

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 1 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790461

研究課題名(和文)動物寄生線虫の持つ細菌様フェロケラターゼ(鉄挿入酵素)の解析

研究課題名(英文)Analysis of bacteria-like ferrochelatases in animal parasitic nematodes

研究代表者

長安 英治(Nagayasu, Eiji)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：20524193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：線虫類はヘムを合成できないことが知られ、ヘム合成に必要な酵素遺伝子群も全て欠損するものと考えられてきた。しかしながら我々の行った糞線虫(動物寄生線虫)ゲノムを始めとする様々な線虫種ゲノムの解析により、いくつかの動物寄生線虫においてヘム合成の最終ステップを触媒する酵素であるフェロケラターゼ(FeCH)の遺伝子配列が見出された。

興味深いことに、線虫FeCHは動物界に広くみられる真核生物型のFeCHよりもむしろ細菌型FeCHに類似するアミノ酸配列上の特徴を示した。これらの動物寄生線虫においては、なんらかの必然性により未知の細菌からFeCH遺伝子が遺伝子水平伝播によりもたらされたことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It had been thought that nematodes are unable to synthesize heme, lacking all enzyme genes necessary for heme biosynthesis. However our analysis of Strongyloides (an animal parasitic nematode) genome and those of other nematode species indicated some animal parasitic nematode species possess genes that encode ferrochelatase (FeCH), an enzyme which mediates the terminal step of the heme biosynthesis.

Interestingly, nematode FeCH amino acid sequence showed more similarity to bacterial FeCH rather than to eukaryotic FeCH. Our results indicated some animal parasitic nematode species acquired FeCH gene from bacteria by horizontal gene transfer for a certain nutritional necessity at some point in their evolutionary histories.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学(含衛生動物学)

キーワード：糞線虫 フェロケラターゼ ヘム合成 動物寄生線虫 遺伝子水平伝播

1. 研究開始当初の背景

線形動物(線虫類)は地球上で最も繁栄している後生動物の一群で、総種数は7000万種とも推定されている。その殆どは陸上あるいは海中に生息する自由生活性の線虫であるが、ヒトを含めた動物あるいは植物に寄生する線虫類も数多く存在する。人類にとって最もありふれた寄生線虫症である土壤媒介性線虫症(回虫症、鉤虫症、鞭虫症など)には発展途上国を中心に世界人口の24%に相当する約15億人が感染しており、死者数は毎年約13万5千人にもものぼると推定されている。

線虫類の持つ代謝上の特徴を明らかにすることは線虫寄生虫症に対する新たな治療薬の開発に役立つと考えられ、多くの研究がなされてきた。そうした研究の中で線虫類は殆どの生命にとって必須の物質であるヘムを合成することができないことが古くから知られてきた。

1998年にモデル生物として知られる *Caenorhabditis elegans* の全ゲノム配列が解読され、この自由生活線虫種はヘムを合成するために必要な7種類の酵素遺伝子を全て欠損することが明らかとなった。その後さらにいくつかの線虫種に関しても全ゲノム配列の解析が行われたが、いずれもヘム合成系酵素遺伝子の全てを欠損していたことから、線虫類は一般的にヘム合成系酵素遺伝子を全く持たないものと考えられてきた。

しかしながら、研究代表者らが2009年より進めていたベネズエラ糞線虫(ラットを自然宿主とする腸管寄生線虫)のゲノム解析の過程で、本線虫種はヘム合成の最終段階(ポルフィリン環への鉄の挿入)を触媒する酵素であるフェロケラターゼ(FeCH)をコードする遺伝子を持つことが明らかとなり、その進化的起源、動物寄生現象における役割が大きな謎として浮上した。

2. 研究の目的

(1) これまで得られていたベネズエラ糞線虫 FeCH 遺伝子の部分配列を基に全長 cDNA 配列を決定し、推定されるアミノ酸配列の解析により、糞線虫 FeCH の配列上の特徴を明らかにする。また、公共データベースに登録されている多様な生物種由来の FeCH 配列を収集し、分子系統樹を作成し、糞線虫 FeCH の進化的起源を明らかにする。

(2) 今回見出されたベネズエラ糞線虫 FeCH 配列が実際に金属配位酵素としての活性を示すかどうかを *in vitro* 及び *in vivo* のアッセイ系を用いて確認する。

(3) 糞線虫 FeCH の mRNA 発現量を糞線虫生活環における様々な発育ステージ間で比較する。

3. 研究の方法

ベネズエラ糞線虫 (*Strongyloides venezuelensis*) を Wistar Rat を感染宿主とした継代により実験室環境で維持し、必要に応じて糞線虫虫体の採取を行った。

既に得られていたベネズエラ糞線虫 FeCH 遺伝子の部分配列をもとに、5' -RACE 及び 3' -RACE を行い、全長 cDNA 配列を決定した。

公共データベース (NCBI non-redundant タンパクデータベース及び NEMBASE4 (線虫 EST 配列データベース)) に登録されている配列を対象とした BLAST 解析を行い、糞線虫以外の線虫由来 FeCH 遺伝子の検索を行った。

線虫由来及びいくつかの生物種(ヒト、酵母、大腸菌など)由来 FeCH タンパク配列を用いたマルチプルアライメント解析を行い、線虫 FeCH の配列上の特徴を明らかにすることを試みた。また、より多様な生物種(71種の原核生物及び65種の真核生物)に由来する FeCH 配列を公共データベースより入手し、分子系統解析を行い、線虫 FeCH の進化的起源を明らかにすることを試みた。

今回得られたベネズエラ糞線虫 FeCH が実際に金属配位酵素としての活性を示すかどうかを確認する目的で、大腸菌に組み換えタンパクとして発現させた糞線虫 FeCH の活性を *in vitro* ケラターゼアッセイにより測定した。また、FeCH を欠損する大腸菌株と、糞線虫 FeCH 発現プラスミドを用いた genetic complementation アッセイを行った。

糞線虫の生活環における各種発育ステージ間での FeCH mRNA 発現量の比較を Real-time RT-PCR 法にて行った。

4. 研究成果

(1) ベネズエラ糞線虫 FeCH cDNA 全長配列の決定

5' -及び 3' -RACE 法により全長配列(1,187塩基長)を決定し、NCBI データベースに登録した (Accession AB710461)。開始コドンから終始コドンまでは1,122塩基長であり、ゲノム DNA 配列との比較から、単一の短い(49塩基長)のイントロンを挟んだ2つのエクソンからなる遺伝子構造が明らかになった。

cDNA 配列から推定される FeCH タンパクの分子量は43.3kDaであった。

(2) 線虫類 FeCH タンパクの配列解析

解析を行った時点において既にゲノムデータが公共データベース上で利用可能であった9種および EST database に配列の登録があった62種の線虫種について FeCH 遺伝子の存在の有無を調べたところ、FeCH 遺伝子を持つ線虫種は糞線虫族及び *Brugia malayi* などのフィラリア類であった。自由生活性線虫及び植物寄生性線虫においては登録されている配列データの中には FeCH 遺伝子は見出されなかった。

今回得られたベネズエラ糞線虫、及びその他動物寄生線虫の FeCH アミノ酸配列を細菌、酵母、ヒトなどの FeCH 配列と比較したところ、線虫類の FeCH は全て C-terminal extension と呼ばれる真核生物型の FeCH 配列に特徴的な約 35 アミノ酸長の領域を欠いていた。

(3) ベネズエラ糞線虫 FeCH の *in vitro* 活性解析

今回見出されたベネズエラ糞線虫 FeCH 遺伝子産物が実際に金属配位酵素 (chelataase) としての活性を示すかどうかを調べるため、組換えタンパクとして大腸菌にベネズエラ糞線虫 FeCH を発現させ、確かに chelataase 活性を持つことを *in vitro* のアッセイ系で確認した。

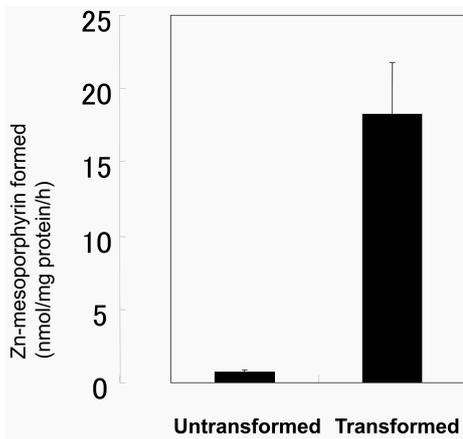


図 1 糞線虫 FeCH の示す chelataase 活性. Untransformed: ネガティブコントロールとして用いた大腸菌, Transformed: 糞線虫 FeCH を発現する大腸菌. 下記雑誌論文リスト 1) より転載.

(4) ベネズエラ糞線虫 FeCH の *in vivo* におけるフェロケラターゼ活性解析

今回見出されたベネズエラ糞線虫 FeCH が *in vivo* の条件においてフェロケラターゼ活性を示すかどうかを確認するため、FeCH を欠損する大腸菌株 (hemH) に糞線虫 FeCH を発現させ、代替ヘム源としてのヘミン要求性の消失を指標とした genetic complementation assay を行った。

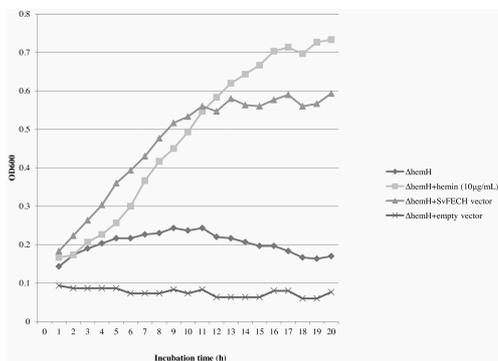


図 2 フェロケラターゼ欠損大腸菌 (hemH) を用いた genetic complementation assay. hemH は代替ヘム源としてのヘミンの非存在下では増殖できないが、ベネズエラ糞線虫 FeCH 発現ベクターで形質転換することでヘム合成能が回復し、ヘミンを加えずとも増殖できるようになる. 下記雑誌論文リスト 1) より転載.

(5) 線虫 FeCH の分子系統解析

今回得られたベネズエラ糞線虫の FeCH アミノ酸配列に NCBI Genbank に登録されている 71 種の原核生物及び 65 種の真核生物に由来する FeCH アミノ酸配列を用い、分子系統解析を行った。

興味深いことに、線虫類の FeCH と線虫を除く後生動物由来の FeCH はそれぞれ明確に異なるクレードに所属することが分かった。線虫類 FeCH は主としてプロテオバクテリア類を含むクレードに内包され、糞線虫の持つ FeCH 遺伝子は、線虫以外の後生動物が持つ FeCH 遺伝子とは明確にその進化的起源が異なり、恐らくはプロテオバクテリアからの遺伝子水平伝播によりもたらされたことが示唆された。

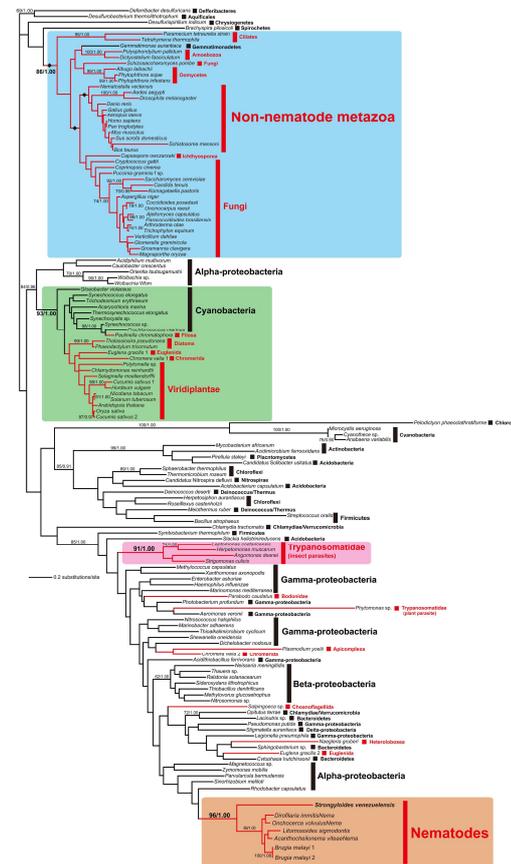


図 3 FeCH タンパクの分子系統解析. 線虫以外の後生動物由来の FeCH (青色の背景の部分の non-nematode metazoa とラベルされた範囲) と線虫由来の FeCH 配列 (オレンジ色の背景の部分) は明確に異なるクレードに位置する. 下記雑誌論文リスト 1) より転載.

(6) ベネズエラ糞線虫 FeCH の発現解析
糞線虫の生活環における様々な発育ステージに属する虫体を回収し、Real-time RT-PCR 法により mRNA 発現量を比較した。図 4 に示すとおり、休眠型ステージである感染幼虫 (L3i) において発現量が著明に低く、本発育ステージにおける全般的な代謝活動の低下を反映しているものと考えられる。

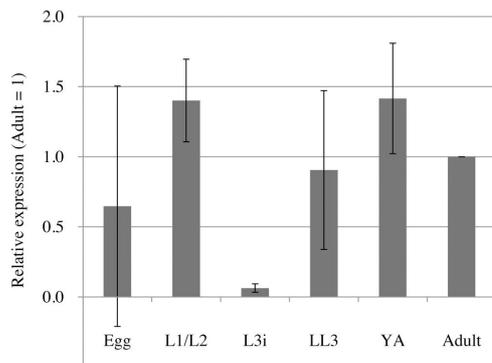


図 4 ベネズエラ糞線虫 FeCH 遺伝子 mRNA 発現量 (Egg: 卵, L1/L2: 第 1/2 期幼虫, L3i: 感染幼虫, LL3: 肺幼虫, YA: 寄生世代の未成熟親虫, Adult: 寄生世代親虫). Adult における発現量を 1 とした時の相対的発現量を示す。図は下記雑誌論文リスト 1) より転載。

(7) 線虫 FeCH の進化的起源に関する考察

線虫類はこれまでヘム合成系酵素遺伝子を全く持たないと考えられてきたが、今回の一連の研究により、一部の動物寄生線虫 (線虫分類クレード IV に属する糞線虫及びクレード III に属するフィラリア類) がヘム合成の最終ステップであるポルフィリン環への鉄の挿入を触媒する酵素である FeCH を持つことがわかった。今回の解析において、自由生活性の線虫種及び植物寄生性の線虫種には FeCH 遺伝子を見出すことができなかった。FeCH 遺伝子を持たない線虫種が大多数であることを考えると、線虫類においては後生動物の共通祖先から引き継がれた FeCH 遺伝子は線虫類の共通祖先に近い部分で既に失われ、その後、少数の動物寄生線虫種においては何らかの必然性によりプロテオバクテリアからの遺伝子水平伝播により細菌型の FeCH 遺伝子が会得されたものと考察された。

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) Nagayasu E, Ogura Y, Itoh T, Yoshida A, Chakraborty G, Hayashi T, Maruyama H: Transcriptomic analysis of four developmental stages of *Strongyloides venezuelensis*. Parasitol Int 62: 57-65, 2013 (査読あり).

- 2) Nagayasu E, Ishikawa SA, Taketani S, Chakraborty G, Yoshida A, Inagaki Y, Maruyama H: Identification of a bacteria-like ferrochelatase in *Strongyloides venezuelensis*, an animal parasitic nematode. PLoS One 8: e58458, 2013 (査読あり).

[学会発表] (計 12 件)

- 1) 長安英治, 伊藤武彦, 小椋義俊, 吉田彩子, 林哲也, 丸山治彦. ベネズエラ糞線虫のゲノム/トランスクリプトーム解析. 第 80 回日本寄生虫学会大会 (2011 年 07 月 17 - 18 日, 東京).
- 2) 長安英治. 糞線虫フェロケラターゼ (鉄挿入酵素) の同定とその起源・役割についての考察. 第 5 回蠕虫研究会, (2011 年 7 月 29 - 30 日, 宮崎).
- 3) Eiji Nagayasu, Yoshitoshi Ogura, Takehiko Ito, Ayako Yoshida, Gunimala Chakraborty, Tetsuya Hayashi, and Haruhiko Maruyama. Transcriptome Sequencing Analysis of *S. venezuelensis*, an Animal Parasitic Nematode. 国際微生物学連合 2011 会議 (2011 年 09 月 6 - 10 日, Sapporo).
- 4) 長安英治. 糞線虫の持つプロテオバクテリア様フェロケラターゼ遺伝子の解析. 第 19 回分子寄生虫学ワークショップ (2011 年 10 月 21 - 23 日, 神戸).
- 5) 長安英治, 石川奏太, 竹谷茂, 稲垣祐司, 吉田彩子, 丸山治彦. 糞線虫の持つ細菌様フェロケラターゼ遺伝子の同定. 第 81 回日本寄生虫学会大会 (2012 年 03 月 23 - 24 日, 西宮).
- 6) Eiji Nagayasu. Bacteria-like ferrochelatase in nematode genome. フォーラムチェジュ 第 15 回日韓寄生虫学セミナー (2012 年 05 月 23 日 - 25 日, 宮崎).
- 7) 長安英治, 丸山治彦. 線虫類における動物寄生関連遺伝子の探索. 第 20 回分子寄生虫学ワークショップ (2012 年 08 月 26 - 29 日, 神戸).
- 8) Nagayasu E, Ishikawa S, Taketani S, Chakraborty G, Yoshida A, Inagaki Y, Maruyama H. Bacteria-like ferrochelatase in animal parasitic nematodes. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity (2012 年 09 月 11 - 14 日, Awaji).
- 9) 長安英治, 小椋義俊, 伊藤武彦, 吉田彩子, 林哲也, 丸山治彦. ゲノム概要配列が未知の寄生虫研究における次世代型シーケンサの活用法. 第 72 回日本寄生虫学会東日本支部会、第 10 回分子寄生虫マラリアフォーラム合同大会 (2012 年 10 月 12 - 13 日, 前橋).
- 10) 長安英治, 丸山治彦. ゲノム/トランスクリプトーム情報に基づく動物寄生関連

遺伝子の検索. 第 72 回日本寄生虫学会
東日本支部会, 第 10 回分子寄生虫マラリ
アフォーラム合同大会 (2012 年 10 月 12
- 13 日, 前橋).

- 11) Nagayasu E, Ogura Y, Itoh T, Yoshida
A, Chakraborty G, Hayashi T, Maruyama
H. Genome and transcriptome analysis of
Strongyloides venezuelensis, an animal
parasitic nematode. International
Symposium on Genome Science “ Expanding
Frontiers of Genome Science (2013 年 01
月 09 - 10 日, Tokyo).
- 12) 長安英治, 小椋義俊, 伊藤武彦, 吉田
彩子, 林哲也, 丸山治彦. ベネズエラ糞
線虫第 3 期幼虫の発育再開時における遺
伝子発現解析. 第 82 回日本寄生虫学会大
会 (2013 年 03 月 29 - 31 日, 東京).

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.miyazaki-med.ac.jp/parasitology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長安 英治 (NAGAYASU EIJI)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号: 20524193

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし