

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460509

研究課題名(和文)動物寄生線虫(糞線虫)の宿主環境知覚に伴う発育再開メカニズムの解明

研究課題名(英文) Study of the mechanism of resumption of development of Strongyloides larvae by perception of host environment

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：糞線虫の感染幼虫(L3i)が動物宿主へ侵入を果たした後、どのような刺激を受け取り発現遺伝子の変化、そして形態変化がおこっていくのかはよく分かっていなかった。

我々は動物宿主侵入後に発現量が急増するGFAT1遺伝子の発現調節の研究を介して、L3iの動物体内での発育再開を引き起こす刺激の本態を探りたいと考えた。様々な条件を用いて行ったin vitro発育再開刺激実験の結果を総合すると、このGFAT1遺伝子発現増加には幼虫を取り巻くグルコース濃度の上昇が最も大きく関わっていることが判明し、またこの発現調節はムスカリン様受容体を介した神経伝達に支配されていることが想定された。

研究成果の概要(英文)： It was not well understood what kind of environmental cues are perceived by Strongyloides infectious larvae (L3i), which leads to changes in gene expression and morphology. In the present study, we especially focused on studying mechanism of regulation of expression of GFAT1 gene, that was identified as one of the genes which showed remarkably up-regulated expression, once larvae are inside the animal host.

Taken the experimental results obtained in the present study together, we concluded that glucose concentration surrounding larvae are the most responsible for the elevation of GFAT1 expression. It was presumed that the elevation of GFAT1 expression is under the control of neurological pathway which involves muscarinic receptors.

研究分野：寄生虫学

キーワード：糞線虫 感染幼虫 GFAT 発現調節

## 1. 研究開始当初の背景

糞線虫(genus *Strongyloides*)は脊椎動物を宿主とする腸管寄生線虫である。ヒトを主要な宿主とするステルコリス糞線虫(*S. stercoralis*)をはじめ、約 50 種が報告されている。宿主動物の腸管粘膜に寄生している寄生世代成虫は腸管内で産卵し、虫卵もしくは孵化した第 1 期幼虫が糞便とともに外界へ排出される。糞便汚染土壤中での発育により最終的に第 3 期感染幼虫(L3i)と呼ばれる発育ステージに至る。L3i は発育停止状態にあり、もはや摂食行動を行わない。体内に蓄積した脂質等を消費しつつ新たな動物宿主へ寄生する機会をうかがう。

L3i が宿主動物の皮膚からの侵入を果たすと、摂食行動及び発育の再開がおり、幼虫が最終寄生部位である腸管粘膜に到着した後に 2 回の脱皮を行い成虫となる。またラットを自然宿主とする糞線虫種であるベネズエラ糞線虫 L3i を動物宿主に感染させなくとも、DMEM 培地中に 37 で 3 日間培養することで、幼虫頭部の球状化といった、*in vivo* (動物感染)で見られるのと同様の形態変化が起こることが報告されていた (Tsuji *et al.*, 1994)。この報告により、糞線虫の発育再開には温度の変化や、栄養環境の変化が関わっていることが示唆された。

本研究に先立って我々が行ったトランスクリプトーム解析により、*in vivo* (動物感染)および *in vitro* (培養実験)両方の実験系で、感染後、あるいは培養開始後に発現量が急増する遺伝子群が明らかとなった。この中で、我々は glucosamine - fructose - 6 - phosphate aminotransferase (GFAT)と呼ばれる酵素遺伝子の発現急増に着目し、本遺伝子を後の *in vitro* 発育再開刺激実験のためのマーカーとして選択した (SvGFAT1 と命名)。GFAT は nutrient sensing pathway としての役割を担うとされるとされるヘキソサミン経路の律速酵素であり、最終産物である UDP-GlcNAc (ウリジン二リン酸 N-アセチルグルコサミン)はヒストンや転写因子など、様々なタンパク質機能を O-GlcNAc 修飾を介して調節していることが知られ、糞線虫においても外界から宿主体内環境という非常に異なった環境、栄養条件への適応に重要な役割を担うことが予想されたからである。

## 2. 研究の目的

糞線虫の感染幼虫が動物宿主体内に皮膚からの侵入を果たした後におこる発現遺伝子の変動に関し、特に GFAT1 遺伝子の感染後における発現量急増という現象に着目し、この現象が、どのような環境変化に最も影響を受けているのかを *in vitro* の発育再開刺激実験で明らかにしたいと考えた。また、GFAT1 遺伝子の発現急増を引き起こすような条件で、他にどのような遺伝子群の変動が見られるのかを、トランスクリプトーム解析

で明らかにしたいと考えた。

## 3. 研究の方法

糞線虫各発育ステージにおける GFAT1 遺伝子の発現量の変化

ベネズエラ糞線虫(*S. venezuelensis*)を Wistar ラットを用いて実験室内で維持した。糞便から虫卵を飽和食塩水浮遊法で回収した。回収した虫卵をリン酸緩衝液 (PBS) 中で 1 晩培養することで第 1 期幼虫/第 2 期幼虫の混合ステージを得た。糞便濾紙培養により感染幼虫(L3i)を得た。感染幼虫を C57BL/6 マウスに感染させ、72 時間後に肺より肺幼虫、80 時間後に小腸より未成熟成虫を得た。また感染後 8-10 日後のラット小腸より寄生世代雌成虫を回収した。各々の発育ステージの虫体は回収後速やかに -80 に凍結保存した。

虫体は破碎器具(SK ミル, トッケン)を用いて凍結粉碎し、TRI Reagent (Sigma-Aldrich)を用いて total RNA を精製した。Total RNA を出発材料として cDNA 合成を行った(PrimeScript RT-PCR kit, Takara)。得られた cDNA を用いて Real-time RT-PCR を行った(GoTaq qPCR Master Mix, プロメガ)。

## 4. 研究成果

糞線虫各発育ステージにおける SvGFAT1 遺伝子の発現量の変化 (Real-time RT-PCR)

各種発育ステージ間の比較を行ったところ (図 1) 宿主体外で感染機会を覗く L3i のステージではほとんど発現がみられないのに対して、宿主体内へ侵入後のステージである LL3 (肺幼虫)のステージで、発現が急増していることが分かった。しかしながらそれからわずか 8 時間後の未成熟成虫 (YA) の時期には発現量が急減しており、また完全に成熟した寄生世代成虫ではほとんど発現がみられないことが分かった。このことから GFAT1 は外部環境から宿主体内へ移行した後に何らかの刺激により発現量が急増するものの、この発現量の増加は一過性のものであることが判明した。

*In vitro* 発育再開刺激による GFAT1 遺伝子発現の誘導

Tsuji らにより、頭部の球状化といった特徴的な形態学的変化を引き起こすことが報告されている DMEM (High glucose) 培地中で、L3i を 37、24 時間培養することで、GFAT1 遺伝子の発現が上昇 1xPBS 中、27 という培養条件と比較して約 86 倍と急増した(図 2)。一方グルコースを含まない DMEM 培地を用いた場合においても発現量は増加したが、DMEM High glucose (4.5g/L のグルコースを含む)を用いた場合の約 40%程度に留まっ

た。

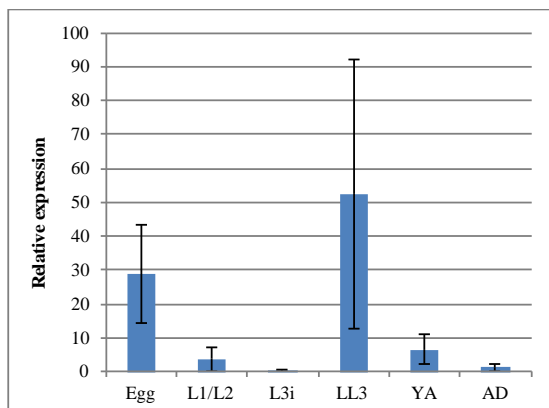


図 1 ベネズエラ糞線虫各発育ステージにおける GFAT1 遺伝子の発現量の変動 (Real-time RT-PCR 法) Egg:虫卵, L1/L2:第 1 期/第 2 期幼虫, L3i:感染幼虫, LL3 (肺幼虫)、YA (未成熟成虫)、AD:成虫

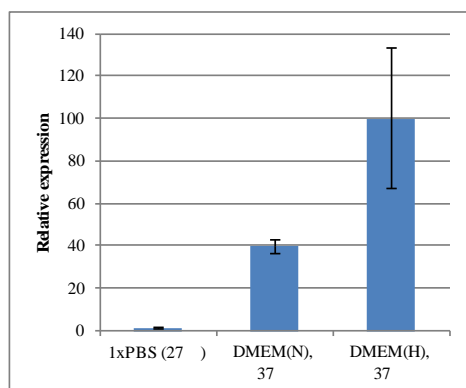


図 2 ベネズエラ糞線虫 L3i *in vitro* 発育再開刺激実験における GFAT1 遺伝子発現量の変化 (Real-time RT-PCR 法)

#### 培地中のグルコース濃度と GFAT1 発現量との関係

前述の DMEM(high glucose)培地はラットの平均的な空腹時あるいは食時後 2 時間後の血糖値 0.71g/L あるいは 1.0g/L (Wang *et al.*, 2010) と比較し遥かに高い濃度のグルコース (4.5g/mL) を含む。生理的なグルコース濃度においても GFAT1 遺伝子の発現上昇が見られるかどうかを、異なった濃度のグルコースを含む DMEM 培地を用いて検討した。その結果、GFAT1 発現量はグルコース濃度が 0.28g/L の段階で既にグルコースを含まない培地を用いた場合と比較して約 2 倍に達し、グルコース濃度が 2.25g/L に達するまでは GFAT 発現量はほぼ直線的に増加した(図 3)。このことから、GFAT1 の発現量の上昇は生理的グルコ

ース濃度の範囲で認められることが分かった。

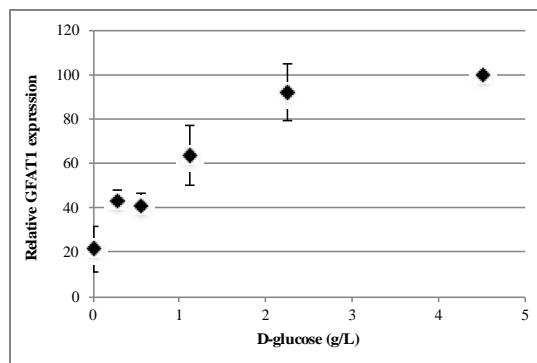


図 3 培地中のグルコース濃度と GFAT1 遺伝子発現量との関係 (*in vitro* 発現再開刺激実験) (Real-time RT-PCR 解析)

#### アトロピンによる GFAT1 遺伝子発現誘導の阻害

糞線虫感染幼虫の発育再開はモデル生物として知られる *C. elegans* の耐性幼虫 (dauer larva) の発育再開現象 (dauer recovery) と進化的に相同な現象なのではないかという仮説 (dauer hypothesis) のもと、*C. elegans* の dauer recovery を阻害することが知られるムスカリン受容体に対する拮抗薬であるアトロピンの糞線虫感染幼虫発育再開に伴う GFAT1 遺伝子発現上昇に対する効果を検討した。アトロピンは 5mM の濃度で、この GFAT1 遺伝子発現上昇をほぼ完全に阻害した (図 4)。このことから、栄養環境の改善にともなう宿主の知覚がムスカリン受容体を介した神経伝達のもとに GFAT1 遺伝子発現上昇という現象に結びついていることが想定された。

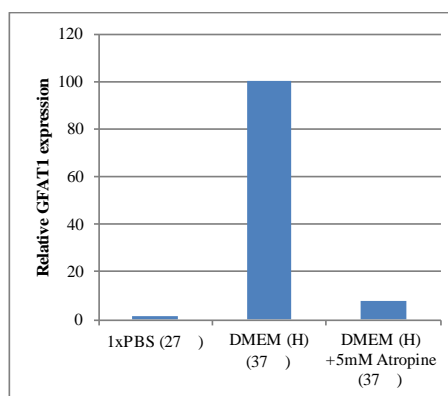


図 4 アトロピンは DMEM (H: high glucose) による GFAT1 遺伝子発現誘導を阻害する。 (Real-time RT-PCR)

## ベネズエラ糞線虫概要ゲノム配列とトランスクリプトームシーケンシング

本計画研究と相前後してヒトを主要な宿主とする糞線虫種である *S. stercoralis* (ステルコラリス糞線虫)、ラットを宿主とする *S. rattii* および *S. venezuelensis* など、糞線虫種 4 種および近縁線虫種 2 種 (*Parastrongyloides trichosuri*, *Rhabditophanes* sp. KR3021) を対象とした国際的なゲノムシーケンシングプロジェクトが進行していた。本計画研究遂行において、高品質なベネズエラ糞線虫ゲノム配列およびトランスクリプトーム配列に関する情報基盤が整備されていることは非常に重要であると考えられた。当研究室(宮崎大学)においては、ベネズエラ糞線虫のゲノム DNA および各種発育ステージ(L1/L2, L3i, Lung L3, Young adult, Adult 及び、発育再開刺激実験に由来する L3i (培養 1 日および 5 日目に採材したもの)虫体に由来する RNA サンプルを調整した。国内外の研究機関との共同研究により、ベネズエラ糞線虫の概要ゲノム配列が決定された(主な発表論文等)。ベネズエラ糞線虫のゲノムサイズは 52.1Mb でありモデル生物として知られる線虫 (*Caenorhabditis elegans*) の約半分程度であった。また予測される遺伝子数は 16,904 と、*C. elegans* ゲノム(17,500 遺伝子)とほぼ同程度であった。Illumina HiSeq2000 シーケンサを用いて産出されたトランスクリプトームシーケンシングデータは公共データベースに登録された (NCBI accession: PRJDB3457)

新規に得られたベネズエラ糞線虫ゲノム配列を対象に、あらためて GFAT 遺伝子の探索を行ったところ、過去に Roche454 シーケンサを用いて行ったトランスクリプトームシーケンシング(Nagayasu *et al.*, 2013)では見出すことのできなかった「もう一つの」GFAT 遺伝子の存在が明らかとなり、GFAT2 と命名した。糞線虫各発育ステージごとの GFAT2 遺伝子の発現量の変動を見るために、半定量的 RT-PCR 解析を行った。L3i で殆ど発現が見られないのは GFAT1 と同様であったが、Lung L3 においても殆ど発現がみられず、腸管到達後のステージ(Young adult)で発現がみられ、Adult stage ではさらに発現量が増強した。したがって GFAT1 と GFAT2 という 2 つのパラログ遺伝子の発現調節は非常に異なっているということが分かった。

### 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 1 件)

Hunt VL, Tsai IJ, Coghlan A, Reid AJ, Holroyd N, Foth BJ, Tracey A, Cotton JA, Stanley EJ, Beasley H, Bennett HM,

Brooks K, Harsha B, Kajitani R, Kulkarni A, Harbecke D, Nagayasu E, Nichol S, Ogura Y, Quail MA, Randle N, Xia D, Brattig NW, Soblik H, Ribeiro DM, Sanchez-Flores A, Hayashi T, Itoh T, Denver DR, Grant W, Stoltzfus JD, Lok JB, Murayama H, Wastling J, Streit A, Kikuchi T, Viney M, Berriman M: The genomic basis of parasitism in the Strongyloides clade of nematodes. **Nat Genet**, 査読有り, 48: 299-307 (2016)

[学会発表](計 0 件)

[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

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

( )

研究者番号:

#### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

#### (4) 研究協力者

( )