

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：35302

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15987

研究課題名（和文）条虫はどのようにして終宿主と中間宿主を識別するのか

研究課題名（英文）The mechanism of discriminate between definitive host and intermediate host by tapeworm.

研究代表者

林 慶（Hayashi, Kei）

岡山理科大学・獣医学部・助教

研究者番号：90823196

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的はM. cortiをモデルとし、条虫の幼虫の成虫化に重要な遺伝子を特定することである。人為的に分化した成虫および幼虫を用い、RNA-seq解析を行うことで両者の遺伝子の発現量を網羅的に比較した結果、約14,000遺伝子のうち342遺伝子の発現が成虫において上昇し、230遺伝子の発現が減少していた。また、遺伝子オントロジー解析の結果、有性生殖に関与すると考えられる新規遺伝子や成虫化の初期に重要な役割を持つと考えられる転写関連遺伝子を見出した。qPCRの結果、これらの遺伝子は成虫において発現が上昇していた。これらの機能を解析するため、M. cortiにおけるRNA干渉法の検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

条虫にはエキノコックスやマンソン裂頭条虫、有鉤条虫など、ヒトや家畜に致死的な症状を引き起こす寄生虫が数多く含まれている。しかしながら、条虫はその生物学的特性から実験生物学的な研究のハードルが高く、特に培養液中で飼育・実験が可能な種は限られている。このため、条虫はそのユニークな生態や社会的要請の高さにも関わらず分子学的知見が限られており、条虫の感染症に対する対策は他の感染症と比べ世界的に大きく遅れている。本研究で研究対象とするM. cortiは上記の様な研究上の障害を全てクリアしており、得られた研究成果は条虫類の研究において重要な知見を提供するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study was to identify genes that have a critical rule in the differentiation of cestode larvae into adult, using Mesocostoides corti as a model species. We compared the expression levels of genes in artificially differentiated adults in vitro and larva of M. corti by using RNA-seq analysis. As a result, 342 genes were up-regulated and 230 genes were down-regulated in adult worms in the 14,182 genes that were comparable. In addition, gene ontology analysis revealed novel genes that may be involved in sexual reproduction and transcription-related genes that may have important roles in the early stages of adult development. The qPCR results showed that the expression levels of some of the genes were up-regulated in adult worms. To further analyze their functions, we investigated a novel RNA interference method in M. corti.

研究分野：獣医寄生虫学

キーワード：条虫 寄生虫

1．研究開始当初の背景

（1）条虫類と宿主体内におけるその病原性

寄生虫がその生活環を完遂するには、「宿主」と呼ばれる他の生物に感染・寄生する必要がある。条虫類の宿主には、条虫がその体内で成虫へと发育し、有性生殖を行って次世代を産生する場となる「終宿主」と、終宿主への伝搬過程としての「中間宿主」が必要である。一般的に、条虫は終宿主の体内では小腸に寄生するため顕著な症状を呈することは稀である。一方で、中間宿主の体内では実質臓器や筋肉内、皮下などに侵入し移動することで重篤な病害を与えるものが知られている（幼虫移行症）。また、一部の条虫は中間宿主の腹腔や肝臓などで無性増殖をしてその数を増やすため、より時に致死的な傷害を引き起こす。ヒトや家畜の難治性の寄生虫感染症として知られるエキノコックス症やマンソン孤虫症などは、中間宿主であるヒトや家畜に上記の病害を与える「人獣共通感染症」である。

条虫類の幼虫は終宿主となる動物に感染した場合のみ、有性生殖を行って次世代を産生することができる。条虫と終宿主の組み合わせは種ごとに決まっており（宿主特異性）これには感染した幼虫が成虫へと分化するために必要な栄養や宿主の免疫など様々な因子が関わっていると考えられている（Espinoza et al. 2005）。しかしながら、条虫の幼虫が終宿主への感染を認識し、成虫へと分化する際の具体的な因子やメカニズムはよく分かっていない。

（2）モデル条虫である *Mesocostoides corti*

Mesocostoides corti (Syn. *M. vogae*) はイヌなどの食肉動物を終宿主とすると考えられている円葉目条虫の一種であり（Specht and Voge, 1965; Eckert et al., 1969; Kawamoto et al., 1986）ほぼ全ての陸上脊椎動物を中間宿主にすると考えられている。*M. corti* の幼虫テトラチリジウムは終宿主となる動物に捕食された場合はその小腸内で成虫へと分化する。一方、中間宿主となる動物に感染した幼虫は成虫になることはなく、幼虫のまま腹腔内で無性分裂を繰り返す。すなわち、*M. corti* のテトラチリジウムはあらゆる脊椎動物に感染することが出来るにも関わらず、終宿主であるイヌ科動物の体内に侵入した時にのみ、成虫への分化が生じる。

ラットを用いた実験室継代を経た *M. corti* のテトラチリジウムは高濃度のトリプシンに曝露することにより、培養液中で成虫へと人為的に分化させることが出来ることが知られている。また、この幼虫をマウスで複数代に渡って継代すると、成虫に分化することができなくなる。さらに、マウスでの複数代継代によって成虫への分化能を失った幼虫をラットで継代することで、再び成虫への分化能を獲得する（Markoski et al., 2003）。培養下で成虫に分化できる条虫種は限られており、*M. corti* のテトラチリジウムは条虫類の生物学的活性について研究を行う上で優れたモデル条虫として利用されている。

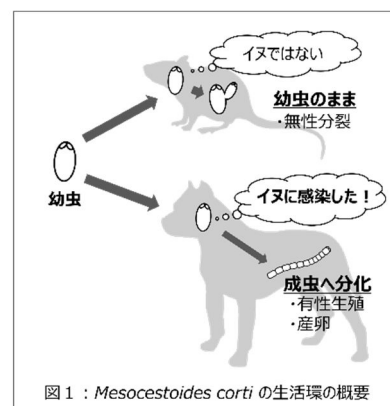


図1： *Mesocostoides corti* の生活環の概要

2．研究の目的

これまでの知見から、*M. corti* のテトラチリジウムは宿主となる動物に感染した際に何らかの方法で宿主の動物種を識別し、食肉動物に感染した時だけ成虫へと分化するスイッチが入ると考えられる。本研究ではテトラチリジウムがラットでの継代を経て成虫へ分化できる状態となり、さらにトリプシンの刺激を受けて成虫へと分化する課程においてその機能を担っている分子を特定することを目的とした。具体的には、以下の2点を目標として設定した。

（1）成虫と幼虫における遺伝子発現の違いを明らかにし、ターゲットとなる候補遺伝子の探索を行う。

(2) 幼虫が成虫になるために必要な責任遺伝子の特定を行うには、研究の目的(1)で見出した候補遺伝子の機能解析を行う必要がある。そこで、テトラチリジウムにおいて dsRNA を用いた RNA 干渉法を確立する。

3. 研究の方法

(1) RNA-seq 法を用いた成虫で特異的に発現する遺伝子の網羅的スクリーニング解析および Realtime PCR 法を用いた確認

ラットを用いた実験室内継代を経たテトラチリジウムを高濃度のトリプシンに曝露し、人為的な成虫への分化を誘導した。この成虫化虫体とコントロール培養下のテトラチリジウムを用い、RNA シーケンス (RNA-seq) 解析を行うことで両者の遺伝子の発現量を網羅的に比較解析した。

RNA-seq の結果を基にした遺伝子オントロジー解析を行い、テトラチリジウムの成虫化に必要なと考えられる遺伝子群を見出した。具体的には有性生殖に必須と考えられる遺伝子や、成虫のみで特異的に発現量が高い転写因子などを標的とした。

遺伝子オントロジー解析により見出した遺伝子の発現を Realtime PCR を用いて成虫化虫体とコントロール培養下のテトラチリジウムで比較し、RNA-seq の結果を確認した。

(2) dsRNA を用いた *M. corti* における RNA 干渉法の検討とそれを用いた遺伝子の機能解析法の確立

dsRNA を用いた RNA 干渉法を新たに確立するため、幼虫と成虫のいずれでも発現していることが知られている *McCRISP2* (Britos et al., 2007) を標的遺伝子とした。まず、寄生虫の遺伝子データベースである WormBase ParaSite (<https://parasite.wormbase.org/index.html>) にて *McCRISP2* の mRNA 配列を参照し、その部分配列約 150bp に相当する dsRNA (dsCRISP2) を作成した。dsCRISP2 を in vitro 培養下のテトラチリジウムに 4 時間あるいは 24 時間曝露した。洗浄後し dsCRISP2 を含まない培地でさらに 24 時間培養した後のテトラチリジウムから RNA を抽出し、qPCR を用いて *McCRISP2* の発現量を測定した。

4. 研究成果

(1) RNA-seq 法を用いた成虫で特異的に発現する遺伝子の網羅的スクリーニング解析および Realtime PCR 法を用いた確認

RNA-seq 法を用いて約 14,000 個の遺伝子の発現量を成虫化虫体とコントロール培養下のテトラチリジウム比較した結果、成虫化にともなって 342 個の遺伝子の発現が統計的に有意に上昇しており、一方で 230 個の遺伝子の発現が統計的に有意に減少していた。

RNA-seq の結果を基にした遺伝子オントロジー解析の結果、有性生殖に必須と考えられる 5 個の遺伝子の発現が、成虫化に伴って上昇していることが分かった。これらの遺伝子は具体的にはセルトリ細胞の修復や精子の運動性、卵黄細胞の生成に関与すると考えられた。また、転写因子や Eukaryotic initiation factor など遺伝子の転写に関与する考えられる複数の遺伝子の発現量も同様に上昇していた。

遺伝子オントロジー解析により見出した有性生殖に関与すると考えられる 5 個の遺伝子の発現量の変化について、Realtime PCR を用いて成虫化虫体とコントロール培養下のテトラチリジウムで比較した結果、これらの遺伝子の発現量の変化を確認することができた。

(2) dsRNA を用いた *M. corti* における RNA 干渉法の検討とそれを用いた遺伝子の機能解析法の確立

dsCRISP2 を 4 時間曝露したテトラチリジウムにおける *McCRISP2* の発現量は、非曝露コントロール群のテトラチリジウムにおける発現量との間に違いは認められなかった。一方で、dsCRISP2 を 24 時間曝露したテトラチリジウムにおける *McCRISP2* の発現量は、非曝露コントロール群のテトラチリジウムにおける発現量と比べて約 2 割程度まで発現量が減少した。

以上の結果から、テトラチリジウム¹の成虫化に關与する遺伝子の候補を探索するためのライブラリーを構築することができ、複数の遺伝子を候補遺伝子として新規に見出した。また、テトラチリジウムにおける RNA 干渉に成功し、候補遺伝子の機能解析を進め成虫化の責任遺伝子を特定するためのアッセイ法を作成することができた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1 . 発表者名 林慶、尾針由真、高島康弘、黒木俊郎、柴原壽行
2 . 発表標題 Mesocostoides vogaeのin vitroにおける成虫への発育のメカニズム
3 . 学会等名 第91回日本寄生虫学会大会
4 . 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究協力者	高島 康弘 (Takashima Yasuhiro) (20333552)	岐阜大学・応用生物科学部・准教授	

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------