

# 学 位 論 文 要 旨

氏名 FUQIANG HUANG

題 目 : Transcriptome-wide gene expression profiling in oncospheres and metacestodes of *Echinococcus multilocularis*  
(多包条虫の虫卵から成熟包虫における遺伝子発現の推移)

---

論文要旨 :

*Echinococcus multilocularis*, a worldwide zoonotic parasite, causes alveolar echinococcosis that is of great public health concern. The parasite requires two mammalian hosts, a definitive host (carnivores) and an intermediate host (mostly wild rodents), to complete its life cycle. For decades, it has been developed as an experimental model to study host-parasite interplay. The excretory-secretory (ES) proteins of parasites have been found to be crucial for their survival inside and outside of the host organisms by acting as virulence factors or host immune responses modulators. In addition, transmembrane (TM) proteins, as a group of membrane proteins, are involved in many important biological processes. Thus, ES and TM proteins received great attention as antigen proteins for vaccine or drug development that aimed to cure or prevent *E. multilocularis* infection. However, only very few candidate proteins have been identified due to the lack of systematic understanding of *E. multilocularis* genome and gene expression details. Until recently, the *E. multilocularis* genome sequence has been resolved, which largely facilitated the identification of antigen families that possess high potentials for developing diagnostic assays, vaccines, and drugs. In order to diagnose and prevent the infection of *E. multilocularis* at a very early stage, discovery of/exploring potential antigen candidate proteins that are expressed during oncospheres and early metacestode larva stage would be important. Thus, it is invaluable to dissect the gene expression profile *E. multilocularis* at a stage-specific manner. In this thesis, we used next-generation sequencing approach to investigate gene expression dynamics at different

stages of *E. multilocularis* (Nemuro strain).

In this work, seven *E. multilocularis* mRNA samples from non-activated oncospheres (Nonc), activated oncospheres (Aonc), 4-week immature metacestodes (4Wmet), 16-weeks mature metacestodes (16Wmet), and *in vitro* cultivated metacestodes small vesicles (Cmet) were collected to profiling the gene expression dynamics at different stages of the parasite development. The single-end (s4Wmet and s16Wmet) and pair-end (pNonc, pAonc, p4Wmet, pCmet) sequencing gave 700 million clean reads with > 90% of all bases having Phred scores above 30. Moreover, most of *de novo* assembled contigs could be matched to the reference genome of *E. multilocularis*, which indicated that all sequenced reads of the seven samples and the assembled contigs of pair-end sequencing samples were reliable.

The gene expression profile analysis revealed that amyloid beta A4 protein, some diagnostic antigen GP50 gene isoforms, antigen EG95 family, major egg antigen (HSP20) and *Tetraspanin 3* were dominantly expressed in activated oncospheres, while Antigen B subunits (EmAgB8/1, 2,3 and 4), *Tetraspanin 5* and 6, tegumental protein and Antigen 5 family were highly expressed at metacestodes stage.

Furthermore, heat shock proteins 70 family and antigen II/3(*elp*) are constantly expressed in all stages. And apomucin analysis showed that MUC-2 sub-family transcripts were present in all sequenced stages and some of them were highly expressed in oncospheres, especially in Aonc. However, MUC-1 family transcripts only present in metacestodes. Functional annotation of *E. multilocularis* transcripts revealed that 769 predicted ES and 1980 predicted TM proteins were enriched with gene ontology term of ‘extracellular region’ and increased ‘transmembrane transporter activity’. And it was shown that the up-regulated genes in metacestodes were enrichment in ‘cell adhesion’ when compared with oncospheres which indicted that many molecular that took part in the host-parasite interfaces were highly expression in the metacestodes to regulate the immune response for establishing the chronic infection. Strikingly, 97% (938/968) of the predicted trans-splicing genes were expressed at

oncospheres and metacystodes, though 20% (2,177/10,669) genes in reference transcriptome were almost no expression. Furthermore, the protease analysis showed that there were 257 proteases and 55 proteases inhibitor in the reference transcriptome and most of these proteases had relatively higher expression levels in 16Wmet, which indicated they might play important roles in regulating host immune response during the chronic stage of larval echinococcosis. In contrast, proteases inhibitors, especially Kunitz-type protease inhibitors (102), were highly expressed in oncospheres, suggesting they might play important roles to block the proteolytic attack in the host alimentary tract.

The results clearly showed that the expression dynamics of antigen candidates, ES proteins, TM proteins, and proteases in *E. multilocularis* at different developmental stages/growth phases were differentially regulated. These large sets of detailed and systematical results might provide novel insights for studying host-parasite interaction at different stages of the life cycle. In addition, it also serves as an invaluable resource for future experimental studies that aim to develop new intervention tools, including vaccines and drugs, against this parasite at its early infection phase.

## 学位論文審査の結果の要旨

氏 名	黄 福 强
審 査 委 員	主 査：鳥取大学 教授 奥 祐 三 郎
	副 査：山口大学 教授 佐 藤 宏
	副 査：鳥取大学 教授 伊 藤 壽 啓
	副 査：鳥取大学 教授 竹 内 崇 師
	副 査：鳥取大学 准教授 金 京 純
題 目	Transcriptome-wide gene expression profiling in oncospheres and metacestodes of <i>Echinococcus multilocularis</i> (多包条虫の虫卵から成熟包虫における遺伝子発現の推移)
審査結果の要旨： 近年、多包条虫のゲノムのほとんどは解読され、成虫や発育の進んだ幼虫(包虫)のトランスクリプトームも公表されてきた。人を含む中間宿主へ経口感染する多包条虫の虫卵や肝臓での感染初期の包虫のトランスクリプトームの情報は、ワクチン開発および感染初期における免疫診断のためには不可欠であるが、これまで解明されてこなかった。 本研究において、申請者は、多包条虫の虫卵、感染初期から感染後期の包虫を用いて、発育に伴うトランスクリプトームの推移を解明した。さらに、ワクチンおよび診断用抗原候補分子については、分泌蛋白および膜結合蛋白の観点から、これらのトランスクリプトームを詳細に調べた。 第一章では、トランスクリプトーム検査材料として、活性化前および活性化後のオンコスフェア、感染4週目のマウス肝臓(初期発育包虫で嚢胞壁のみ)、人工培養された微小嚢胞(嚢胞壁のみ)、感染16週目のマウス肝臓(成熟包虫で嚢胞内に繁殖胞および原頭節を含む)から mRNA を抽出し、次世代シーケンサを用いて解読した。各材料から7千万から14千万リードが得られ、さらに塩基配列解読結果も精度が高いことが確認された。しかし、感染マウスの肝臓から得られた検査材料には、マウス由来の遺伝子が多く含まれていることが示唆された。 第二章では、各遺伝子の発現レベルを RPKM として算出し、解析した。まず、16 の遺伝子について、算出された RPKM とリアルタイム PCR の結果を比較し、ほぼ同様の結果が得られたことから、本研究で算出された RPKM の値の信頼性を支持した。各材料のトランスクリプトームの全体的な比較では、2 検体あった活性化前オンコスフェア間と4週目初期発育包虫間は類似性が確認され、活性化前および活性化後オンコスフェアはやや近似した。一方、初期発育包虫、人工培養された微小嚢胞さらに成熟包虫間ではかなり差が見られ、初期発育包虫と成熟包虫の中間に人工培養された微小嚢胞が位置した。それぞれの発育段階間の比較では、活性化前および活性化	

(別紙様式第 10 号)

後オンコスフェアでは、活性化後に高発現する遺伝子が多く見られ、特に膜輸送に関連するものが見られた。オンコスフェアと包虫間では、それぞれ特異的に高発現する遺伝子が多数見られ、特に、細胞外の蛋白質基質、細胞膜、細胞接着に関連するものにおいて差が顕著に見られた。

第三章では、すでにワクチン抗原もしくは診断用抗原として知られている抗原を元に、それら遺伝子のアイソフォームを含めた発現状況を解析した。特に、Antigen B subunit (EmAgB8/1,2,3 および 4)、診断用抗原 GP50 類、テトラスパニン類、アポムチン類、フィブロメクチン類(EM95 類)およびセリンプロテアーゼインヒビター類などについて解析し、発育段階における興味有る発現パターンを示した。特に、有鉤囊虫の診断用抗原 GP50 類は、多包条虫ではオンコスフェアと成虫のみ発現されており、高発現が予想された包虫では発現が認められなかった。また、オンコスフェアでは、セリンプロテアーゼインヒビターの高発現が見られ、虫卵の経口感染時における胃の消化に対する抵抗性への関与が予想された。

以上のように、本研究は、多包条虫のオンコスフェアから成熟包虫までのトランスクリプトームを解明した初めての研究で有り、過去の報告とまとめると多包条虫のすべての発育段階のトランスクリプトームの比較が可能となった。特に、本研究において明らかにした虫卵および感染初期包虫のデータはワクチン開発および感染初期に有効な免疫診断法開発のために有用な情報を提供していると思われる。また、このようにトランスクリプトームの網羅的なデータが得られたことから、本研究は多包条虫の生物学および疾病制御における基礎的な情報を提供し、今後のエキノコックスおよび条虫研究に広く貢献するものと考えられる。

以上、審査員 5 人が審議した結果、本論文は博士(獣医学)の学位論文として十分価値があるものと判断した。