

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 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：26460510

研究課題名(和文) 芽殖孤虫のゲノム解読による条虫類幼虫における無性増殖機構の解明

研究課題名(英文) Larval proliferation mechanisms of pathogenic cestodes revealed by draft genome sequence of *Sparganum proliferum*.

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：マンソン孤虫による通常の孤虫症と違い、芽殖孤虫は人体内で無性的に増殖し、感染は致死的に経過する。芽殖孤虫の無性増殖の謎を解明するため、マンソン孤虫と芽殖孤虫のゲノムを決定し両者を比較した。

芽殖孤虫のゲノムサイズは653 Mb、マンソン孤虫は796 Mbで、芽殖孤虫のゲノムでは16の遺伝子ファミリーが増大し、26の遺伝子ファミリーが縮小していた。増大していた遺伝子ファミリーは既知の遺伝子と相似性が低かったが、増大したファミリーの遺伝子には臓器分化、シグナル伝達、アポトーシスに関連するものがあった。これは、宿主内という定常環境に生息し臓器を持たないプレロセルコイドの活動を反映したものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Sparganosis is caused by the plerocercoid of Pseudophyllidean tapeworms. While *Spirometra* spp. cause benign sparganosis, *Sparganum proliferum* causes fatal disease, in which plerocercoids proliferate continuously in humans, resulting in the death of the patient. We compared the genomes of *S. proliferum* and *S. erinaceieuropaei*, to understand the basis for *S. proliferum* pathogenicity.

We produced a 653 Mb assembly with N50 of 1.2 Mb for *S. proliferum* and a 796 Mb assemblies with N50 of 821 kb for *Spirometra* spp., respectively. In *S. proliferum* genome, 16 gene families were expanded and 26 families were contracted. Most of the expanded gene families did not have good similarities to known genes. Some of the contracted gene families were associated with organ development, signal transduction, and apoptotic processes. These changes in *S. proliferum* genome seem to reflect the activities of plerocercoids, which do not have developed organs and live in the stable environment.

研究分野：寄生虫学

キーワード：孤虫症 芽殖孤虫 条虫 比較ゲノム プレロセルコイド 病原性 寄生虫

### 1. 研究開始当初の背景

芽殖孤虫症は、きわめて希であるが致命的な寄生虫感染症で、わが国で 1905 年に最初の症例が東京で発見された。飯島魁によって原因寄生虫は芽殖孤虫と命名された。それ以来わが国や北米、中南米で散発的な発生があり、ヒト以外の哺乳類での発症も報告されている。いわゆる奇病とあってよく、症状はきわめて特異であり、「ワサビの根のよう」と表現される虫体が皮下をはじめとした体内各臓器で増殖し、皮下や内部臓器に多発性の腫瘤を形成して組織を破壊する。これまでに救命され得た例はない。

芽殖孤虫は擬葉類条虫のプレロセルコイドであろうとは以前から指摘されていたが、近年、わが国の研究グループによって核およびミトコンドリアゲノム上にコードされている酵素遺伝子の塩基配列が決定され、実際に、芽殖孤虫はマンソン裂頭条虫とごく近縁の独立種であることが明らかになった。しかしながら、これらの研究で得られた生物学的なデータはごく限られており、成虫は何か、なぜ芽殖孤虫のプレロセルコイドは人体内で増殖するのかなど、芽殖孤虫の謎自体は解き明かされていない。

### 2. 研究の目的

芽殖孤虫およびマンソン孤虫からゲノム DNA および RNA を抽出し、次世代型 DNA シーケンサを用いて塩基配列を決定する。リードデータをアセンブルし、転写産物のデータを活用して遺伝子予測をおこなって完成度の高いドラフトゲノムを構築し、両者のゲノムを詳細に比較することで、芽殖孤虫に特異的な遺伝子ないしゲノム構造を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) DNA/RNA の調整とライブラリ作製

連携研究者である倉持により国立科学博物館で維持されている芽殖孤虫の虫体および野生のシマヘビに寄生しているマンソン孤虫からゲノム DNA を抽出し、イルミナ社 HiSeq のプロトコルにしたがって DNA 断片を調製した。ライブラリは、ペアエンド(100 bp x 2, インサート長 500 bp)とメイトペア(100 bp x 2, インサート長 3kb ~ 15kb)の計 5 種類を作製した。

#### (2) ゲノムアセンブル

アセンブルは、上記のゲノム DNA ライブラリからイルミナシーケンサによってリードを得て、Platanus (東京工業大学・伊藤研究室)を用いて実施した。次いで Haplomerger によりハプロタイプで異なる塩基配列を除去し、ロングインサートのリードを用いてスキップフォルダ (SSPACE) によりスキップフォルドを構築し、Image によるギャップフィリング、Reapr によるミスアセンブリ補正を経て、高精度のアセンブリを得た。

#### (3) 遺伝子予測

RNAseq 解析では、複数個体をプールした虫体から RNA を抽出し、イルミナ社のプロトコルにしたがって cDNA を合成し、リードを取得した。ライブラリは、スプライスバリエーション等の検出のため、インサート長 500 bp のペアエンドとした。

次いで、ゲノムアセンブリをもとに RNAseq のデータを最大限に活用して遺伝子予測ソフトウェア Augustus (v. 3.0.1) にマニュアルキューレーションを実行した遺伝子セットを用いて「トレーニング」をおこない、信頼度の高い遺伝子セットを獲得した。

#### (4) 反復配列

ゲノム中の反復配列は、RepeatModeler と TransposonTSI の組み合わせで同定した。

#### (5) 遺伝子ファミリー解析

種分化における遺伝子ファミリーの獲得と喪失は、OrthoFinder によって得たオルソログ遺伝子ファミリーを CAFÉ (v3) により解析して計算した。

### 4. 研究成果

#### (1) ゲノム概要

ゲノムシーケンシングはイルミナ社の DNA シーケンサを用い、主に HiSeq2500、一部 Miseq によりデータを得た。それぞれの虫種でペアエンド 3 ライブラリ、メイトペアは 7 ライブラリ (3kb, 8kb, 12kb, 15kb) をシーケンスし、総リード数は芽殖孤虫が 13.1 億でデータ総量は 205 Gb、マンソン孤虫が 11.1 億リードで 205 Gb であった (表 1)。

RNAseq は HiSeq2500 で各 2 回実施し、芽殖孤虫が 8.9 Gb、マンソン孤虫では 8.1 Gb の塩基配列データを得た (表 1)。

表 1 産出データ量

	芽殖孤虫	マンソン孤虫
ゲノム DNA		
リード数	1,308,870,692	1,114,464,686
塩基数 (Mb)	204,980	205,013
RNA		
リード数	88,455,820	79,741,978
塩基数 (Mb)	8,934	8,054

アセンブルの結果は、芽殖孤虫の推定ゲノムサイズが 654 Mb、N50 スキャップフォルドサイズが 1.24 Mb で、ギャップが 51.1 Mb (全ゲノムの 7.8%) であった (表 2)。

一方、マンソン孤虫では推定ゲノムサイズ 796 Mb、N50 スキャップフォルドサイズが 0.82 Mb、ギャップが 77.8 Mb (全ゲノムの 9.8%) であった。

以上より、両者ともに概要ゲノムとして十分公開可能なレベルに到達した。予測遺伝子数は、芽殖孤虫が 15,492 個、マンソン孤虫が 17,868 個であり、芽殖孤虫の方が 2,376 個(約 13%) 少なかった (表 2)。

表2 ゲノム諸数値

	芽殖孤虫	マンソン孤虫
アセンブルサイズ (Mb)	653.8	796.0
スキップフォルド数	7,621	5,723
平均スキップフォルド長 (kb)	86	139
最長スキップフォルド長 (kb)	8,099	5,490
N50 (kb)	1,241	821
N50 (n)	146	271
N90 (kb)	109	167
N90 (n)	700	1,079
Gaps (kb)	51,118	77,788
遺伝子数	15,492	17,868

### (2) 芽殖孤虫の系統上の位置

芽殖孤虫と他の条虫類との系統的な関係を確定させるため、191 個の核ゲノムオルソログ遺伝子、および 12 個のミトコンドリア遺伝子について、既知の条虫配列と比較し、系統樹を描出した。

その結果、核ゲノムでもミトコンドリアゲノムでも、擬葉類条虫と円葉類条虫はそれぞれクレードを形成し、擬葉類の中で芽殖孤虫とマンソン孤虫は単一のクレードにまとまっていた。

芽殖孤虫とマンソン孤虫の関係では、ミトコンドリア遺伝子では両者は分離していなかったが、核ゲノムでは明瞭に芽殖孤虫とマンソン孤虫が分離していた。よって、芽殖孤虫とマンソン孤虫は明らかな別種に位置づけられてよいと考えられた。

以上の知見は芽殖孤虫とマンソン孤虫は近縁だが別種であることを示しており、これはこれまでに予想されていたことであるが、今回のわれわれのデータにより、この見解が確定したと考えてよい。

### (3) ゲノム中の反復配列

ゲノムアセンブルの結果、推定ゲノムサイズは、芽殖孤虫が 654 Mb、マンソン孤虫が 796 Mb で、高品質な概要ゲノムが報告されている円葉類条虫と比べると 3~5 倍大きく、反復配列の存在が疑われた。

そこで、全ゲノムに占めるリピート部分を解析したところ、芽殖孤虫とマンソン孤虫どちらのゲノムも 50%以上あり、特に LINE (long interspersed element) が、芽殖孤虫で 26.3%、マンソン裂頭条虫で 31.9%と多くを占めていた。LINE の中でも RTE-BovB が大きく増大していた。これは、これまでに知られている円葉類条虫 (多包条虫、単包条虫、有鉤条虫、*Hymenolepis microstoma*) との大きな違いであった (表 3)。

一方、SINE (short interspersed element) および LTR 型レトロトランスポゾン、芽殖孤虫とマンソン裂頭条虫ではどちらのゲノムでも 1~2%であった。

表3 ゲノム中の反復配列

芽殖孤虫	エレメント数	% 塩基数
SINEs:	49,435	1.59
LINES:	390,953	26.32
Penelope	139,623	7.95
RTE-BovB	162,469	10.24
CR1	75,037	7.59
LTR element:1	18,276	1.79
Gypsy	16,179	1.56
DNA element:	22,386	1.38
CMC-EnSpm	5,795	0.35
TcMar-Tc1	8,162	0.59
Small RNA:	2,906	0.15
Satellites:	10,967	0.39
Simple repeat:	80,123	1.21
Low complexity:	3,841	0.04
Unclassified:	378,820	20.68
計	1,004,498	54.99

マンソン孤虫	エレメント数	% 塩基数
SINEs:	45184	1.09
LINES:	519,275	31.90
Penelope	214,116	10.41
RTE-BovB	188,656	11.18
CR1	101,503	9.37
LTR element:1	25,374	1.88
Gypsy	24,544	1.81
DNA element:	54,802	2.48
CMC-EnSpm	16,161	0.69
TcMar-Tc1	7,416	0.53
Small RNA:	2,955	0.08
Satellites:	5,823	0.16
Simple repeat:	68,909	0.76
Low complexity:	5,690	0.06
Unclassified:	425,608	15.92
計	1,185,136	55.14

### (4) 遺伝子ファミリー解析

芽殖孤虫とマンソン孤虫の共通の祖先から芽殖孤虫へと分化する段階で、16 の遺伝子ファミリーが増大し、26 の遺伝子ファミリーが縮小していた。

増大していた遺伝子ファミリーのほとんど (11/16) は、既知の遺伝子とは似ておらず、機能未知と考えられた。一方、縮小した遺伝子ファミリーには、臓器分化、シグナル伝達、アポトーシスに関連するものがあつた。

### (5) まとめと考察

芽殖孤虫とマンソン孤虫の概要ゲノムの決定により、以下のことが明らかとなった。

- 1) 芽殖孤虫はマンソン孤虫と近縁の擬葉類条虫である
  - 2) 両種ともゲノムに多くの反復配列、特に RTE-BovB を含む
  - 3) 芽殖孤虫への分化において、臓器発生、トランスポート、シグナル伝達に関わる遺伝子ファミリーに大きな変化が生じていた
- ゲノム学的に興味深い点として、反復配列 LINE RTE-BovB がある。これは反芻動物

やヘビに広くみられ、爬虫類から哺乳類へ水平転移によって移動してきたと考えられている。これが糸虫ゲノムに多く存在するという事実は、LINE RTE-BovB はゲノムに書き記された過去の宿主の記録である可能性を示唆するものと考えられる。

芽殖孤虫に起きた遺伝子ファミリーの変化で、臓器分化、シグナル伝達、アポトーシスに関連するものが縮小していたが、これは宿主内という定常環境に生息し臓器を持たないプレロセルコイドの活動を反映している可能性がある。

今の段階では、なぜ、どのようにして芽殖孤虫のプレロセルコイドが宿主内で無性的に増殖しうるのかという問への答は得られていないが、ゲノム全長にわたってさらに精査することで、この大きな謎が解ける可能性は十分にあると考えている。

## 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6件)

Tsubokawa D, Hatta T, Kikuchi T, Maeda H, Mikami F, Alim MA, Maruyama H, Tsuji N.: Venestatin, a Ca<sup>++</sup>-binding protein from the parasitic nematode *Strongyloides venezuelensis*, is involved in the larval migration process. Int J Parasitol. 2017 Mar 24. pii: S0020-7519(17)30084-X. doi: 10.1016/j.ijpara.2017.01.008. 査読あり

Kikuchi T, Hino A, Tanaka T, Aung MP, Afrin T, Nagayasu E, Tanaka R, Higashiarakawa M, Win KK, Hirata T, Htike WW, Fujita J, Maruyama H.: Genome-Wide Analyses of Individual *Strongyloides stercoralis* (Nematoda: Rhabditoidea) Provide Insights into Population Structure and Reproductive Life Cycles. PLoS Negl Trop Dis. 2016 Dec 29;10(12): e0005253. doi: 10.1371/journal.pntd.0005253. eCollection 2016 Dec. 査読あり

Yoshida A, Matsuo K, Moribe J, Tanaka R, Kikuchi T, Nagayasu E, Misawa N, Maruyama H.: Venison, another source of *Paragonimus westermani* infection. Parasitol Int. 2016 Dec;65(6 Pt A):607-612. doi: 10.1016/j.parint.2016.09.009. Epub 2016 Sep 17. 査読あり

Yoshida A, Kikuchi T, Nakagaki S, Maruyama H.: Optimal ELISA antigen for the diagnosis of *Ascaris suum* infection in humans. Parasitol Res. 2016 Dec;115(12):4701-4705. Epub 2016 Sep 8. 査読あり

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. 2016 Oct;65(5 Pt B):572-575. doi:

10.1016/j.parint.2016.01.009. Epub 2016 Jan 16. 査読あり

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, Maruyama H, Wastling J, Streit A, Kikuchi T, Viney M, Berriman M.: The genomic basis of parasitism in the *Strongyloides* clade of nematodes. Nat Genet. 2016 Mar;48(3): 299-307. doi: 10.1038/ng.3495. Epub 2016 Feb 1. 査読あり

[学会発表](計1件)

Draft genome sequence of *Sparganum proliferum* revealed phylogenetic and genetic relationships with *Spirometra erinaceieuropaei*. 菊地泰生、丸山治彦、倉持利明、第86回日本寄生虫学会大会、2017年5月28日~29日(北海道大学学術交流センター、札幌市)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[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・医学部・教授  
研究者番号: 90229625

(2)研究分担者

菊地 泰生 (KIKUCHI TAISEI)  
宮崎大学・医学部・准教授  
研究者番号: 20353659

(3)連携研究者

倉持 利明 (KURAMOCHI TOSHIAKI)  
独立行政法人国立科学博物館・動物研究部・研究部長  
研究者番号: 80277590

(4)研究協力者

なし