

フェイヤー住肉胞子虫が持つ毒性タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列はすでに明らかになっている⁴⁾。開始コドンを含む20 merをフォワードプライマーおよび、終止コドンを含む20 merをリバースプライマーとし、馬肉より抽出したDNAをテンプレートに、PCRを行った。

3. 住肉胞子虫毒性タンパク質遺伝子の検出法開発

本研究事業において、*S. fayeri* のゲノム解析が進んでいる。毒性タンパク質遺伝子は、ゲノム中では2つのエクソンから構成されていることが明らかになっている(泉山博士、私信)。5'側をエクソン-1、3'側をエクソン-2とし、エクソン-1の3'端20 merの双方配列をリバースプライマーとして、また、エクソン-2の5'端の配列20merをフォワードプライマーとして、エクソン-1およびエクソン-2を増幅するPCR条件を検討した。具体的には、94℃の変性15分の後、94℃変性60秒、58から69℃まで、勾配を付けたアニーリング温度(以下グラディエントアニーリング温度)60秒、72℃伸長60秒、50サイクル、72℃5分伸長の条件内で、標的遺伝子断片の増幅条件を探索した。テンプレートには、B-1.で調製した、馬肉より抽出したDNAを用いた。

4. 18S rRNA 遺伝子および毒性タンパク質エクソン-1あるいはエクソン-2の同時

検出

B-2. の検討の結果から得られた条件で、18S rRNA 遺伝子 1,100 bp と毒性タンパク質エクソン-1、あるいは18S rRNA 遺伝子と毒性タンパク質エクソン-2を同時に検出することが可能か検証した。テンプレートには上述の馬肉より抽出したDNAを用いた。

5. シカ肉を対象とした住肉胞子虫遺伝子検査法

研究室で保存中のシカ肉を用いた。同シカ肉は、2012年に発生した、住肉胞子虫が原因の有症苦情事例³⁾で、患者が喫食したことが明らかになっている肉片で、馬肉と同様の方法で、肉片よりDNAを抽出した。

18S rRNA 遺伝子を標的としたPCRを行った。厚生労働省が通知した条件²⁾を用いてPCRを行った。

C. 研究結果

1. 馬肉から抽出したDNAをテンプレートとした、住肉胞子虫毒性タンパク質遺伝子の検出

住肉胞子虫の18S rRNA 遺伝子が増幅されることがわかっている、馬肉から抽出したDNAを用いて、毒性タンパク質遺伝子を増幅するPCRを行ったところ、本来350 bp前後のDNAバンドが形成されるはずが、約4,000 bpのバンドが検出された(結果は示していない)。PCR反応には、毒性遺伝子のタンパク質翻訳部分であるところの、開始

コドンから終止コドン部分 350 bp を増幅させるプライマーを含ませている。4,000 bp のバンドが出現する原因に、毒性タンパク質遺伝子は、ゲノム中にあるときは 2 つ以上に分断されている、すなわち、1 個以上のイントロン（タンパク質非翻訳部分）を含んでいることが考えられる。この結果は、*S. fayeri* のゲノム解析の結果と一致する。

2. 住肉胞子虫毒性タンパク質遺伝子エクソン-1 の増幅条件

アニーリング温度を 58°C から 69°C まで、1°C のピッチでグラディエントを設定し、PCR を行った。その結果を図 1 に示す。エクソン-1 の断片の大きさは約 200 bp になるが、泳動図で、約 200 bp のバンドが明瞭で、かつ、副反応バンドがみられない条件を検討した。図 1 に示した結果から、66°C のアニーリング温度が適していると判断した。

3. 住肉胞子虫毒性タンパク質遺伝子エクソン-1 の増幅条件

アニーリング温度を 53°C から 60°C まで、1°C のピッチでグラディエントを設定し、PCR を行った。その結果を図 1 に示す。エクソン-1 の断片の大きさは約 150 bp になるが、泳動図で、約 150 bp のバンドが明瞭で、かつ、副反応バンドがみられない条件を検討した。図 1 に示した結果から、66°C のアニーリング温度が適していると判断した。

4. 住肉胞子虫の 18S rRNA 遺伝子および毒性タンパク質遺伝子の同時検出法の検討

厚生労働省が通知した、サルコシステイス遺伝子検査法では、その 18S rRNA 遺伝子が標的になっている。感染（寄生）体のもつ共通の配列より、病的症状を誘発する物質をコードする遺伝子を標的とするほうが、病因検出の意義は大きい。住肉胞子虫が保有する毒性タンパク質は 2 個のエクソンから構成されている。そこで、病因論的な意義に加え、科学行政的な意義も勘案し、18R rRNA 遺伝子と、毒性タンパク質遺伝子エクソン-1 あるいはエクソン-2 の同時検出 PCR 法の検討を行った。

18S rRNA 遺伝子検出用プライマーを共存させ、エクソン-1 を増幅する条件を用いて、PCR を行った結果を図 3 に、エクソン-2 を増幅する条件を用いて PCR を行った結果を図 4 に示した。

エクソン-1 と 18S rRNA 遺伝子の同時検出を試みたが、エクソン-1 のバンドのみが検出された。エクソン-2 についての同時検出では、18S rRNA のサイズである 1,100 bp 付近と、エクソン-2 のサイズとなる 150 bp 付近にバンドが認められた。しかしながら、1,100 bp 付近のバンドの強度は弱く、複数のバンドが検出されていて、最適な PCR 反応を示していなかった。

5. シカ肉由来 DNA からの住肉胞子虫 18S rRNA 遺伝子検出

シカ肉から DNA を抽出し、サルコシステ

イス遺伝子検査法を実施した。DNA の抽出は、馬肉より抽出する方法と同じ手法を用いた。また、18S rRNA 遺伝子を検出する PCR 法も、厚生労働省が通知した方法を用いて実施した。その結果、馬肉と同様に、1,100 bp の位置に、明瞭 DNA の増幅バンドが検出された (図 5)。

D. 考察

1. 住肉胞子虫の遺伝子検査法改良

馬肉食中毒におけるサルコシスティス検査法を厚生労働省は通知した²⁾。顕微鏡検査に加え、遺伝子検査法が周知されている。その遺伝子検査法には、住肉胞子虫の 18S rRNA 遺伝子を標的として、定性 PCR 法が記載されている。標的塩基配列は、多数ある住肉胞子虫の種の、共通な部分を指定している。この方法は、単に住肉胞子虫を検出するという考え方からは妥当なものである。また、行政機関からの通知によるため、通知の方法で住肉胞子虫を検出したということの科学行政的な意義は高い。一方、病原微生物、感染性微生物を検出するために、遺伝子検査法を開発する場合、直接の病原因子の遺伝子を標的とするのが通常である。たとえば、腸管出血性大腸菌であれば志賀毒素 (ベロ毒素) を、腸炎ビブリオであれば耐熱性溶血毒 (Thermodirect hemolysin : TDH) を、黄色ブドウ球菌であればエンテロトキシンを標的として、遺伝子検査法を開発している。馬肉食中毒の原因究明と、その発生機構の解析から、サルコシスティス

には、下痢誘発活性をもった毒性タンパク質の存在が明らかになっている⁴⁾。本研究事業において、同毒性タンパク質の遺伝子が明らかとなり、その配列も取得された。同時に、住肉胞子虫 *S. fayeri* のゲノム解析研究も展開されている。本研究では、科学行政的な意義と、病因論からの妥当性の両方を満足させるため、住肉胞子虫の 18S rRNA 遺伝子と、毒性タンパク質遺伝子の双方を同時に検出する方法の開発を試みた。また、ウマに寄生する以外の種の住肉胞子虫が、シカに寄生し、シカ肉を喫食しての有症苦情事例が発生していることから、シカ肉を対象とした、住肉胞子虫の遺伝子検査法を検証した。

S. fayeri の毒性タンパク質遺伝子を増幅させる PCR を、馬肉より抽出した DNA をテンプレートにして実施したところ、約 4,000bp のフラグメントが増幅されてきた。毒性タンパク質は 354bp で構成されていることから、ゲノム中では、同毒性タンパク質遺伝子は 2 個以上のエクソンから構成されていることが示された。この結果はゲノム解析の結果と一致した。研究班の泉山博士より、ゲノム中の塩基配列を解析した情報を入手し、2 つのエクソンの存在を確認できた。5'端に位置するエクソン-1 は 250 bp、3'端に位置するエクソン-2 は 154 bp で、エクソン-1 の 3'端、エクソン-2 の 5'端を相補するオリゴプライマーを用いて、エクソン-1 および-2 を検出する PCR 条件を検討した。アニーリング温度に勾配

を持たせて解析したところ、エクソン-1は66°C、エクソン-2は60°Cでの、効率のよい増幅が観察され、この条件で、18S rRNAと各エクソンの同時検出を試みたところ、エクソン-2と18S rRNA遺伝子断片の増幅が確認された。アガロース電気泳動像で見る限り、18S rRNA遺伝子の増幅が最適でなく、今後、アニーリング温度以外の要因についても検討が必要であるが、同時検出法を確立できる可能性は十分に確認される。

シカに寄生する住肉胞子虫には、*S. hominis* や *S. suis*⁵⁾、*S. wapiti*、*S. sybillencis*⁶⁾ が報告されているが、シカニクからの住肉胞子虫遺伝子検査法は確立されていない。試みに、馬肉からの検査法を応用したところ、定性PCR法として、応用可能なことが示された。シカ肉は、馬刺しと同様に、「鹿馬し」として生で喫食される食文化がある。ホンドシカおよびエゾシカにおいても、それらの駆除と同時に、ジビエ料理としての有効利用がすでに進んでいる。住肉胞子虫が野生動物の喫食部位である筋肉組織に寄生することから、ゲームミートとしての野生動物肉の安全性確保の観点で、住肉胞子虫の検査法や危害性の評価、調理法を含めた制御法を勘案する必要がある。

E. 参考文献

1. 厚生労働省医薬食品局食品安全部長：生食用生鮮食品による病因物質不明有症事例への対応について。平成23年6月

17日、食安発0617第3号、2011

2. 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長：生食用馬肉中の *Sarcocystis fayeri* 検査法（暫定法）、平成23年8月23日、食安監発0823第1号、2012
3. 青木佳代、石川和彦、林 賢一、新井陽子、斉藤守弘、鎌田洋一、小西良子：シカ肉の *Sarcosystis* が原因として疑われた有症苦情の事例について、日本食品微生物学雑誌、30、28-32、2013
4. 鎌田洋一、渡辺麻衣子、入倉大祐、斉藤守弘、田中成幸、原田誠也、古川真斗：生鮮獣肉中の危険因子の制御に関する研究。厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）生鮮食品を共通食とする原因不明食中毒に対する食品衛生上の予防対策 平成22年度 総括・分担研究報告書、79-95、2011
5. 成澤昭徳、横井 智、河合和枝、作井睦子、菅原憲治：野生エゾシカにみられた *Sarcosystis*。日獣会誌、61、321-323(2008)
6. 斉藤守弘、柴田 穰、久保政則、板垣 博：野生ホンジョウシカおよびエゾシカにみられた住肉胞子虫。日獣会誌、51、683-686(1998)

F. 研究発表

論文・総説発表

1. 原田誠也、古川真斗、徳岡秀亮、松本一俊、八尋俊輔、宮坂次郎、斉藤守弘、鎌田洋一、渡辺麻衣子、入倉大祐、松本 博、小西良子：馬肉中に含まれる住肉胞子虫

の危害性消失条件の検討による生食用馬肉を共通食とする食中毒事例の発生防止対策に関する研究、食衛誌 54, 198-203、2013

2. Kamata, Y., Saito, M., Irikura, D., Yahata, Y., Ohnishi, T., BEsso, T., Inui, T., Watanabe, M., Sugita-Konishi, Y. A toxin isolated from *Sarcocystis feyeri* in raw horsemeat may be responsible for food poisoning. J. Food Prot. in press, 2014

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案取得

なし。

3. その他

なし。

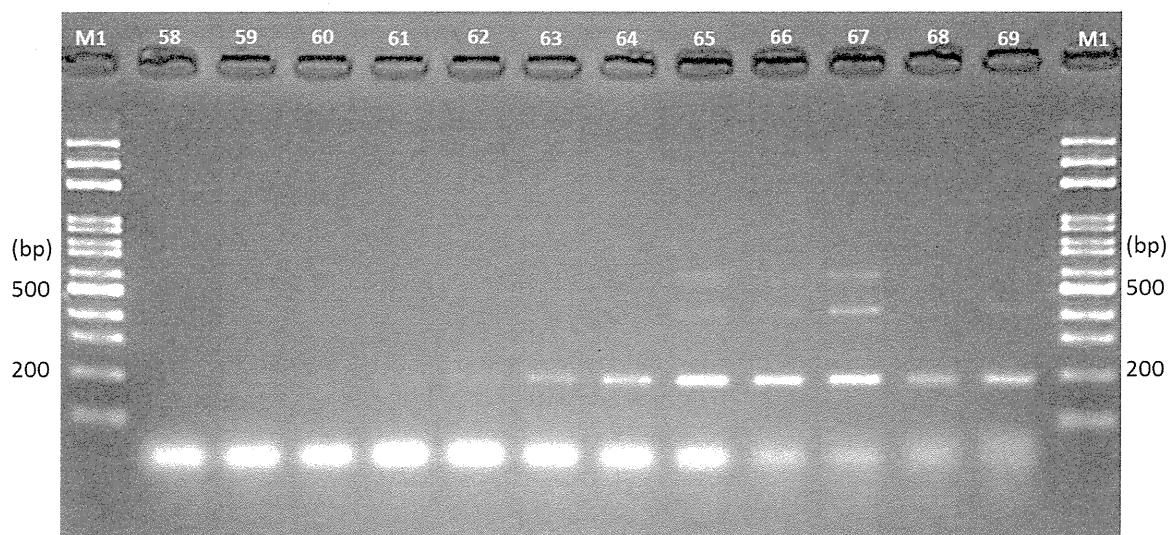


図1 住肉胞子虫毒性タンパク質遺伝子エクソン-1部分を増幅するためのアニーリング温度の検討

エクソン-1 に対応する遺伝子断片を増幅するためのアニーリング温度を検討した。アガロースゲル電気泳動のレーン上部に記載している数字は、アニーリング温度を示す。

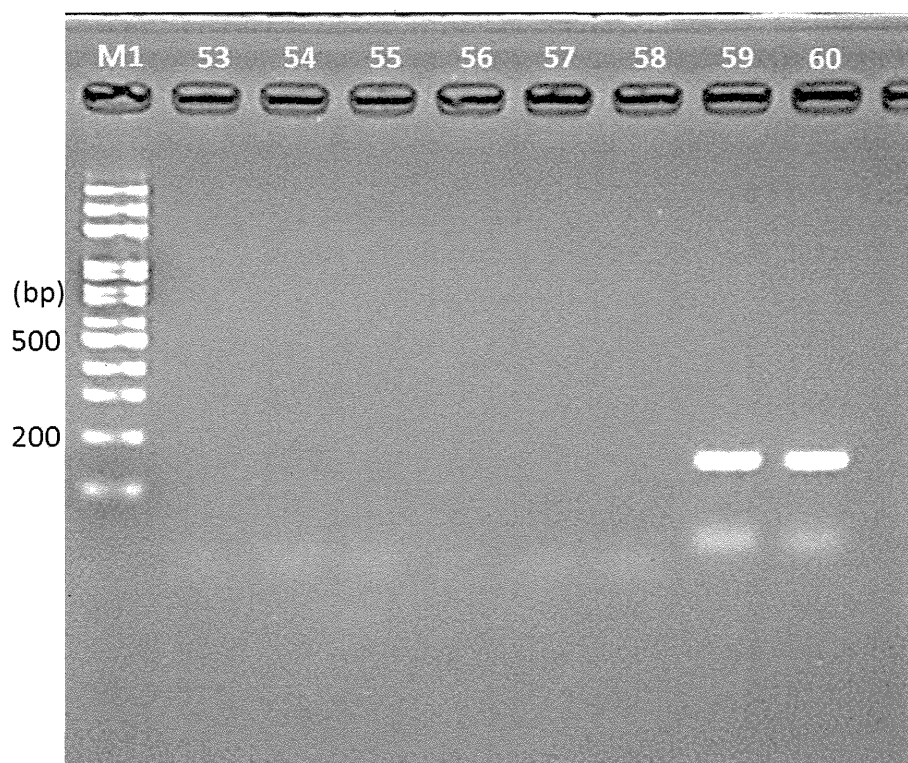


図2 住肉胞子虫毒性タンパク質遺伝子エクソン-2部分を増幅するためのアニーリング温度の検討

エクソン-2に対応する遺伝子断片を増幅するためのアニーリング温度を検討した。アガロースゲル電気泳動のレーン上部に記載している数字は、アニーリング温度を示す。

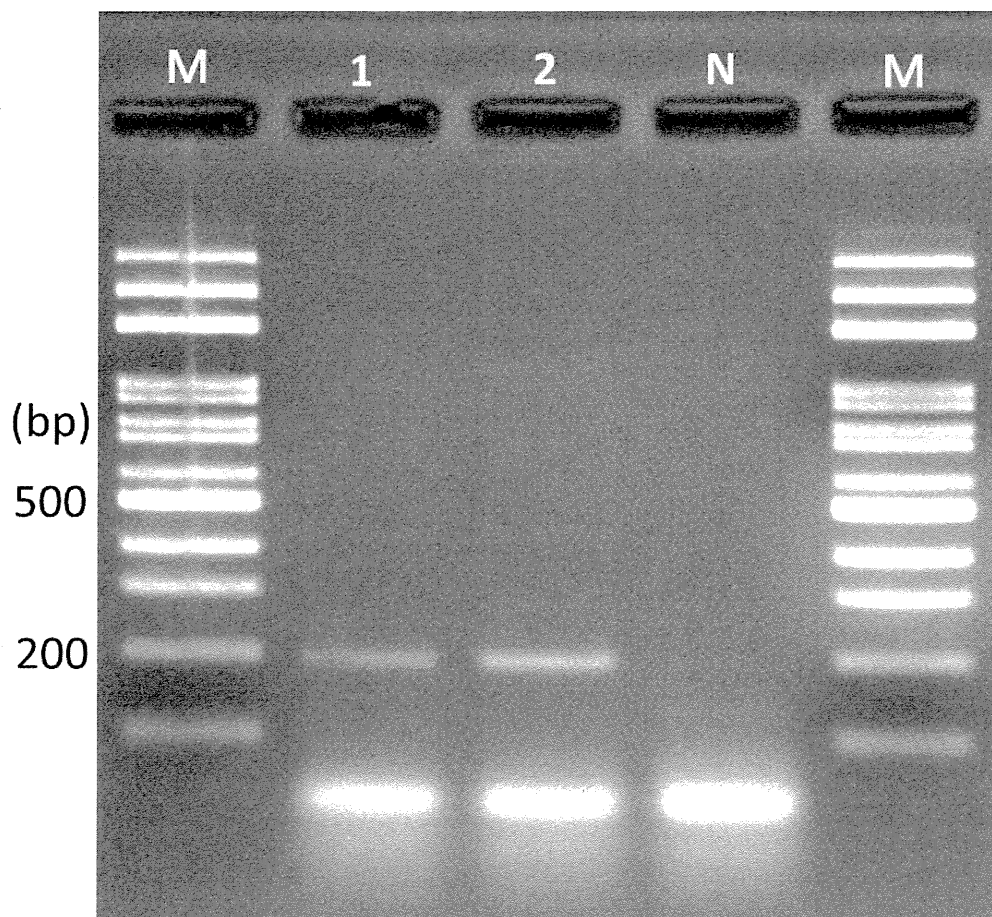


図3 住肉胞子虫 18S rRNA 遺伝子と、同胞子虫毒性タンパク質遺伝子エクソン-1の同時検出のための PCR 反応

M : DNA サイズマーカー、1 : 馬肉より抽出した DNA を用いての PCR 反応、2 : 別ロットの馬肉より抽出した DNA を用いての PCR 反応、N: Negative Control として、Mili-Q 水を用いた。

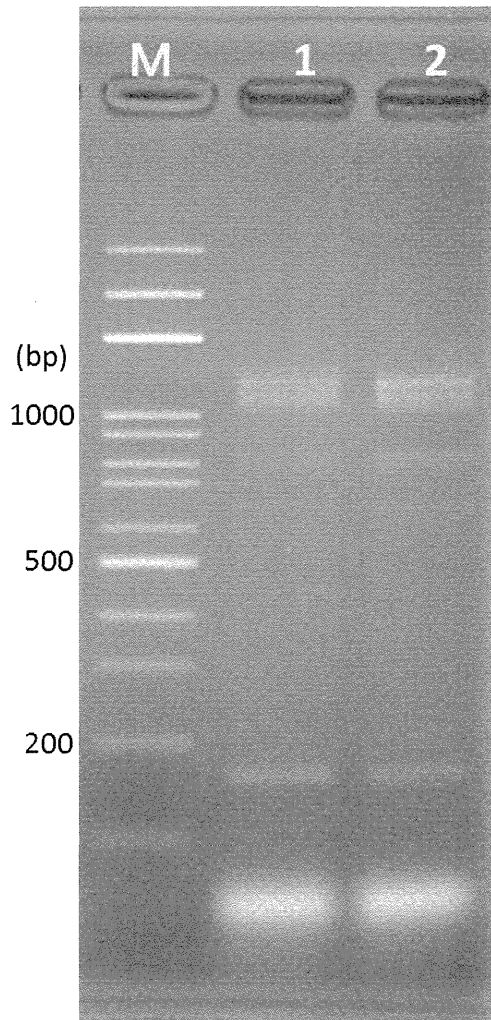


図4 住肉胞子虫 18S rRNA 遺伝子と、同胞子虫毒性タンパク質遺伝子エクソン-2 の同時検出のための PCR 反応

M : DNA サイズマーカー、1 : 馬肉より抽出した DNA を用いての PCR 反応、2 : 別ロットの馬肉より抽出した DNA を用いての PCR 反応

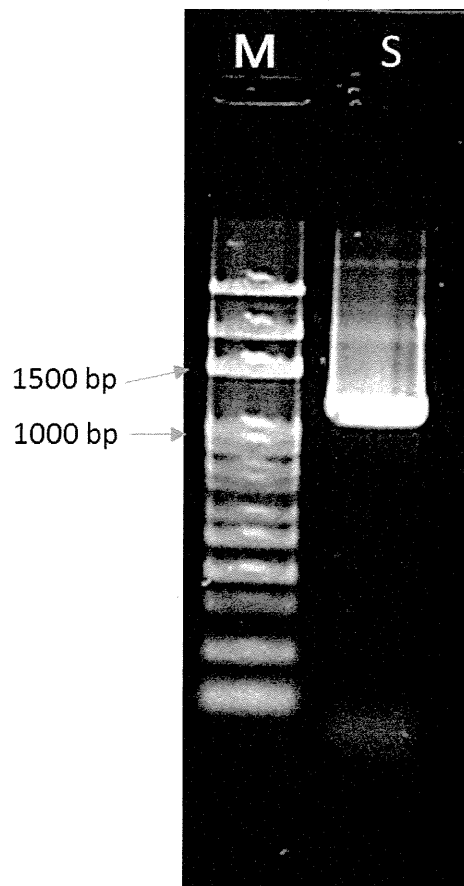


図5 シカ肉より抽出した DNA を用いての、住肉胞子虫 18S rRNA 遺伝子の検出
M : DNA サイズマーカー、S : シカ肉より抽出した DNA をテンプレートとし、厚生労働省が通知した、サルコシスティス遺伝子検査法の条件のもとに PCR を行った。

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

Sarcocystis fayeri のアピコプラストゲノムの構造決定

野崎 智義

平成 25 年度 厚生労働科学研究（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 *Sarcocystis fayeri* の
アピコプラストゲノムの構造決定

研究分担者 野崎 智義（国立感染症研究所寄生動物部）
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 八木田健司（国立感染症研究所寄生動物部）
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 泉山 信司（国立感染症研究所寄生動物部）
研究協力者 岡崎 隆三（国立感染症研究所寄生動物部）

馬肉生食による食中毒の病因物質と考えられている *Sarcocystis 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。昨年度の結果として、総塩基長が 127Mbp、コンティグ数 68,209 本が得られ、下痢症状の誘発が推測される 15kDa タンパク質の配列や、近縁の *Toxoplasma* のアピコプラストに相同性の高い配列が含まれていた。アピコプラストは原虫の生存に必須な細胞小器官で、有効な薬剤標的になり得ると言われている。本年度はアピコプラストゲノム配列を完成させるために、PCR-シーケンスを行ってコンティグ間の接続を確定させ、アノテーションを行った。完成したゲノムの大きさは 32,702bp で、近縁の *Toxoplasma* のアピコプラストゲノムに比べると、SSU rRNA 遺伝子の 1 コピーが少なく、2kb ほど小さかった。*Toxoplasma* と同様に AT の割合が 79%と著しく高く、終止コドンの UGA は Tryptophan として読まれていると想像された。アノテーションの結果は、tRNA 遺伝子が 26、rRNA 遺伝子が 3、*rps* 遺伝子が 10、*rpl* 遺伝子が 6、その他の遺伝子に ORF B、C、D、E、F、*rpoB*、*rpoCl*、*clp*、elongation factor-Tu、*ycf24* homolog が含まれていた。植物と大腸菌で必須な遺伝子ではないと考えられる、*rpl36* 遺伝子が欠失していた。この作業の途中過程で、公共データベースから取得した次世代シーケンサーの生データを用いて、*Neospora caninum* と *T. gondii* のアピコプラストゲノムの配列も整備した。

A. 研究目的

近年、国内において、馬刺しの喫食による一過性の嘔吐下痢症を主徴とした食中毒が問題となっている。原因として、これまでヒトへの健康危害が知られて

いなかった、ウマに寄生した *S. fayeri* の関与が疫学調査の結果として示唆された。現在までに、*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。しかし、サルコシスティス感染症の報告は多くなく、他の原虫類に比べて研究が少なく周回遅れとなっている。一方、近年大きく発展したゲノム解析手法は、比較生物学的な解析を可能とし、研究リソースの限られた条件下においても、病原体研究の有効な方法の一つと考えられる。当該研究では、*S. fayeri*の病原体を研究する目的で、ゲノム解析を行うこととした。

昨年度に生鮮馬肉からザルコシストを得て作成したライブラリより、Illumina HiSeq2000 シーケンサーを用いて 1.67 億リード、16.7Gbase の配列が得られた。CLC Genomics Workbench を用いた *de novo assemble* の結果、最終的に N50 が 3,349bp、最大コンティグ長が 220,145bp、総塩基長が 126,606,435bp、コンティグ数 68,209 本が得られていた。近縁の *S. neurona* の 124Mbase に対して、同等のデータ量が取得できた。得られた配列には、下痢症状の誘発が推測される 15kDa タンパク質の配列や、近縁の *T. gondii* のアピコプラストに相同性の高い配列が含まれていた。

アピコプラストは、紅藻の二次共生によって形成された、退化した色素体の細胞内小器官で、apicomplexa にほぼ共通に存在する¹⁾。光合成の機能と遺伝子の多くは既に失われているが、細胞核とは別に、35kb 程度の独自のゲノムを有している。その構造は環状、あるいは線状だが連続的な複製が行える構造の結果として配列が環状に見える、と考えられている。*Toxoplasma* や *Eimeria* 等では、SSU rRNA (small subunit rRNA 遺伝子) と LSU rRNA (large subunit rRNA 遺伝子) が、Inverted repeat の状態で 2 コピーずつ存在し (図 1)、ピロプラズマ

原虫の *Theileria parva* と *Babesia bovis* ではこのリピートがない。配列の AT の割合が著しく高く、終止コドンの UGA は Tryptophan として読まれていると考えられている^{1, 2)}。

アピコプラストの機能には、脂質合成系、イソプレノイド合成系、ヘム合成系などがあると考えられている³⁾。薬剤処理によりアピコプラストを消失させると細胞が死ぬことから、アピコプラストは原虫の生存に必須で、薬剤の標的として有効と期待されている^{1, 3)}。実際、*T. gondii*、*Plasmodium falciparum* では、RNA の転写阻害をする Rifampicin や Rifabutin (アピコプラストの RNA polymerase β サブユニットが標的)、タンパク質の翻訳阻害をする

Clindamycin や Doxycycline (アピコプラストの LSU rRNA、SSU rRNA)、脂肪酸合成阻害剤の Thiolactomycin (核ゲノムコードでアピコプラストへ移行する β -ketoacyl-ACP synthase II and III)、イソプレノイド合成阻害剤の Fosmidomycin (核ゲノムコードでアピコプラストへ移行する DOXP

reductoisomerase)、等々が有効であるとする研究がある。*S. fayeri* のアピコプラストゲノムも近縁種との相同性があり、同様の薬剤が有効な可能性がある。

当該研究では、*S. fayeri* のアピコプラストゲノムの構造決定を行うこととした。昨年度の *de novo assemble* の結果では、アピコプラストゲノムは一本につながっていなかった。アピコプラストには rDNA の配列が複数あり、繰り返し配列部分を解決して構造を決定し、アノテーションを付与して含まれる遺伝子の詳細を検討する必要があった。

B. 研究方法

S. fayeri の塩基配列は、昨年度に *de*

de novo assemble で作成した、総塩基長が 127Mbp、コンティグ数 68,209 本を使用した。次世代シーケンサーから得たアピコプラストのリードは、HiSeq ではカバレッジが x1,700 と過剰になったこと、MiSeq の方がより長い 150+150 の配列が読めていることから、リードマッピングには MiSeq のデータ (1060 万リード、1.59Gbase、x150 カバレッジ程) を使用した。

アピコプラストゲノムの想定は以下の通りに行った。*de novo* assemble で得られたコンティグをデータベースに使用し、BLAST 検索を行い、アピコプラストのコンティグ (複数) を取得した。リファレンス配列には近縁種であり既に Gen Bank に登録されている、*T. gondii* のアピコプラスト配列 (U87145、以下 U87145 と略) を用いた。U87145 を参考にして、コンティグの並びを予測した。コンティグ末端の相同な配列部分でコンティグを接続し、アピコプラストゲノムの全長を想定した。

想定配列におけるコンティグの接続が正しいことを PCR-sequence で確認した。すなわち、CLC Genomics Workbench (Ver. 5.5 以降) を使用して、接続部分にまたがって増幅する PCR プライマーを設計した。外注で合成したプライマー (オペロンバイオテクノロジー株式会社) を使用して PCR を行った。PCR 反応には Ex Taq DNA polymerase (タカラバイオ) を使用した。必要に応じて PCR 反応のアニーリング温度を 50~65°C、サイクル数を 30~40 サイクルに調節した。PCR 産物は定法に従いアガロースゲル電気泳動で確認した。サイズマーカーには One STEP Ladder 100 (NIPPON GENE)、または One STEP Ladder 1kb (NIPPON GENE) を使用し、目的の大きさの PCR 産物が得られていることを確認した。

PCR 産物の塩基配列を BigDye Terminator (ver. 1.1、ABI) とサンガーシーケンサー (ABI Prism 3100-Advant Genomic Analyzer) を使用して取得した。得られた塩基配列のデータは、CLC Genomics Workbench を使用して、想定配列とのアライメントを作り、相同性を確認した。

確定した *S. fayeri* アピコプラストゲノムの配列に、アノテーションを付与した。アライメントを作成すると、配列は U87145 とおよそ全長が相同であったことから、U87145 のアノテーションを参考に、マニュアル操作で *S. fayeri* アピコプラストゲノム配列にアノテーションを付与した。タンパク質のアノテーションは必要に応じて開始コドン、終止コドンの位置を調整した。

tRNA のアノテーションの位置と種類は、<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/> (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>) を使用して確認した⁴⁾。幾つかは tRNAscan-SE の結果に従って数塩基の位置を調整した。U87145 の tRNA は、実際の発現 tRNA の解析結果ではなく、tRNAscan-SE の結果を利用していると考えられ、本研究でも tRNAscan-SE の結果に従うこととした。

参考にした U87145 の配列には遺伝子途中に終止コドンがあるなど不完全な部分があり、*Toxoplasma* と *Neospora* のアピコプラスト配列を別途用意し、比較した。これには、DDBJ (DNA Data Bank of Japan、<http://www.ddbj.nig.ac.jp>) からダウンロードした *Toxoplasma* の次世代シーケンサーの生データ (SRR346134、SRR346136) と *Neospora* の次世代シーケンサーの生データ (ERR012899、ERR012900) を利用した。それぞれ *S. fayeri* と同様にトリム処理、*de novo* assemble を行い、コンティグを取得し

た。取得したコンティグをデータベースにして U87145 の BLAST 検索を行い、アピコプラストゲノムのコンティグを取得した。この場合も複数のコンティグに分かれていたことから、*S. fayeri* と同様に、U87145 を参考にしてアピコプラストゲノムの構造を計算機上で求めた。アノテーションも U87145 を参考にして付与した。

最終的に、本研究で U87145 を参考にして作成した *S. fayeri*、*Toxoplasma*、*Neospora* の 3 つのアピコプラストゲノム配列、U87145、さらに U87145 とは独立の *Eimeria tenella* (AY217738)、計 5 つのアピコプラストゲノムの配列を使用して、CLC Genomics Workbench でアライメントを作成し、遺伝子の異同を確認した。

C. 研究結果および考察

近縁種である *T. gondii* のアピコプラストゲノムの配列 (U87145) を用いて *S. fayeri* の配列 126Mb をデータベースとして BLAST 検索を行ったところ、LSU rRNA とその近隣の領域、SSU rRNA とその近隣の領域、それ以外の遺伝子がコードされている領域の、3 つの領域に高い相同性の高いコンティグが得られた (図 2)。それぞれ LSU rRNA と相同性があったコンティグを Contig1 (図 2A)、遺伝子がコードされているコンティグを Contig2 (図 2B)、SSU rRNA のコンティグを Contig3 (図 3C) として、コンティグの接続を行った。

U87145 の遺伝子の並び順を参考にして、これらの 3 つのコンティグの並び順を予想し、コンティグの末端で相同な配列部分でコンティグを接続し、*S. fayeri* のアピコプラストゲノムの想定配列を得ることができた。接続の詳細については、以下の通りである。すなわち、

U87145 では SSU rRNA が 2 コピー、LSU rRNA が 2 コピーずつの Inverted repeat の構造が特徴的であった。ところが、

S. fayeri では SSU rRNA に相同性を持つコンティグ (Contig3) 同士が接続できず、U87145 の様な Inverted repeat を作って環状配列にする事ができなかった。これとは別に、SSU rRNA の Contig3 を 2 コピーではなく 1 コピーとして配列を想定すると、SSU rRNA が 1 コピー、LSU rRNA が 2 コピーと変則的だが、配列に矛盾なく接続が可能であり、配列は環状になった。

無理に接続した想定配列にリードマッピングを行うと、SSU rRNA 領域のカバレッジが、周辺の領域と比較して半分に落ち込んだ (図 3A)。一方、SSU rRNA を 1 コピーに減らして、矛盾なくコンティグを接続した場合のリードマッピングは、配列全体でカバレッジが一定した (図 3B)。ライブラリの作成では、可能な限り均一なカバレッジが得られるように作成を行っており、カバレッジが均一な方が、より正しいと言えた。従って、リードマッピングの結果、すなわち取得したリードの量比が一定であるという実験的な裏付けから、*Toxoplasma* では 2 コピーある SSU rRNA の遺伝子が、*S. fayeri* では 1 コピーに減っていると考えられた。

コンティグ同士の接続が正しい事を PCR-Sequence で確認した。すなわち、コンティグの接続部分をまたいで PCR を行うようにプライマーを設計した (表 1、図 4A~D)。PCR 産物の大きさがそれぞれ 600bp、700bp、750bp、600bp という予測の下、アガロースゲル電気泳動で予定通りのサイズのバンドを検出することができた (図 4E)。PCR 産物の配列をサンガーシーケンサーで取得した結

果、得られた配列と想定配列は 100%一致であった。結果には示さないが、想定配列に対してリードマッピングを行うと、配列に特異的なリードがコンティグ間にも問題なく張り付いた。以上の事からコンティグの接続は想定通りであり、アピコプラストゲノムの構造と配列が完成した。U87145 の長さが 34,996bp であったのに対して、SSU rRNA が 1 コピー減った分、*S. fayeri* アピコプラストゲノムの長さは 32,702bp と短かった (図 5)。

S. fayeri アピコプラストゲノム配列にアノテーションを付与した。まず *S. fayeri* アピコプラストゲノム配列と、U87145 とのアライメントを作成した (図 5)。作成したアライメントはおよそ全長で相同性が高く、U87145 のアノテーションを参考に、アノテーションを *S. fayeri* アピコプラスト配列にマニュアル操作で付与することが可能だった。タンパク質のアノテーションは必要に応じて開始コドンと終止コドンの位置を調整した。この作業は 1 つ 1 つの遺伝子を目視で行った (図 6)。なお、終止コドンの UGA は他の原虫のアピコプラスト同様に Tryptophan として読まれていると想像され、そのように見なして取り扱った^{1, 2)}。

SSU rRNA の一コピーが無くなり、その付近の 7 つの tRNA (Ile, Ala, Asn, Leu, Arg, Val, Met) の各 1 コピーが一緒に無くなった (図 7A)。また、別の場所の tRNA-Met が欠失していた (図 7B)。それでも、アピコプラストゲノム中の tRNA 遺伝子は、アミノ酸 20 種分が確認できたことから、現時点でアピコプラスト内の遺伝子の翻訳に支障はないと推測された (表 2)。なお、tRNAscan-SE を使用して tRNA を検索した結果、U87145 のアノテーションに比べて、

tRNA-Thr を 1 塩基、tRNA-Asn を 5 塩基、tRNA-Ile を 3 塩基、tRNA-Arg を 5 塩基だけ位置を修正した。*rpl4* 遺伝子の配列上にも tRNA-Lys の検出があったが、そこでは *rpl4* 遺伝子のアノテーションを優先し、tRNA のアノテーションは付加しなかった。U87145 において、tRNA-Cys と tRNA-Tyr に挟まれた tRNA-Leu が、イントロンを含んでいた。*S. fayeri* でも同様の配列があり、イントロンを除去した配列を tRNAscan-SE に使用したところ、この場所に tRNA-Leu が検出されたため、イントロンを含んだ tRNA-Leu 配列をアノテーションとした (表 2)。

近縁種に存在する *ribosomal protein large subunit 36 (rpl36)* が、*S. fayeri* アピコプラストゲノム配列には存在しなかった (図 7C)。Blast 検索でも、*S. fayeri* の配列 127Mb 中に、*rpl36* の配列がないことを確認した。*rpl36* は、細胞の生存には必須ではない事が植物、大腸菌や枯草菌で示されている^{5, 6)}。ただし、タバコ葉緑体ゲノムの *rpl36* ノックアウト株は、光合成能と成長に障害が見られ、葉の形態にも変化が見られていた。枯草菌でも必須ではないが、増殖速度の低下が認められていた⁶⁾。これらのことから考えると、*S. fayeri* アピコプラストは *rpl36* の欠失により、機能低下の可能性が示唆された。

U87145 の配列は、*rps8* と *rpoC2* (RNA polymerase β' サブユニット遺伝子) の遺伝子の途中で終止コドンが挿入されていた。基準として利用するには不安があったので、別途、*T. gondii*、*N. caninum* アピコプラストゲノム配列を計算により求めた。すなわち、方法に書いた通り、DDBJ から *T. gondii* と *N. caninum* の次世代シーケンサーの生データをダウンロードし、*S. fayeri* と同

様の処理を行ってアピコプラストゲノムの配列を構築した。*T. gondii* は 34,997bp、*N. caninum* は 34,931bp であった (図 8)。U87145 を基準として、SSU rRNA と LSU rRNA 遺伝子は各 2 コピーとしたが、リードマッピングの結果から SSU と LSU の割合が 1:1 と考えられ、配列にも矛盾は生じなかった。U87145 の配列を参考にしてアノテーションを付与した。*T. gondii* の配列では ribosomal protein large subunit 6 (*rpl6*) に未確定の塩基 N が残った不完全な配列となった。これを受けて、U87145 と本研究で作成した *T. gondii* の配列の両方を参考として使用し続けた。

U87145 では終止コドンが ORF の中間付近に入ってしまった *rps8* は、本研究で得た *S. fayeri*、*T. gondii*、*N. caninum* アピコプラストゲノム配列のいずれにおいても、終止コドンの挿入がなかった。従って、これら一連の原虫の *rps8* には、終止コドンがないと考えられた。

これとは別に、配列の中間付近に終止コドンが入っていた *rpoC2* の遺伝子は、本研究で作成した *S. fayeri*、*T. gondii*、*N. caninum*、基準に使用した *T. gondii* の U87145、さらに *E. tenella* アピコプラストゲノム配列 (AY217738) のいずれにおいても、ほぼ同じ場所に終止コドンの挿入が見られた。機能しない遺伝子は保存性がなくなって変化しやすいと想像されるが、配列や終止コドンの位置などはよく保存されており、何らかの実験的な確認が必要だが、この *rpoC2* 遺伝子はこの状態で機能しているのではないかと想像された。

その他の遺伝子も、他の近縁種と同様によく保存されていた (表 3)。最終的に、*S. fayeri* アピコプラストゲノムに

は、26 の tRNA、SSU rRNA、LSU rRNA、10 の *rps*、6 の *rpl*、ORF B、C、D、E、F、*rpoB*、*rpoC1*、*clp*、elongation factor-Tu、*ycf24* homolog がコードされていると考えられた。

本研究で作成した *S. fayeri*、*T. gondii*、*N. caninum* アピコプラストゲノム配列、公共データベースに登録の *T. gondii* (U87145) と *E. tenella* (AY217738)、以上 5 つの配列を使用してアライメントを作成し、遺伝子の異同を確認した (表 3、図 9)。遺伝子の並び順と存在はほぼ共通し、これらのアピコプラストゲノムの構造はよく似ていた。一方、*S. fayeri* での変化を再掲すると、2 コピーあった SSU rRNA とその近辺の 7 つの tRNA (Ile、Ala、Asn、Leu、Arg、Val、Met) (図 7A) の一方、tRNA-Met の一つ (図 7B)、*rpl36* (図 7C) が欠失していた。そしてこれらは *Toxoplasma*、*Neospora*、*Eimeria* とは異なることが特徴的であった。*S. fayeri* のアピコプラストゲノムは、近縁種に比べて縮小、退化しつつあると考えられた。残った遺伝子は良く保存されており、最初に紹介した薬剤の標的となる遺伝子も残っており、近縁種で有効な薬剤は *S. fayeri* でも有効ではないかと期待された。

D. 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* のアピコプラストに着目し、そのゲノムの構造と配列を決定し、アノテーションを付与した。PCR-シーケンスを行ってコンティグ間の接続を確定した。完成したゲノムの大きさは 32,702bp で、近縁の *Toxoplasma* のアピコプラストゲノムに比べると、SSU rRNA 遺伝子の 1 コピーが少なく、2kb ほど小さかった。他のアピコプラストゲノムと同様に AT の割合が 79%と著

しく高く、終止コドンの UGA は Tryptophan として読まれていると想像された。アノテーションの結果は、tRNA 遺伝子が 26、rRNA 遺伝子が 3、*rps* 遺伝子が 10、*rpl* 遺伝子が 6、その他の遺伝子に ORF B、C、D、E、F、*rpoB*、*rpoC1*、*clp*、elongation factor-Tu、*ycf24* homolog が含まれていた。植物と大腸菌で必須な遺伝子ではないと考えられる、*rpl36* 遺伝子が欠失していた。公共データベースから取得した次世代シーケンサーの生データを用いて、*N. caninum* と *T. gondii* のアピコプラストゲノムの配列も整備した。

E. 参考文献

1. Sato S. The apicomplexan plastid and its evolution. *Cell Mol Life Sci* 2011;68:1285-96.
2. Ohama T, Inagaki Y, Bessho Y, Osawa S (2008) Evolving genetic code. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 84:58-74
3. Waller RF, McFadden GI. The apicoplast: a review of the derived plastid of apicomplexan parasites. *Curr Issues Mol Biol* 2005;7:57-79.
4. Lowe TM, Eddy SR. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence, *Nucleic Acid Research*, 1997;25(5):955-964

5. Fleischmann TT, Scharff LB, Alkatib S, Hasdorf S, Schöttler MA, Bock R. Nonessential plastid-encoded ribosomal proteins in tobacco: a developmental role for plastid translation and implications for reductive genome evolution. *Plant Cell*. 2011 Sep;23(9):3137-55.
6. Akanuma G, Nanamiya H, Natori Y, Yano K, Suzuki S, Omata S, Ishizuka M, Sekine Y, Kawamura F. Inactivation of ribosomal protein genes in *Bacillus subtilis* reveals importance of each ribosomal protein for cell proliferation and cell differentiation. *J Bacteriol*. 2012 Nov;194(22):6282-91.

F. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

八木田健司、内田雄治. 国産重種馬肉における *Sarcocystis fayeri* 汚染実態調査. 第 82 回日本寄生虫学会大会、平成 25 年 3 月 29-31 日、東京.

G. 知的所有権の取得状況

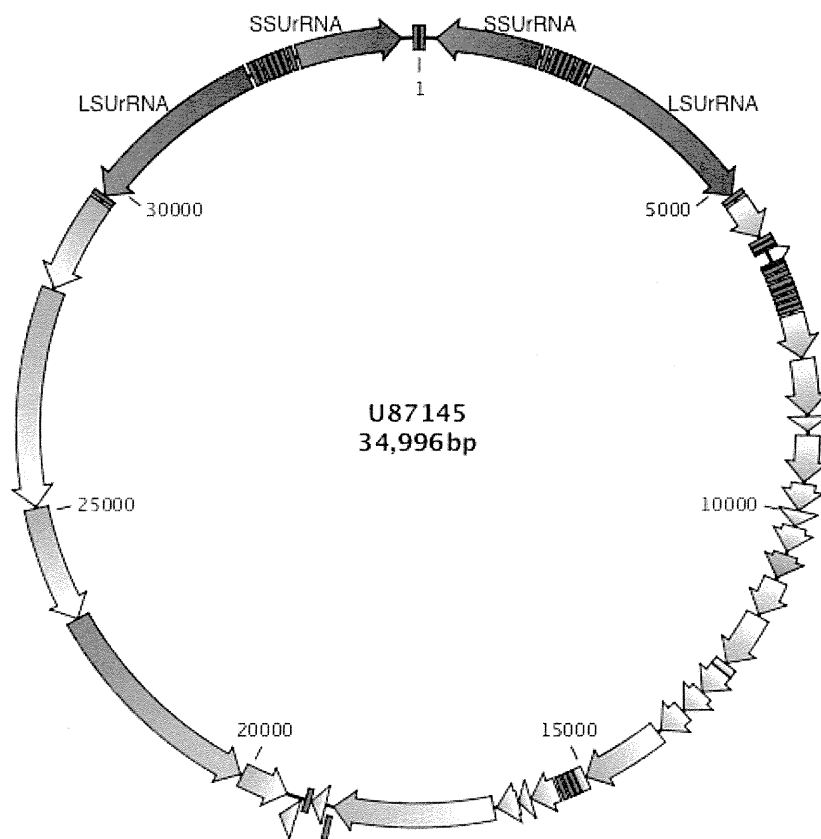
1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

なし

A) 環状の表現



B) 直鎖状の表現

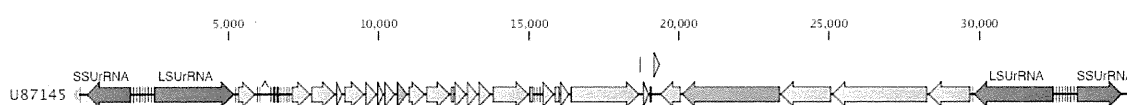
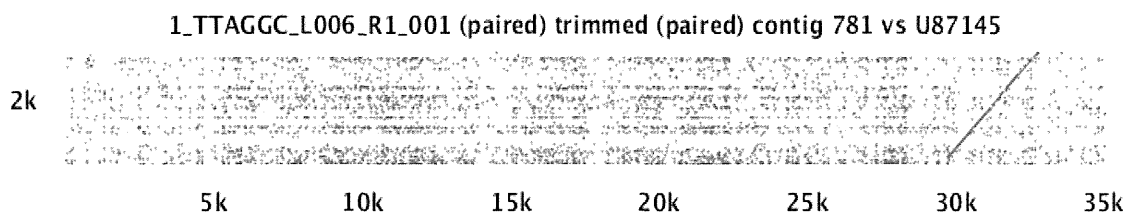


図1 *Toxoplasma gondii* アピコプラストゲノムの構造

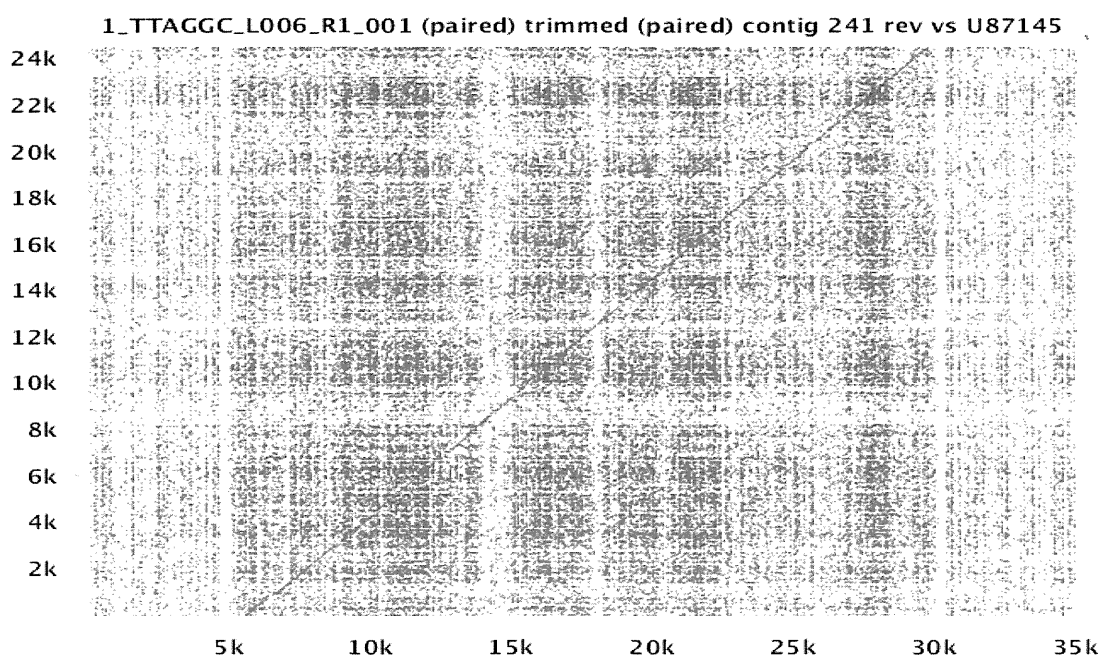
GenBank の U87145 を CLC Genomics Workbench で読み込み、表示したもの。頂上付近の赤の矢印は ribosomal RNA、短い四角は tRNA を表す。その他、黄色の矢印は遺伝子、ピンクは情報が不完全なアノテーションを表す。矢印の向きは遺伝子の方向性を意味している。細い黒い線が塩基配列を表し、矢印のない部分はアノテーションがない領域を表す。

A：環状の表現をした場合、B：直鎖状に表現をした場合で、環状の場合と内容は同一

A) Contig1 (LSU rRNA)



B) Contig2 (多くの遺伝子がコードされた中心部分の領域)



C) Contig3 (SSU rRNA)

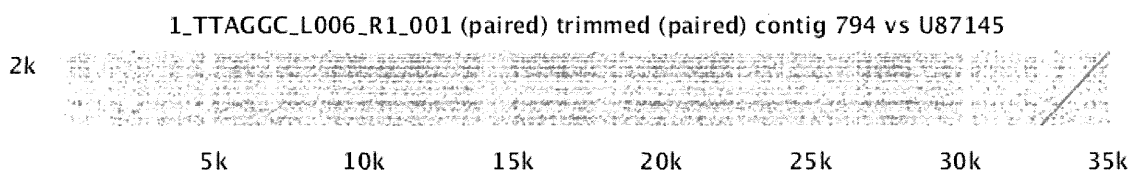


図2 *Toxoplasma gondii* アピコプラストゲノム配列と同一性のあるコンティグ
de novo assemble によって作成したコンティグと *Toxoplasma gondii* アピコプラストと同一性のある3つのコンティグの同一性をドットプロットで示した。縦軸が検出されたコンティグ、横軸が *T. gondii* のアピコプラスト配列。