

表 1. *K. septempunctata* 種特異的リアルタイム PCR のプライマーおよびプローブ配列

	配列 (5'-3')	Tm (°C)	配列位置(GenBank accession No. AB553293)
F-プライマー	CGGTCATATCAGCCATGGATAAC	62.6	100-122
R-プライマー	CTATCGACAAATTAATGTTCGATATGC	61.2	232-258
プローブ	(6-FAM TM)-TCACCATGTAAATGGTGGGAGCATTT-(Iowa Black®FQ)	68.1	156-181

表 2. 2011 年 5 月～2012 年 7 月に発生した 28 件の *K. septempunctata* による
食中毒事例(疑い事例を含む)に由来する患者情報とリアルタイム PCR 法の結果

事例番号	患者性別・年齢	発症潜伏期間	患者症状	喫食から検体採取までの期間	結果(Ct値)
1	男性・61歳	14時間	むかつき・腹痛・下痢	6日	陰性
	女性・58歳	5.5時間	腹痛・下痢・嘔吐	6日	陰性
	男性・57歳	6時間	頭痛・嘔吐	6日	陰性
	女性・56歳	6時間	むかつき	6日	陰性
	男性・59歳	4.5時間	むかつき・腹痛・下痢・嘔吐	6日	陰性
2	男性・69歳	3時間	腹痛・下痢	1.5日	陽性(37.65)
3	不明	4時間	不明	2.5日	陽性(38.74)
4	男性・50歳	4時間	嘔吐・下痢	1日	陽性(34.16)
	女性・74歳	8.5時間	腹痛・下痢	2.5日	陽性(34.44)
5	不明	6時間	不明	2.5日	陰性
	男性・50歳	9時間	腹痛・下痢	3日	陰性
	男性・49歳	7時間	嘔吐・下痢	4日	陰性
	男性・53歳	4.5時間	嘔吐・下痢	1日	陽性(38.95)
6	女性・39歳	4時間	発熱・下痢・嘔吐	1日	陽性(33.99)
7	女性・68歳	5.5時間	嘔吐・下痢	2.5日	陽性(40.22)
8	女性・38歳	8時間	むかつき・発熱・下痢・嘔吐	2日	陰性
	男性・38歳	7時間	むかつき・発熱・下痢	2日	陽性(38.36)
9	男性・57歳	5.5時間	むかつき・下痢・嘔吐	2.5日	陽性(33.74)
	男性・82歳	不明	むかつき	2.5日	陽性(33.43)
	男性・60歳	3.5時間	むかつき・発熱・下痢・嘔吐	1.5日	陽性(36.84)
	男性・67歳	4時間	むかつき・頭痛・発熱・下痢・嘔吐	1.5日	陽性(32.13)
	女性・60歳	4時間	むかつき・頭痛・発熱・下痢・嘔吐	1.5日	陽性(35.18)
	男性・57歳	10時間	下痢	2日	陰性
	女性・53歳	4時間	むかつき・頭痛・発熱・下痢・嘔吐	2日	陽性(36.00)
	男性・57歳	10時間	嘔吐・下痢	2日	陰性
	女性・56歳	5時間	嘔吐・下痢	2日	陰性
	女性・73歳	3.5時間	腹痛・下痢・嘔吐	1.7日	陰性
10	女性・59歳	3.5時間	下痢	1.7日	陽性(36.92)
	女性・74歳	3.5時間	むかつき・腹痛・下痢	2.7日	陰性
	女性・68歳	3.5時間	嘔吐・下痢	3.7日	陽性(36.38)
	女性	12時間	嘔吐	2.5日	陰性
11	男性	12時間	倦怠感	2.5日	陽性(36.26)
	男性・68歳	6時間	発熱・下痢	2.5日	陰性
	男性・71歳	5時間	むかつき・発熱	2.5日	陰性
	男性・76歳	7時間	嘔吐	2.5日	陰性
	女性・64歳	4.5時間	下痢・発熱	2.5日	陽性(38.85)
	男性・73歳	7.5時間	むかつき・腹痛	3.5日	陽性(38.41)
	男性・72歳	6時間	下痢・発熱	3.5日	陽性(40.69)
	男性・58歳	20時間	頭痛・下痢	3.5日	陰性
	女性・64歳	7.5時間	むかつき	2.5日	陽性(35.60)
12	男性・68歳	6時間	嘔吐・下痢	2.5日	陰性
	女性・74歳	6時間	嘔吐・下痢	2.75日	陽性(39.06)
14	男性・35歳	5時間	嘔気・腹痛・下痢・嘔吐	1日	陰性
	男性・35歳	4時間	嘔気・嘔吐・発熱	<2日	陽性(33.62)

表 2. 続き

15	女性・49歳	12.5時間	嘔気・腹痛・下痢	4.5日	陰性
	女性・40歳	10.5時間	嘔気・嘔吐	4.5日	陰性
	女性・30歳	28.5時間	嘔気・発熱・下痢・嘔吐	4.5日	陰性
	男性・38歳	22.5時間	悪寒・発熱	4.5日	陰性
	女性・53歳	9.5時間	むかつき・腹痛・下痢	4日	陰性
	女性・49歳	7.5時間	腹痛・下痢	4.5日	陽性(37.07)
	女性・55歳	14時間	下痢	4.5日	陰性
	男性・25歳	8.5時間	頭痛・腹痛・下痢	5.5日	陰性
	男性・64歳	5時間	下痢	6.5日	陰性
	男性・62歳	5時間	腹痛・下痢・嘔吐	6.5日	陰性
16	男性・61歳	5時間	発熱・下痢・嘔吐	1日	陽性(40.58)
	女性・51歳	5時間	頭痛・腹痛・下痢・嘔吐	1日	陽性(32.36)
17	男性・58歳	4時間	むかつき・嘔吐・腹痛・下痢	1.5日	陽性(38.65)
	女性・56歳	4時間	むかつき・嘔吐	3.5日	陽性(38.06)
	女性・26歳	3.5時間	むかつき・嘔吐・下痢	3.5日	陰性
	女性・37歳	8時間	嘔気・むかつき	3.5日	陰性
18	女性・72歳	6時間	むかつき・下痢・嘔吐	2.5日	陽性(40.19)
	女性・66歳	6時間	むかつき・腹痛・下痢・嘔吐	2.5日	陽性(38.53)
19	女性・39歳	6時間	むかつき・腹痛・下痢・嘔吐	0.75日	陽性(39.07)
	女性・62歳	6時間	むかつき・腹痛・下痢・嘔吐	0.75日	陰性
	女性・59歳	3時間	むかつき・腹痛・下痢・嘔吐	0.75日	陽性(39.84)
	男性・39歳	12時間	下痢	1.5日	陽性(38.74)
	男性・63歳	4時間	むかつき・腹痛・下痢	1.5日	陰性
20	男性・65歳	4時間	下痢・嘔吐	2.5日	陽性(39.52)
	男性・35歳	9時間	下痢・発熱	2.5日	陰性
21	不明	不明	不明	不明	陽性(36.47)
	不明	不明	不明	不明	陽性(36.20)
	32歳	5.5時間	嘔吐・発熱	4日	陰性
	女性・22歳	5.5時間	むかつき・発熱・嘔吐	4日	陽性(37.92)
22	女性・46歳	3時間	嘔気・下痢・嘔吐	<2日	陰性
	女性・21歳	6時間	嘔気・頭痛・発熱	<2日	陽性(32.73)
	男性・78歳	4時間	嘔気・下痢・嘔吐	<2日	陽性(40.37)
	女性・69歳	3時間	嘔気・嘔吐	<2日	陰性
23	不明	3-13時間	下痢・嘔吐・発熱	<2日	陽性(36.34)
	不明	3-13時間	下痢・嘔吐・発熱	<2日	陽性(34.48)
	不明	3-13時間	下痢・嘔吐・発熱	<2日	陽性(38.46)
24	57歳	6時間	下痢	<3日	陽性(33.51)
	女性・53歳	6時間	下痢	<3日	陽性(39.30)
25	男性・36歳	4時間	むかつき・下痢・嘔吐	<1.5日	陽性(37.26)
	男性・36歳	3時間	むかつき・下痢・嘔吐	<1.5日	陽性(40.85)
26	女性・71歳	6時間	嘔気・下痢	6日	陽性(37.74)
27	男性・33歳	4時間	むかつき・下痢	1.5日	陽性(34.62)
	女性・62歳	5時間	むかつき・下痢・腹痛・嘔吐	1.5日	陽性(38.25)
	男性・38歳	3時間	むかつき・下痢・嘔吐	1日	陽性(40.85)
	女性・60歳	18時間	むかつき・腹痛	1日	陰性
28	男性・63歳	6時間	嘔吐・下痢	<1日	陰性
	男性・69歳	10.5時間	下痢・腹痛	2.5日	陽性(35.86)
	男性・63歳	7時間	嘔吐・下痢	2.5日	陽性(35.07)
	男性・69歳	5時間	嘔吐・下痢	<3日	陽性(34.10)

表 3. 孢子接種試験による糞便からの *K. septempunctata* DNA 抽出法の検討

	孢子接種量					
	低濃度 (1.6×10 ⁴ 個/g)			高濃度 (1.6×10 ⁶ 個/g)		
	QIA stool ^a	FastDNA ^b	Ultra Clean ^c	QIA stool	FastDNA	Ultra Clean
検体 1	37.65 (± 0.747) ^C	27.55 (± 0.286) ^A	35.54 (± 0.751) ^B	30.70 (± 0.125) ^C	24.25 (± 0.547) ^A	29.48 (± 0.596) ^B
検体 2	37.15 (± 0.435) ^C	29.40 (± 2.264) ^A	32.94 (± 0.330) ^B	31.83 (± 0.366) ^C	27.03 (± 0.323) ^B	25.31 (± 0.212) ^A
検体 3	36.96 (± 0.422) ^C	27.75 (± 0.108) ^A	32.85 (± 0.193) ^B	29.52 (± 0.166) ^C	20.64 (± 0.215) ^A	25.65 (± 0.853) ^B
有意差検定はTukey-Kramer testで行い、 <i>P</i> < 0.05の場合を統計学的有意とした。同一検体でのそれぞれの孢子接種量において、異なる大文字のアルファベットはその2群間の有意差を示す。						
^a QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN)						
^b FastDNA SPIN Kit for soil (MP-biomedicals)						
^c UltraClean Fecal DNA Kit (MO BIO)						

表 4. 孢子接種試験による検出下限値の検討

	孢子接種量 (孢子/g)				
	1.6×10^{-1}	1.6×10^0	1.6×10^1	1.6×10^2	1.6×10^3
検体 4	不検出	不検出	36.83 (± 0.36)	33.91 (± 0.64)	30.16 (± 0.35)
検体 5	不検出	不検出	39.75 (± 1.24)	36.61 (± 0.55)	32.19 (± 0.29)
各検体からのDNA抽出はFastDNA SPIN Kit for soil (MP-biomedicals)により行った。					

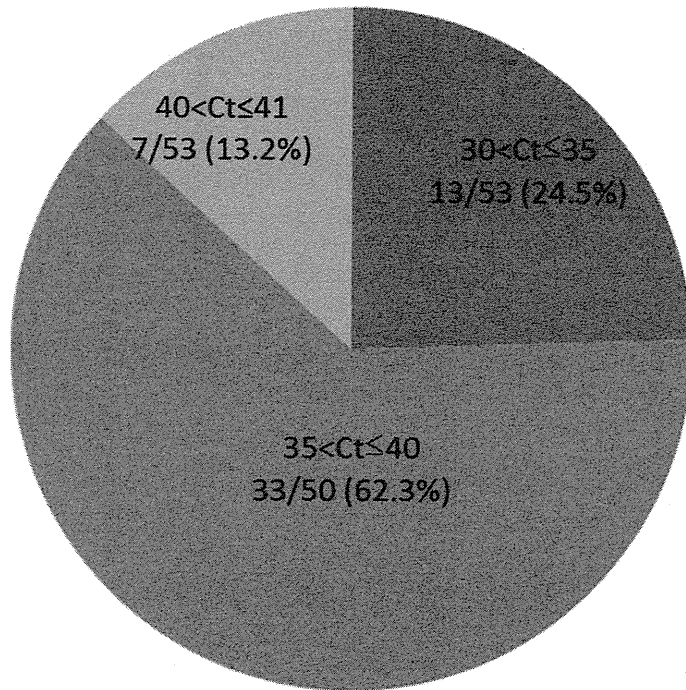


図 1. 陽性検体の Ct 値分布

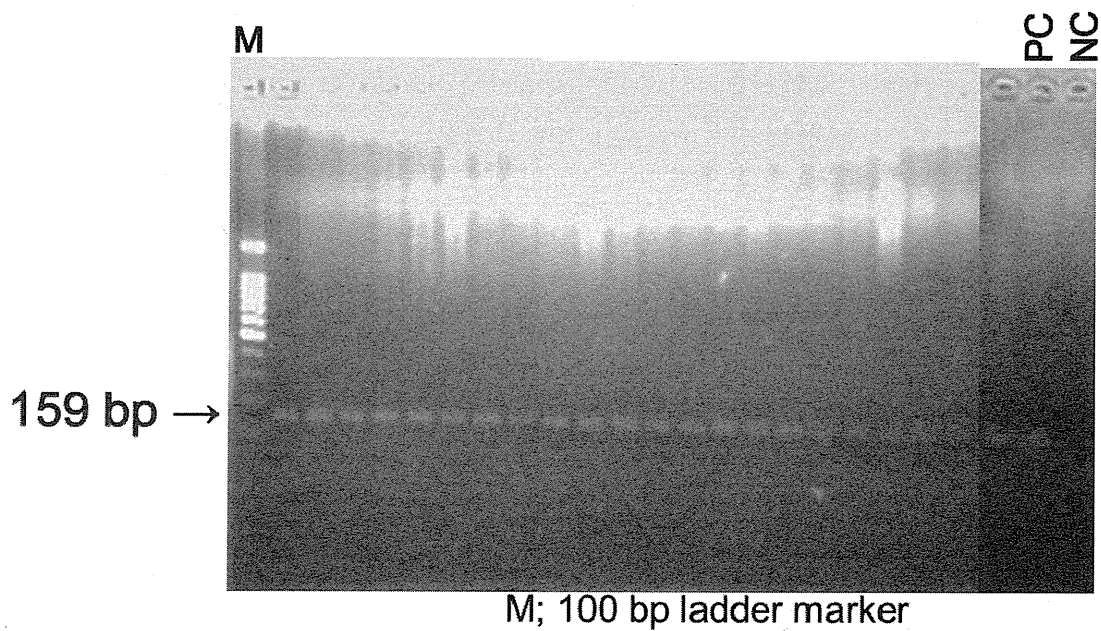


図 2. 陽性検体リアルタイム PCR 産物の電気泳動像 (23 検体分)

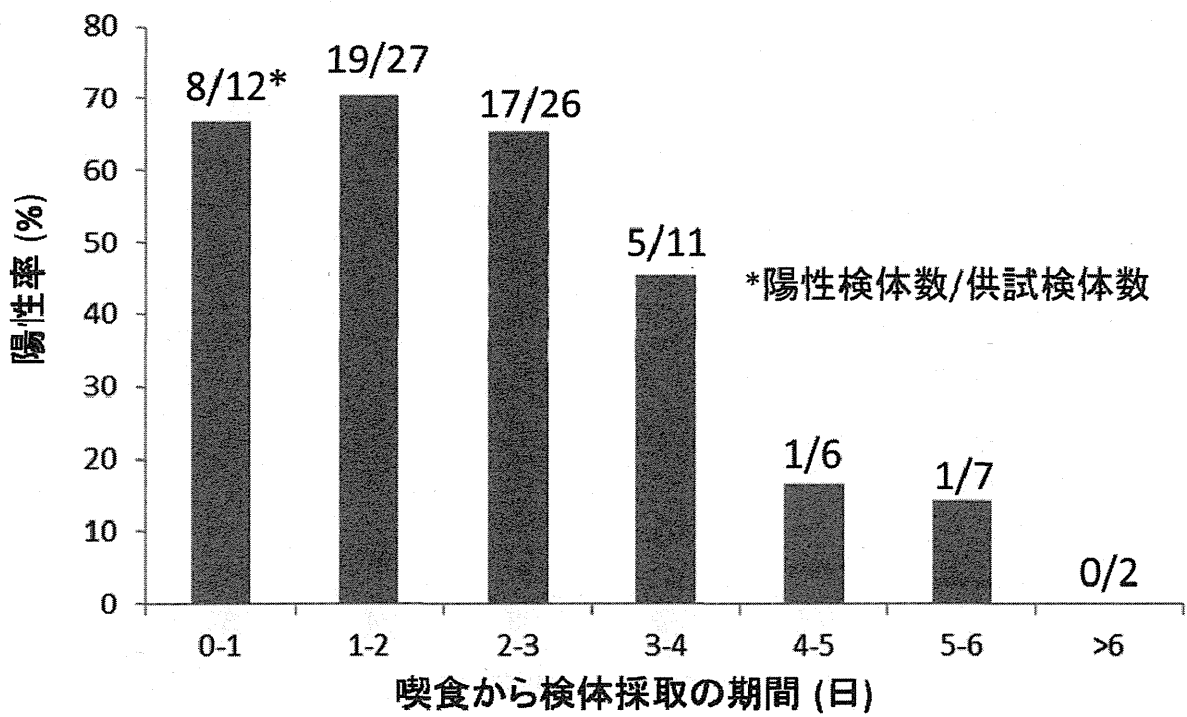


図 3. ヒラメ喫食から便検体採取までの期間と陽性率の関係

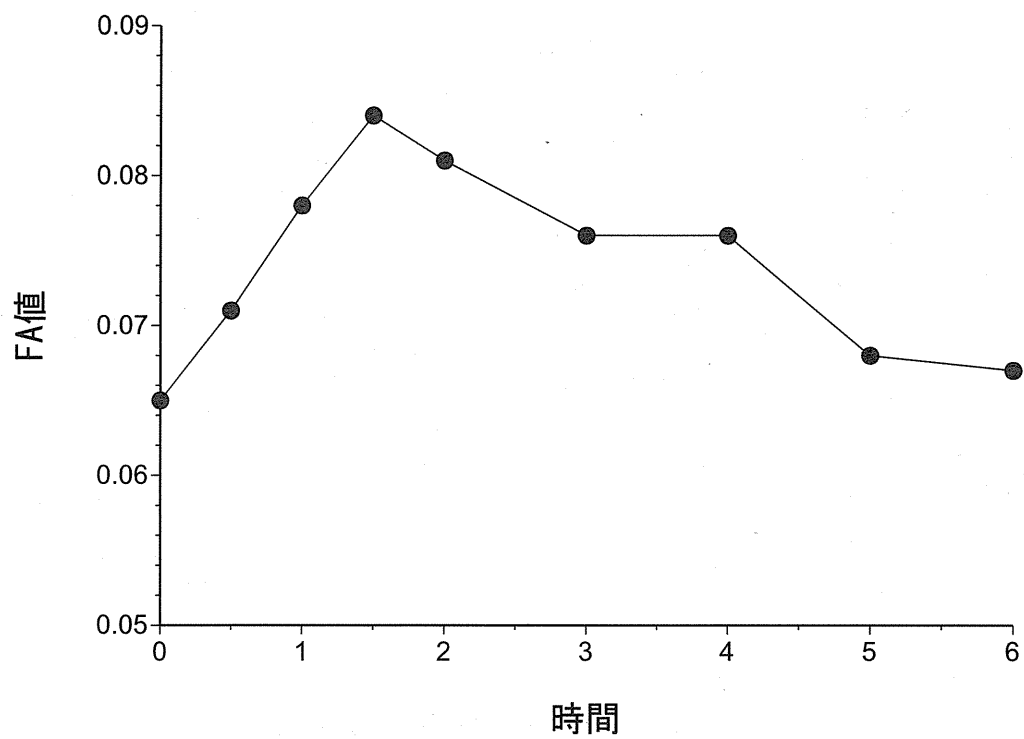


図4 *K. septempunctata* 孢子による FA 値の経時変化

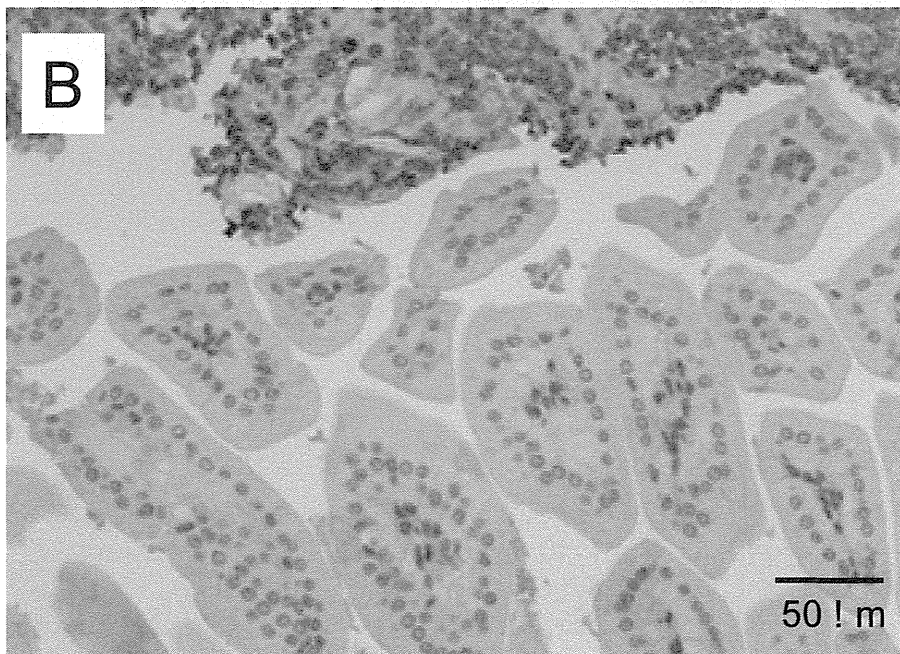
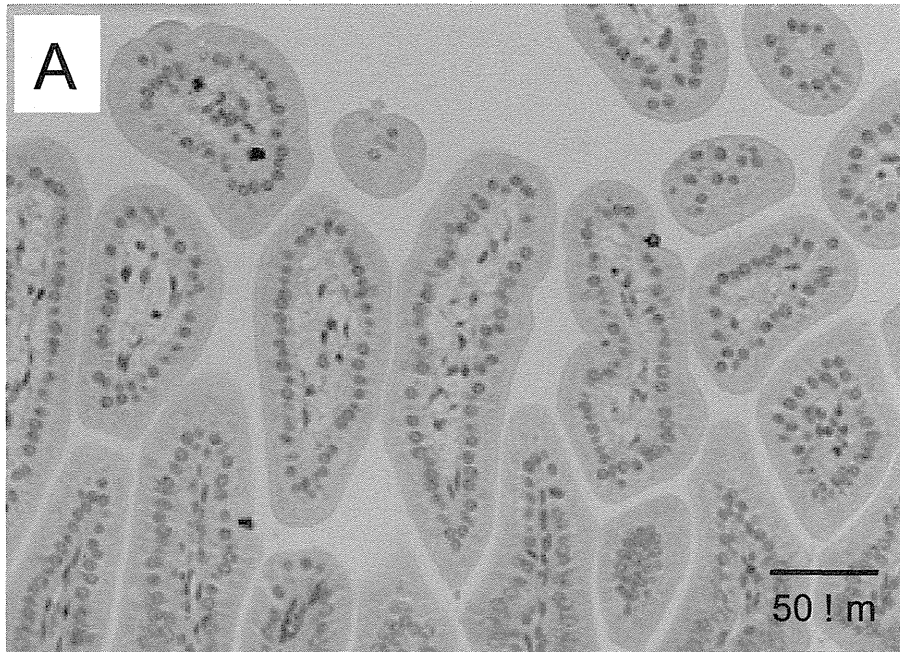


図5 *K. septempunctata* 孢子投与後 1.5 時間の腸管
 A, 無処置 *K. septempunctata* 孢子投与; B, 冷凍処置 *K. septempunctata* 孢子投与

分 担 研 究 報 告 書

生鮮食品中に含まれる *Kudoa* 属の遺伝学的解析

黒田 誠

平成 24 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

分担研究報告書

生鮮食品中に含まれる *Kudoa* 属の遺伝学的解析

研究分担者	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	竹内 史比古	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
研究協力者	小笠原由美子	国立感染症研究所	病原体ゲノム解析研究センター

ナナホシクドアが寄生するヒラメの生食により嘔吐・下痢が起こることは、疫学的に明らかであり、細胞や動物の実験からも裏付けられている。しかし、ナナホシクドアが消化器のどこでどのように作用して食中毒を引き起こすかについての細胞生物学的な機序は未解明である。解明の基盤を整えるために、本研究ではクドアのゲノム解析を行う。

今年度は、新たにナナホシクドア 2 検体と *Kudoa neothunni* 1 検体について、次世代 DNA シーケンサを用いて配列解読を行った。核ゲノムの配列解析は、まだ進行中である。ミトコンドリアゲノムについては解読を完了し、ナナホシクドアの種内では塩基配列の 98～99%が同一であることを明らかにした。一方で、クドアの種間では遺伝子領域のみが保存されていた。これらの違いを利用して産地の区別ができれば、疫学解析にも応用できる。

ナナホシクドアについては、ゲノム配列解読に加えて、光学マッピングにより全ゲノム制限酵素地図を作成した。その結果、ゲノムサイズが 83 Mb で 3 本の染色体からなることが分かった。

また、腸内でのナナホシクドアの振る舞いを解明するために、ヒト腸管培養細胞との接触により、ナナホシクドアの遺伝子発現がどう変化するかも解析した。17 の遺伝子グループで発現変動が観察され、heat shock protein などが経時的に増加していた。

A. 研究目的

ナナホシクドアの寄生するヒラメの生食により嘔吐・下痢が起こることは、疫学的に明らかであり、細胞や動物の実験からも裏付けられている。しかし、ナナホシクドアが消化器のどこでどのように作用して食中毒を引き起こすかについての細胞生物学的な機序は未解明である。解明の基盤を整えるために、本研究ではクドアのゲノム解析を行う。ゲノム解読により全遺伝子の一覧が作れば、ナナホシクドアの表面タンパク質や分泌タンパク質の解析を効率的に行うことができる。また、遺伝子配列を用

いた疫学調査や検出系開発のための基盤情報を提供できる。

ナナホシクドアのゲノム配列解読に加えて、光学マッピングにより全ゲノム制限酵素地図を作成した。これにより、染色体構造やゲノムサイズを明らかにし、ゲノム配列決定の道標となる情報が得られた。

また、腸内でのナナホシクドアの振る舞いを解明するために、ヒト腸管培養細胞との接触により、ナナホシクドアの遺伝子発現がどう変化するかも解析した。具体的には、ヒト腸管培養細胞と未接触・接触後 1 時間・接触後 3 時間のナナホシクドアのサンプルを調製し、mRNA の配列を次世代シー

ケンサにより解読し、発現量が変化している遺伝子を探索した。

クドアのゲノム解析の進捗状況を表 1 に示す。

B. 研究方法

1. クドアのゲノム配列の解読

食中毒残品のヒラメ刺身片、又は養殖ヒラメからクドアを抽出し、DNA を精製し、ライブラリを作成した。次世代シーケンサ GAIIx 及び MiSeq (Illumina) を用いて、DNA を配列解読した。ABYSS プログラムを用いて、核およびミトコンドリアゲノムの配列をアセンブルした。

2. 全ゲノム制限酵素地図の作成

1) ナナホシクドアの染色体 DNA 調製

養殖ヒラメからパーコール遠心によりナナホシクドアを抽出したもの（ロット 2012.04）を大西先生より頂いた。等量の低融点アガロースと混合し、ナナホシクドア 5×10^5 胞子を含む 0.5% アガロースの $100 \mu\text{l}$ プラグを作成した。1% N-lauroylsarcosine in EDTA (0.5M, pH8.0) 5ml に、プロテアーゼ K 10mg、TrypLE Express (Life Technologies) 1ml を添加したものにプラグを浸け、 37°C で 2 日間処理した。プラグを TE で 3 回洗浄した後に、Argus システム (OpGen) のプロトコルに従って DNA を調製した。

2) DNA 分子の制限酵素処理と光学的スキャン

Argus システムを用いて、DNA 分子を伸ばしてスライドガラスに接着した後に、制限酵素 *NcoI* で切断し、蛍光染色して断片をスキャンした。このようにして、各分子について、制限酵素断片の順番を保ったままで断片長を測定することができる。Low-density MapCard 7 枚、High-density MapCard 8 枚を用いてスキャンした。DNA の品質の悪いレーンは目視で除外し、合計 762,752 分子を取得した。

3) 制限酵素地図のアセンブル

制限酵素地図のアセンブルは、OpGen 社のサーバ、および国立感染症研究所の Argus システムを用いて行った。前者は $\text{quality} \geq 0.2$ の 608,753 分子を用い、後者は $\text{quality} \geq 0.4$ かつ断片数 ≥ 12 かつ分子長 350~1400kb の 83,025 分子を用いた。アセンブルにより断片長のパターンが共通する分子はまとめられて contig となる。contig 中の特定の断片にマップされている分子の数(深さ)は 100 前後であった。深さが < 30 、あるいは他の箇所比べて $< 50\%$ の断片については、アセンブルの間違いが無いが精査した。ただし、contig の端の断片、あるいは特に長い断片についてはこの限りではない。問題箇所の再アセンブルを行った結果、後述する変異箇所を除けば、深さが小さくなっている断片は無くなった。

contig の端がテロメアに対応している場合は、分子の端が揃うことから判別できた。また、contig の端がセントロメアに対応している場合は、端から長く不揃いな断片がはみ出していることから分かった。contig の両端が各々テロメアとセントロメアになっている場合には、この contig は染色体腕全体に対応している。

3. ヒト腸管培養細胞との接触によるナナホシクドアの遺伝子発現変化

1) ナナホシクドアと Caco-2 細胞の調製 (大西先生)

養殖ヒラメからパーコール遠心によりナナホシクドアを抽出した（ロット 2012.04）。ナナホシクドア単体、および Caco-2 細胞（ヒト結腸癌由来の培養細胞）に掛けて 1 時間ないしは 3 時間放置したものの三種類のサンプルを調製した。以下では、Kudoa-0h, Kudoa-1h, Kudoa-3h とする。

2) RNA からのライブラリ作成と次世代シーケンサによる配列解読

FastTrack™ MAG Micro mRNA Isolation Kit (Invitrogen) にて mRNA を精製した。ScriptSeq™ mRNA-Seq Library Preparation

Kit ver2 (Epicentre) にてライブラリを作製した。次世代シーケンサ GAIIX (Illumina) にて 81 塩基の paired-end を解読した。解読配列数は、Kudoa-0h, 1h, 3h の各々について 16, 273, 130 対, 15, 679, 530 対, 15, 804, 159 対であった。

3) 解読配列の品質管理とヒト由来配列の除外

アダプター配列は SeqPrep プログラムにより除去し、また解読した 81 塩基の最初と最後の 1 塩基ずつを除去した。次に、PoPoolation パッケージにより信頼度の低い塩基を除去した。ヒトの参照ゲノム配列 (GRCh37. p2) に相同性のある配列を除外するために、BWA プログラムと MEGABLAST プログラム ($E\text{-value} \leq 1e-8$) を用いた。残った配列対の割合は、Kudoa-0h, 1h, 3h の各々について 58%, 2.1%, 1.8% であった。これらの配列中には、ナナホシクダアの配列以外に、ヒラメの配列及び除去し切れなかったヒト配列が少しずつ含まれている。

4) 解読配列のアセンブルと検証

ヒト由来配列除去後の三つのライブラリの配列をまとめ、Trinity プログラム (r2013-02-25) によりアセンブルした。このプログラムの長所は、参照となるゲノム配列がなくても、RNA の解読データのみから転写物をアセンブルできることである。アセンブルの結果、18, 524 個の遺伝子について 38, 353 個の転写物が得られた。

アセンブル結果を検証するために、ナナホシクダアのドラフトゲノム (別途解析中) との相同性を MEGABLAST で調べた。ドラフトゲノムは、ナナホシクダアを冗長度 >100 で解読しており、ナナホシクダアのゲノムをほぼ網羅している。ドラフトゲノムには、ナナホシクダアに加えてヒラメの配列も混入しているが、ヒトの配列は含まれていない。38, 353 個の転写物のうち、ドラフトゲノムに相同性が無いもの ($E\text{-value} > 1e-20$) は 173 個 (0.5%) のみであり、残存しているヒト由来配列の割合は小さいことが確認できた。

さらに、ヒラメ由来配列の割合を推定するために、既知配列データベースに対して相同性検索を行った。各転写物について、核酸配列データベース nt (2012 年 10 月 26 日版) に対して BLAST 検索し、相同なデータベース配列に基づいて MEGAN (ver. 4.62.3) を用いて由来する種を推定した ($\text{match score} \geq 70$, $\text{top match } 10\%$, $\text{taxon support} \geq 1$)。真正後生動物に割り当てられた 816 の転写物配列のうち、真骨魚類 (Teleostei) は 122 配列、霊長目 (Primates) は 110 配列、前口動物が 191 配列、刺胞動物が 153 配列だった。従って、ヒラメ由来配列の割合も小さいと推測された。

同様の検索をタンパク質配列のデータベース nr (2012 年 10 月 26 日版) に対しても行った。全転写物について、正のストランド上で ≥ 50 アミノ酸からなる配列を抽出することにより便宜的に翻訳して 79, 535 個のタンパク質配列を得た。BLAST 検索し、MEGAN を用いて由来する種を推定したところ ($\text{match score} \geq 50$, $\text{top match } 10\%$, $\text{taxon support} \geq 1$)、真正後生動物に割り当てられた 7133 配列のうち、真骨魚類は 247 配列、霊長目は 21 配列、前口動物が 1056 配列、刺胞動物が 559 配列だった。核酸配列による検索と同様に、ヒラメ由来配列の割合は小さいと推測された。

後の解析で遺伝子発現量が変化した遺伝子を抽出するためには、発現量が変化していない大多数の転写物を基準にして正規化する必要がある。基準とする転写物の中に、ナナホシクダア以外の生物由来のものが多いと問題になる。上記の解析から、ヒト及びヒラメ由来の転写物が少しは混じっているものの、割合が小さいことが分かったので、発現量の正規化を行うに当たっては問題にならない。しかし、後に抽出する発現変動した転写物の一覧からは、ヒト及びヒラメ由来のものを個別に確認して除外する必要がある。

5) 遺伝子発現量の推定

Kudoa-0h, 1h, 3h での各遺伝子の発現量

は、RSEM プログラムを用いて解析した。前節でアセンブルした転写物の参照配列に対して、Kudoa-0h, 1h, 3h のライブラリの各々についてマッピングを行った。マップされた配列対の総数 (RSEM プログラムの expected_count の和) は、各ライブラリで 7 154 666, 230 022, 200 928 だった。

最も転写量の多かった遺伝子はナナホシクダアの核 rRNA であり、各ライブラリにおいて、18S は 60 884, 118 482, 96 212 FPKM, 28S が 31 534, 111 382, 106 876 FPKM であった。FPKM は Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped (paired) reads という単位であり、これらのサンプルにおいては fragments per transcript per million mapped (paired) reads と値はほぼ同じであった。従って、18S (或いは 28S) rRNA がライブラリに占める割合は、Kudoa-0h では 5%程度、1h と 3h では 10%程度であった。

6) 発現変動遺伝子の抽出と機能推定

Kudoa-0h, 1h, 3h で発現量が変化している遺伝子は、Bioconductor プログラムの edgeR パッケージを用いて抽出した。各ライブラリの大きさ (総リード数) については、trimmed mean of M-values を用いて補正し、極端に発現量の大きい遺伝子に影響されないようにした。いずれかの 2 サンプルの比較で、統計的に有意 ($FDR < 0.001$) に発現量が変化 (>4 倍あるいは <0.25 倍) している遺伝子を抽出したところ、33 個が該当した。

上述したように、発現量が変化した遺伝子のリストから、ヒト及びヒラメ由来のものを除外する必要がある。これは、ナナホシクダアゲノムのドラフト配列との照合、及び既知配列データベース (核酸については nt、タンパク質については nr) との相同性検索により行った。ナナホシクダアのゲノムドラフト配列については、ヒラメ由来の配列が混じっているが、ヒトの配列は含まれていない。33 遺伝子のうちの 5 つは、ナナホシクダアのゲノムドラフト配列に相

同性が無く、既知配列データベース中の霊長目の配列と相同だったので、ヒト由来のものと判定された。また、1 遺伝子については、既知配列データベース中の魚類の配列と相同性を示したので、ヒラメ由来のものと判定された。

残る 27 遺伝子がナナホシクダアで発現変動を示した遺伝子である。これらについて、機能を推定するために、既知配列データベース (核酸については nt、タンパク質については nr) との相同性検索を行った。

C. 研究結果

1. クダアのゲノム配列の解読

今年度はナナホシクダアのロット 2 (2012.04)、ロット 3 (2012.11) と *K. neothunni* を配列解読した。核ゲノムについては、挿入長の短いライブラリしか解読していないため、コンティグの配列が長くなっていない (表 1)。

ミトコンドリアゲノムについては、全配列を決定できた。ナナホシクダア種内の比較については、ロット 1 とロット 2 は塩基配列の 98~99% が一致していることが分かった。ロット 2 とロット 3 は数塩基しか違わなかった。ナナホシクダアと *K. neothunni* の種間比較では、遺伝子の領域 (細胞呼吸に関する *COX1*, *COX2*, *CYTB*, *ND1*, *ND5*、及びリボソーム RNA の大小サブユニット) のみが保存されていることが分かった (図 1)。

2. 全ゲノム制限酵素地図の作成

図 2 に *NcoI* によるナナホシクダアの制限酵素地図を示す。左端のテロメアから右端のセントロメアに至る染色体腕 6 本がアセンブルされた。3 本の染色体が存在すると推測されるが、セントロメア部分での染色体腕の対応はまだ分かっていない。合計した 83mb がゲノムサイズである。図には示していないが、m1, m2, m3, m4 については、部分的に異なる contig もアセンブルされ

ていて、数カ所で 100kb 程度の挿入・欠失が起きていた。変異箇所では、contig にマップされた分子の深さが約半分になっていた。従って、83mb の二倍体であることが推測される。m1, m2, m3, m4 については相同染色体に部分的な変異があり、m5, m7 については相同染色体の当該腕同士が同一と思われる。

3. ヒト腸管培養細胞との接触によるナナホシクダの遺伝子発現変化

表 2 の 27 遺伝子が、腸管細胞との接触によりナナホシクダで発現変動を示した。いずれも接触前の 0h に比べ、1h ないし 3h で発現が増加している。発現が減少したものが見つからなかった理由は 1h と 3h の配列解読量が少なかったという方法論的なものであり、生物学的な理由ではない。

27 遺伝子は、配列相同性から 17 の遺伝子グループにまとめられる。最も顕著に発現増加していたのは heat shock protein, Hsp-16 であった（遺伝子グループ comp17071, comp18162, comp19207）。1h と 3h で同程度に発現が高くなっていたものに reverse transcriptase family protein があつた（遺伝子グループ comp21007）。既知配列と弱いながらも相同なものに、delta-1 and delta-2 crystallin genes（遺伝子グループ comp12448, $E=2e-5$ ）と hypothetical protein と（遺伝子グループ comp16083, $E=0.005$ ）がある。残りの 11 遺伝子グループについては、既知配列データベースには相同なものが無く（ $E>0.01$ ）、機能は推定できていない。

D. 考察

1. クダのゲノム配列の解読

核ゲノムについては、短い挿入長のライブラリ解読は完了した。来年度は、中程度の挿入長のライブラリ解読を行う。DNA の量が限られているため、どのような方法が良いかは検討が必要である。

ミトコンドリアゲノムについては、配列解読を完了し、ナナホシクダの種内およびクダの種間の比較を行った。ナナホシクダの種内でも配列に多様性があるために、検出系を作るときには注意が必要である。例えば、PCR 判定については、塩基配列が保存されている領域にプライマを作る必要がある。一方で、種内の違いを利用して産地の区別ができれば、疫学解析にも応用できる。

2. 全ゲノム制限酵素地図の作成

光学マッピングを用いてナナホシクダの制限酵素地図を決定した結果、ゲノムサイズ 83mb で 3 本の染色体からなることが分かった。次世代シーケンサ解読によるゲノムのドラフト配列は、重複配列を除けば合計 83mb であり、ゲノムサイズについては同じ結果になっている。今年度決定した制限酵素地図は一倍体としてのものであるが、正確には相同染色体同士が部分的に異なる二倍体であることが推測されるため、二倍体としてのアセンブルを来年度初めに行う。ナナホシクダと同様にミクソゾアに属する *Zschokkella nova* については、3 対で合計 6 本の染色体があることが報告されており [Tyutyaev (2008) Tsitologiya 50:907; ロシア語]、染色体の数としては本研究と合致している。来年度は、制限酵素地図を利用して、ナナホシクダのゲノム配列を決定する予定である。

3. ヒト腸管培養細胞との接触によるナナホシクダの遺伝子発現変化

ヒト腸管培養細胞と接触したナナホシクダの遺伝子発現解析を行ったところ、17 の遺伝子グループで発現変動が観察できた。heat shock protein が経時的に増加しており、外部からの刺激に対するナナホシクダの防御と解釈できる。一方で、他の遺伝子グループについては、配列からは機能が明確には推定できなかった。また、タンパク分解酵素は見当たらなかった。

発現変動を示した遺伝子の殆どが機能未知であった。クドアは培養さえもできない生物であるため、遺伝子の機能解析は難しい。しかし、食中毒の原因を探るという目的であれば、見つかった候補遺伝子について、タンパク質産生を質量分析などで確認し、さらに組換えタンパク質を作成してCaco-2あるいはマウスに対する病原性を検討することも可能である。

一方で、遺伝子発現の検討は、食中毒機序の解明には見当違いであることも考えられる。例えば、粘液胞子の表面に既にあるタンパク質が食中毒を起こしているとする、その遺伝子は腸管細胞との接触により発現増強されるものではないからである。喫食後の発症時間の中央値は5時間であり、ナナホシクドアが腸管に到達してから転写と翻訳を行うには時間が足りないとも考えられる。

本実験は、ナナホシクドアの生活環の解明にも示唆を与え得る。ナナホシクドアを含むミクソゾアは、魚と環形動物の二つのホストに相互に寄生していると考えられている。ヒラメ肉中のナナホシクドアの粘液胞子が、ヒトに食べられたときに、環形動物の腸内に入ったものと勘違いして、原形質を放出して（環形動物の代わりに）ヒトの腸管に侵入しようとしているとも考えら

れる。即ち、本実験の遺伝子発現変動は、ナナホシクドアが環形動物に侵入するステージを捉えているのかもしれない。本解析の感度と特異度を上げるためには、以下の追加実験が考えられる。本解析では1h, 3hの配列解読量が限定的だったため、これを増やすことにより感度を上げられる。また、食中毒実験系として用いられている乳飲みマウスについても、腸管内から回収したナナホシクドアに対して同様の実験ができる。Caco-2との接触及びマウス腸管内の双方の条件で発現量が上がる遺伝子を絞り込むことにより、食中毒発生要因の探索という意味での特異度を上げることができよう。

E. 研究発表

・学会発表

1. 竹内史比古、関塚剛史、野崎智義、大西真、小西良子、大西貴弘、黒田誠(2012)。「ナナホシクドアの退化したミトコンドリアゲノムが明らかにする、ミクソゾアの左右相称動物起源」日本進化学会第14回東京大会、東京(2012.8)

表1 クドアゲノム解析の進捗状況

サンプル	ナナホシクドア			<i>K. neothunni</i>
	ロット1(0904)	ロット2(201204)	ロット3(201211)	
由来	食中毒残品	パーコール精製	パーコール精製	パーコール精製
クドアDNAの割合(推定)	60%	60%		90%
核ゲノム				
イルミナ(短い挿入長)		ライブラリ解読完了		ライブラリ解読完了
挿入長 [bp]	200, 750	1000, 1500		1350
解読量	x85	x270	少し	x75
contig N50 [kb]	短い	9		27
scaffold N50 [kb]		42		68
中程度の挿入長		少量DNAでできる 方法を検討中		
制限酵素地図		完了(一倍体ゲノム)		
ミトコンドリアゲノム				
配列決定	全配列決定済み	全配列決定済み		全配列決定済み
ミトコンドリアであることの確認(Southern)		実験中		
トランスクリプトーム				
解読	済み	済み(Caco-2 0h, 1h, 3h)		
解析	解析中	済み		

表2 ヒト腸管培養細胞との接触による発現変動したナナホシクドア遺伝子

Gene group, gene ID	FPKM			Function
	0h	1h	3h	
comp12448_c0	0	0	236	delta-1 and delta-2 crystallin genes (E=2e-5)
comp14810_c0	0	17	158	unknown
comp16083_c1	0	6	489	unknown
comp16083_c3	0	8	238	hypothetical protein (E=0.005)
comp16083_c4	0	41	339	unknown
comp16083_c5	0	0	221	unknown
comp16531_c0	0	0	200	unknown
comp16531_c1	0	8	136	unknown
comp17071_c0	123	2350	2907	heat shock protein, Hsp-16
comp17558_c1	0	27	316	unknown
comp17755_c0	2	0	285	unknown
comp18002_c0	3	9	311	unknown
comp18002_c3	2	16	348	unknown
comp18162_c0	14	441	543	heat shock protein, Hsp-16
comp18401_c0	0	23	360	unknown
comp18817_c0	0	0	294	unknown
comp18817_c2	0	0	204	unknown
comp18817_c5	0	6	654	unknown
comp19207_c0	0	148	203	unknown
comp19207_c1	39	7948	11291	heat shock protein, Hsp-16
comp19927_c0	4	15	165	unknown
comp19927_c4	7	18	471	unknown
comp20271_c0	8	100	732	unknown
comp21007_c0	11	314	304	reverse transcriptase family protein
comp21007_c1	13	251	173	unknown
comp43275_c0	5	54	115	unknown
comp101440_c0	0	117	163	unknown

図1 ナナホシクドアと*K. neothunni*のミトコンドリアゲノム比較

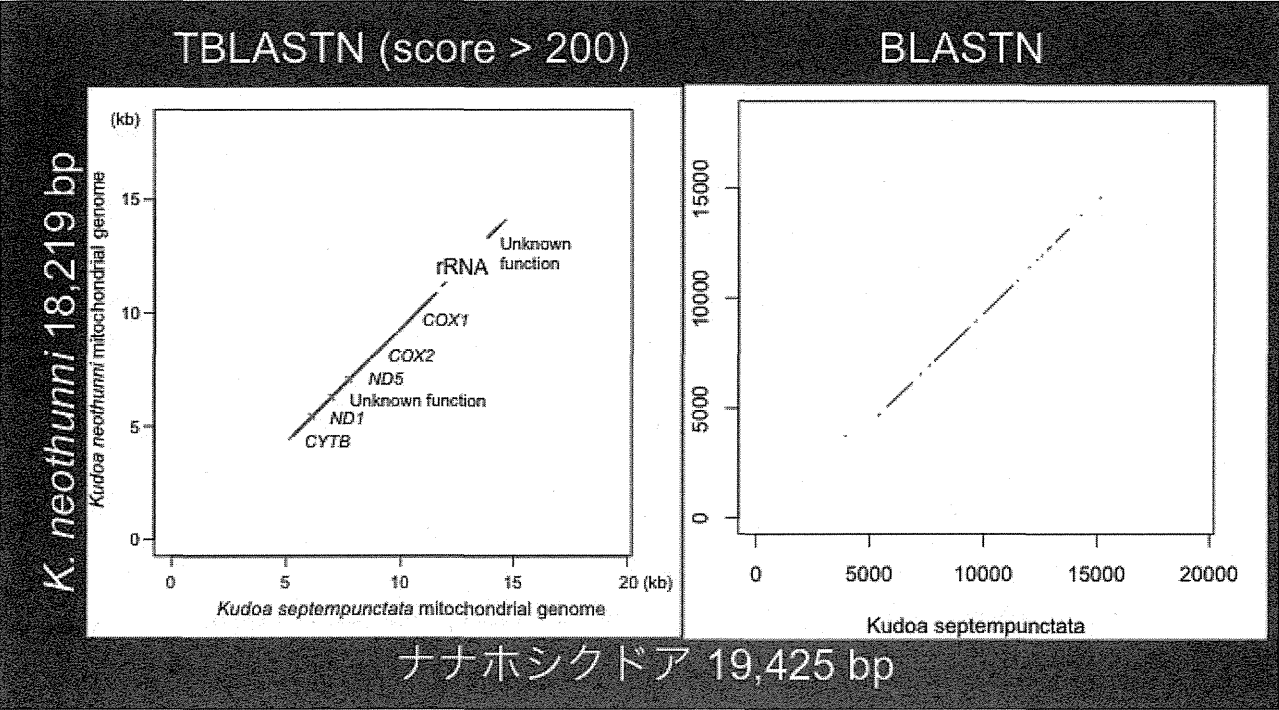


図2 ナナホシクドアの*Nco*Iについての制限酵素地図



分 担 研 究 報 告 書

ヒラメの喫食に関連した原因不明食中毒の疫学的検討

八幡 裕一郎