

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18590409

研究課題名（和文）ネズミ糞線虫の大腸寄生と自食作用 (autophagy) について

研究課題名（英文）Infection of *Strongyloides ratti* in the large intestine as a survival strategy, and the role of autophagy

研究代表者

木村 英作

愛知医科大学・医学部・教授

70153187

研究成果の概要：

ネズミ糞線虫 (Sr) の大腸寄生は、種の保存に必要な‘進化’と考えられ、Sr は宿主の免疫反応を利用して大腸寄生能力を獲得するようである。大腸への Sr 成虫移植実験によれば、感染 7 日目の成虫は大腸寄生能力を持たないが、19 日目の成虫は持っている。また、ラットに抗酸化剤を混ぜた食餌を与えると Sr の大腸寄生を完全に消去できる。このような現象の背景には自食作用関連遺伝子を含む様々な遺伝子の関与が推定されている。それらについての解析が進行中である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

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：ネズミ糞線虫 大腸寄生 自食作用 抗酸化剤 電子顕微鏡 cDNA サブトラクション

## 1. 研究開始当初の背景

ネズミ糞線虫は極めてユニークな寄生線虫である。寄生世代と自由生活世代より成る複雑な生活史を持っており、その様々な段階において生存と種族維持のための巧みな戦略が見え隠れしている。これらの生命現象の謎を解く方法論は様々考えられるが、近年の傾向として、‘うごきまわる生き物’の生物現象が十分把握されないままに分子論的研究が先行するケースが多いように思われる。本

研究では、主として成虫の移植実験や電子顕微鏡観察など生物学的な手法を用い、本寄生虫に特徴的な‘目に見える’諸現象を記載することを一つの柱とする。興味深い現象を踏まえた上で、分子生物学的アプローチのターゲットを絞り込み、現象の背景を明らかにしたい。

大腸の寄生虫としてのネズミ糞線虫

一般に小腸寄生の線虫として知られている

ネズミ糞線虫は、小腸から‘排虫’された後、少数が大腸に再定着して長期間寄生を続ける。大腸寄生が成立すると糞便中に自由生活世代の雌雄が1:1の割合で出現し、間接発育によって最終的には小腸寄生以上に多くの感染幼虫が産生される (Kimura et al., Parasitology, 1999)。

我々は、これをネズミ糞線虫の生存戦略の一環であると考えている。この場合、大腸に定着した成虫は大腸 specific な適応をしているのか (例えば大腸から小腸に移植した場合には定着できないのか)、大腸に定着した成虫は小腸の成虫と何が異なるのか (例えば、抗原性、クチクラの構造、食べ物、etc.) などの比較的単純な疑問をまず解決する必要がある。この大腸寄生はヌードラットではみられないので、糞線虫は宿主の免疫機構を逆手に取って大腸寄生を達成している可能性が高い。このような観点からは、小腸と大腸における免疫反応の量的、あるいは質的な違い、抗体等が糞線虫に及ぼす影響、さらには小腸感染中に宿主の免疫反応を‘利用’して虫が‘生まれ変わる’可能性とそのメカニズムなど興味深い研究テーマが多くある。

#### ネズミ糞線虫の生活史を左右する (と考えられる) 自食作用

自食作用 (autophagy) とは、飢餓状態に陥った生物が、生存に必須でない自己の細胞成分を autophagosome を形成して意図的に消化・分解し、緊急に最も必要とされるアミノ酸などを調達・再配分する現象で、全真核生物に保存されている基本的な生命現象である。飢餓に対応するのみならず、寿命、発育 (例えば *Caenorhabditis elegans* の dauer 転換)、病原細菌の処理などにも関与することが知られている。

ネズミ糞線虫は、寄生 (栄養豊富)、自由生活 (栄養減少)、感染幼虫 (飢餓状態) など様々な環境を生き延びており、状況に応じた自食作用が機能していると想像される。また、ネズミ糞線虫の自由世代は、最も寿命の短い生物 (孵化から性成熟、産卵、死亡まで3日) として知られており、この面から自食作用を検討することも興味深い。電子顕微鏡による観察で autophagosome をある程度識別できるので、当初は様々な発育ステージや異なる環境条件下で得られる糞線虫材料を用いて autophagosome の発生状況を検討し、さらに免疫学的・分子生物学的研究に入る予定である。

## 2. 研究の目的

(1) ネズミ糞線虫の大腸寄生はなぜ必要なのか、またどのようなメカニズムで引き起こされるのかを明らかにする。

(2) 大腸寄生と小腸寄生の糞線虫成虫の形態を電子顕微鏡を用いて観察し、微細構造の差異を明らかにする。

(3) 多様な生活環境 (小腸寄生、大腸寄生、自由生活) のもとで生存しているネズミ糞線虫において自食作用はいかなる役割を果たしているのかを解明する。

(4) 上記と関連して、大腸寄生時に特異的に発現する遺伝子の解析を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 生物学的方法による研究

① 抗酸化剤 BHA (butylhydroxyanisole) をラットに経口投与し、BHA がネズミ糞線虫の大腸寄生に及ぼす影響 (糞便中虫卵数の変化、小腸や大腸における成虫の寄生数など) を調べた。

② ネズミ糞線虫感染7日目以小腸上部に寄生する成虫 (免疫の影響を受けていない) と感染19日目以小腸下部に寄生する成虫 (免疫の影響を強く受けている) を採取し、それぞれ naive なラット、および免疫獲得済みのラットの大腸に移植した。その後、経時的に虫卵排出数、寄生成虫数などを調べた。

(2) 電子顕微鏡による研究

小腸及び大腸より採取した成虫を用いて電顕標本作製し観察した。

(3) 分子生物学的研究

① 酸化還元に関わる遺伝子を得て、小腸及び大腸寄生の成虫、感染幼虫において発現量を比較した。

② 自食作用に関する遺伝子を得て、小腸及び大腸寄生の成虫、感染幼虫において発現量を比較した。

③ 大腸寄生成虫の cDNA から小腸寄生成虫の cDNA をサブトラクションして得られた cDNA ライブラリーより大腸ステージで up-regulate されている遺伝子を調べた。

## 4. 研究成果

(1) 生物学的方法による研究

① 抗酸化剤 BHA をネズミ糞線虫感染ラットに投与すると、小腸寄生成虫の産卵には全く影響を与えず、大腸寄生によって作られる産卵のプラトー (25-30日付近) のみが消失した (図1)。また、ラットの剖検によって成虫の大腸寄生が起きていないことが確認された (図2)。さらにネズミ糞線虫の superoxide dismutase (SOD) を調べると、小腸寄生と大腸寄生の成虫の間で SOD の電気泳動パターンが大きく異なることが明らかとなった。

図 1

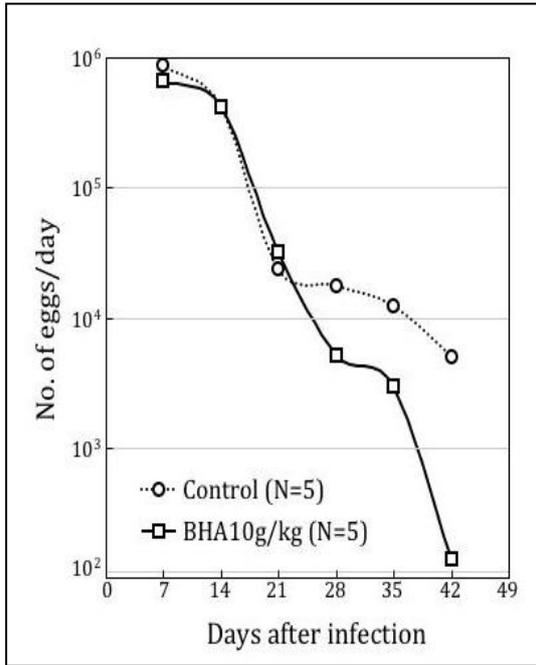
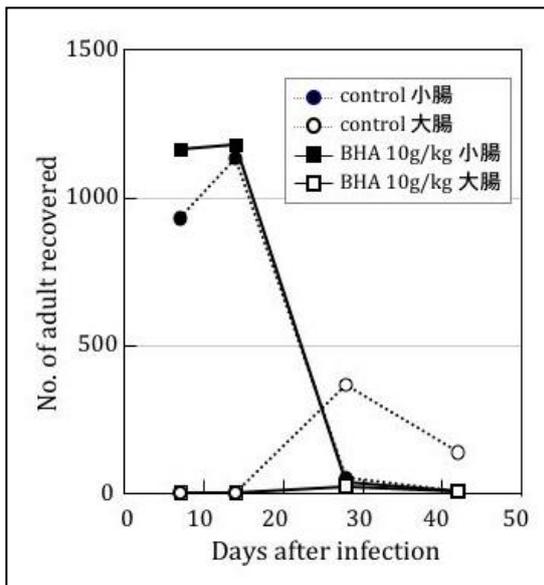


図 2



②感染後7日目で小腸上部に寄生している成虫を、既に感作されているラットの大量に移植すると定着率が低く(10%程度)すみやかに排虫された。一方、感染後19日目で小腸下部に寄生している成虫を同様に移植すると50-60%が大腸に定着し、その後も明らかな排虫遅延が認められた(図3)。また、産卵数を比較すると、19日目に移植された成虫がはるかに多かった(図4)。ネズミ糞線虫は、小腸寄生の間に宿主の免疫作用などを受けつつ、大腸寄生に適した形質を獲得していくようである。

図 3

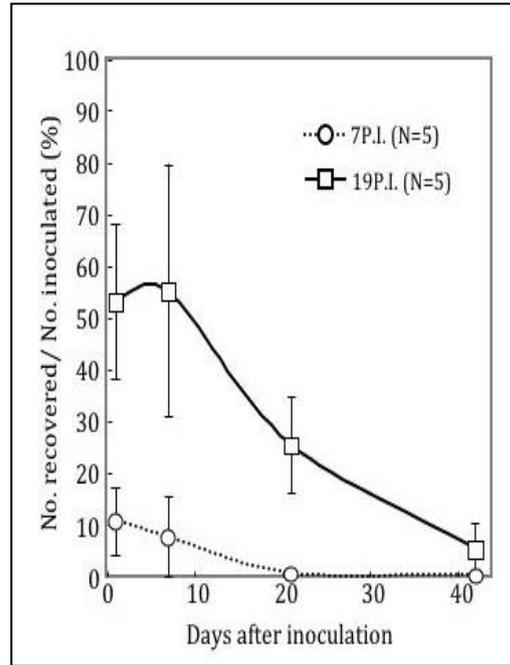
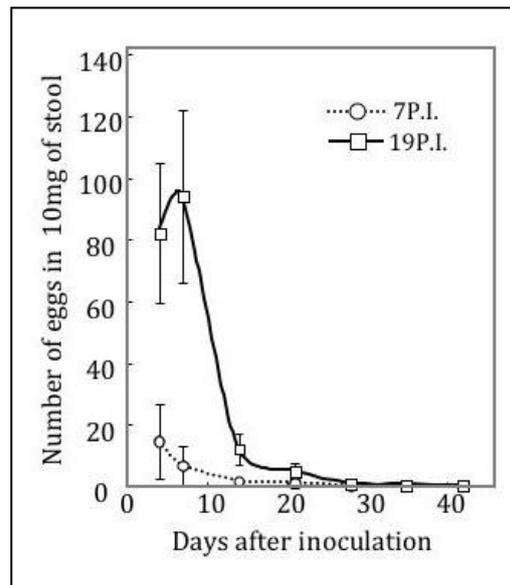


図 4



(2) 電子顕微鏡による研究

透過型、走査型電顕により、各発育ステージ・寄生部位における形態学的観察を行っている。最も明白な変化はネズミ糞線虫の消化管に見られた。小腸上部に寄生する成虫の腸管は「食物」で満たされ、やや拡大している(図5)のに対し、大腸に寄生する成虫の腸管は空で腸管腔がつぶれ枝状を呈した(図6)。また、大腸寄生成虫の腸管細胞内ミトコンドリアは多くが変性していた。さらに、消化管を構成する細胞中にはユニークな膜構造物がみられ、autophagosomeの可能性を考えて

いるが確証は得られていない。

図 5

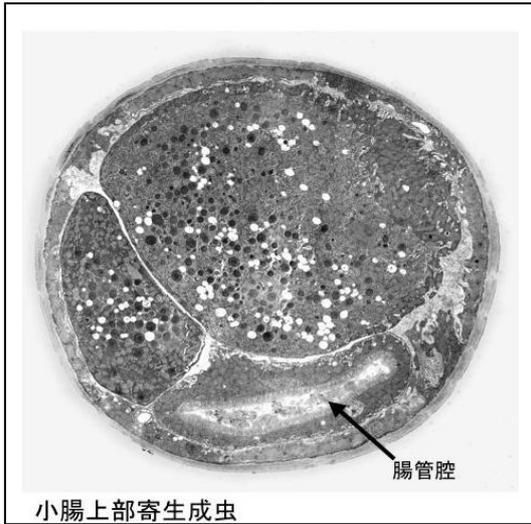


図 6



大腸寄生の成虫が飢餓状態にあるという確証はないが、大腸寄生が確立する直前に、宿主の免疫反応によりほとんどの成虫が排出されるという事実により、Sarles 現象による摂食障害が示唆される。また、大腸自体が糞線虫にとって「快適」な環境ではない可能性もある。一方、小腸と大腸に寄生するネズミ糞線虫成虫の子宮内虫卵数を比較すると、小腸上部で最も多く、小腸下部で一時減少するが、大腸では再び増加している。この時の卵巣内には小腸寄生成虫には見られない構造物が電顕で観察されている。

なお、ネズミ糞線虫の大腸寄生成虫の体長は小腸寄生成虫の約 1/2 しかない。さらに、小腸より大腸に移植された成虫では、移植の翌日には既に短縮が認められる。このメカニズムを解明するための第一段階として電顕を用いた形態学的研究を進めている。

### (3) 分子生物学的研究

①酸化還元に関わる遺伝子を研究する目的で、感染幼虫、小腸上部寄生成虫（感染 7 日目）、小腸下部寄生成虫（感染 19 日目）、大腸寄生成虫（感染 25 日目）より RNA を抽出し、RT-PCR を行った。その結果、*sod* (super-oxide dismutase)-1, *sod-2*, *sod-3*, *gpx* (glutathione peroxidase), *prdx* (thioredoxin peroxidase)-2, *prdx-3* の遺伝子は、寄生部位にかかわらず同様に発現していたが、感染幼虫では *sod-1*, *prdx-3* の発現がみられなかった。

②自食作用関連遺伝子、*lgg-1*, *atgl*, *fhtfla*, *fhtflb* は感染幼虫を含む全てのステージで同様な発現が見られた。

自食作用関連蛋白 LC3 の関連蛋白 (*S. ratti* *lgg-1*) とその抗体を作製するために *S. ratti* *lgg-1* を大腸菌発現ベクターに組み込み、組み換え抗原を作製し、それに対する特異抗体を作製した。この抗体を用い、免疫組織化学的研究を進めつつある（電顕では autophagosome 様の構造を認めている）。

③大腸寄生している成虫の cDNA から小腸寄生している成虫の cDNA をサブトラクションした cDNA ライブラリーを作製し、これまでに大腸ステージで up-regulate されている 36 遺伝子を確認した。このうち 19 個は従来知られている遺伝子と一致、あるいは相同性が高いが、残りは機能不明のネズミ糞線虫に特異的なタンパク質と考えられる。ネズミ糞線虫成虫の大腸寄生成立のために必要な遺伝子、宿主の免疫の影響によって誘導される遺伝子、間接発育する虫卵を産むために必要な遺伝子などを知るため、大腸ステージ特異的に発現している遺伝子の同定を試みている。

### 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 1 件）

①Minato K, Kimura E, Shintoku Y, Uga S. Effect of temperature on the development of free-living stages of *Strongyloides ratti*. Parasitology Research 102:315-319, 2008. 査読有

〔学会発表〕（計 7 件）

①Takagi H, Nagaoka F, Shintoku Y, Kadosaka T, Kimura E. Analysis of specifically expressed genes of *Strongyloides ratti* in the large intestine, 第78回日本寄生虫学会大会 2009, 3月27-28日, 東京

②高木秀和、木村英作、大腸寄生しているネズミ糞線虫に特異的に発現している遺伝

子の同定を目指して、第2回蠕虫研究会  
2008、11月7-8日、宮崎

③高木秀和、木村英作、ネズミ糞線虫が大腸  
に寄生するときに起こる虫体変化の解明、第  
1回蠕虫研究会2007、11月26日、宮崎市

④神徳好美、高木秀和、角坂照貴、近藤繁生、  
長岡史晃、伊藤誠、Islam MZ、木村英作、ネ  
ズミ糞線虫の大腸寄生のメカニズム --- 大  
腸への移植実験、第63回日本寄生虫学会西  
日本支部大会2007、10月6日、高知市

⑤山田清太郎、須賀康晴、新垣英美、望月里  
衣子、福本真一郎、渡邊直熙、木村英作、  
鎌倉和政、異なった *Nippostrongylus*  
*brasiliensis* 個体群の rDNA ITS 2 領域を用  
いた比較検討、第144回日本獣医学会(日本  
獣医寄生虫学会)2007、9月2日、江別市

⑥高木秀和、蠕虫研究の新展開、「感染現象  
のマトリックス」研究会2006、12月18-19  
日、箱根

⑦市川慶、角坂照貴、長岡史晃、神徳好美、  
尾関教生、中野隆、木村英作、ネズミ糞線虫  
成虫の寄生部位による腸管の比較、第62回  
日本寄生虫学会西日本支部大会2006、11月  
11-12日、愛知県長久手町

[図書] (計1件)

①・木村英作寄生虫学テキスト 第3版  
文光堂2008、pp. 83

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木村 英作 (KIMURA EISAKU)  
愛知医科大学・医学部・教授  
研究者番号：70153187

### (2) 研究分担者

伊藤 誠 (ITO H MAKOTO)  
愛知医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：90137117

角坂 照貴 (KADOSAKA TERUKI)  
愛知医科大学・医学部・講師  
研究者番号：90109760

近藤 繁生 (KONDO SHIGEO)  
愛知医科大学・医学部・講師  
研究者番号：20097786

高木 秀和 (TAKAGI HIDEKAZU)  
愛知医科大学・医学部・助教  
研究者番号：90288522

### (3) 連携研究者

宇賀昭二 (UGA SHOJI)  
神戸大学・医学部・教授  
研究者番号：90071399

### (4) 研究協力者

湊 健二 (神戸大学・大学院)  
神徳好美 (愛知医科大学・研究員)  
長岡史晃 (愛知医科大学・大学院)  
市川 慶 (愛知医科大学・研究員)  
尾関教生 (愛知医科大学・講師)  
中野 隆 (愛知医科大学・教授)