

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18580313  
 研究課題名（和文） エキノコックス成虫cDNAライブラリーを基盤とした感染イヌ対策法の検討  
 研究課題名（英文） Analysis of cDNA library of *Echinococcus multilocularis* adult worm for its control measures in dog  
 研究代表者  
 八木 欣平（YAGI KINPEI）  
 北海道立衛生研究所・感染症センター生物科学部・主任研究員  
 研究者番号：70414323

研究成果の概要：北海道のエキノコックス症（多包虫症）は、住民の健康への脅威となっている。本症の実験的研究は、本症の解決に必須であるが、危険を伴うため情報が限られていた。我々は、感染リスクのある成虫ステージに着目し、特殊感染実験施設を用いて、新鮮なエキノコックス成虫の cDNA ライブラリーを作成し、対策に有用な遺伝子と蛋白の探索を行った。その結果、1035 個のクローンの塩基配列を決定し、その中から新規遺伝子 *emY162* を発見、その有用性を実験的に検証した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,300,000	0	1,300,000
2007 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	630,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学

キーワード：人獣共通感染症、エキノコックス症、イヌ、成虫、cDNA ライブラリー、血清診断、ワクチン

## 1. 研究開始当初の背景

北海道のエキノコックス症（多包虫症）は、衛生教育などの対策がなされているにもかかわらず、依然として年間 20 名前後の新規患者が報告されている。人から人への感染が成立しないことから、爆発的な流行は無いが、患者の体内で無制限に増殖すること、有効な薬剤がないことなどから、住民への脅威となっている。そのため、本症に対する有効な対策方法の確立が求められている。一方、新たな対策方法を確立するために

は、実験的な研究が必須であるが、多包条虫の実験は実験従事者に感染リスクを伴うことから、危険性のある成虫や虫卵に関する研究には制約があった。しかしながら、北海道立衛生研究所は、安全に感染実験を遂行出来る施設を有し、その中で根室株多包条虫の継代が成功、本症に関する様々な実験的検討が可能となっている。

## 2. 研究の目的

イヌへの感染実験から得られた多包条虫成虫の cDNA ライブラリーを作製し、クローンの解析を行い、エキノコックス対策に有用な遺伝子を探索する。



図1 研究に用いた根室株多包条虫成虫

### 3. 研究の方法

北海道立衛生研究所で継代維持されている根室株多包条虫原頭節をビーグル犬に経口投与し、成虫まで発育させ、これらの成虫より mRNA を抽出し、この mRNA を鋳型にして cDNA を合成した。合成した cDNA は、pTriplEx2 ベクターに挿入した。cDNA 組換えファージライブラリーは、cDNA を挿入したベクターをバクテリオファージ  $\lambda$  TriplEx2 に組換えて構築した。cDNA を組み換えたファージは、大腸菌 XL1-Blue に形質転換し、得られたファージプラークをランダムクローニングにより 1035 個選択した。各ファージを大腸菌 BM25.8 に再感染させ、形質転換して得られたコロニーからプラスミド DNA を調製した。挿入した cDNA の塩基配列は、3130x1 ジーンアナライザーにて決定し、DNA 解析は、GeneBank databases の BLAST を用いて行った。この結果、一部の有用性が予測された遺伝子について組換え蛋白を作製し、実験感染を行ったビーグル犬の血清とのウエスタンブロット法による反応性を検討した。さらにマウスを用いて皮下への免疫を行い、抗体を誘導した後、虫卵感染をおこない、防御効果について実験的に検証した。



図2 研究方法の手順

### 4. 研究成果

(1)総数 1035 個のクローンの解析の結果、682 個は既知遺伝子に類似性を認めるものであり、211 個は未知の遺伝子であった。また残りの 142 個は短い断片など解析不能のものであった。(表 1、学会発表④)

表1 多包条虫成虫cDNAライブラリーの解析結果

既知遺伝子に類似した遺伝子を持つクローン数	682
Em. mitochondrial DNA gene	404
Em. mitochondrial rRNA	5
Em. mit-Cytochrome oxidase C1	8
Em. mit-Cytochrome oxidase C2	2
Em. mit-Cytochrome oxidase C3	14
Em. mit-NADH dehydrogenase 1	4
Em. mit-ATPase 6-NADH2	1
Em. mit-large subunit rRNA-AKR	1
Em. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	2
ATP synthase H <sup>+</sup> transporting (mitochondrial F1 complex)	2
Cytochrome b5	1
Deoxyribonucleoside kinase (mitochondrial)	1
Eg. Malate dehydrogenase	3
Mitochondrial elongation factor	1
Mitochondrial inner membrane protein	1
Succinate dehydrogenase b-subunit	2
Ribosomal protein	1
Ribosomal protein L9	2
Ribosomal protein L10	1
Ribosomal protein L27	1
Ribosomal protein L30	1
Ribosomal protein L31	1
Ribosomal protein L34	1
Ribosomal protein L35a	1
Ribosomal protein L36	2
Ribosomal protein L38	1
Ribosomal protein L44a	2
Ribosomal protein S11	1
Ribosomal protein S14	2
Ribosomal protein S16	1
Ribosomal protein S17	2
Ribosomal protein S18	1
Ribosomal protein S23	1
Ribosomal protein S25	1
Em. AbB8/3 Antigen B	60
Em95/Eg95 like protein	1
Em. EmDLC (dynein light chain)	10
Em. Thioredoxin peroxidase	1
Em. 14. 3. 3	1
Em. Tropomyosin	1
Em. a-Tubulin	1
Em. b-Tubulin, Tub-1	1
Em. b-Tubulin, Tub-2	1
Em. Ubiquitin	3
Eg. AbB8/3 Antigen B	3
Eg. Actin	2
Eg. Ag5 precursor (Antigen 5)	1

Eg. Cyclophilin	1
Eg. EgBRep repetitive DNA element	7
Eg. Elongation factor 1	2
Eg. Fatty acid binding protein (DF)	1
Eg. EF-hand calcium binding	1
Eg. Heat shock protein (70kDa)	2
Eg. 14.3.3	1
Eg. Thioredoxin	1
Actin ( <i>Taenia solium</i> )	1
Actin depolymerizing factor	1
Acyl CoA binding protein	1
AIR carboxylase	1
Adhesing like protein	1
Annexin B2	1
Aquaporin-3	1
Arginase	1
Arginine N-methyl transferase	1
ATP(GTP) binding protein	1
ATP synthase	1
Calmodulin domain protein kinase	1
Calboxyl esterase	1
Cat eye syndrome	1
Chromatin modifying protein 4A	1
Coiled coil-helix-coiled coil helix domain containing 5	2
COBW domain containing protein	1
Conserved hypothetical protein	1
Cystein-rich protein	3
DEAD box polypeptide 39	1
DEAH box polypeptide 38	1
GABA (A) receptor associated protein like 1	1
Glutathion S-transferase (GST)	7
Glycerol-3-phosphate transporter	1
Glycesyl hydrotase	1
Elongation factor 1a	1
Envelope glycoprotein	1
FK506 binding protein	1
Heat shock protein 10 kDa	1
Heat shock protein 20 kDa	1
Heat shock protein 40 kDa	1
Heat shock protein 86 kDa	1
Heat shock protein 90 kDa	2
Hydroxyacyl glutathion hydrolase	1
Hypothetical protein	6
Internal transcribed spacer 2	1
Intron maturase, Type II family	1
1Kb kinase	5
Keratinocytes associated protein 2	1
Kunitz family Serine-protease	1
Leucine rich repeat containing 2	3
Microglobulin alpha 1	1
N-acetyltransferase	1

Polyubiquitin mRNA	1
PQ loop repeat containing 2	2
RNA binding region protein	2
Secreted protein	1
Sec 20 family protein	1
Serine-Protease	1
Serine/Threonine protein kinase	1
Sorbitol dehydrogenase	1
Sphinglipid (FADS-like) desaturase deluta-4	1
Splicing factor (Transformer 2)	1
26S proteasome ATPase (SUG1)	2
26S proteasome non-ATPase	1
26S proteasome complex subunit DSS1	1
Synaptic glycoprotein	1
Synaptobrevin	2
Syntenin	1
12S rRNA DNA ( <i>Rattus</i> )	1
TaHC17-G9 mRNA	1
TaHC21-C5 mRNA	1
TATA binding protein	2
Titin isoform (microglobulin domain 4)	1
Translation factor SUI-1	2
Transport protein SEC61 gamma- subunit	1
Transmembrane protein 180	1
Transpanin (Transmembrane- superfamily member)	1
Tublin beta mRNA	1
Tubulin tyrosin ligase like	1
U3 small nuclear ribonucleoprotein (Meta-phosphoprotein 10)	1
Ubiquitin conjugating enzyme E2	1
Ubiquitin like protein	1
Ubuquinol oxidase	1
Ubiquitin protein ligase	1
Vacuolar ATPase B-subunit	1
Zeste homolog 2 enhancer	1
未知遺伝子クローン数	211
その他 (極めて短いDNAなど)	142
合計	1035

(2)分泌・膜結合型遺伝子である新規遺伝子 *emY162* を発見し、その構造と寄生虫の各ステージの発現状況を明らかにした。(図 3、雑誌論文①、学会発表①)

```

GAGATGGTA CTTGGATCT GCTATTCT ACTGGCACT TCAATGATG CTGAGAACT GGGGTAGAC CCAGAGCTAA TAGAAAGTT GACAAGAAA 100
N V L R F C L I L L A T S V I A E E V G V D P E L I A A L L P K K
CTAGAGACA CAGTGCAGA AAGCTTGGG TGGATGAGG TGGGTGGGG GTGGCTGAA TTGGTTGGA ATGGCACTGG TTTAGGCAAT CTGACGGGG 200
L G T T L P E H F R W T H V G S R S L E L G W N A T G L A N L H A D
AGCAGTAA ACTGACTGA AAGCTTTATA CAGCTAGCT TCACTGAGG TAGAGAAATG TTGCTATGGA AGGTGAGAAA CTGACTGTTG AGGACTAAA 300
H I R L T A N L Y T T V V S F R Y R N V P I E H Q K L T L E G L K
GGCAGTACA TTCTAGSAG TGGTGTGCA AGCACTGAA GGGGATTCG ANGTTTATA ATACACTGGA TTTATTAGAA CACTGCTCC AGGGAGAT 400
P S T F Y E V V V G A L K G D S E V Y K Y T G F I R T L A P G E D
GGGCTGACA GAGCTGGGG ATGGGCTTA ATTGTGGA TGGTGGCT GATATACTT ACTGAGGCT TGGGTAAGC CAATGAGCT GGTCACTGT 500
G A D R A G G F A L I F A M A G L L L L I .
TGCATTGTT GAGACTAGA GGGCTGAGC GGGTCTATC GGAAGGTTT TTGACTAGA CACTGCAAGT GTTACTAGAA TAGAAAGCT TGCATGATT 600
GUTTAAGAA AAAAGAGAA AAAAAGAAA AAAAAGAAA AAAA

```

図3 *emY162* cDNA クローンの塩基配列

(3)組換え蛋白 (EMY162) を作製し、多包条虫を感染させた犬の血清とウエスタンブロットをおこない、陽性反応を認めた。このことから腸管に寄生している成虫が **EMY162** に対する血清抗体を誘導することを明らかにした。(図4、雑誌論文①)

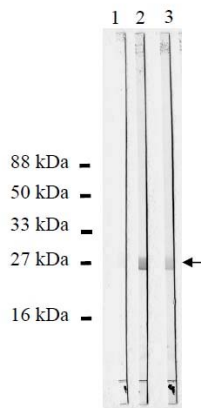


図4 組換え蛋白 EMY162 と多包条虫感染イヌ血清とのウエスタンブロット解析 (レーン1: 非感染血清; レーン2: 根室株多包条虫感染血清; レーン3: ヨーロッパ株多包条虫感染血清)

(4)EMY162 組換え蛋白で免疫したマウスが、虫卵感染に対してワクチン効果を誘導することを明らかにした。(雑誌論文②、学会発表②、③)

(5) *emY162* 遺伝子とその組換え蛋白である **EMY162** について、その有用性に鑑み特許出願を行った。

(6)エキノコックスの危険性のあるステージに対する実験とその結果について、今回の結果を含め、包括的に論じた。(雑誌論文③)

これらの結果は、本研究の遂行が、新たなエキノコックス対策の確立に有効であったことを示しているものとする。

## 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3件)

①KATOH Y, KOUGUCHI H, MASTUMOTO J, GOTO

A, SUZUKI T, OKU Y, YAGI K,

Characterization of *emY162* encoding an immunogenic protein cloned from an adult worm-specific cDNA library of *Echinococcus multilocularis*. *Biochim Biophys Acta*, 1780(1): 1-6, (2008), 査読有

②KOUGUCHI H, MASTUMOTO J, KATOH Y, OKU Y, SUZUKI T and YAGI K. The vaccination potential of EMY162 antigen against *Echinococcus multilocularis* infection. *Biochem Biophys Res Commun*, 363(4): 915-20, (2007), 査読有

③MATSUMOTO J, YAGI K, Experimental studies on *Echinococcus multilocularis* in Japan, focusing on biohazardous stages of the parasite. *Exp Parasitol*, 119(4): 534-41, (2008), 査読有

[学会発表] (計5件)

①KATOH Y, KOUGUCHI H, MASTUMOTO J, GOTO A, SUZUKI T, OKU Y and YAGI K.

Characterization of novel secretory-protein cloned from an adult worm-specific cDNA library of *Echinococcus multilocularis*. XXII International congress of hydattidology, 16, May 2007, Athens, Greece

②KATOH Y, KOUGUCHI H, MASTUMOTO J, SUZUKI T and YAGI K. EMY162 protein as a vaccine candidate to reduce level of alveolar hydattid disease. II World Conference of Magic Bullets (EHRlich II), 9, Oct. 2008, Nuremberg, Germany

③孝口裕一, 松本 淳, 加藤芳伸, 奥 祐三郎, 鈴木智宏, 八木欣平、組換えEMY162 抗原の中間宿主における多包条虫感染防御効果第145回日本獣医学会, 2008年4月, つくば市 麻布大学

④加藤芳伸, 孝口裕一, 松本 淳, 後藤明子, 鈴木智宏, 奥 祐三郎, 八木欣平, 多包虫対策に有用な新規タンパク質探索のための多包条虫成虫cDNAライブラリー構築, 第76回日本寄生虫学会, 2007年3月, 吹田市 大阪大学医学部

⑤党 志勝, 八木欣平, 奥祐三郎, 孝口裕一, 梶野喜一, 渡辺淳一, 中尾亮, Hiroyaki Wakagari, Atsushi Toyoda, 杉本千尋、多包条虫metacestodeに対するワクチン開発に関する研究, 日本獣医学会学術集会, 2009年4月3日, 栃木県宇都宮市 栃木県総合文化センター

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 多包条虫由来の新規蛋白質

発明者: 奥祐三郎, 松本淳, 八木欣平, 加藤芳伸, 孝口裕一, 鈴木智宏, 後藤明子

権利者: 国立大学法人 北海道大学、北海道

種類：特許  
番号：特願 2007-22365  
出願年月日：平成 19 年（2007 年）1 月 31 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

八木 欣平 (YAGI KINPEI)  
北海道立衛生研究所・感染症センター生物科学部・主任研究員  
研究者番号：70414323

### (2) 研究分担者

加藤 芳伸 (KATOH YOSHINOBU)  
北海道立衛生研究所・感染症センター生物科学部・主任研究員  
研究者番号：00414326

松本 淳 (MATSUMOTO JUN)  
日本大学・生物資源科学部・講師  
研究者番号：70296169

奥 祐三郎 (OKU YUZABURO)  
国立大学法人北海道大学・(連合) 獣医学研究科・准教授  
研究者番号：60133716

鈴木 智宏 (SUZUKI TOMOHIRO)  
北海道立衛生研究所・感染症センター生物科学部・研究職員  
研究者番号：10414327

後藤 明子 (GOTO AKIKO)  
北海道立衛生研究所・感染症センター生物科学部・研究職員  
研究者番号：60414322

### (3) 研究協力者

孝口 裕一 (KOGUCHI HIROKAZU)  
北海道立衛生研究所・感染症センター生物科学部・研究職員  
研究者番号：50435567