

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790407

研究課題名(和文) 統合型オミックス解析によるエキノкокスのエネルギー代謝マップの作成

研究課題名(英文) A study on energy metabolism of fox tapeworm *Echinococcus multilocularis*

研究代表者

松本 淳(Matsumoto, Jun)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：70296169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：エキノкокス(以下「Em」)は国内にも分布する人獣共通寄生虫で、感染者に深刻な健康被害をもたらしている。本研究では、Emに特徴的なエネルギー代謝マップを描き、Em症に対する創薬研究の推進に資することを目的とした。Em虫体に含まれる代謝物質を網羅的に解析した結果、Emは、宿主哺乳類とは異なる嫌氣的代謝機構を利用していることが示唆された。一方、Emによるエネルギー代謝の出発点となるグルコース摂取に関わる遺伝子の解析を進めた結果、受動輸送型および能動輸送型の両タイプのトランスポーターが機能していることが示唆された。Emが保持するエネルギー代謝経路の全体像を明らかにすべく、引き続き研究を推進したい。

研究成果の概要(英文)：Echinococcus multilocularis (Em) is a zoonotic parasite, distributed widely in northern hemisphere including Japan. The larval stage of Em causes life-threatening disease in humans called alveolar echinococcosis. The present study aimed to provide an overview of energetic metabolism pathway in Em. The result of metabolomics analysis using larval Em cultured under aerobic/anaerobic condition suggests that the parasite possesses both aerobic and anaerobic metabolic pathways. The presence of the putative anaerobic pathway is consistent with our previous study (Matsumoto et al., 2008), leading us to infer that the parasite uses this unique metabolic pathway to survive in anaerobic conditions in host tissues. In addition, we obtained the complete sequence for 3 glucose transporter genes, which are supposed to be involved in energy uptake by Em. Further analyses on energy metabolism in Em are presently carried out to identify novel targets for chemotherapy of alveolar echinococcosis.

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：寄生虫 エキノкокス エネルギー代謝 メタボロミクス グルコース トランスポーター 創薬 寄生適応

1. 研究開始当初の背景

(1) エキノコックス症の現状： エキノコックス(多包条虫)は、感染者に致死的な健康被害をもたらす人獣共通寄生虫である。人体エキノコックス症は、国内における動物由来感染症リスクプロファイリングの結果、ハイリスク感染症として上位にランクされている(吉川ら、2009)。特に、本症に対する有効な治療薬が未開発であることが、問題を一層深刻化させており、新規治療薬の創製に向けた研究の推進は、私たち研究者に課せられた使命である。

(2) 創薬標的としての寄生虫の嫌氣的エネルギー代謝： 宿主体内の低酸素環境で生息する寄生虫は、嫌氣的なエネルギー代謝経路を発達させて環境に適応している。例えば、豚回虫成虫では、酸素を利用しない独特の糖分解経路や、フマル酸を還元してコハク酸を生成する嫌氣的ミトコンドリア呼吸鎖の機能が証明されるなど、グルコースを出発点とするエネルギー代謝経路の詳細が明らかにされている(Kita & Takamiya, 2002)。

上述のような、寄生虫に特異的な嫌氣的エネルギー代謝経路は、選択性の高い化学療法標的として期待を集めており、実際に駆虫効果を示す化合物が開発されるなど、多くの優れた研究成果が日本からも発信されている。

(3) エキノコックスのエネルギー代謝： エキノコックスの寄生部位は宿主哺乳類の肝組織内であるが、虫体は循環系をもたない塊状の形態をなすため、虫体内組織への酸素供給量は、ごく限られている。このような嫌氣環境において活発な増殖・発育を続けるために、エキノコックスも豚回虫と同様の嫌氣的呼吸鎖を利用していることが、私達の研究で明らかとなった(Matsumoto et al., 2008)。また、これまでの予備的な解析により、嫌氣的エネルギー代謝を構成する主要酵素の一部については、虫体における遺伝子発現を確認した。

しかし、エキノコックスのエネルギー代謝の全体像は、まだ描かれておらず、虫体の生存における嫌氣的呼吸鎖の相対的重要性についての情報も欠けている。豚回虫研究の成功例に倣い、エキノコックス独自のエネルギー代謝マップを描くことが、合理的な創薬研究の推進につながる近道と考え、本研究計画を立案するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、2つの強力なオミックス解析法を駆使することにより、グルコースを出発点とするエネルギー代謝中間体の流れと、代謝経路を構成する酵素群の遺伝子発現情報を、網羅的に明らかにすることを目

的とした。これらの情報を統合することにより、エキノコックスのエネルギー代謝マップの全体像を描き、新規創薬につなげることができると考えた。

なお、当初は上記計画を立案して研究を開始した。メタボローム解析については予定通り実施することができたが、関連遺伝子発現の網羅的解析については、主に技術面および費用面の制約により、実施が困難であると判断した。そこで本研究では、エキノコックスによるエネルギー代謝の出発点となるグルコース摂取機構に特に着目し、グルコース摂取に関わる遺伝子のクローニングおよび機能解析を実施した。

3. 研究の方法

(1) 試験管内培養法による純培養虫体の用意： 実験用げっ歯類を用いて継代しているエキノコックスを、試験管内培養系に導入して嫌氣的環境で培養することにより、宿主組織を含まない純粋なエキノコックスのシスト(以下、純培養シスト)を用意した。得られた純培養シストを虫体の組織成分とシスト液に分離し、それぞれをメタボローム解析に使用した。対照として、好氣的環境で培養したシストのシスト液をメタボローム解析に供した。なお、エキノコックスのシストは好氣的な環境では長期間生存できないため、ラット肝臓細胞(rat Reuber RH cells)との共培養により、好氣的な培養を実施した。

(2) メタボローム解析： 上述の要領で用意したエキノコックス培養シストを、メタノール、クロロホルム、水の液々分配によってタンパク質および脂質を除去し、これをメタボローム測定用試料とした。調製した試料を、キャピラリー電気泳動・質量分析装置(CE-TOFMS)による測定に供し、培養シストに含まれる代謝物質を網羅的に定量した。これにより、培養シストのメタボローム情報を取得した。なお、メタボローム測定作業の大部分は、専門業者(ヒューマンメタボロームテクノロジー株式会社)に委託した。

(3) グルコース摂取に関わる遺伝子のクローニング： 我々が既に所有している、エキノコックスのcDNAライブラリーの塩基配列情報に基づいて標的遺伝子を増幅するためのプライマーを作製し、RACE(rapid amplification of cDNA ends)法およびプライマーウォーキングにより、各トランスポーター遺伝子の全長を解読した。

得られた塩基配列情報について、膜貫通領域予測プログラムTMHMMによる構造予測を実施するとともに、MEGA5.1による系統解析をおこない、他種生物の相同遺伝子との関係を調べた。

4. 研究成果

(1) メタボローム解析の結果： エキノコックスに含有される代謝物質について： CE-TOFMS による測定により得られたピークのうち、150 のピークについて候補代謝物質が付与された。これらのうち、65 の主要代謝物質については、CE-TOFMS によるピークの面積から定量値が算出された。得られた測定値に基づき作成した代謝物質の経路図を図 1 に示す。また、本研究で特に着目しているエネルギー代謝に関わる解糖系/糖新生、ペントースリン酸経路、およびクエン酸回路にあたる部分を図 2 に拡大して示す。

クエン酸回路における中間代謝物質に着目すると、大部分の代謝物質が、シストの培養条件に関わらず、いずれの検体からも検出された。各代謝物質について、好気培養シストおよび嫌気純培養シストにおける相対含有量を算出した結果、興味深い傾向が認められた。すなわち、嫌気純培養シストでは、嫌氣的代謝の過程でも産生されるリンゴ酸、フマル酸、コハク酸などの代謝物質の相対含有量が特に多い傾向が認められた。一方、クエン酸やイソクエン酸、アニコット酸など嫌氣的代謝の過程では産生されない代謝物質は、嫌気純培養シストにおける相対含有量が少なかった。以上の結果から、エキノコックスの培養シストは、環境の酸素条件に応じて、好氣的代謝と嫌氣的代謝の両方を使い分ける仕組みを備えていることが示唆された。

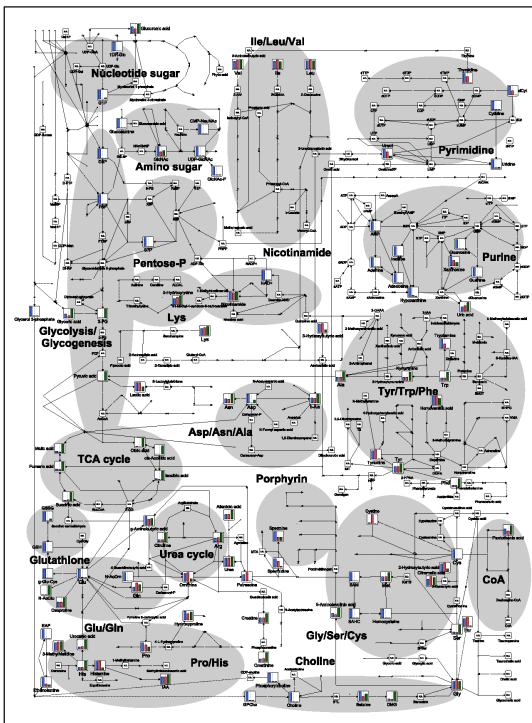


図 1 エキノコックスの培養シストに含有された代謝産物の経路図 (全体像) 青色バー：嫌気純培養シストの組織成分、赤色バー：嫌気純培養シストのシスト液、緑色バー：好気培養シストのシスト液。

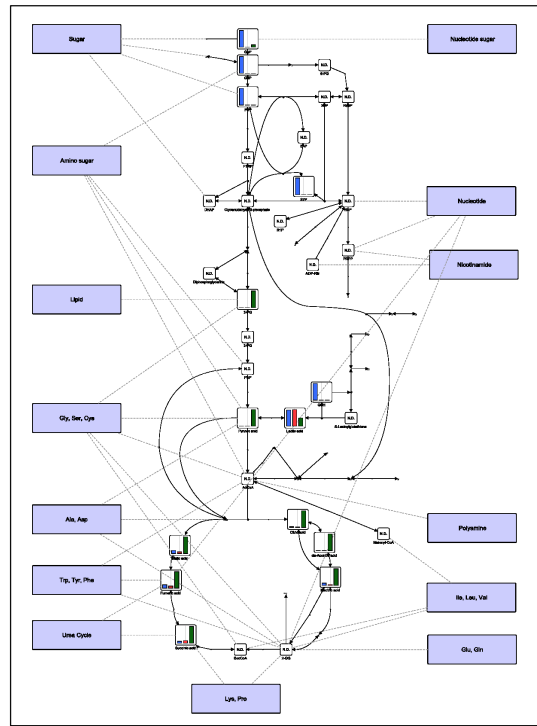


図 2 エキノコックスの培養シストに含有された代謝産物の経路図 (解糖系/糖新生、ペントースリン酸経路、およびクエン酸回路) 青色バー：嫌気純培養シストの組織成分、赤色バー：嫌気純培養シストのシスト液、緑色バー：好気培養シストのシスト液。

(2) グルコース摂取に関わるグルコーストランスポーター遺伝子のクローニング： 解析の結果、近縁寄生虫である有鉤条虫 (*Taenia solium*) 由来 GLUT に相同性の高いグルコーストランスポーター遺伝子 (EmGLUT1、EmGLUT2) および 1 種類のマガキ由来 SGLT に相同性の高いトランスポーター遺伝子 (EmSGLT) の全長配列を取得した。

EmGLUT1 および EmGLUT2 はそれぞれ 509 個および 500 個のアミノ酸をコードしており、膜貫通領域予測プログラム TMHMM において予測された構造上の特徴は、一般的な哺乳動物由来 GLUT と一致した。一方、EmSGLT は 698 個のアミノ酸をコードし、14 回膜貫通領域など予測された構造上の特徴は、一般的な哺乳動物の SGLT と一致した。これらの結果から、エキノコックスによるグルコース摂取には、受動輸送型および能動輸送型の両タイプのトランスポーターが機能していることが示唆された。

全長アミノ酸配列に基づく系統解析の結果を図 3 に示す。2 種類の EmGLUT は、いずれもヒト由来および有鉤条虫由来の GLUT と同じグループを形成した。一方、EmSGLT はヒト由来およびマガキ由来の SGLT と同じグループを形成した。全長アミノ酸配列の相同性解析においても、2 種類の EmGLUT は、いずれも有鉤条虫由来の GLUT と 98% の similarity を有し、EmSGLT はマガキ (二枚貝) 由来の SGLT

と82%の similarity を保有していた。以上のように、今回取得した3種類のトランスポーター遺伝子は、他種生物の機能的グルコーストランスポーターと高い相同性を示した。現在、これら3種類のトランスポーター遺伝子について、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた基質輸送機能解析を進めている。

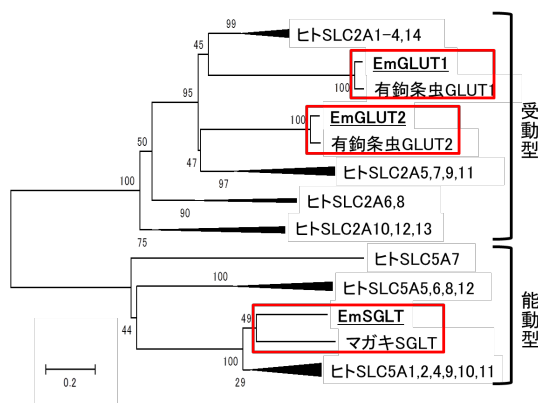


図3 系統解析の結果(近隣接合法、MEGA5.1)
SLC2A1-14 = GLUT、SLC5A1,2,4,9,10 = SGLT

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)

Okanishi, H., Matsumoto, J., Nogami, S., Kagawa, Y., and Watari, T. (2013): A dog of *Echinostoma hortense* infection with enteritis diagnosed by upper gastrointestinal endoscopy. *Journal of Veterinary Medical Science* 75(7): 991-994. [査読あり]

Kouguchi, H., Matsumoto, J., Nakao, R., Yamano, K., Oku, Y., and Yagi, K. (2013): Characterization of a surface glycoprotein from *Echinococcus multilocularis* and its mucosal vaccine potential in dogs. *PLoS ONE* 8(7): e69821. [査読あり]

Okanishi, H., Matsumoto, J., Aoki, H., Kagawa, Y., Asano, K., Nogami, S., and Watari, T. (2013): Successful resolution of esophageal granulomas in a dog infected with *Spirocerca lupi*. *Journal of Veterinary Medical Science* 75(12): 1629-1632. [査読あり]

Kashiide, T., Matsumoto, J., Yamaya, Y., Uwasawa, A., Miyoshi, A., Yamada, K., Watari, T., and Nogami, S. (2013): Case report: First confirmed case of canine

peritoneal larval cestodiasis caused by *Mesocestoides vogae* (syn. *M. corti*) in Japan. *Veterinary Parasitology* 201(1-2): 154-157. [査読あり]

松本 淳 (2013): 寄生虫に学ぶ One Health: エキノコックスを例に. *Twig's* (日本大学獣医学会誌) 59:1-10. [査読なし]

[学会発表](計2件)

遠海 重裕、大森 惇子、二橋 望、稲岡健ダニエル、坂元 君年、松本 淳、孝口 裕一、八木 欣平、片倉 賢、奥 祐三郎、藤田 修、野崎 智義、齋本 博之、北 潔(2014年3月27日): *Echinococcus multilocularis* (larval stage) ミトコンドリアのフマル酸呼吸を薬剤標的とした新規薬剤開発. 第83回日本寄生虫学会大会、愛媛大学城北キャンパス(松山)。

孝口 裕一、松本 淳、中尾 亮、山野 公明、奥 祐三郎、入江 隆夫、八木 欣平(2013年9月13日): エキノコックス由来表面糖タンパク質の性質とそのイヌにおける潜在的粘膜ワクチン効果. 第86回日本生化学会大会、横浜パシフィコ(横浜)。

[図書](計3件)

松本 淳 (分担)(2014): 獣医公衆衛生学 I、文永堂出版、pp.186-188.

松本 淳 (分担)(2014): 獣医公衆衛生学 II、文永堂出版、pp.152-157.

松本 淳 (分担): 寄生虫病学, 緑書房(印刷中)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 淳 (MATSUMOTO, Jun)
日本大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号: 70296169

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

以上