

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659190

研究課題名(和文) 出芽酵母を用いた寄生線虫由来の長寿遺伝子の単離

研究課題名(英文) Isolation of longevity related genes of parasitic nematodes with yeast expression system

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) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：寄生虫が近縁の自由生活種と比べて長寿命である理由を明らかにするため、ベネズエラ糞線虫のドラフトゲノムを構築し、宿主侵入後の遺伝子発現や自由生活線虫との違いを詳細に検討した。

次世代シーケンサによりリードデータを取得しドラフトゲノムを構築した。アセンブル全長は55.5Mb、最長断片長15Mb、N50断片数5、N50最低長2Mbと高品質なドラフトが得られた。タンパク質コード遺伝子は18,048個だった。自由生活線虫と植物寄生線虫には存在せず、動物寄生線虫のみに存在する遺伝子にヘム合成の最終酵素であるフェロケラターゼがあった。この遺伝子は細菌からの水平転移によって獲得したと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Parasitic animals live longer as compared with related free-living species. In order to elucidate molecular basis for the longevity, we constructed a high-quality draft genome of an intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*, to approach this issue with bioinformatics. Statistics of our draft genome were as follows; total size 55.5 Mb, longest scaffold 15Mb, N50 scaffold length 2Mb, with 18,048 predicted coding genes.

One of the genes which exist only in parasitic nematodes but not in free-living nematodes was that for ferrochelatase, which catalyzes the final step of hem-biosynthesis. We confirmed that this gene of *S. venezuelensis* was perfectly functional, though all nematodes including animal parasitic nematodes do not synthesize hem by themselves. Phylogenetic analysis suggested that animal parasitic nematodes acquired this gene from bacteria through horizontal gene transfer. The physiological role could be to detoxify hem, which is highly toxic to cells.

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：線虫 寄生 寿命 ゲノム

1. 研究開始当初の背景

近年のモデル生物を用いた研究により、寿命は、発生や分化と同じく生化学の言葉で記述できる生命現象であることがわかってきた。これまでに明らかにされた、寿命の決定に一定の役割を演ずるシグナル伝達系は、酵母、線虫、ハエ、哺乳動物で共通しているが、シグナル経路の機能喪失により寿命が延びることから、野生型では寿命には一定の限度がもうけられていると考えられる。

一方、寄生虫は近縁の自由生活種と比べると著しく長寿である。つまり寄生虫は、なんらかの「長寿遺伝子」を獲得するように進化してきた可能性が高い。本研究では、ベネズエラ糞線虫の成虫が発現している遺伝子を出芽酵母に導入し、寿命延長作用のある遺伝子を同定する。本研究により、これまでの寿命研究では得られなかった、新規の長寿獲得機構の発見が期待できる。

2. 研究の目的

出芽酵母にベネズエラ糞線虫の寄生世代で発現している遺伝子を導入し、長寿命クローンをスクリーニングして、寿命延長作用を有する糞線虫由来の遺伝子を単離する。または、ベネズエラ糞線虫の高品質ドラフトゲノムを構築し、バイオインフォマティクス的手法を用いて長寿関連遺伝子を同定する。

3. 研究の方法

(1) ベネズエラ糞線虫の寄生世代のメスから cDNA を調整し、出芽酵母でライブラリを作製して、経時寿命 *chronological lifespan* および分裂寿命 *replicative lifespan* についてスクリーニングを実施する。ライブラリは、特定の培養条件下では娘細胞からは出芽しなくなるミュータント酵母で作製する。

経時寿命のスクリーニングはフローサイトメータで死細胞をカウントする方法を、分裂寿命のスクリーニングは培養液の細胞数を濁度 OD600 で計測する方法を用いる。それぞれについて長寿命クローンが得られればインサートの塩基配列を決定し、ベネズエラ糞線虫のゲノム・トランスクリプトーム配列情報から cDNA 全長の塩基配列を決定する。これと並行して、DNA マイクロアレイにより、形質転換酵母における遺伝子発現の変化を網羅的に調べ、導入遺伝子の作用機構を明らかにする。

(2) なんらかの原因により出芽酵母を用いたライブラリ作製で十分な品質が確保できなかった場合には、ベネズエラ糞線虫のドラフトゲノムとトランスクリプトームの情報を最大限に利用し、寿命関連遺伝子の同定を試みる。

具体的には、以下の3つの方法をとる。

ベネズエラ糞線虫の高品質ドラフトゲノムを構築し、遺伝子変異によって長寿命となることが知られているシグナル伝達系関連

遺伝子を精査し、欠損等がないかを調べる。トランスクリプトーム解析により、宿主侵入後に発現が大幅に上昇する遺伝子を同定する。

自由生活種よりも長寿命である動物寄生線虫にしか存在しないトランスクリプトを同定し、生物学的機能を詳しく調べる。

4. 研究成果

(1) 出芽酵母ライブラリ

ベネズエラ糞線虫感染ラットの腸管から寄生世代メスを回収し、polyA+ RNA を抽出・精製した。逆転写反応をおこない Creator SMART システムにより標準化 cDNA を作製した。しかしながら、次の段階である酵母を宿主としたライブラリ調製で、十分なクローン数と多様性を備えたものを構築することができず、ベネズエラ糞線虫のゲノム情報を整備し、バイオインフォマティクス的手法により当初の目的を達成することとした。

(2) 高品質ドラフトゲノム

ゲノムアセンブリ

ベネズエラ糞線虫の感染幼虫から抽出した DNA を用いて、イルミナ TruSeq 300bp ペアエンドライブラリ、および 3kb メイトペアライブラリを作製し、Illumina HiSeq1500 により両端 100bp のゲノムリードを、各々 600 万ペアと 300 万ペア獲得した。

ゲノムリードはアダプターシーケンス除去、エラー修正等の前処理を行った後、Velvet でアセンブルした。得られたコンティグを SSPACE を用いてスキップフォルディングし、PAGIT アプローチおよび ReApr によって、誤リード補正、ギャップフィリング、ミスアセンブリの検出と修正を行った。さらにアセンブリの品質を高めるため、ChefGel により抽出したベネズエラ糞線虫の高分子ゲノム DNA を用いて Optical マッピングを実施し、マッピングデータを取り入れて更なるスキップフォルディングを行った。

以上の手順により、ベネズエラ糞線虫ゲノムのアセンブル全長は 55.5Mb、断片数 642、平均長 86 kb、最長断片長 15Mb、N50 断片数 5、N50 最低長 2Mb となった。これまでに公表された線虫ゲノムは、完全ゲノムである *C. elegans* を除くと N50 断片長は 50 kb~1 Mb であり、われわれのアセンブリはこれらよりも高品質である。

遺伝子予測

ベネズエラ糞線虫ゲノムの遺伝子部位を予測するため、まず 500 個の遺伝子についてマニュアルキュレーションを行った。キュレーションには近縁種の遺伝子情報および RNAseq データのマッピング情報を用いた。次いで、得られたキュレーション済遺伝子を用いて遺伝子予測ソフト Augustus のトレーニングを行い、ベネズエラ糞線虫における最適なパラメータを確立した。

得られたパラメーターとRNAseq マッピング情報を用いてゲノム上の遺伝子予測を行った結果、ベネズエラ糞線虫は 18,048 個のタンパク質コード遺伝子を持っていることが明らかとなった。

長寿関連遺伝子

上述により構築したゲノムおよび遺伝子セットの中から、長寿関連遺伝子のホモログの探索をシミュラリサーチにより行った。

C. elegans で知られている age-1/daf-23, AKT-1, AKT-2, ASNA-1, BRA-1, D2096.8, daf-1, daf-10, daf-11, daf-12, daf-15, daf-16, daf-18, daf-19, daf-1b, daf-2, daf-21, daf-36, daf-3, daf-4, daf-6, daf-8, daf-9, egl-4, FTT-2, GPA-2, GPA-3, hsp-12.6, LET-363, ncr-1, ncr-2, PAR-5, PDK1, RLE-1, scd-2, sdf-13, sdf-14/mrp-1, sod-3, TAX-2, TAX-4, unc-31 は検出できたが、af-14, daf-28, daf-5, daf-7, eak-4, eak-6, hil-1, ins-1, INS-18, ins-4, ins-6, ins-7, scd-1 の存在は確認することができなかった。ただし、これはこれらの機能を持つ遺伝子が存在しないことを直ちに意味するものではないので、今後一層の検討が必要である。

(2) 宿主侵入後に発現が上昇する遺伝子

RNA-seq に用いたベネズエラ糞線虫の発育段階は、虫卵、土壌幼虫、感染幼虫、肺移行期幼虫、粘膜幼若虫、成虫、培養幼虫 (cultured L3i、培養 1 日または 5 日) の 8 通りである。

虫卵または虫体から TRI Reagent®, Ambion によって total RNA を抽出し、次いで poly-A RNA を精製 (Genelute™, Sigma)、RNA-seq ライブラリを作製した (Scriptseq™ v2, Epicentre)。各発育段階の断片にインデックスシーケンスを付加し (Epicentre) HiSeq2000 の 2 lanes を使用し配列情報を得た。RNA-seq の結果、それぞれの発育段階ないし培養条件から $38\text{-}53 \times 10^6$ の高品質リードペアを得ることができた。

次いで HiSeq2000 により得られたリードをベネズエラ糞線虫 cDNA 配列にマップし、単一の cDNA にマップされたリード数を発現量の指標とした。発現量はエクソンの長さによって補正し RPKM (reads per kilobase exon per million mapped reads) として表現した。

これまでの研究によって、ベネズエラ糞線虫の感染直後の虫体に起こる変化は、感染幼虫を培養液中で 37 °C で培養しても再現できることが分かっていたので、ベネズエラ糞線虫において宿主体内に侵入後早期に発現の上昇する遺伝子を決定するため、感染幼虫と比較して培養 1 日後の幼虫で発現量が 10 倍以上に増加しているものを選び出した (表 1)。

発現量の上昇が最も大きかった cre-osm-11 protein は、これまで肺移行時特異的に発現がみとめられる遺伝子のひとつとして同定されていたものである。*C. elegans* では Notch シグナルに参与する転写因子とされており、陰門形成にかかわることがわかっている。ベ

ネズエラ糞線虫においても感染幼虫から成虫へと発育が進むための鍵となるタンパク質である可能性が高い。

それ以外では、patched family protein (Hedgehog シグナル伝達)、daf-12 (ステロイドホルモン核内受容体)、fork head domain containing protein (転写因子) 遺伝子の発現が上昇しており、とくに daf-12 は長寿命に関連しているタンパク質であり、今後集中的に検討する予定である。

表 1 宿主侵入後に発現が上昇する遺伝子

fold-change	B2G_description
54.1	cre-osm-11 protein
38.2	cysteine-rich venom protein
26.7	atp dependent helicase
26.2	cre-col-144 protein
23.9	patched family protein
20.9	cre-dos-3 protein
17.4	proteinase inhibitor i4 serpin
17.2	cre-hch-1 protein
17.0	fatty acid retinoid binding protein precursor
16.1	atp dependent helicase
16.0	transthyretin-like protein 46
15.9	fatty acid retinoid binding protein precursor
15.6	cre-gst-11 protein
15.4	catechol o-methyltransferase domain-containing protein 1
15.3	abnormal dauer formation family member (daf-12)
15.2	ibr domain containing protein
14.9	hypothetical protein BRAFLDRAFT_239922
14.8	cre-cyp-14a1 protein
14.6	fatty acid desaturase
14.5	peptidase family m13 containing protein
12.2	cre-acy-3 protein
12.0	flavin monooxygenase
11.8	gamma-butyrobetaine dioxygenase
11.5	protein hum-9
11.1	glutathione s-transferase 1
10.8	proteinase inhibitor i4 serpin
10.8	cre-osm-11 protein
10.7	metalloproteinase inhibitor tag-225
10.5	valacyclovir hydrolase
10.4	cre-mrp-4 protein
10.3	fork head domain containing protein
10.2	acyl- desaturase
10.2	alpha-aminoadipic semialdehyde mitochondrial-like
10.2	cre-unc-54 protein
10.1	double-stranded rna activated protein kinase 1

(3) 動物寄生線虫特異的遺伝子

ベネズエラ糞線虫の発現遺伝子の中から、他の動物寄生性線虫では発現がみられるが、植物寄生性および自由生活線虫では発現がないものを選び出す目的で、ベネズエラ糞線

虫のトランスクリプトーム解析で得られた13,981個のEST (expressed sequence tag; 発現している遺伝子の一部塩基配列)を問い合わせ配列にして、線虫類のEST統合データベースであるNemabase 4に対してBLAST検索を実行した。Nemabase 4の登録EST数は、動物寄生線虫が114,356個(線虫33種)それ以外の線虫が122,798個(線虫29種)である。

その結果、動物寄生線虫だけに発現しているベネズエラ糞線虫遺伝子を1,305個同定することができた。これらはほとんどが機能不明のトランスクリプトであったが、われわれは有意のアノテーションができていた遺伝子の中でフェロケラターゼに着目した。それは、一般的に線虫類はヘム合成系を欠いており、なぜ糞線虫がヘム合成系の最終段階を触媒する酵素のみを保持しているのか、大変興味を持たれたからである。

最初にEST断片の配列をもとに完全長cDNAをクローニングし、大腸菌発現ベクターに挿入して組換タンパク質を得た。組換酵素は*in vitro*でキレート活性が確認され、さらにフェロケラターゼ欠損大腸菌に導入するとヘミン欠損培地でも欠損株は増殖できるようになった。以上より、ベネズエラ糞線虫由来のフェロケラターゼは、完全に機能的な遺伝子であることが明らかであった。

ヘムタンパク質は生体にとって必要不可欠であり、ヘム合成系を欠損している線虫類は、この点でむしろ奇異な生物グループと考えられる。われわれがクローニングしたベネズエラ糞線虫のフェロケラターゼおよび他の動物寄生線虫のフェロケラターゼ塩基配列を詳細に他種生物と比較すると、系統的には後生動物のものよりも細菌のそれに近いことが分かった。これは、動物寄生に適應した線虫類では、一旦放棄したヘム合成系の中で最終段階のキレート酵素だけを、細菌からの水平転移によって獲得し直したことを強く示唆する。動物寄生線虫といっても系統的には別々のクレードを含むので、本酵素は線虫が動物体内で生活するために必要な酵素なのではないかと考えられる。

線虫の中でのフェロケラターゼの生理機能は未解明だが、ヘムは重要な物質でありながらきわめて強い細胞毒性を持つことから、キレートではなく逆反応の脱キレートを触媒して細胞毒を解毒するという機能が想定される。これが寄生線虫の動物体内での長寿命に貢献しているというシナリオが考えられるであろう。

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5件)

Nagayasu E, Yoshida A, Hombu A, Horii Y, Maruyama H: Paragonimiasis in Japan: A Twelve-year Retrospective Case Review

(2001–2012). *Int. Med.* 査読有 *in press*

Kajitani R, Toshimoto K, Noguchi H, Toyoda A, Ogura Y, Okuno M, Yabana M, Harada M, Nagayasu E, Maruyama H, Hayashi T, Kohara Y, Fujiyama A, Itoh T: Efficient *de novo* assembly of highly heterozygous genomes from whole-genome shotgun short reads. *Genome Res.* 査読有 *in press*

El-Malky MA, Maruyama H, Al-Harhi SA, El-Beshbishi SN, Ohta N: The role of B-cells in immunity against adult *Strongyloides venezuelensis*. *Parasit Vectors.* 査読有 6: 148. doi: 10.1186/1756-3305-6-148, 2013.

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* 査読有 8 (3): e58458, 2013

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.* 査読有 2013, 62 (1): 57-65.

[学会発表](計10件)

Nagayasu E, Ogura Y, Ito 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 (2013.1), Tokyo, Japan.

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10回日本寄生虫学会東日本支部会、第10回分子寄生虫マリアアフォーラム合同大会(2012.10)、前橋市
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10回日本寄生虫学会東日本支部会、第10回分子寄生虫マリアアフォーラム合同大会(2012.10)、前橋市

Yoshida A, Nejsum P, Skallerup P, Thamsborg SM, Maruyama H: Serological diagnosis of Ascarid Visceral Larva Migrants with recombinant antigens. ESCCAP *Toxocara* 2012, 3-5 October 2012, Budapest

Yoshida A, Poulsen CS, Skallerup P, Maruyama H, Thamsborg SM, Nejsum P: Migratory pattern of *Toxocara cati* and *Toxocara canis* in pigs. ESCCAP *Toxocara* 2012, 3-5 October 2012, Budapest

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 (2012.9), Awaji, Japan.

長安英治、吉田彩子、本部工三、黒木美香、丸山治彦：寄生虫症血清診断から見た肺吸虫症の最近の動向 第 24 回日本臨床寄生虫学会学術大会、2013 年 6 月 15 日、奈良市

Yoshida A, Poulsen CS, Skallerup P, Maruyama H, Thamsborg SM, Nejsum P : Migratory pattern of *Toxocara cati* and *Toxocara canis* in pigs. 24th International Conference of the WAAVP, 25-29 August, 2013, Perth

Yoshida A, Skallerup P, Poulsen CS, Nejsum P, Maruyama H, Thamsborg SM : Migratory pattern of *Toxocara cati* and *Toxocara canis* in pigs as a model for human infection. Forum Cheju 16, 30-31 August, 2013, Seoul

Poulsen CS, Yoshida A, Skallerup P, Maruyama H, Thamsborg SM, Nejsum P : Migratory pattern of *Toxocara cati* and *Toxocara canis* in pigs. 8th European Congress on Tropical Medicine and International Health, 10-13 September, 2013, Copenhagen

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 治彦 (MARUYAMA, Haruhiko)
宮崎大学・医学獣医学総合研究科・教授
研究者番号：90229625

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：