

分 担 研 究 報 告 書

馬肉生食による食中毒の病因物質とされる  
ザルコシスティス *Sarcocystis fayeri* のゲノム解析

野崎 智義

平成 23 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

生鮮食品を共通食とする原因不明食中毒の発症機構の解明

研究代表者 大西 貴弘（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

### 分担研究報告書

馬肉生食による食中毒の病因物質とされるザルコシステイス

*Sarcocystis fayeri* のゲノム解析

研究分担者 野崎 智義（国立感染症研究所 寄生動物部）

研究協力者 八木田健司（国立感染症研究所 寄生動物部）

研究協力者 黒田 誠（国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター）

研究協力者 関塚 剛史（国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター）

馬肉生食による食中毒の病因物質と考えられている *S. fayeri* に関して、その毒性関連因子を中心とした遺伝子情報を網羅的に得るために、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析を行った。食中毒事例残品馬肉より回収したザルコシストより DNA、RNA ならびにタンパク質を抽出し、DNA に関して illumina GAIIX を用いて解析を行った。馬肉等からの混入核酸由来のリードを除くと、*S. fayeri* 由来のリード数は、総数 18,163,062 の 96.8%、17,582,622 と算出され、得られたライブラリーのほとんどが *S. fayeri* 由来と想定された。得られた解析結果からは GC 含量が約 50%、ゲノムサイズは 50~70 Mb と推定された。de novo assemble によるドラフトゲノム解析を進めているが、総 contig 長が想定ゲノムサイズよりも少なく、リード数不足を解決する必要性が示された。

#### A. 研究目的

これまで食肉に寄生する原虫である住肉胞子虫ザルコシステイス *Sarcocystis* は、牛肉あるいは豚肉の喫食によりヒトに感染しザルコシステイス症を引き起こすことが知られていた。一方、近年国内において馬刺し喫食による食中毒が発生し、その原因がこれまでヒトへの健康被害の知られていない馬肉寄生性の *S.*

*fayeri* であることが判明し、*S.*

*fayeri* が新たなヒト健康被害をもたらさうる種類であることが明らかとなった。現在のところ *S. fayeri* の毒性に関しては下痢原性の毒性タンパク質の関与が示唆されているのみであり、本種の毒性あるいは寄生虫学的特性に関する研究の進展が求められている。病原体の全ゲノム解析・ゲノミクスは遺伝子レベルで網

羅的に病原性関連因子を検索する上で有用で、病態解明につながる情報を得ることが可能である。本研究では *S. fayeri* による食中毒の発症要因を解明し、病因物質の特定を行うために *S. fayeri* の全ゲノム解析を行うことを目的として、そのための試料調整ならびに次世代シーケンサーを用いたライブラリーの解析を行った。

## B. 研究方法

### 1. 試料の調整

食中毒事例残品馬肉 (-20°C 冷凍保管) を解凍し、22G 注射針と実体顕微鏡を用いて馬肉を切削し、乳白色で細長い袋状のザルコシストを馬肉中より回収した。回収したシストは生理食塩水中におき形態的特長を確認後、一部を用いてシスト内のブラディゾイトを確認した。本研究では事例残品馬肉の量が限られていたため、回収したシスト数は12個であった。シスト周囲に付着する馬肉の筋原繊維はゲノム解析のノイズとなるため、顕微鏡下でシストより馬肉繊維を剥離、除去した後、全シストを1.5ml 遠心チューブに入れた生理食塩水中に移し-20°Cで保管した。

### 2. 核酸・タンパク質の解析

得られたシスト量からはゲノム解析用試料の収量は少ないことが予想された。そこで、少ないサンプルソースより広く情報を集めるためにDNA、RNAならびにタンパク質に関して広く分子レベルでの解析を行うこととした。この目的のために Nucleo Spin

TriPrep kit (TaKaRa) を用いて核酸ならびにタンパク質を同時にシストより抽出する方法を用いた。

DNA 試料は収量が少なかった (0.2 ng / $\mu$ l, 50  $\mu$ l) ことから GenomiPhi v2 (GEヘルスケア社)を用いてゲノムDNA増幅を行った。QIAGEN キットを用いて精製し 64.7ng/ $\mu$ l のDNA試料を40 $\mu$ l得た。これをNextera DNA sample prep kit (EpiCentre社)を用いて次世代シーケンサー用試料として調整した。

RNA試料は14.9 ng / $\mu$ l, 60  $\mu$ lのRNA試料が回収され、ライブラリー作製に十分量を確保できた。これをScript Seq mRNA-Seq kit (EpiCentre社)を用いてcDNAを合成し、次世代シーケンサー用試料として調整した。

タンパク質試料は定法により塩析沈殿ペレットを調整した(使用するまで未溶解)。

### 3. ゲノム解析

次世代シーケンサー iIIumina GAIIx を用いて短いリードのアセンブルに基づくゲノム解読を行った。

## C. 研究結果

### 1. *S. fayeri* のザルコシスト

図-1に残品馬肉より回収したザルコシストを示した。シストに内包されたブラディゾイト(図-2)は凍結融解を行っているため生理食塩水中では崩壊が進行したが、シスト内に内包されている限りは形態的な変化は認められず、虫体の細胞成分の漏出はないものと考えられた。

## 2. Illumina GAIIx による *S. fayeri* のゲノム解析

解析に用いられた試料中にはウマと *S. fayeri* に加え、クローニングに用いられた大腸菌ならびに vector も核酸由来物質となるため、ライブラリーとしての質を把握するためにこれらの DNA に関する解読リード数とその割合を調べた。結果を図-3 に示した。総リード数は 18,163,062、その中でウマ配列数は 544,489 (2.998%)、*E. coli* 配列数が 35,220 (0.194%)、vector の配列数が 731 (0.004%) となり、*S. fayeri* 配列数は残り 17,582,622 (96.804%) と算出された。解読した総塩基数は 18,163,062 リード x 2 の paired-end を行っているので、合計 36,326,124 リードとなり、リードあたり 81mer の解読量から総塩基数は 2,942,416,044 bp と算出された。現在までの解読データからはゲノム GC 含量は約 50%、ゲノムサイズは 50~70 Mb と推定された。表-1 に、現在進めている de novo assemble によるドラフト配列の解析結果をまとめた。N50 値が 57bp、最長 contig が 7639bp、contig 数は 318,497、総 contig 長が 19,245,883 であり想定ゲノムサイズよりも少ない状況であった。

### D. 考察

ザルコシステイスのゲノミクスに関しては、馬原虫性脊髄脳炎の原因である *S. neurona* の EST データベースがワシントン大学に、ゲノム解読はケンタッキー大学で進行中である以外、人に病害を起こすこ

との知られている *S. hominis* あるいは *S. sui hominis* のゲノム情報は存在しない。本研究はヒトに病害を示すザルコシステイスとしては初めてのゲノミクス研究である。得られたライブラリー解析からリードの 96%が *S. fayeri* 由来の配列と想定されたことから、このライブラリーで de novo assemble を進めることは適当と考えられた。しかしながら de novo assemble の現状において N50 値、最長 contig 値は contig が進まないことを示しており、総 contig 長が想定ゲノムサイズよりも少ない結果となっている。リード数の不足が原因と考えられ、今後リード数を増した解析が必要である。解析の効率化も重要であり、GAIIx ではリードの長さがやや短いことから、次年度ではより長いリードが読める Mi Seq を導入し、de novo assemble に対応することを考えている。

ザルコシステイスの毒性に関しては、ウシに感染する *S. cruzi* のもつ 15kDa タンパク質がウサギに対する実験的致死毒性を示す物質として同定されている。一方、これと同じものが *S. fayeri* にも存在しウサギに対する毒性が明らかとなっている。このタンパク質に関する遺伝学的解析、またヒトへの毒性因子となる可能性の検証は今後の問題となっている。遺伝子レベルの網羅的解析というゲノミクスの特性は毒性の物質的な条件を検索する上で有用であり、今後解析が進むことで 15kDa タンパク質を中心とした毒性関連因子の情報が得られ、

さらには食中毒の病態が物質的に解析されることにつながることを期待される。加えて、ザルコシステイスに関する新規の、あるいは潜在的な病原性を含めた寄生虫学的特性を明らかにすることは保健衛生上も重要な課題である。ザルコシステイス属には100種類以上あると考えられており、家畜あるいは野生動物の生食において筋肉中のシストは危害因子となり得る。そのリスク評価は今後重要な問題となることが予想され、ゲノミクスはその基盤的研究として高い重要性を有している。

ザルコシステイスは分類上 Apicomplexa に属すが、本属には既にゲノム解析の終了しているマラリア・トキソプラズマ・クリプトスポリジウム、また解読中のバベシアが含まれている。解読されたゲノムサイズはマラリアが23Mb、クリプトスポリジウムが91Mb、そしてザルコシステイスに最も近縁と考えられるトキソプラズマで63Mbであり、今回推定された *S. fayeri* のゲノムサイズが50~70 Mbという結果は妥当なものと理解される。さらに比較ゲノミクスという点からみれば、ザルコシステイスのゲノミクスは、Apicomplexa 原虫の進化、病原性あるいは薬剤耐性など寄生虫学的な課題の解決にも有用な情報基盤になると考えられる。

#### E. 結論

馬肉生食による食中毒の病因物質と考えられている *S. fayeri* に関して、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析を開始

した。得られたライブラリーのほとんどが *S. fayeri* 由来と想定され、次年度の効率的解析が見込まれた。GC含量、ゲノムサイズなど *S. fayeri* ゲノムの特徴が明らかとなった。de novo assemble の現状はリード数不足により contig が進まない結果となっている。ドラフト配列を得るためにはリード数を増やす、またMiSeqなど別のシステムを用いた assemble の併用が必要と考えられた。

#### F. 研究発表等

なし

#### G. 知的

なし

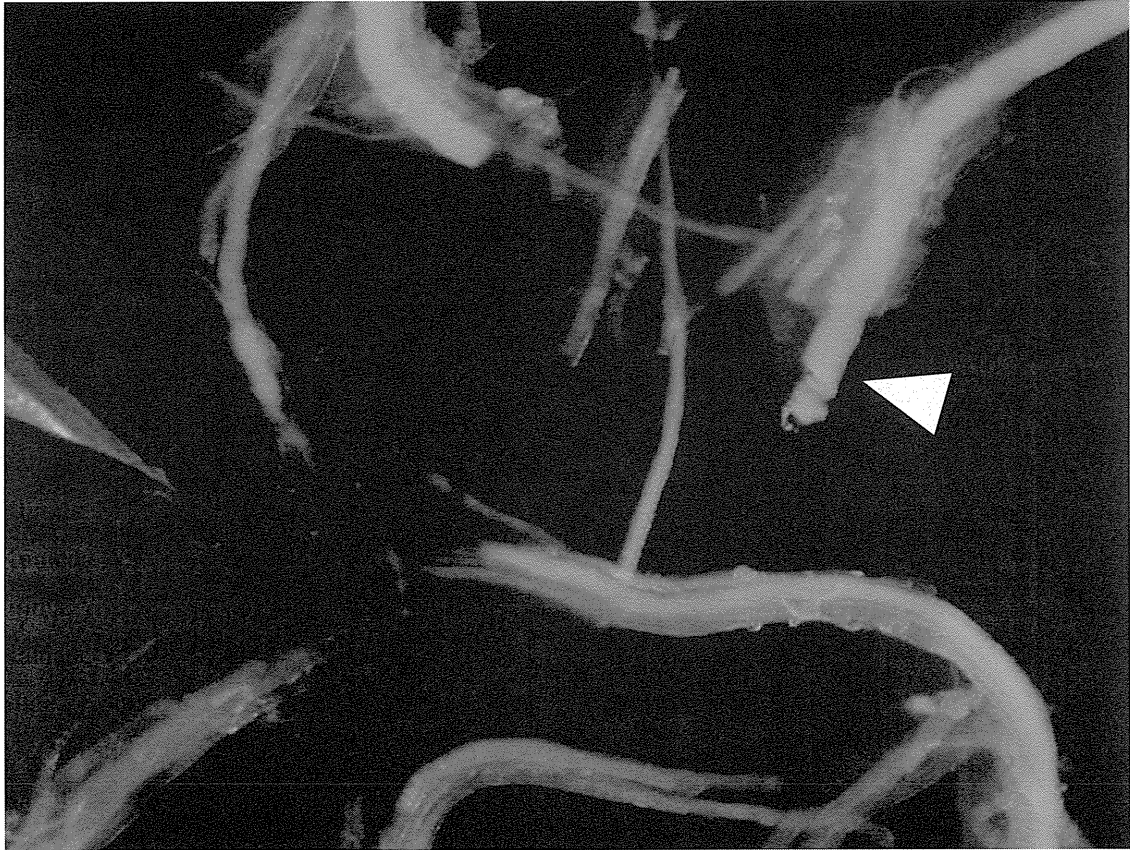


図-1. 事例残品の馬肉より回収した *S. fayeri* のザルコシスト  
乳白色の細い袋がシスト (矢印)。その周辺に馬肉繊維が残る

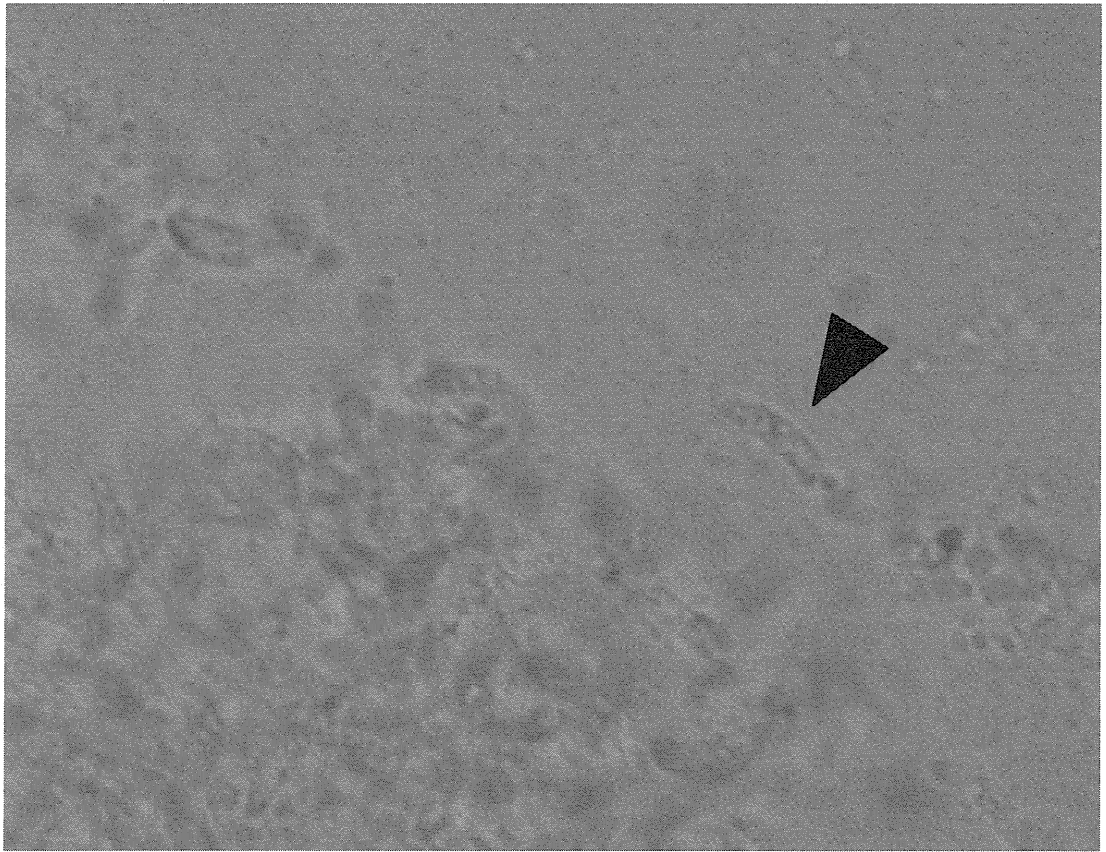


図-2. シストに内包されていたブラディゾイト  
矢印はひとつの虫体を示す

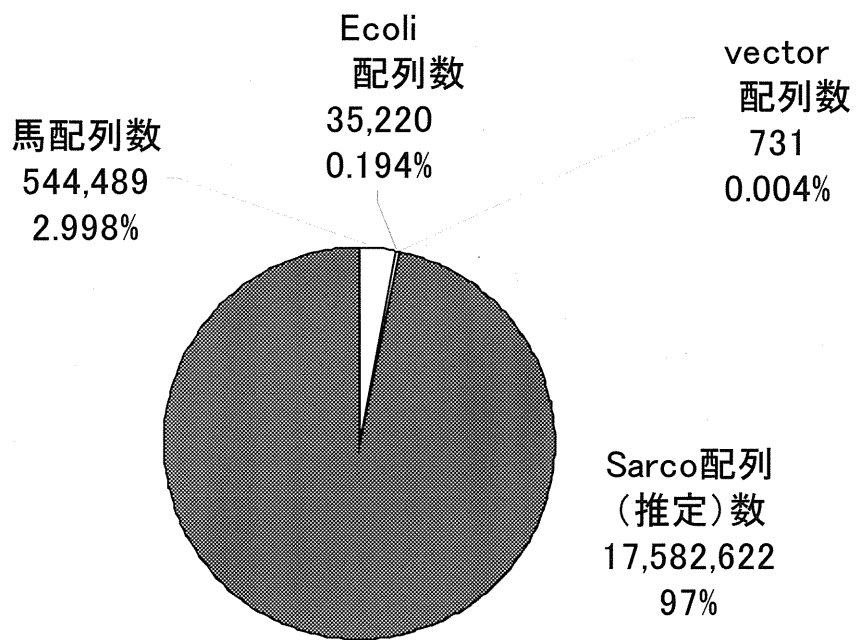


図-3. ザルコシストより調整した試料の illumina GAIIX による解析結果



表-1. *S. fayeri* のドラフトゲノム解析  
de novo assemble データ

N50 (bp): 57
N90 (bp): 40
Max (bp): 7,639
total (bp): 19,245,883
Contigs: 318,497

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Matsukane Y, Sato H, Tanaka S, Ka-mata Y, Sugita-Konishi Y	<i>Kudoa iwatai</i> and two novel <i>Kudoa</i> spp., <i>K.</i> <i>trachuri</i> n. sp. and <i>K.</i> <i>thunni</i> n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida), from daily consumed marine fish in western Japan.	Parasitol Res	108	913-926	2011
Kawaia, T., Sekizuka, T., Yahatac, Y., Kuroda, M., Kumeda, Y., Iijima, Y., Kamata, Y., Sugita-Konishie, Y., Ohnishi, T	Identification of <i>Kudoa</i> <i>sep-tempunctata</i> as the causative agent of novel food poisoning outbreaks in Japan by consumption of <i>Paralichthys olivaceus</i> in raw.	Clinical Infectious Diseases	54	1046-105 2	2012
Harada, T., Kawai, T., Sato, H., Yokoyama, H., and Kumeda, Y	Development of a quantitative polymerase chain reaction assay for detection of <i>Kudoa</i> <i>septempunctata</i> in olive flounder ( <i>Paralichthys</i> <i>olivaceus</i> ).	Int. J. Food Microbiol. (in press) DOI information; 10.1016/j.ijfoodmicro. 2012.03.018			
Li Y-C, Sato H, Kamata Y, Ohnishi T, Sugita-Konishi, Y	Three novel myxobolid species of genera Henneguya and Myxobolus (Myxosporea: Bivalvulida) from marine fish in Japan	Parasitology Research (in press) DOI10.1007/s00436-0 12-2904-z			

佐藤 宏	食中毒の新たな寄生虫性病原体として注目される粘液胞子虫の生物学.	山口獣医誌	38	1-26	2011
大西貴弘	<i>Kudoa Septempunctata</i> を病因微生物とする食中毒	食品衛生研究	61	13-20	2011

