



図 8 腸上皮に陥入した *K. septempunctata* 孢子 (投与後 3 時間)

1 : *K. septempunctata* 孢子 2 : 変性した微絨毛

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 25 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

#### 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。

今年度は、ミトコンドリア遺伝子の多型により、ナナホシクドアが ST1 と ST2 の二つの系統に分類できることを明らかにした。韓国産成魚の殆どが ST1 であった。二系統の間で、食中毒病原性の違いは検出されなかった。

また、ナナホシクドア 2 検体と *Kudoa neothunni*, *Kudoa iwatai* について、次世代 DNA シーケンサを用いてミトコンドリアゲノムと核ゲノムの配列解読を行った。ミトコンドリアゲノムについては、ナナホシクドアの種内では塩基配列の 96~99% が同一であることを明らかにした。一方、クドアの種間では遺伝子領域のみが保存されていた。これらの遺伝子配列の違いは、検出系開発や疫学解析に応用できる。

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 83mb で 3 本の染色体からなることが分かり、また二倍体であることが示唆された。

#### 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。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も提供する。

ナナホシクドアという種にどのような系統があるか、系統が地域ごとに異なるか、また系統ごとに食中毒性が異なるかを解明するために、これまでに解読したミトコンドリアゲノム配列を活用し、ミトコンドリア遺伝子の多型に基づく系統解析を行った。

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。

## 研究方法

### 1. ミトコンドリア遺伝子多型を用いたナナホシクドアの系統分類

ミトコンドリアの *cox1* 遺伝子内のプライマ (mtDNA\_cox1-F, mtDNA\_cox1-R) および *1-rRNA* 遺伝子内のプライマ (mtDNA\_1-rRNA-F, mtDNA\_1-rRNA-R) を設計し、PCR を行い、サンガー法で核酸配列を解読した。上記で解読ができなかった検体については、さらに外側に設計したプライマ (*cox1* については mtDNA\_cox1-F2, mtDNA\_cox1-R2、*1-rRNA* については mtDNA\_1-rRNA-F2, mtDNA\_1-rRNA-R2) で事前に PCR しておいてから、上記の PCR を行った。プライマの配列を表 1 に示す。

3730x1 キャピラリー型シーケンサ (Life Technologies) で核酸配列を解読した。両向きから解読したリードのベースコールとアセンブルには、Phred, Phrap, Consed を用いた。MAFFT を用いて複数検体

の配列をアライメントした後に、MEGA5 で多型を確認した。

検体は、食中毒検体、韓国産、養殖場由来のナナホシクドア DNA を大西貴弘先生 (国立医薬品食品衛生研究所) にご提供頂いた。

### 2. 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ナナホシクドア (*Kudoa septempunctata*) と *Kudoa neothunni* を抽出した。*Kudoa iwatai* については、キチヌのシスト由来の検体 KI-001 を横山博先生 (東京大学) にご提供頂いた。検体から DNA を精製し、ペアエンドとメイトペアの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 および Platanus 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。

系統解析は、MAFFT プログラムによりアミノ酸配列をアライメントした後に、>90% の配列で欠失しているサイトを除外した。系統推定は、RAxML プログラムにより最尤推定で行った。

### 3. 全ゲノム制限酵素地図の作成

ナナホシクドア (検体 201204・国内養殖場由来) の染色体 DNA 調製、および DNA 分子の制限酵素処理と光学的スキャンについては、昨年度報告書に記載した。昨年度に

行った制限酵素地図のアセンブルにおいて、ヘテロな染色体領域が見つかり、二倍体であることが推測されたため、本年度は二倍体としてアセンブルし直した。

制限酵素地図のアセンブルは、Argus システムを用いて行った。quality $\geq$ 0.4 かつ断片数 $\geq$ 12 かつ分子長 350~1400kb の 82,025 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か精査した。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。

変異箇所は、二倍体の相同染色体間で異なる領域と推測された。そこで、各染色体ごと（父方、母方の各々）についてアセンブルをし直した。具体的には、変異箇所において、着目している染色体とは異なるタイプの分子を除外してから、アセンブルを行った。

最後に、制限酵素地図の精度をさらに上げるために、分子をマッピングして再アセンブルした。Argus システムの処理能力が限られているため、三回に分け、1) quality $\geq$ 0.4 かつ断片数 $\geq$ 12 かつ分子長 350~1400kb の 82,025 分子、2) quality $\geq$ 0.2

かつ断片数 $\geq$ 12 かつ分子長 370~1400kb の 85,318 分子、3) quality $\geq$ 0.6 かつ断片数 $\geq$ 12 かつ分子長 240~1400kb の 81,864 分子、について行った。

## 研究結果

### 1. ミトコンドリア遺伝子多型を用いたナナホシクダの系統分類

*cox1* の核酸配列については、二種類しか存在せず (*cox1-1*, *cox1-2* と名付けた)、それらは 5 箇所の一塩基多型で異なっていた。*1-rRNA* の配列についても、二種類しか存在せず (*1-rRNA -1*, *1-rRNA -2* と名付けた)、それらは 2 箇所の一塩基多型で異なっていた (図 1)。

食中毒事例、韓国産、養殖場由来の合計 117 検体（少数の重複あり）を調べた結果を表 2~5 に示す。*cox1-1* かつ *1-rRNA -1* が 66 検体、*cox1-2* かつ *1-rRNA -2* が 49 検体あった。*cox1-1* かつ *1-rRNA -2*、あるいは *cox1-2* かつ *1-rRNA -1* の組み合わせについては、1 検体ずつしか検出されず、コンタミネーションなどの実験的な問題によるものと考えられる。従って、以降では *cox1-1* かつ *1-rRNA -1* のものを「ST1」、*cox1-2* かつ *1-rRNA -2* のものを「ST2」とよぶことにする (ST は sequence type の略)。

韓国産成魚は全て ST1 であった (表 2, 4)。また、食中毒事例の韓国産成魚は、一例 (表 2 の検体 12) を除いて全て ST1 であった。従って、韓国産成魚のナナホシクダの殆どは ST1 であることが推測された。

国内養殖所由来の検体は、ST1, ST2 の両型が入り交じっていた (表 2, 3)。

食中毒事例については、ST1 が多い傾向はあったが、両型が観察された (表 2)。

愛媛の大規模食中毒事例 (表 5) では、ST1, ST2 の両型が検出された。遺伝子型と食中毒症状 (有症か無症か) には有意な関連がなかった (Fisher 正確検定  $P=1$ )。また、遺伝子型とクドア量にも有意な関連はなかった ( $\log$ クドア量の  $t$  検定  $P=0.95$ )。

## 2. クドアのゲノム配列の解読

ミトコンドリアゲノムについては、昨年度までのナナホシクドアの検体 0904 (食中毒事例、韓国産成魚) と *K. neothunni* に加えて、今年度はナナホシクドアの検体 201204 (国内養殖場由来) と *K. iwatai* を配列解読した。

ナナホシクドアの検体 201204 については全配列 19,350bp を決定できた。ナナホシクドア検体 0904 と比較すると、塩基配列の 96~99% が一致していることが分かった (図 2)。

*K. iwatai* については、まだ複数のコンティグに分かれたドラフト配列であるが、細胞呼吸に関する *COX1*, *COX2*, *CYTB*, *ND1*, *ND5*, 及びリボソーム RNA の大サブユニットは全て存在していた。5 つの遺伝子のアミノ酸配列を用いて系統解析を行ったところ、*K. iwatai* に比べると *K. septempunctata* と *K. neothunni* が近縁になっており、これは核の rDNA に基づく既知の系統関係と合致

している (図 3)。

核ゲノム配列については、ナナホシクドア (検体 201204) についてメイトペアライブラリを追加した結果、scaffold N50=71kb とアセンブルが進展したが、まだ完成には至っていない。

## 3. 全ゲノム制限酵素地図の作成

図 4 に *NcoI* によるナナホシクド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。染色体腕 A~D については、相同染色体の数カ所で 100kb 程度の挿入・欠失が起きていた (ピンクの斜め線で繋がれている箇所)。変異箇所では、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。染色体腕の E, F については相同染色体の当該腕同士が同一と思われる。

## 考察

### 1. ミトコンドリア遺伝子多型を用いたナナホシクドアの系統分類

ミトコンドリア遺伝子多型により、ナナホシクドアを ST1, ST2 の二つの系統に分類できることが分かった。国内養殖場からは ST1, ST2 両型が検出されたが、韓国産成魚

の殆どはST1であった。従って、ミトコンドリア遺伝子多型はヒラメに寄生するナナホクドアの由来の追跡(トレーサビリティ)に応用できる。

ミトコンドリア遺伝子多型により区別されたナナホクドアの二系統については、食中毒性の違いは検出されなかった。

## 2. クドアのゲノム配列の解読

ミトコンドリアゲノムについては、ナナホクドア2種、*Kudoa neothunni*、*Kudoa iwatai*の配列を解読した。ナナホクドア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。この多様性を活かして、上記の系統解析が行えた。異なる種のクドアのゲノム配列が得られたので、今後の疫学解析のリソースとして利用できる。

核ゲノムについては、短い挿入長のライブラリに加えて中程度の挿入長のメイトペアライブラリを解読した。アセンブルは改

善したが、まだ完成には至っていない。

## 3. 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クドア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。アセンブルの結果、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た。

研究発表

無し。

表 1. ミトコンドリア遺伝子多型を用いたナナホシクダの系統分類のためのプライマ

Primer name	DNA sequence
mtDNA_cox1-F	tatggcaaagaaggtctgat
mtDNA_cox1-R	tctagggattccacaaagac
mtDNA_cox1-F2	ttygatccytcwggaggagg
mtDNA_cox1-R2	ggwayycktctwggkrttcc
mtDNA_l-rRNA-F	gttccaacaagtccatgaaa
mtDNA_l-rRNA-R	gactttatggacaactcagc
mtDNA_l-rRNA-F2	aagtcgaaacacggtaggag
mtDNA_l-rRNA-R2	cagtcaagatactgctgcca



表2. ナナホシクドアの系統分類 (2013年3月18日受領検体)

ID	cox1遺伝子型	t-rRNA遺伝子型	由来	サンプル名	クドア(1g当り)	PCR(コピー数)	備考
1	1	1	韓国産	Y-10	$4.2 \times 10^5$	$3.96 \times 10^7$	韓国産・成魚
2	1	1	韓国産	Y-15	$1.3 \times 10^5$	$1.1 \times 10^5$	韓国産・成魚
3	1	1	韓国産	YC-17	$1.0 \times 10^5$	$1.8 \times 10^7$	韓国産・成魚
4	1	1	韓国産	66168525①	$1.0 \times 10^4$	$2.3 \times 10^7$	韓国産・成魚
5	1	1	韓国産	66167159①	$4.8 \times 10^3$	$5.3 \times 10^7$	韓国産・成魚
6	1	1	韓国産	66162909①	$1.7 \times 10^5$	$2.1 \times 10^8$	韓国産・成魚
7	1	1	韓国産	66162909②	$2.35 \times 10^6$	$1.99 \times 10^9$	韓国産・成魚
8	1	1	食中毒事例	09-04(K)	$8.05 \times 10^5$		東京事例(韓国産・成魚)
9	1	1	食中毒事例	09-17-08(K)	$3.5 \times 10^6$		福井事例(韓国産・成魚)
10	1	1	食中毒事例	2012.3.2(K)	$1.60 \times 10^5$		千葉事例(韓国産・成魚)
11	1	1	食中毒事例	2011.12.22北九州	$1.40 \times 10^7$		
12	2	2	食中毒事例	2011.10.14広島	$1.0 \times 10^7$		韓国産・成魚
13	1	1	食中毒事例	10-08	$7.66 \times 10^3$		広島事例(韓国産・成魚)
14	1	1	食中毒事例	09-17-05	$4.35 \times 10^6$		福井事例(おそらく韓国産・成魚)
15	1	1	食中毒事例	倉敷①	$2.2 \times 10^6$		
16	2	2	食中毒事例	高松①			香川県事例 天然
17	1	1	食中毒事例	2013.2.22天然ヒラメ(大分市)1	$6.6 \times 10^6$		
18	1	1	食中毒事例	2013.2.22天然ヒラメ(大分市)2	$6.6 \times 10^6$		
0904	1	1	食中毒事例	0904 (全ゲノム解読中)			韓国産・成魚
19	1	1	養殖所	えひめ3-5	$9.63 \times 10^5$		えひめ養殖所A
20	1	1	養殖所	えひめ6	$3.78 \times 10^5$		えひめ養殖所A
21	1	1	養殖所	えひめ27-1	$5.13 \times 10^6$		えひめ養殖所A
22	2	2	養殖所	11.3.2-2	$1.60 \times 10^7$		大分県養殖所A
23	1	1	養殖所	2011.4.26-6	$7.79 \times 10^5$		大分県養殖所A
24	2	2	養殖所	2011.3.8-7	$1.04 \times 10^7$		大分県養殖所A
25	1	1	養殖所	2013.1.30大分ヒラメ9	$1.0 \times 10^7$		大分県養殖所B
26	2	2	養殖所	2013.1.30大分ヒラメ13	$1.0 \times 10^7$		大分県養殖所B
27	1	1	養殖所	2011.12.13 No2	$3.0 \times 10^6$		えひめ養殖所B
201204	2	2	養殖所	201204 (全ゲノム解読中)			

表3. 大分養殖場のナナホシクドアの系統分類 (2013年7月5日受領検体)

ID	cox1遺伝子型	1-rRNA遺伝子型	Y	M	D	lot
1	1	1	2011	01	18	3
2	1	1	2011	02	16	4
3	2	2	2011	03	02	2
4	1	1	2011	03	02	8
5	1	1	2011	03	02	10
6	2	2	2011	03	08	7
7	2	2	2011	04	05	3
8	2	2	2011	04	06	6
9	2	2	2011	04	12	2
10	2	2	2011	04	12	8
11	1	1	2011	04	12	12
12	1	1	2011	04	12	15
13	2	2	2011	04	12	21
14	2	2	2011	04	12	27
15	2	2	2011	04	18	1
16	2	2	2011	04	18	10
17	1	1	2011	04	26	8
18	1	1	2011	04	26	16
19	2	2	2011	05	17	1
20	2	2	2011	05	27	5
21	2	2	2011	05	27	8
22	2	2	2011	05	27	10
23	2	2	2011	06	06	3
24	2	2	2011	06	08	2
25	2	2	2011	06	08	4
26	1	1	2011	06	15	15
27	1	1	2011	06	22	8
28	2	2	2011	06	28	5
29	1	1	2011	06	29	4
30	2	2	2011	07	05	10
31	2	2	2011	07	12	2
32	1	1	2011	07	12	9
33	1	1	2011	08	01	2
34	2	2	2011	08	09	4
35	1	1	2011	08	24	4
36	2	2	2011	08	30	2
43	1	1	2011	10	12	
38	2	2	2011	11	02	4
39	1	1	2011	11	16	2
40	2	2	2012	03	28	5
41	1	1	2012	07	26	
42	2	2	2012	09	26	
37	1	1	2012	10	12	
44	1	1	2012	10	31	1
45	2	2	2012	11	28	1
46	2	2	2013	02	06	3

赤字はtubeの表記優先(送付書類とは異なる)