

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293099

研究課題名(和文) 日本住血吸虫中間宿主貝のゲノム情報プラットフォームの整備

研究課題名(英文) Building genomic information platform of Oncomelania snails, intermediate host snails of Schistosoma japonicum.

研究代表者

太田 伸生 (Ohta, Nobuo)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：10143611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：日本住血吸虫の中間宿主貝、Oncomelania属貝のゲノム解析を通じた系統解析をおこなった。ゲノム増幅技術を用いて少数個体からのゲノム解析が可能となり、ゲノムサイズが1.47ギガベースであることが確認できた。さらに地理的分布が異なるOncomelania属亜種について全ミトコンドリアゲノムをシーケンスして系統解析をおこなった。その結果、Oncomelania属貝は中国西部地域に分布するものを起源として、揚子江沿いに東進して日本に至ったものとフィリピンに移動したものに分かれたと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Genetic studies on the intermediate host snails, Oncomelania spp, was performed. By the use of genome-amplification method, whole genome analysis was possible from the limited number of snails, and the genome size was 1.47g base, which was much more bigger than Biomphalaria snails. Whole mitochondrial DNA was sequenced and phylogenetic analysis was done about five sub-species of Oncomelania hupensis. Results indicated that the origin of this snail species seemed to be O. h. robertsoni, distributed in the west part of China, and mover to the east to form O. h. hupensis and finally to O. h. nosophora distributed in Japan. The Filipino snails, O. h. quadrasi seemed have separated from O. h. robertsoni. Considering research on Schistosoma japonicum, evolutionary profiles were different from their intermediate host snails.

研究分野：寄生虫学、熱帯医学、感染症学

キーワード：日本住血吸虫 Oncomelania ゲノム解析 系統解析 RNA-seq

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本住血吸虫は東アジア地域に生息域が存在する。*Oncomelania* 属貝が中間宿主であり、寄生虫と中間宿主貝は共進化を遂げたと示唆されるように、同種/属の寄生虫と貝であるにもかかわらず両者の感受性が地理分布ごとに厳密である。その生物学的解析のために地理分布が異なる *Oncomelania* 属貝のゲノム情報を解明することが望まれてきたが、*Oncomelania* 属貝は実験室内で維持することが出来ず、ゲノム解析のための純系試料が得られないことが大きなネックであった。しかし、最近ではゲノム増幅技術が発達し、少数個体を用いたゲノム解析も可能になってきている。

(2) 日本住血吸虫症は日本国内では流行が終息したが、山梨県内には *Oncomelania* 属貝の繁殖フォーカスが残っている。しかし、最近では生息域が減少しており、また国内では最近まで貝の繁殖が確認されていた木更津市内では、この数年貝の存在が確認できなくなった。中間宿主貝のゲノム解析は住血吸虫の寄生生物学を研究する上で重要な情報であるが、日本産の *Oncomelania* 属貝の研究試料が近い将来、日本国内では得られなくなる可能性が高い状況になっている。

2. 研究の目的

従来、研究が遅れていた日本住血吸虫の中間宿主である *Oncomelania* 属貝のゲノムについて解析を進めることが本研究の目的である。ヒトに感染する日本住血吸虫の中間宿主になるのは *Oncomelania hupensis* であるが、その棲息分布によって少なくとも4つの亜種があり、それぞれがその地域の日本住血吸虫の中間宿主として機能している。これらの *Oncomelania* 属貝の亜種間の遺伝学的差異を比較検討することを通じて、その進化的な背景まで検討を進めることにした。

3. 研究の方法

(1) 地理分布ごとの日本住血吸虫と *Oncomelania* 属貝の感染感受性の比較
ヒトに感染する日本住血吸虫の中間宿主となる5つの亜種 (*Oncomelania hupensis*: 中国、*O.h.robertsoni*: 中国、*O.h.nosophora*: 日本、*O.h.quadrasi*: フィリピン)の実験室内維持を確立し、それらのサンプルを用いて、日本産または中国産の日本住血吸虫の感染感受性を比較した。観察はミラシジウムを貝に暴露した後、24時間~16週にわたって貝体内の日本住血吸虫の存在をPCRで追跡し、最終的なセルカリアの游出まで観察した。

(2) *Oncomelania* 属貝の少数個体からのゲノム情報解析
実験室内飼育の *Oncomelania* 貝は野外採集貝であるため、細菌や真菌類のコンタミが避け

られない。そのために貝はゲンタマイシンとアンフォテリシンBで1週間処理し、その後貝1個体からキアゲン社の genome-tip を用いてDNAを抽出して解析を開始した。貝1個体から得たDNA試料の純度を確認して、イルミナシーケンス用ライブラリーを TrueSeq Sample Prep を用いて作製してゲノムサイズの決定を試みた。

(3) *Oncomelania*のミトコンドリアゲノム解析と系統解析

Oncomelania 属貝の4つの亜種について、ミトコンドリアの全塩基配列を次世代シーケンサーによって解析した。その一塩基多型(SNP)情報を基にして、4種の亜種間の系統解析をおこなった。

4. 研究成果

(1) 地理分布ごとの日本住血吸虫と *Oncomelania* 属貝の感染感受性の比較

日本産日本住血吸虫を *Oncomelania* の4亜種それぞれにミラシジウムをチャレンジして、貝体内での発育をPCR法によってモニターした。チャレンジ早期とその後の長期間とで感受性のパターンを整理することが出来た。すなわち、日本産の住血吸虫は中国の *O.h. hupensis* に暴露すると24時間以内にPCRでも住血吸虫DNAが検出できなくなり、貝体内への侵入段階で強い阻害がかかっていることがわかった。同じミラシジウムは山梨の *O.h. nosophora* にはセルカリア游出までの全期間に亘ってPCRが陽性であり、ミラシジウムは中間宿主貝に侵入して発育するプロセスを追跡することが出来た。中国西部の *O.h. robertsoni* に対しては、日本産住血吸虫は高い侵入効率が観察されたものの、比較的早い段階でPCR陰性となり、発育の阻害が起こることが考えられた。フィリピンの *O.h. quadrasi* に対しては、中程度の侵入効率があるものの、やはり早い段階でPCR陰性となった(表1)。宿主寄生体関係からすれば、日本産の *O.h. nosophora* は *O.h. robertsoni* に似ていたが、発育効率の点では大きく異なっていた。

生息地	亜種名	1日後の侵入率	16週後の発育率	
日本	山梨	<i>O.h.nosophora</i>	97%	67%
中国	安徽	<i>O.h.hupensis</i>	10%	5%
	四川	<i>O.h.robertsoni</i>	80%	0%
フィリピン	ボホール	<i>O.h.quadrasi</i>	67%	0%

表1 日本産日本住血吸虫の *Oncomelania* 亜種に対する感受性試験結果

(2) *Oncomelania* 属貝の少数個体からのゲノム情報解析

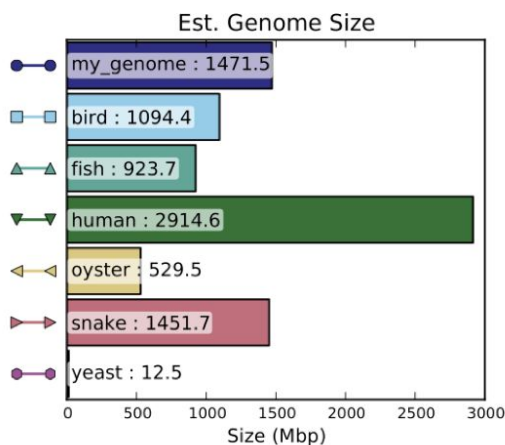
貝1個体の殻と腹足を除いた部分からDNAを抽出してその純度を検討した結果、遺伝子解

析に十分に使用できる純度であることを確認した (Mean Quality Score = 36-37)(表 2)

Sample	Yield (Mb)	# Reads	% of >Q30 base	Mean Quality Score
O.h.nos 1	22546	223231532	93.97	36.8
O.h.nos 2	12232	121104832	93.33	36.64
O.h.nos 3	11594	114772270	94.46	36.93

表 2 抽出 DNA の純度検定

これをもとに、de Bruijn graph による de novo アッセムリーをおこなって、*Oncomelania* 属員のゲノムサイズを 1.471 メガベースと推定した。マンスン住血吸虫の中間宿主貝であるヒラマキガイのゲノムサイズはすでに明らかになっているが、*Oncomelania* はそれに比べてかなり巨大な



ゲノムサイズであることがわかった (図-1)。

図-1 *Oncomelania* (*my_*) のゲノムサイズ

しかし、予測したゲノムサイズよりも実際のものがかなり大きかったため、ショートリード長解析において N50 値が 500 以下であったので、リード数をさらに増やす必要があった。

(3) *Oncomelania* のミトコンドリアゲノム解析と系統解析

Oncomelania の亜種 4 種を用いて、ミトコンドリアの全長の塩基配列決定をおこない、系統解析に供した。これまでに N100 値が 16,000 以上でカバーできる解析を進めることが出来て、4 つの亜種について解析が終了した。全領域に亘って 100X の深度で解析が出来て、ほぼ正確なミトコンドリアゲノム解析が進んだ。

解析の結果、*Oncomelania* 属員のミトコンドリアは 13 の呼吸鎖タンパク質遺伝子、22 の tRNA、2 つの rRNA 遺伝子からなる一般的なミトコンドリア構成であることがわかった (図-2)。100 塩基あたりの多様性を示す

Theta 指標からは多様性が遺伝子ごとに異なり、最も高い多様性は *nad2* 遺伝子に認められた。

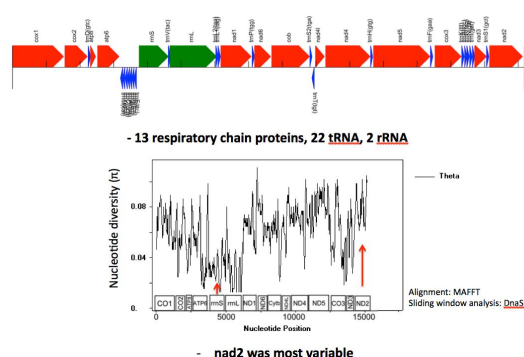


図-2 *Oncomelania* のミトコンドリア遺伝子

全塩基配列決定の結果から 4 つの亜種間の系統解析をおこなった。その結果、中国西部に分布する *O.h. robertsoni* が他の 3 亜種とは違うクレードに属し、次いでフィリピンの *O.h. quadrasi* が系統として分けられ、日本の *O.h. nosophora* と中国揚子江地域の *O.h. hupensis* がごく近縁関係にあることがわかった (図 3)。*O.h. nosophora* と *O.h. robertsoni* とでは全ミトコンドリアゲノムの約 10% に違いが認められている。

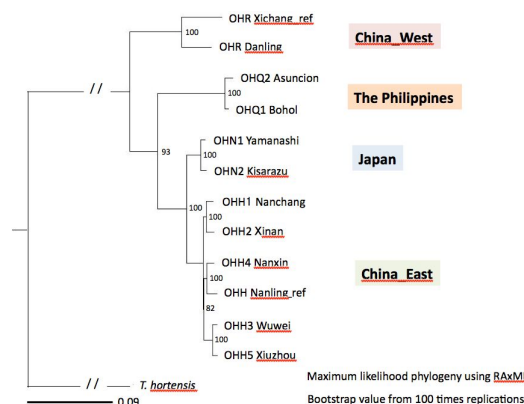


図-3 *Oncomelania* 4 亜種の系統解析

これから推定されることは、日本住血吸虫の中間宿主である *Oncomelania* 属員は中国西部地域がオリジンであり、そこからフィリピンと揚子江流域に広がり、最終的に中国揚子江沿いの貝が日本に至ったことが推定された。ただし、この関係は日本住血吸虫の側から推定される生息域の拡大、すなわち中国東部に起源を持つという説とは一致しておらず、軟体動物宿主がまず存在して、そこに扁形動物である日本住血吸虫が寄生できるようになったことを示していると考えられた。

引用文献

Agatsuma T. Origin and evolution of *Schistosoma japonicum*. Parasitol Int,

52:335-40, 2003.

Ohmae H, Iwanaga Y, Nara T, Matsuda H, Yasuraoka K. Biological characteristics and control of intermediate snail host of *Schistosoma japonicum*. *Parasitol Int*, 52:409-17, 2003.

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4件)

Hino A, Maruyama H, Kikuchi T. A novel method to assess the biodiversity of parasites using 18S rDNA Illumina sequencing; parasitome analysis method. *Parasitol Int*, 査読有 2016 Jan 16.pii:S1383-5769(16)30001-0. doi:10.1016/j.parint.2016.01.009.

Tong QB, Chen R, Zhang Y, Yang G,

Mbenefo EC, Kumagai T, Kodama Y, Kurosaki T, Furushima-Shimogawara R, Cherif MS, Mizukami S, Kikuchi M, Huy NT, Ohta N, Sasaki H, Hirayama K. Immunogenicity and anti-fecundity effect of nano particle coated glutathion-S-transferase DNA vaccine against murine *Schistosoma japonicum* infection. *Parasitol Int*, 査読有 64:24-31, 2015.

Kumagai T, Furushima-Shimogawara R, Lou D, Yang K, Wen L, Lu S, Ohta N, Zhou X. A new surveillance and response tool; Risk map of infected *Oncomelania hupensis* detected by Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) from pooled samples. *Acta Tropica*, 141:170-7, 2014.

Anyan WK, Seki T, Kumagai T, Obata-Ninomiya K, Furushima-Shimogawara R, Kwansa-Bentum B, Akao N, Bosompem KM, Boakye DA, Wilson MD, Karasuyama H, Ohta N. Basophil depletion downregulates *Schistosoma mansoni* egg-induced granuloma formation. *Parasitol Int*, 査読有 62:508-13, 2013.

[学会発表](計6件)

日野明紀菜、菊地泰生、熊谷貴、齋藤康秀、下河原理江子、丸山治彦、太田伸生 日本住血吸虫中間宿主貝 *Oncomelania hupensis* 亜種間の全ミトコンドリアゲノム配列を用いた系統解析 第85回日本寄生虫学会大会、2016年3月20日、宮崎県宮崎市

小笠原啓祐、下河原理江子、熊谷貴、日野明紀菜、二瓶直子、齋藤康秀、太田伸生 日本住血吸虫ミラシジウムの侵入と発育における感染感受性から見た *Oncomelania* spp. 各亜種が示す防御機構の特徴 第85回日本寄生虫学会大会、2016年3月20日、宮崎県宮崎市

Kumagai T, Ichimura K, Yamabe M, Shimogawara R, Ohta N. Female-biased mRNA production through the extracellular vesicles induced by the erythrocyte uptake in the adult worm of *Schistosoma japonicum*. Annual Meeting of US-Japan Cooperative Medical Science Program. January 2016, Washington DC, USA.

下河原理江子、熊谷貴、齋藤康英、二瓶直子、Chen R, 太田伸生 日本住血吸虫の中間宿主貝 *Oncomelania hupensis* spp. が示す侵入と発育に対する防御機構について。第26回日本生体防御学会、2015年7月11日、東京都台東区

Ohta N, Kumagai T, Shimogawara-Furushima R, Seki T, Ishikawa H, Wang T, Chen R, Lu S. ICOPA XII, August 14, 2014, Mexico City.

下河原理江子、熊谷貴、齋藤康秀、二瓶直子、太田伸生 中間宿主貝類 *Oncomelania hupensis* spp. における *Schistosoma japonicum* ミラシジウムの感染性から見た防御機構について 第84回日本寄生虫学会大会、2015年3月15日、東京都三鷹市

[図書](計1件)

熊谷貴、下河原理江子、山邊将史、太田伸生 寄生虫学研究材料と方法 2014, 三恵者

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

特になし

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)研究分担者

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

丸山治彦 (MARUYAMA, Haruhiko)

宮崎大学医学部・教授

研究者番号: 90229625