

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 10 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K21367

研究課題名（和文）遺伝子ノックアウト吸虫作成技術の確立と虫卵孵化のタイミングを司る遺伝子の同定

研究課題名（英文）Establishment of gene knockout Fasciola sp. and identification of genes controlling the timing of insect egg hatching

研究代表者

高島 康弘（TAKASHIMA, Yasuhiro）

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：20333552

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：肝蛭卵は浸透圧刺激により成長抑制、孵化抑制を受けることが明らかになった。マウス、ヒトにおいて浸透圧を感知する分子が知られているが、この分子をコードする遺伝子と相同性の高い推定遺伝子領域が肝蛭ゲノム中にも存在することが分かった。当該遺伝子産物が孵化のタイミングを決定しているか否かが明らかにするため、当該遺伝子のノックアウトを目指して技術開発を実施した。最終的には組換え体作出までに至らなかったものの、遺伝子導入に最適なスポロシト期の幼虫を培養条件下で大量に誘導すること、培養下のスポロシトを中間宿主貝に戻してメタセルカリアを得ることに成功した。また肝蛭用外来遺伝子発現プラスミドベクターを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝蛭をはじめとする吸虫は家畜やヒトの健康被害の原因となる。しかし遺伝子改変技術が確立されておらず、吸虫のさまざまな生命現象を司る責任遺伝子の確認が実験生物学的レベルで実施できないのが現状である。本研究では肝蛭の遺伝子組換えにむけた基盤技術を確立した。また宿主糞便中に排出された肝蛭卵は中間宿主貝の生息する淡水中で孵化する一方、糞便中では孵化しないが、これがなぜ起こるのかは不明であった。本研究により浸透圧が孵化を抑制することが明らかとなり、糞と淡水の浸透圧の差を虫卵が認識している可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Eggs of Fasciola sp. are found to undergo growth and hatching inhibition upon osmotic stimulation. A gene region that is homologous to the gene encoding the osmotic pressure-sensing molecule known in mice and humans was also found to exist in the Fasciola sp. In order to clarify whether the gene product determines the timing of hatching, we developed a technology to knock out the gene. Although we were not able to produce KO parasite until the end of research period, we succeeded in inducing a large number of sporocyst stage larvae, which are optimal for gene transfer, under culture conditions, and obtaining metacercariae by returning sporocysts in culture to intermediate host mollusks. We also constructed a plasmid vector for expression of foreign genes for liver leech.

研究分野：獣医学

キーワード：肝蛭 遺伝子組換え 孵化

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

多くの寄生虫卵（吸虫、条虫、線虫）は、宿主体外に排出された環境中で長期間孵化しないまま生存した後、適切な宿主に感染が成立する環境が整うと孵化する。例えば感染動物の糞便中に排出された回虫卵や鞭虫卵は土壌中や水中で孵化しないまま長期間にわたって生存するが、これを人や動物が摂取すると腸内で直ちに孵化する。このような現象があるからこそ人や動物は食品に付着した虫卵や環境中の虫卵に感染する。しかしこの現象はあまりにも当たり前のことと考えられたのか、寄生虫卵の孵化のタイミングを決めるメカニズムはほとんど研究されてこなかった。ほぼ唯一の例外は、鞭虫卵の表面に腸内細菌が付着すると孵化が誘導されるという報告である[Hayes et al., 2010. Science]。ところが虫卵孵化のタイミングを司る遺伝子の同定は全く試みられていない。これは蠕虫（線虫・吸虫・条虫）の遺伝子改変技術開発が世界的に遅れているためである。いまだに完全なノックアウト虫体すら作成されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では吸虫のひとつである肝蛭を用いて世界で初めての遺伝子ノックアウト吸虫の作成に挑戦する。さらに確立した手法を用いて「肝蛭卵が中間宿主貝が孵化するタイミングを司る」と推定される遺伝子をノックアウトすることで肝蛭卵の孵化のタイミングを司る遺伝子を同定することをめざす。

### 3. 研究の方法

本研究で研究対象とする肝蛭 (*Fasciola* sp.) の卵は感染動物の糞便中に排出されるが、糞便中では孵化せず、中間宿主のヒメモノアラガイが生息する淡水中に入ってはじめて孵化する。このメカニズムはこれまで不明であったが、予備実験において肝蛭卵は糞便中のみならず高張液中でも発育を停止することを見出した。したがって、虫卵は浸透圧を認識して孵化のタイミングを決めているものと考えられる。この前提に立って以下の実験を行う。

#### ①浸透圧レセプター遺伝子候補のコードするタンパクに対する抗体の作製

予備実験として肝蛭のゲノム情報 (taxid:6192) を精査し、低浸透圧を認識することで知られるマウス TRPM8 遺伝子と相同性の高い領域を見出した (ftrp8 gene とする)。この配列を人工合成して組換え大腸菌に発現させ、得られた組換えタンパク質 (rFTRP8 とする) をマウスに接種して抗体を得る。

#### ②肝蛭への遺伝子導入条件の確定と基盤整備

蛍光標識 DNA を様々な条件化のエレクトロポレーション法で肝蛭の幼虫（ミラシジウム）に導入を試み、共焦点顕微鏡で観察することで虫体内部の生殖細胞内に DNA が効率よく入る条件を確認する。本年エレクトロポレーション法で近縁のタイ肝吸虫の成虫に遺伝子導入できることが初めて報告されたが、虫体を構成する細胞の数%でしか遺伝子の改変が起こっていない (Arunsan et al., eLife, 2019)。これは成虫表層の体細胞の一部でのみ遺伝子導入・改変がおこったためと考えられる。そこで本研究では成虫ではなくミラシジウム期の幼虫に遺伝子導入する。ミラシジウムは将来複数匹の成虫になる生殖細胞を体腔に多数持ち（下図）、1 匹のミラシジウムから多い場合は数百匹の成虫を生じる。ここに遺伝子が導入されることで、すべての体細胞で遺伝子が組替わった複数匹の成虫が発生するはずである。

#### ③候補遺伝子のノックアウトと虫卵孵化能力の検証

確立した技術を応用して **ftrp8 gene** をノックアウトした肝蛭を作成し、その肝蛭が生む卵がどのような浸透圧下で孵化するか検証する。

### 4. 研究成果

①作成した組換え大腸菌は rFTRP8 のアミノ酸配列から予想される分子量のタンパクを発現したが、菌体内で封入体となり可溶化出来なかった。そこで封入体を何度も洗浄したのちマウスに接種し、封入体に含まれる複数のタンパク質に対する抗体を含んだ血清を得た。得られた血清中に含まれる目的外の抗体を非組み換え大腸菌ライセートで吸収することで除き、吸収処理済み血清を得た。得られた処理済み血清は大腸菌に反応せず組換えタンパクには反応した。以上の作業により FTRP8 を検出するポリクローナル抗体が得られた。

②エレクトロポレーション法によるミラシジウムへの核酸導入では効率の良い核酸導入ができなかった。またマイクロマニピュレーションにより核酸を直接注入することも試みたが、処理後のミラシジウムが数分で死亡してしまった。そこでミラシジウムへの導入を諦め、多数の胚細胞を含むスポロシストへの遺伝子導入技術を確認する方向に方針を切り替えた。しかしスポロシストは中間宿主貝の体内ステージであり、遺伝子導入作業が行いにくい。そこで虫卵から孵化した直後のミラシジウムを *in vitro* で培養し、培養液中でスポロシストを誘導することを試みた。自然界ではミラシジウムは中間宿主貝に侵入できなければ数時間で死亡するが、特定条件下の培地中では 10 日以上生存した。また培養 1-3 日目に形態変化がみられ、ミラシジウムとスポ

ロシストの中間的形態を示した。電子顕微鏡で表皮構造を詳細に観察したところ、スポロシスト特有の構造が確認された。このことから不完全ではあるがスポロシストへの誘導ができたものと考えられる。さらに培養3日目のスポロシスト様虫体を中間宿主貝の筋肉に接種したところ、約一か月後にメタセルカリアにまで成長した。このことから培養条件下で誘導したスポロシスト様虫体が成虫にまで成育する可能性が強く示唆された。すなわち培養下のスポロシスト様虫体に遺伝子改変を加えることができれば組換え肝蛭が得られるものと思われる。スポロシストへの核酸導入は近縁種で報告があり、この条件にもとづいて導入を試みている。

③残念ながら研究期間中に目的遺伝子をノックアウトした組換え虫体の作製には至らなかったが、ほぼ技術的な基盤整備ができた。現在、得られた技術を用いて組換え虫体作成作業を継続中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

2024年4月現在、学会発表ならびに論文投稿準備中。

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------