

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659209

研究課題名（和文）二生類吸虫幼虫の行動制御に関わる感覚センサーの同定と機能解析

研究課題名（英文） Identification and functional analysis of the sensor system involved in behavioral regulation of larvae of digenic platyhelminthes.

研究代表者

太田 伸生 (OHTA NOBUO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：10143611

研究成果の概要(和文):人体寄生二生類吸虫幼虫が終宿主を効率的に認識する機構を解析した。住血吸虫セルカリアはリノール酸に対する強い指向性を示し、それを感知する銀親和性センサー分子が考えられ、その候補遺伝子も推定された。機能解析に必要な RNA 干渉による遺伝子発現抑制実験系をスポロシト期について確立したがセルカリア期については課題を残した。セルカリアが毒性の強いリノール酸に対して遊走行動を示すことは、毒性リスクを超えて生存に必須な作用をリノール酸が包含することが示唆された。

研究成果の概要(英文): In the hope of uncovering sensor system of digenic platyhelminthes, we analyzed possible sensor organs of cercariae *Schistosoma mansoni*. Cercariae of *S. mansoni* were strongly attracted by linoleic acid and the responsible sensor seemed to be detected on the surface of cercariae. It was needed to test the direct effects of the probable sensors, and RNAi was applied for schistosoma cercariae. There are still technical matters left for RNAi at the cercarial stage. Results of the current study seem to lead development of reagents to avoid schistosomal infection targeting the skin penetration of cercariae.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：6910

キーワード：住血吸虫、セルカリア、誘引行動、リノール酸、認識センサー、RNA 干渉

1. 研究開始当初の背景

(1) 住血吸虫の感染幼虫であるセルカリアが自然水の中で効率的に終宿主に侵入するためには、終宿主を能動的に感知して遊走行動を取る必要がある。特に中間宿主貝の棲息範囲が広大な水域に亘る場合は、寄生虫にとってもヒト宿主の存在を能動的に求めることが種の維持のために必要である。類縁の扁形動物であるプラナリアでは嗅覚センサーを用いた索餌行動が知られており、住血吸虫においても同様のセンサー分子の存在を検討

することに疫学的意義があると考えた。

(2) 住血吸虫症流行制圧の戦略として、セルカリアの終宿主感知システムを阻害することが出来れば、流行現場への応用も期待できる。

(3) 住血吸虫はヒト寄生蠕虫の中で、RNA 干渉が比較的起こし易いといわれている。しかし、これまでセルカリアでの RNA 干渉による特定の遺伝子発現調節には成功していな

かった。二生類吸虫を扱うという研究上のハンディキャップを考えると、住血吸虫におけるすべての発育ステージで RNA 干渉の実験系を確立することが求められるが、その解決には至っていなかった。

2. 研究の目的

(1) 住血吸虫のセルカリアステージをモデルとして、二生類吸虫の終宿主侵入のために必要な誘引行動の発現機序を、環境中の誘引物質とセルカリア側の感知装置の双方についての機能的、分子的解明を通じて、“セルカリア忌避剤”の可能性を考慮した新しい住血吸虫症対策ツールの開発を目指した。

(2) 住血吸虫の各発育ステージにおける遺伝子機能の解析には、遺伝子組み換え技術の応用が困難である二生類吸虫の場合、RNA 干渉による遺伝子発現の調節誘導は必須の研究手法である。しかし、これまでセルカリアでの RNA 干渉に成功した報告はなく、ここでの研究遂行のためにも中間宿主貝のステージであるスポロシストやセルカリア期での RNA 干渉による遺伝子発現調節の実権系を確立も試みることにした。

3. 研究の方法

(1) マンソン住血吸虫セルカリアの遊走行動の検討： 図1に示したT字チャンバーを作製し、東京医科歯科大学で維持しているマンソン住血吸虫（プエルトリコ系）セルカリアの一定の個体数をチャンバー中央円形部(d)に添加して室温にて一定時間水平にて静置した。チャンバーのT字部先端(a)、(b)に各種誘引物質を置き、セルカリアに対する誘引活性を、(a)又は(b)に到達したセルカリアの個体数を計測して定量判定した。

(図-1) セルカリアの誘引行動測定用T字チャンバー



(2) 誘引物質として、ほ乳類皮膚に含まれる脂肪酸を想定し、各種脂肪酸を様々な濃度で寒天に含ませ、上述のT字チャンバーの先端部に置いた。

(3) セルカリアの感覚センサー候補を、プラナリアの検索結果などを参考にして *in silico* の解析を行った。

(4) 扁形動物の体表神経器官が銀によって染色できることから、セルカリアを硝酸銀にて処理し、染色パターンを確認するとともに、硝酸銀処理がセルカリアの誘引行動にどのような影響が見られるかを検討した。

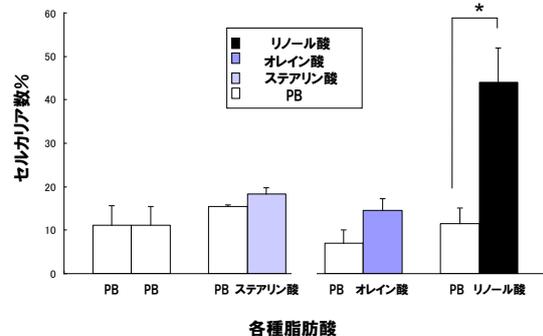
(5) 住血吸虫幼虫期、特にスポロシストからセルカリアのステージにおける RNA 干渉の効果を検討するために、幼虫が中間宿主貝に寄生している状態で RNA 干渉を行うことが出来るかについて検討した。中間宿主貝をそのまま用いて、soaking 法と electroporation 法とを比較検討した。遺伝子発現抑制は、標的とした遺伝子の RT-PCR により、その遺伝子発現調節の有無を観察した。

4. 研究成果

(1) 住血吸虫セルカリアの行動誘引物質としての脂肪酸の検討：

① T字チャンバーの(b)に各種 C18 脂肪酸を含む寒天を置き、(a)には PBS のみの寒天を置いた時のセルカリアの遊走を検討すると、寄生虫はリノール酸を特異的に認識して郵送していることがわかった(図-2)。

(図-2) T字チャンバーを用いた住血吸虫セルカリアの各種脂肪酸に対する誘引行動の比較



このような誘引パターンは、T字チャンバーの(a)と(b)を入れ替えても全く同じ行動が観察された(データ未提示)。

② 特異的な遊走行動がリノール酸の量に依存するかどうかを検討するため、寒天に含ませるリノール酸を 10mM~1pM の範囲で変化させた所、セルカリアは 10nM 以上を包含する寒天に対して有意な誘引行動を示した。

また T字チャンバーの(a)と(b)に同じリノール酸包含寒天を置いた場合も、より濃度の高い方に有意に強い遊走行動をセルカリア

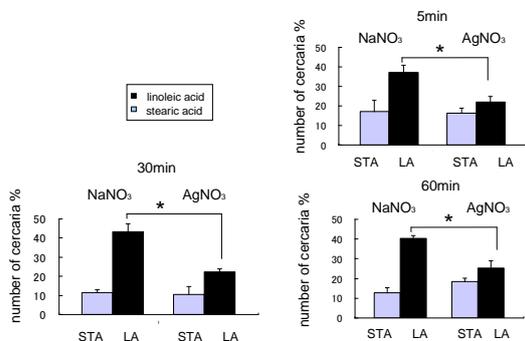
は示していたことから、dose-dependent な誘引行動であることが確認できた。

(2) 硝酸銀処理によるセルカリアの脂肪酸への誘引行動阻害効果：セルカリアの外部刺激の受容システムについては十分な情報は蓄積していないが、感覚乳頭 (Sensory papilla) が外部刺激の受容に関与していることが示唆されている。このような神経乳頭系の組織は好銀染色性があることから、セルカリアを硝酸銀処理して感覚乳頭からの刺激を阻害する可能性について検討した。

硝酸銀自体のセルカリアに対する毒性をチェックするために、添加する硝酸銀を 2nM ~ 1μM の間で濃度を変化させて、セルカリアの生存に及ぼす影響を検討した。その結果、硝酸銀濃度が 100nM 以下ではセルカリアの生存率、運動性に影響しないことが確認され、この濃度で以降の硝酸銀処理実験を行った。

硝酸銀処理を 5 分~60 分間行い、その後にセルカリアを洗浄して T 字チャンバーでリノール酸への誘引行動に見られる変化の有無を検討した所、図-3 に示すように、5 分間の処理のみでも、セルカリアはリノール酸を感知することが出来なくなり、遊走行動を起さなくなった。対照として処理した NaNO₃ では全く影響はなかった。

(図-3) セルカリアの硝酸銀処理によるリノール酸誘引性の遊走行動の阻害



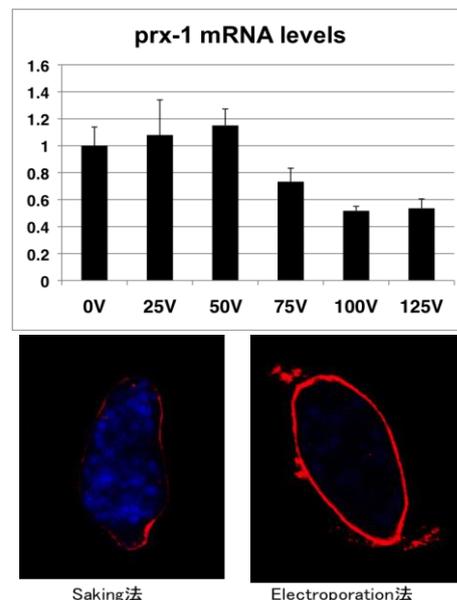
(3) 感覚センサーの分子的解析：リノール酸を感知する感覚センサー分子を特定する目的で、他属の扁形動物のゲノム情報に基づいて、可能性のある分子についてデータベースによる解析を行った。プラナリアでは「嗅覚」センサーが索餌行動の誘導に関わることが明らかにされている。同様の機能を持つセンサー関連遺伝子をマンスン住血吸虫ゲノム情報から検索を行ったところ、sensor histidine/response regulator が該当した。この分子は細胞外から刺激受容に関わる分子として、多くの生物種に保存されているもので、住血吸虫においても機能タンパク質として刺激受容に関係している可能性が高い。

(4) 遺伝子機能の解析システムとしてのシストゾミューラ/セルカリア期での RNA 干渉実験系の確立：感覚センサー候補分子に関して、その機能を直接的に解析するためには遺伝子発現制御 (強制発現またはノックアウト) 寄生虫の作出が求められるが、二生類の動物ではその確立は困難であり、代替技術として RNA 干渉による遺伝子発現調節を応用することになる。しかし、特異的な RNA 試料を添加しても、遺伝子発現レベルの変化として確認できるためには約 1 週間培養を継続する必要があるが、一般にはセルカリアは最長で 1-2 日間しか *in vitro* で生存できない。このことがセルカリア期での遺伝子発現調節実験実施の大きな問題であった。

セルカリアと発育ステージ上、最も近縁の幼虫としてスポロシスト期における RNA 干渉による遺伝子発現調節系の確立を目指した。スポロシスト期の RNA 干渉を導入するためには中間宿主貝の中に寄生する状態で 2 本鎖 RNA (dsRNA) を添加する必要があるため、その条件について検討した。簡便な soaking 法と装置を必要とするが導入効率にすぐれた electroporation 法とを比較検討した。

日本住血吸虫スポロシストの場合、soaking 法による試みではほとんど RNA 干渉がかからなかったが、electroporation 法の場合は 100V の電圧条件下で、スポロシストを殺すことなく dsRNA の導入が一定レベルで起こることが確認できた (図-4)。

(図-4) 中間宿主貝中のスポロシストへの dsRNA 導入のための electroporation の条件検討と dsRNA 導入所見



スポロシストの RNA 干渉は住血吸虫種によって導入効率が異なることが示唆されているが、マンスン住血吸虫、日本住血吸虫とも

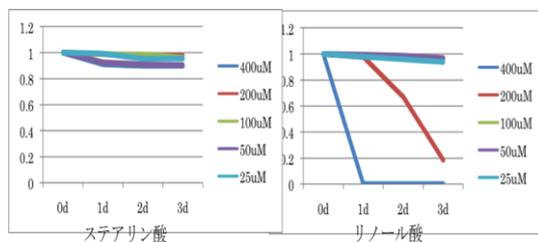
にスポロシストレベルでの RNA 干渉が可能であることを実験的に示すことが出来た。しかしこの条件では未だ遺伝子発現抑制効果が量的に不十分と考えられたので、今後も条件検討の継続が必要である。その上で sensor histidine/response regulator 分子の RNA 干渉実験を行うことがセルカリアのセンサー分子同定のために必須であり、課題として残った。

(5) 住血吸虫幼虫ステージにおける脂肪酸感知・取り込みの分子機構の検討：セルカリアがリノール酸を感知して誘引行動を取る事実から、幼虫の脂肪酸レセプターも関与している可能性をシストゾミューラのステージで検討した。住血吸虫の脂質取り込みに関与する遺伝子として *sid-1* があるので、その発現を RNA 干渉にて抑制して、脂肪酸取り込みに影響があるか否かを検討した。

Sid-1 を RNA 干渉によって発現抑制を行い、各種脂肪酸を添加して、虫体経の取り込みを検討したが *sid-1* の発現抑制の影響は全く観察されず、リノール酸など脂肪酸取り込みに関係する分子の同定には至らなかった。

しかし、リノール酸はオレイン酸やステアリン酸など他の C18 脂肪酸に比してスポロシストに対する毒性が最も高いことも興味ある点であった (図-5)。

(図-5) スポロシストに対するリノール酸の強い障害活性



この事実は、スポロシストやセルカリアなど住血吸虫幼虫が、自身に対する毒性がより強い脂肪酸に対してむしろ積極的に遊走行動を取ると言う、一見矛盾した行動特性を示すことを意味し、その生物学的意義については未だ未解明のことである。

(6) 以上をまとめると、二生類吸虫である住血吸虫のセルカリアは、不飽和脂肪酸であるリノール酸に対する強い指向性を示し、それを感知するセンサーの存在が考えられた。センサーの本態については未だ不明であるが、幼虫の銀処理により、上記の誘引行動は有意に抑制されることから、セルカリア体表上の特異的なセンサーの存在が考えられた。センサー機能の本態は、類縁の扁形動物との比較から、候補遺伝子が推定されるものの、その

機能解析に必要な RNA 干渉による遺伝子発現抑制効果の実験系について、十分に安定した条件を確立するには至らなかった。生物学的に興味深い点は、セルカリアが自身には毒性が強いリノール酸に対して選択的に誘引行動を示すことであり、危険回避行動を上回るような、生存に必要なリノール酸による効果を住血吸虫セルカリアが持つことが予想された。

以上の研究結果は、セルカリアが水中で終宿主と出会うことを、むしろ能動的に行うことを示し、全くのバイチャンスによる感染成立ではあり得ないことを示している。その分子機序の解析は今後の課題として残ったが、以下の二点で住血吸虫症の研究に新しい情報を低キョブすることとなった。

①感染の成立にはセルカリア自身の“意思”が関わっているものであり、そのことは住血吸虫症流行の数理モデル解析など、疫学研究に考慮すべきファクターとして重要である。

②セルカリアのヒトへの接近を防止する方法が可能となるなら、新規の“予防”手段としての応用が期待される。安全なセルカリアリペレントが実現するならば、実用的価値は大きいことが期待される。

以上を含めて、本研究成果に立って、今後の一層の検討を進めることが重要と考えられた。

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 2 件)

- (1) Okumura-Noji K, Miura Y, Lu R, Asai K, Ohta N, Brindley PJ, Yokoyama S. CD36-related protein in *Schistosoma japonicum*: candidate mediator of selective cholesteryl ester uptake from high-density lipoprotein for egg maturation. *FASEB J*, 27: 1236-44, 2013.
- (2) El-Malky MA, Lu SH, El-Bleshbishi SN, Saundy NS, Ohta N. Effects of Mirazid in *Schistosoma japonicum*-infected mice: parasitological and pathological assessment. *Parasitol Res*, 112:371-7, 2012.

[学会発表] (計 5 件)

- (1) 福田一凡、下河原理江子、熊谷貴、太田伸生 マンソン住血吸虫のリノール酸への遊走メカニズム 第 80 回日本寄生虫学会大会 2011 年 7 月、東京都
- (2) 下河原理江子、熊谷 貴、二瓶直子、斉藤康英、Wang TP, Lu SH, Wen LY, 太田伸生 日本住血吸虫ミラジウムの中間宿

主貝への侵入とその発育を考慮した感染感受性の検討 第81回日本寄生虫学会大会、2012年3月、西宮市

- (3) 太田伸生、熊谷 貴、Lu SH, Wang TH, Wen LY 中国の Oncomelania 属貝と日本住血吸虫症の動向 第64回日本衛生動物学会大会、2012年3月、上田市
- (4) 熊谷 貴、下河原理江子、太田伸生 寄生扁形動物である日本住血吸虫の systemic RNA deficiency-1 (sid-1) 遺伝子オルソログは dsRNA トランスポート及び RNAi 機能に影響しない。 2012年12月、福岡市
- (5) Kumagai T, Yamabe M, Seki T, Shimogawara R, Ohta N. Gene-knockdown against sporocysts from Schistosoma japonicum by RNAi. 2013年3月 第82回日本寄生虫学会大会、東京都

[図書] (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 伸生 (OHTA NOBUO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：10143611

(2) 連携研究者

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

(3) 連携研究者

下河原理江子 (SHIMOGAWARA RIEKO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：50146776