する研究

研究課題名（英文） The host RNA uptake related gene in *Schistosoma japonicum*

研究代表者

熊谷 貴 (KUMAGAI TAKASHI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：40369054

研究成果の概要(和文):住血吸虫は *C.elegans* と同様に long-dsRNA の soaking 法による RNAi が誘導できる。これまでの実験で住血吸虫は外界から dsRNA や、宿主の RNA を取込んでいることがわかってきた。この RNA 取込みの意義を確認するために、RNAi 関連遺伝子の一つである *sid-1* 遺伝子についての解析を行った。*sid-1* 遺伝子は宿主に侵入してすぐの幼虫期で発現が上昇し、dsRNA 刺激で発現が調節された。しかし、*sid-1* 遺伝子ノックダウンにおいて、RNAi、dsRNA 取込みや、寄生適応には影響を与えず、住血吸虫には独自の RNAi 機構が備わっていると推測された。

研究成果の概要(英文):Schistosomes induce the RNA interference (RNAi) using long dsRNA in soaking method, such as *C. elegans*. It is previously reported that schistosomes incorporate the dsRNA, including host derived RNA. To understand the relationships between RNA uptake and parasitism, *sid-1* gene, related to RNAi machinery, was investigated. The mRNA of *sid-1* was increased in the larval stage after the invasion to the host, and was regulated by the induction of long dsRNA. However, the schistosomes knocked down with *sid-1* siRNA, were not effects to RNAi machinery, dsRNA uptake, and parasitism in the host. These mean that schistosomes may have the distinct RNAi machinery.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2600000	780000	3380000
2011年度	600000	180000	780000
年度			
年度			
年度			
総計	3200000	960000	4160000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：寄生虫学(含衛生動物学)

キーワード：蠕虫、RNAi、住血吸虫、*sid-1*

1. 研究開始当初の背景

(1) 住血吸虫はヒトを含んだ哺乳類に感染する寄生蠕虫である。幼虫であるセルカリアは経皮感染することで宿主に侵入し、血管内へと移行する。この住血吸虫は *C. elegans* のよ

うに soaking 法による RNAi が強く誘導できる生物であり、一過性の遺伝子ノックダウンによる機能解析が行える。この RNAi が住血吸虫で、なぜ容易に起きるかについての詳細はわかっていない。さらに、RNAi を誘導す

るための dsRNA の取込みについては、虫体の表面を通して、能動的に取込まれていることが観察された。さらに、宿主の RNA も同様の経路で取込まれていることも観察された。このことから、住血吸虫は寄生環境への適応のために宿主の RNA をモニタリングしている可能性が示唆された。

(2) *C. elegans* の報告では、RNAi で最も鍵となり、dsRNA の取込みに必須であると考えられている遺伝子に *sid-1* がある。SID-1 分子は 11 回膜貫通ドメインをもったトランスポーターであり、高等生物でも広く保存されている。しかし、住血吸虫においての *sid-1* 遺伝子の機能は全くわかっていない。

2. 研究の目的

宿主 RNA の取込みは、住血吸虫特異的な現象であると考えられ、宿主適応に関係した寄生虫の戦略であると考えられた。そのため、RNAi 関連遺伝子として最も重要であると考えられる *sid-1* 遺伝子の詳細を検討し、遺伝子ノックダウンを行うことで、その RNA 取込みや RNAi での機能を確認することを目的とする。さらなる研究として、宿主 RNA 取り込みと寄生適応の関係についてもさらに調べていく予定である。

3. 研究の方法

(1) 材料として用いたのは、日本住血吸虫（山梨株）であり、終宿主である ICR マウスと中間宿主であるミヤイリガイに感染させることで、実験室内維持をしている。

(2) 各発育段階の RNA サンプルは虫卵(3000 個)、成虫(10 ペア)を Trizol 溶液にて抽出。幼虫であるセルカリア(1000 隻)、シストソミユラ (300 隻) は RNAqueous kit (Ambion 社) を用いて抽出した。虫卵・成虫は 1 μg の RNA 量を、幼虫は全量を用いて ReverTra Ace aPCR RT kit (TOYOBO 社)にて cDNA を作製した。

(3) *sid-1* 遺伝子の mRNA の発現解析には 2 種類のプライマーセット (*sid-q1*, *sid-q2*) を用いた (図 1)。Dicer と内因性コントロールとして用いた TPI の特異的プライマーを作製した。これらのプライマーを用いて、リアルタイム PCR を用いて mRNA の発現レベルを解析した。

(4) SID-1 分子のタンパク質レベルでの発現を見るために、SID-1 特異的なペプチド

(TPAKSRALNQPQC : 図 2) を合成し KLH とのコンジュゲート (シグマ・アルドリッチ社) をフロイドアジュバントで混和し BALB/c マウスに免疫した。4 回のブーストの後に、抗体価の上昇を確認し、抗血清とした。これを用いて、成虫抗原 20 μg を泳動シウエスタンプ

ロット解析を行った。

(5) RNAi を誘導するための dsRNA として、*sid-1* 遺伝子特異的な Accell-siRNA (Thermo Scientific 社) を合成した (図 5)。また、Dicer、及び、Prx-1、MBP (大腸菌由来 ; 陰性対象) の遺伝子ノックダウンには 500bp 程度の long-dsRNA を in vitro transcription にて合成した後アニーリングすることで作製した。

(6) RNAi は幼虫であるセルカリアから機械的に尾部を切り離したシストソミユラを用いて行った。このシストソミユラに Accell siRNA (*sid-1*) を 1 μM、又は、long dsRNA (Dicer) を 100nM となるように加えて、6 日間 37°C 条件下で RPMI1640 を用いて培養した。幼虫は (2) の方法で RNA を抽出し、リアルタイム PCR を行った。RNAi 自体への *sid-1* 及び、*dicer* 遺伝子ノックダウンの効果を確認するために、最初の RNAi 終了後、虫体を 3 回洗浄し、long dsRNA (Prx-1, MBP) を 100nM となるように加えた。5 日後に RNA をシストソミユラから抽出し、リアルタイム PCR にて *prx-1* 遺伝子の mRNA 発現を解析した。

(7) 全ての統計処理は、student t-test を用いて $p < 0.05$ で有意差があると判定した。

4. 研究成果

(1) RNAi 関連遺伝子として *sid-1* 遺伝子の mRNA の発現解析を行った。結果、複数の mRNA ヴァリエントが確認された (図 1)。また、*sid-1* 遺伝子がサザンブロット解析により 1 コピーであることから、この mRNA ヴァリエントは post-transcriptional な調節を受けて発現していると考えられた (図 1)。

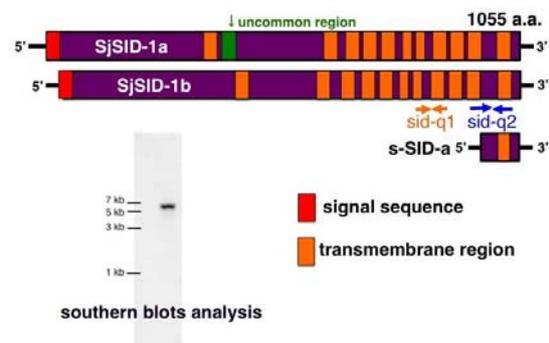


図1 *sid-1* mRNA ヴァリエントとサザンブロット解析

また、3' 側のみを含んでいる短い mRNA ヴァリエント (s-SID-a) が他の mRNA よりも非常に強く発現していることがわかった (図 2)。そのため今回の実験では、二つのプライマーを用いてトランスポーター領域を含む mRNA と s-SID-a の mRNA の両方の発現を見ることにした。発育段階ごとに *sid-1* 遺伝子

の発現を調べた結果、長鎖の mRNA 発現は发育段階を通して大きな違いは無かったが、s-SID-a を含む領域の mRNA 発現はシストソミユラ期に高いことが確認された (図 3)。

(2) 成虫抗原を用いたウェスタンブロット解析により、40kDa の位置に SID-1 分子のバンドを確認した (図 2)。これはアミノ酸配列から予想される大きさ(100kDa 以上)よりかなり小さい。このことから、SID-1 分子はタンパク質レベルにおいてもプロセッシングを受けて存在していると考えられた。また 40kDa というサイズから計算すると、C 末側の膜貫通ドメインのトランスポーター領域は全て含まれていた。このことから SID-1 は住血吸虫においてもトランスポーター機能を有していると考えられた。

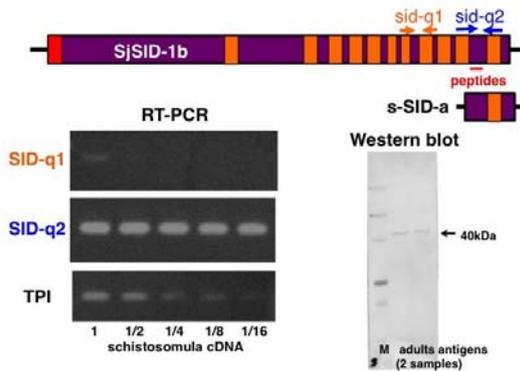


図2 sid-1 mRNAヴァリエントの発現とウェスタンブロット解析

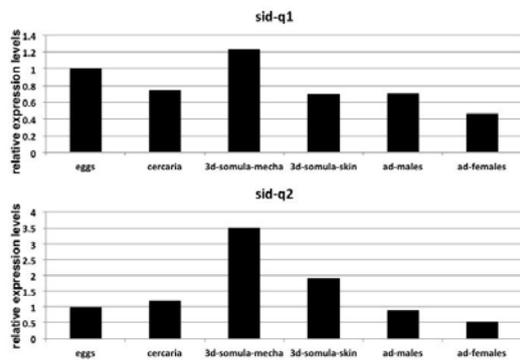


図3 sid-1 mRNAの各发育段階での発現

(3) シストソミユラに soaking 法にて RNAi を行う場合、通常は long-dsRNA を使用する。この dsRNA の刺激と *sid-1* 遺伝子発現の関係について調べたところ、dsRNA 投与 1 日後に *sid-1* の mRNA 発現は抑制された。このことから、long-dsRNA を感知して、*sid-1* の発現調節が行われていると考えられた (図 4)。

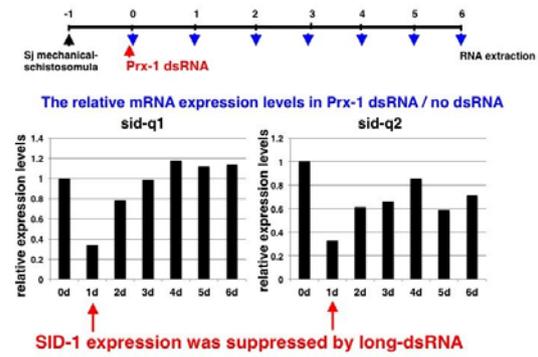


図4 dsRNA誘導によるsid-1 mRNAの発現調節

(4) Accell-siRNA を用いて *sid-1* 遺伝子のノックダウンを行った結果、siRNA で処理した群では、処理 1 日後から両方の mRNA ヴァリエントの発現が抑制されていることがわかり、その効果は 2 週間以上に及んだ (図 5)。

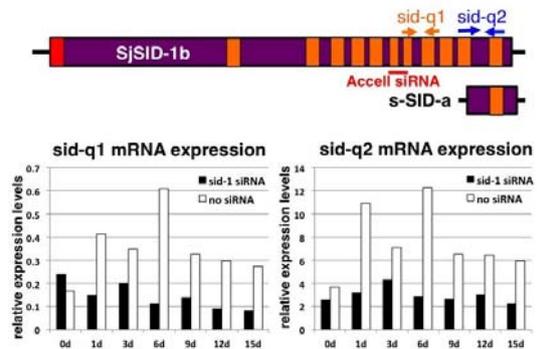


図5 sid-1 Accell-siRNA による特異的 mRNA の発現抑制

sid-1 遺伝子のノックダウンを行い、住血吸虫の long dsRNA による RNAi が抑制されるかを検証した結果、*sid-1* 遺伝子のノックダウンでは soaking 法による RNAi 自体を抑制することはできなかった (図 6)。また long dsRNA の虫体への取込みについても関連性は確認できなかった (図 7)。

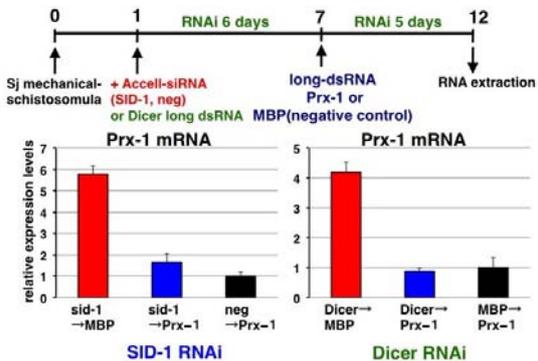


図6 sid-1遺伝子、及びDicer遺伝子ノックダウン住血吸虫でのRNAiの効果

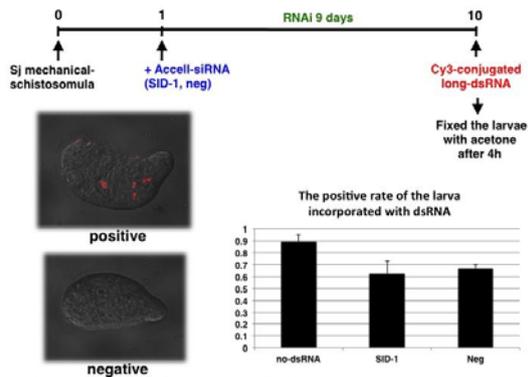


図7 *sid-1*遺伝子ノックダウン住血吸虫での蛍光標識dsRNAの取込み

このことから、RNAiは *sid-1* 遺伝子非依存的であると考えられた。また、他の生物において、long-dsRNAの切断に関わり、RNAiの中心で働く *dicer* 遺伝子をノックダウンした場合においても、明らかな RNAi の抑制を観察できなかった (図6)。このことから、住血吸虫は *C. elegans* 等とは、全く異なる RNAi パスウェイによって遺伝子発現抑制を引き起こしていると推測された。

(5) *sid-1* 遺伝子の発現が住血吸虫の宿主への寄生適応に必要なかを確認するために、*sid-1* 遺伝子をノックダウンした幼虫を BALB/c マウスの腹腔に移入し感染を成立させた。移入後7週で門脈より成虫を回収した。しかし、その感染率に差は認められなかった。このことから、住血吸虫の寄生適応に *sid-1* 遺伝子発現は必ずしも essential ではないと考えられた (図8)。

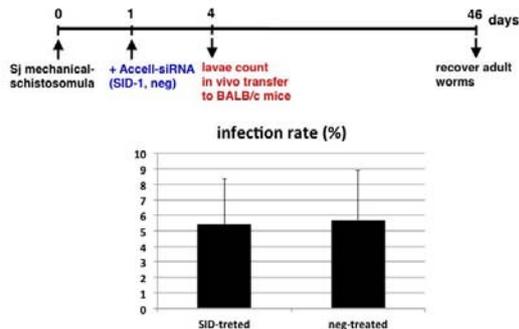


図8 *sid-1*遺伝子ノックダウン住血吸虫のin vivo transferによる宿主内での影響

(6) 最近、SID-1分子のアミノ酸配列にセラミダーゼ活性を有するモチーフが存在することがわかってきた。セラミダーゼモチーフを含む領域は mRNA、タンパク質レベルで住血吸虫のオルソログでも保存されていることが確認されたことから、SID-1が dsRNA 反応性のセラミダーゼとして機能している可能性も示唆された。今後は、SID-1の dsRNA センサーとセラミダーゼ活性の関連性について考えていく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Tokiwa T, Harunari T, Tanikawa T, Komatsu N, Koizumi N, Tung KC, Suzuki J, Kadosaka T, Takada N, Kumagai T, Akao N, Ohta N. Phylogenetic relationships of rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*, isolated from different geographical regions revealed widespread multiple lineages. *Parasitol Int.* 2012, in press.
- ② Kong QM, Lu SH, Tong QB, Lou D, Chen R, Zheng B, Kumagai T, Wen LY, Ohta N, Zhou XN. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): early detection of *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Parasit Vectors.* 3, 2012, 5:2.
- ③ Seki T, Kumagai T, Kwansa-Bentum B, Furushima-Shimogawara R, Anyan WK, Miyazawa Y, Iwakura Y, Ohta N. Interleukin-4 (IL-4) and IL-13 suppress excessive neutrophil infiltration and hepatocyte damage during acute murine schistosomiasis japonica. *Infect Immun.* 80, 2012, 159-68.
- ④ Imai K, Koibuchi T, Kumagai T, Maeda T, Osada Y, Ohta N, Koga M, Nakamura H, Miura T, Iwamoto A, Fujii T. Cerebral Schistosomiasis Due to *Schistosoma haematobium* Confirmed by PCR Analysis of Brain Specimen. *J Clin Microbiol.* 査読有 49, 2011, 3703-6.
- ⑤ Kwansa-Bentum B, Ayi I, Suzuki T, Otchere J, Kumagai T, Anyan WK, Osei JH, Asahi H, Ofori MF, Akao N, Wilson MD, Boakye DA, Ohta N. *Plasmodium falciparum* isolates from southern Ghana exhibit polymorphisms in the SERCA-type PfATPase6 though sensitive to artesunate in vitro. *Malar J.* 査読有 11, 2011, 10:187.
- ⑥ Kwansa-Bentum B, Ayi I, Suzuki T, Otchere J, Kumagai T, Anyan WK, Asahi H, Akao N, Wilson MD, Boakye DA, Ohta N. Administrative practices of health professionals and use of artesunate-amodiaquine by community members for treating uncomplicated malaria in southern Ghana: implications for artemisinin-based combination therapy deployment. *Trop Med Int Health.* 査読有 10,

2011, 134-139.

- ⑦ Taniguchi T, Kumagai T, Shimogawara R, Ichinose S, Hiramoto A, Sato A, Morita M, Nojima M, Kim HS, Wataya Y, Ohta N. Schistosomicidal and antifecundity effects of oral treatment of synthetic endoperoxide N-89. *Parasitol Int*. 査読有 60, 2011, 231-6.
- ⑧ Kumagai T, Furushima-Shimogawara R, Ohmae H, Wang TP, Lu S, Chen R, Wen L, Ohta N. Detection of early and single infections of *Schistosoma japonicum* in the intermediate host snail, *Oncomelania hupensis*, by PCR and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Am J Trop Med Hyg*. 査読有 83, 2010, 542-8.
- ⑨ Macuhova K, Kumagai T, Akao N, Ohta N. Loop-mediated isothermal amplification assay for detection and discrimination of *Toxocara canis* and *T. cati* eggs directly from sand samples. *J. Parasitol*. 査読有 96, 2010, 1224-7.
- ⑩ Anyan KW, Kumagai T, Shimogawara FR, Seki T, Akao N, Obata K, Bentum KB, Bosompen MK, Boakye AD, Wilson DM, Karasuyama H, Ohta N. Schistosome eggs have a direct role in the induction of basophils capable of a high level of IL-4 production: Comparative study of single-and bisexual infection of *Schistosoma mansoni* in vivo. *Tropical Medicine and Health*, 査読有 38, 2010, 13-22.

[学会発表] (計9件)

- ① 熊谷貴ら、日本住血吸虫成虫より分泌されるエクソソーム様小胞の免疫抑制作用、第81回日本寄生虫学会大会、2012年3月、西宮
- ② 熊谷貴ら、日本住血吸虫感染具モニタリングを目指したLAMP法の適用、第52回日本熱帯医学会大会・第26回日本国際保険医療学会学術大会、2011年11月、東京
- ③ Kumagai T et al, Rapid mRNA degradation by soaking method of antisense RNA, but not dsRNA in *Schistosoma japonicum*, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sep. 2012, Sapporo.
- ④ 熊谷貴ら、日本住血吸虫でみられたアンチセンスRNAによるRNA干渉、第22回日本生体防御学会学術総会、2011年6月、那覇
- ⑤ 熊谷貴ら、日本住血吸虫 RNAi 関連分子 SID-1

の mRNA ヴァリアントの機能、第80回日本寄生虫学会大会、2011年3月、東京

- ⑥ 熊谷貴ら、日本住血吸虫の SID-1 とスカベンジャー受容体はそれぞれ異なった場所で RNA 干渉に関わる、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、2010年12月、神戸
- ⑦ Kumagai et al, The application of PCR and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) methods to the field surveillance for snail infections of *Schistosoma japonicum*, The 59th ASTMH Annual Meeting, Nov. 2011, Atlanta.
- ⑧ Kumagai et al, Characterization of systemic RNAi deficiency-1 from *Schistosoma japonicum* and the mechanisms of dsRNA incorporation, The 12th International Congress of Parasitology, Aug. 2011, Melbourne.
- ⑨ 熊谷貴ら、イメージング解析による日本住血吸虫の宿主 RNA 取り込み機構の解析、第79回日本寄生虫学会大会、2010年5月、旭川

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊谷 貴 (KUMAGAI TAKASHI)
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・助教
研究者番号：40369054

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

太田 伸生 (OHTA NOBUO)
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号：10143611