

住血吸虫における発育段階特異的遺伝子発現の機能解析

Developmental regulation of gene expression in schistosomes

代表研究者 筑波大学基礎医学系講師 田中 真奈実
Assist. Prof., Div. of Molecular Parasitology, Inst. of Basic Medical Sci.,
Univ. of Tsukuba
Manami TANAKA

We have studied the gene expression, especially of the oncoproteins, and its regulation in schistosomes. Schistosomes have a complex life cycle with a defined dimorphic lifestyle. The parasite are so far unique in biology in expressing oncogene products in their adult stage. In order to characterize the expression and developmental regulation, a lambda gtl1 cDNA library and lambda EMBL4 genomic DNA library of each growth stage of *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum* was constructed, and was screened with various probes, and monoclonal antibodies against oncogene products. The results obtained were as follows: (1) one protein was characterized which reacted to anti-p53 antibody (Ab-2, Oncogene Science, Inc.). This protein was about 70 KDa in molecular weights, and expressed as 1.4 Kb RNA in the adult stage. The gene contained DNA-protein binding site with zinc finger domain in 5' region, and had a significant homology with sex-hormone receptor in 3' region. P53 gene is well-known as the negative regulator of the cell cycle, and the mutations in the gene are turning out to be the most common genetic alterations in human cancers. (2) schistosomes had different rRNA population among species and strains, which might be responsible for the diversity of pathogenesis among them. (3) Chromosome structures, C-band formation, and the results of *in situ* hybridization were performed. These characteristics also differed among species and strains, and chimera formation could be hardly observed in any chromosomes from *Schistosoma japonicum*. We suppose that the biological and biophysical characterization of each factor, one by one, is the fastest way to understand evolutionary adaptation mechanism of parasites as well as general cell biology of parasitism.

研究目的

“地球は今や虫喰いのクルミだ”と言ったのはチャールズ・ダーウィンである。クルミに巣喰う最大の害虫が、人類という生物種であることは現在否めない事実となった。ここで、人類にもまた巣喰う“虫”があり、数の上で最大の害をなしているのは、“寄生虫”という項に分類されている生物種たちである。寄生虫種は、進化学上早期に同種の自由生活生物と分岐し、人類（総じて哺乳類）という宿主の発展とともに希有の分化・増殖を遂げた。

現在寄生虫疾患による人類の総死亡率は年間億の単位に達し、しかも新生児期から青少年期にかけてがその対象で、その損失は測り知れない。

本研究は、寄生虫疾患コントロールのための具体的ターゲットの選定とそれによる対策の達成を最終目標とするが、過去の失敗にかんがみ、単なる寄生虫種・媒介生物種の根絶によるコントロールを手段とせず、宿主寄生体対応の要となる生物学的適応システムの解明と応用により、宿主体内における病原性の発現をコントロールすることに力点をおくものである。自然環境破壊による寄生体コントロールが不可能であることは自明の理であり、人類の文明がもたらす最善の理知は自ら“宿主を損なわない形の寄生生活”を具現させることを可能にすべきであると考ええる。なお、研究者の属する筑波大学が旧日本住血吸虫流行地にあることから、本研究は住血吸虫を中心に行われた

が、他種の寄生虫症についても解析を行った。

研究経過

(1) 遺伝子材料の準備

日本住血吸虫（山梨株，中国株，フィリピン株），マンスン住血吸虫（ペルトリコ株，ブラジル株）を実験室内で大量に増殖させ各発育段階（虫卵，セルカリア，雄・雌成虫）ごとに DNA・RNA を抽出した。これらはスクリーニング用フィルターを作成するために用いられ，さらに genomic DNA library, cDNA library の作成に用いられた。Library はその insert サイズにより各種フェージ・プラスミドをベクターとして用い，一種につき最低 3 種類のライブラリーを作成した。

(2) 遺伝子マーカーの選別

上記材料から，虫体ターゲットに応じて特異的遺伝子を選別した（遺伝子マーカー）。寄生現象を考えた場合，マーカーとして適当であるものは，①感染＝宿主細胞への侵入に関わるもの（細胞接着因子，蛋白質融解酵素など），②増殖・分化に関わるもの（各種代謝酵素系など），③生殖に関わるもの（ホルモン系），④細胞周期の制御に関わるもの，がまずあげられる。寄生虫種においてこれらの情報は未だ少なく，他の生物種において既に明らかになっているものから進化学上の保存性を考慮した homology assay による選別のみが可能である。したがって，human, *C. elegans*, Yeast などの解析により明らかとなった遺伝子情報から，特に重要性の高いと思われる遺伝子についてライブラリースクリーニングを行い，①より Cysteine Proteinase 遺伝子，② DNA mismatch repair 遺伝子及び rDNA 遺伝子（群），③雌成虫卵殻形成遺伝子，④細胞周期抑制性遺伝子を選別し，これらの遺伝子配列存在様式・合成蛋白質の解析などを行った。

(3) 遺伝子マーカーによる虫体染色体解析

個々の構造遺伝子は群として染色体を構成する。生存に必要な物質は各構造遺伝子部分に記憶されているが，その転写調節・制御はその上流・下流域に多く存在し，いくつかの遺伝子群を一括して操作していることもある。したがって，(2)で

行った各々の遺伝子及び転写産物の解析は，目的とする“寄生現象に必須な生物学的メカニズム”への端緒を与えるにすぎない。ターゲットマーカーを中心としたさらに大きな遺伝子画分，染色体構造上の機能解析，さらに遺伝子組み換えの機構解析が次のステップとなる。ここでも従来の研究では未だ情報が少なく，システムの樹立から着手することが必要であった。*In situ hybridization* を用いた構造解析，パルス電気泳動を用いた染色体サイズの遺伝子解析法をここで確立し，その技術を用いて各遺伝子マーカーの存在様式と住血吸虫の遺伝子マップを作成した。

研究成果

(1) 寄生虫遺伝子はより多く宿主との相同性を保持する。(2)に示したように，短期間で多くの遺伝子の単離・同定に成功したが，これはあくまで方法論の正当性と限界の範囲内のことである。

つまり，用いたプローブ・抗体は多く human 由来であり，結果として寄生虫遺伝子は同種の自由生活種由来の遺伝子より宿主遺伝子に相同性を多く示すため，高い効率で遺伝子マーカーの選別に成功したと言えよう。これは裏返せば，寄生虫に特異的遺伝子の選別ははるかにむずかしいということになる。この点の解決法は次項で示すが，ここで単離した遺伝子群は実に驚嘆すべき性質を持ち，たとえば研究経過の(2)④細胞周期抑制性遺伝子は 5' 上流域に DNA-DNA もしくは DNA-protein 結合性転写調節因子を有し，中間地帯に zinc-finger を 3' 域にホルモン結合性蛋白質を有している。つまり 1 個の遺伝子に実に多目的機能をもたせて，物質・エネルギー系の制御を行っていると考えられる。もちろん，遺伝子相同性は高等動物（特にヒト）で高いスコアを示し，宿主の選別が遺伝子にコードされているがごとくの様相を呈する。

(2) 発育期別遺伝子発現は rDNA 遺伝子群により制御されている。

個々の遺伝子マーカーは，発育期別では相違を示さない。とすれば，住血吸虫における発育期別抗原変異，遺伝子発現制御は DNA が蛋白質に転写，翻訳される過程で行っていることになる。本

研究では rDNA 遺伝子の単離に成功したが、この遺伝子は段階別・種別に遺伝子内疾患を認め、それが大きな構造変異を起こすことが二次解析により示された。すなわち、構造遺伝子部分に変異はないが、それが転写され、核外で翻訳される時に、住血吸虫は発育期別・種別・“地域別”の細胞工場を使い分けており、これが各々の生物学的特異性・病原性の変異の一端をなすと考えられる。

(3) 住血吸虫の染色体 ($n=8$) は進化・分化の極に達している。

In situ hybridization の結果、住血吸虫は 8 対の染色体 (3 対の常染色体, 1 対の性染色体) を持ち、それらは種・株別に変異 (形態学的差異) が大きく、しかもほとんど組み換えを起こさないことが示された。つまり、住血吸虫はその種・株でさえも早期に進化学上分岐しており、その分岐は地域別に固定され、それ以上組み換えによる進化・分化を必要としない点に既に達している。その中間宿主である貝類の生棲が極めて地域的に集束していることから、虫体自体の均一化・貝類の均一化相方により進化上の極点に達したのでであろうと考えられる。また、地域別の著しい病型の差異も、この現象の副産物と考えられる。

今後の課題と発展

研究成果の項に本研究の研究成果のうち、住血吸虫の項のみを簡略化して示したが、同時に他種の寄生虫種の研究により、寄生虫疾患というものが、遺伝子レベルでの虫体の適応を必須としていること、そして病型もしくは種別病態変異というものが、虫体の分散—中間宿主の分散—ヒトの分散という因子により地域別に特徴づけられていることが示された。今後は、より多くの遺伝子群を一括して解析するシステムを樹立し、homology assay のみに依存しない遺伝子解析法により寄生虫種の遺伝子情報の供給を加速することが必要である。さらに、発現物質の解析システム・応用技術の発展が伴わなくてはならない。既に示したように、寄生虫種は高等動物遺伝子に多く相同性を示すため、現在のプラスミド・ファージ・大腸菌のシステムは限界に来ており、これからは S.

cervical (Yeast) によるクローニングシステム (YAC), *S. pombe* による発現システムを用いるべきである。

既に研究者は、パルス電気泳動を用いた染色体サイズ DNA のアガロースゲル内抽出に成功し、YAC (Yeast artificial chromosome) のスクリーニング系を樹立しつつある。この方法論は他の寄生虫種にも応用されており寄生虫学の分野に全く新しい方法論を導入しつつある。現在までのところ、各々の寄生虫の驚くべき生物学的適応システムの理解に終始せざるを得ないが、この根本的理解が同時に効率の良いコントロール法に直結していくであろうことは信ずるに難くない。なんとなればターゲットが明らかとさえなれば、方法論は決してむずかしくはないからである。

著 書

- 1) M. Tanaka: The p 53 gene expression in schistosomes. In: Recent advances in Molecular Biology of Schistosomes, A. D. Coutinho and A. G. Simpson Ed., Oswald Cruz, 1992, in press.

主要論文

- 1) M. Tanaka, T. Tanaka, and Y. Kaneda: The nucleotide sequence encoding DNA mismatch repair gene from the protozoan parasite *Trypanosoma rangeli*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, in press.
- 2) T. Tanaka, M. Tanaka, and Y. Kaneda: Homologous cysteine proteinase genes located on two different chromosomes of *Trypanosoma rangeli*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1992, in press.
- 3) M. Tanaka, T. Tanaka, and Y. Kaneda: Karyotype map of *Trypanosoma* chromosomes by multi gene family. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1992, in press.
- 4) M. Tanaka, H. Hirai, and T. Matsu-ura: The developmental regulation of p53 gene expression in schistosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1992, in press.
- 5) H. Hirai and M. Tanaka and P. T. LoVerde: The developmental rearrangement and chromosomal localization of ribosomal gene population in *Schistosoma japonicum*. *Parasitol.*, 1992, in press.
- 6) W.-B. Li, M. Tanaka, D. J. Bzik, B. A. Fox, and J. Inselburg: The molecular characterization of the *Plasmodium falciparum* RNA polymerase I largest subunit gene. 1992. *J. Biol. Chem.*, in

press.

- 7) H. Ohmae, M. Tanaka, M. Hayashi, *et al.*: The improvement of ultrasonographical and serological changes in schistosoma japonicum infected patients after praziquantel treatment. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **46**, 99-104 (1992).
- 8) H. Ohmae, M. Tanaka, M. Hayashi, *et al.*: Ultrasonographical and serological abnormalities in schistosoma japonicum infection in Leyte, Philippines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **46**, 89-98 (1991).
- 9) W.-B. Li, D. J. Bzik, M. Tanaka, B. A. Fox, and J. Inselburg: The characterization of the largest subunit gene of Plasmodium falciparum RNA polymerase III. *Mol. Biol. Parasitol.*, **46**, 229-240 (1991).
- 10) H. Ohmae, M. Tanaka, T. Nara, H. Utsunomiya, Y. Irie, and K. Yasuraoka: Ultrasonographical

and serological parameters for the evaluation of the improvement of hepatic fibrosis in schistosoma japonicum infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **45**, 350-359 (1991).

総 説

- 1) 関連遺伝子マーカーを用いた薬剤耐性マラリア原虫の性状解析. 日本臨床 1992 年増刊号: 感染症の遺伝子診断と分子疫学, (1992) 印刷中.
- 2) The ultrasonographical and serological changes and their improvement after praziquantel treatment in Schistosoma japonicum infected patients in Leyte, Philippines. *Memorias do Instituto Oswald Cruz*, A. D. Coutinho Ed., Oswald Cruz, (1992) in press.
- 3) 薬剤耐性の克服. 化学療法の領域: 特集マラリアのすべて **8**, 477-484 (1992).
- 4) マラリア原虫薬剤耐性の分子生物学的解析, 寄生虫学雑誌, **40**, 325-329 (1991).