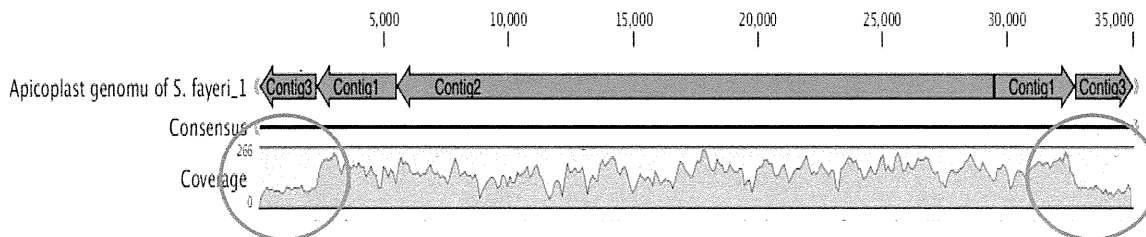


A) SSU rRNA の 2 コピーを想定した場合



B) SSU rRNA の 1 コピーを想定した場合

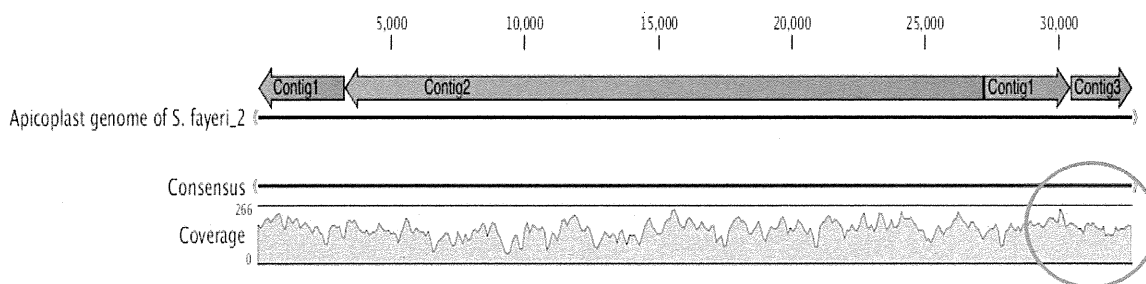


図 3 想定配列 2 パターンとリードマッピングの結果

ピンクの矢印は *Toxoplasma gondii* と相同性のある 3 つのコンティグを表している。その下の Consensus の左右に伸びるある黒い線が、配列を意味している。その下の Coverage グラフは、上の配列に対応していて、縦軸でリードマッピング結果のリードの多寡を表しており、上は多い、下は少ないことを意味している。赤い円で囲まれた領域は SSU rRNA の領域のカバレッジである。

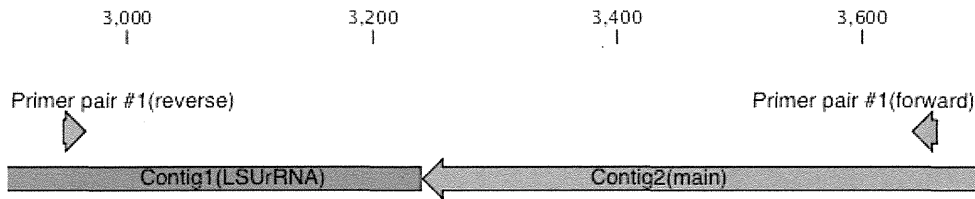
A : SSU rRNA が 2 コピー存在していると仮定した配列ではカバレッジが安定せず、SSU rRNA でのカバレッジが他の領域の半分程度しかない。

B : SSU rRNA が 1 コピーと仮定した配列では、SSUrRNA の領域も他の領域と同程度の均一なカバレッジであった。

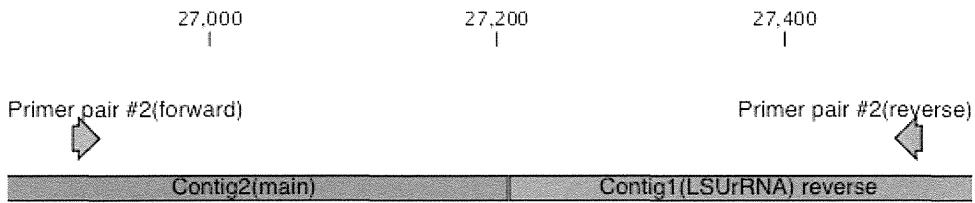
表 1 コンティグ間の接続確認用 PCR プライマーの一覧

Primer pair	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
#1	GTTCAACTCCCTTTATCAGT	TAATTAGAATCACAATCTAACG
#2	CTGCTGAACTTCTAAACCTA	GTTCAACTCCCTTTATCAGT
#3	CGCCGCTACTAAGGAAATA	GAGGAGTTTACGGAAGAAGA
#4	CATTAGCAAGTTAAGACCCAC	TATTCCTACTCGTCGCC

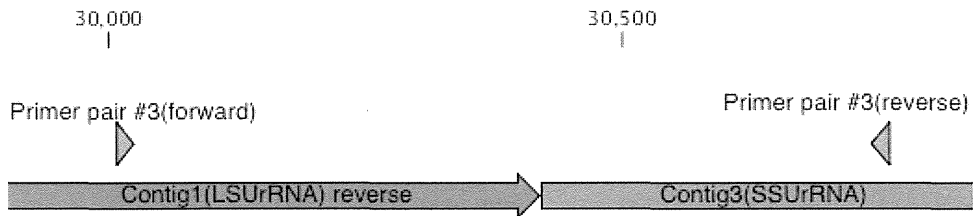
A) PCR #1 (715bp)



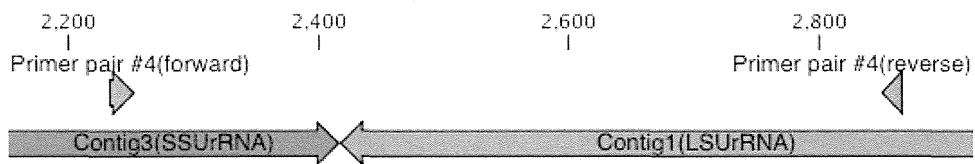
B) PCR #2 (592bp)



C) PCR #3 (754bp)



D) PCR #4 (635bp)



E) PCR 産物

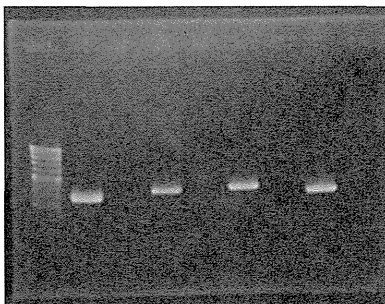


図4 コンティグ間の接続確認用 PCR

接続したコンティグ間をまたいでプライマーを設計した (A~D)。想定のサイズの PCR 産物が得られることを確認した (E)。左からレーン 1 : 100bp サイズマーカー、レーン 2、4、6、8 が PCR #1、#2、#3、#4、レーン 3、5、7、9 はそれぞれの陰性コントロール。

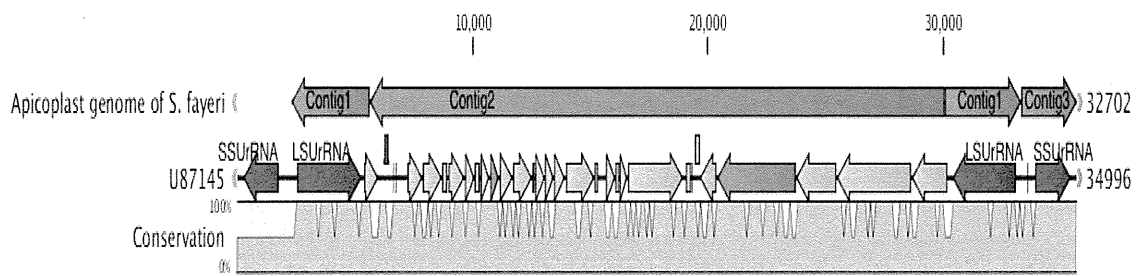


図5 完成した *S. fayeri* アピコプラストゲノムの想定配列

本研究で作成した *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。Conservation は塩基の相同性を表し、一致していれば 100%、不一致はここでは 50% で表示されている。

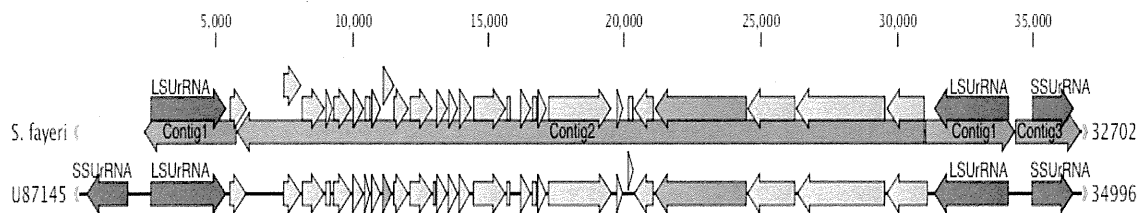
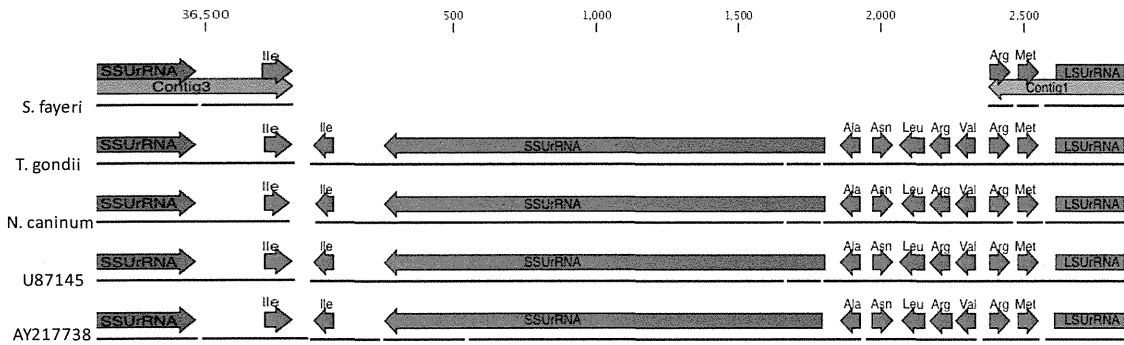


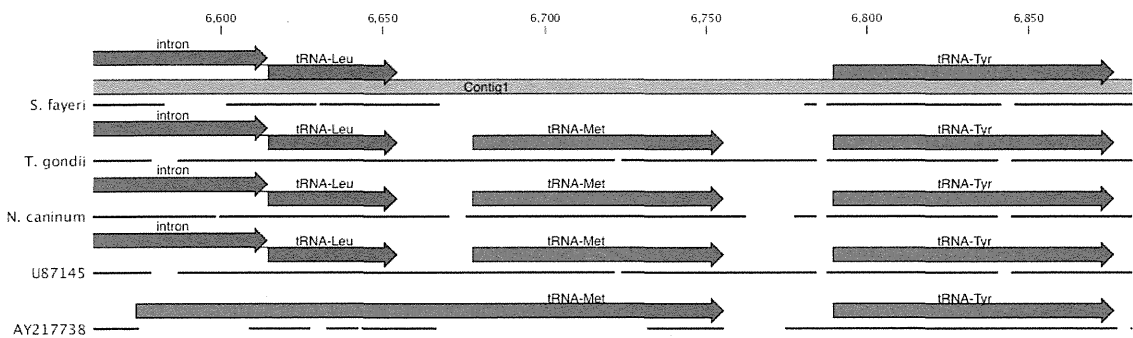
図6 アノテーション付与

図5で作成したアライメントを使い、*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。この図の上段の左右に伸びる矢印が *S. fayeri* アピコプラストゲノム配列、下段が U87145 の配列を意味している。左右端にある赤の矢印は ribosomal RNA、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。この図では tRNA 遺伝子のアノテーションは見えない設定としてあり、遺伝子が空白の部分には実際はほぼない。

A) SSU rRNA の 1 コピーが欠失した領域



B) tRNA-Met が欠失した領域



C) *rpl36* が欠失した領域

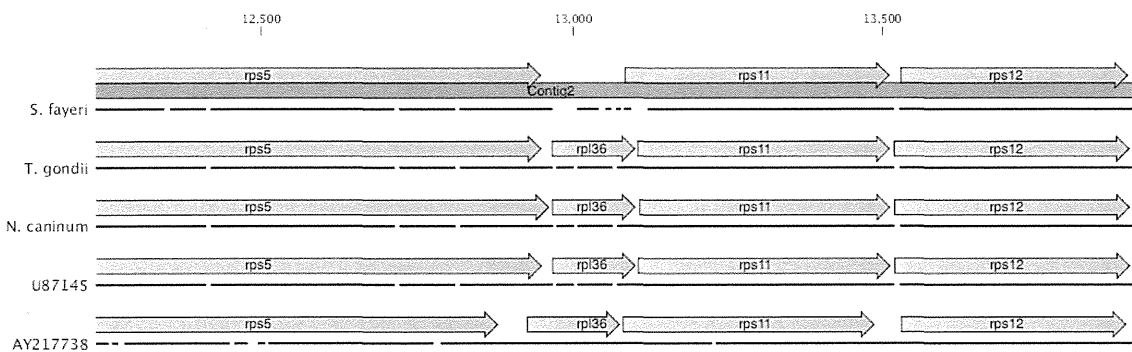


図 7 欠失した遺伝子領域の部分拡大

アピコプラストゲノムのアライメントより、*S. fayeri*で欠失のあった領域を拡大表示した。

A : SSU rRNA の一つの欠失、B : tRNA-Met の欠失、C : *rpl36* の欠失。

赤の矢印は ribosomal RNA と tRNA を表す。薄い赤の矢印は、接続したコンティグを表す。黄色の矢印は遺伝子を表す。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、線が続かず分断されている部分は、配列がないギャップ部分であることを表す。

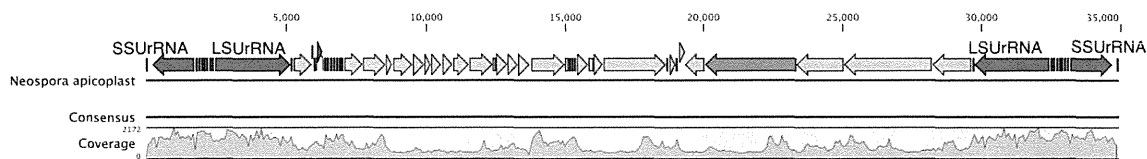
表 2 tRNAscan-SE の結果

#	bp位置	対応アミノ酸	アンチコドン
1	4-76	Arg	ACG
2	86-159	Met	CAT
3	2897-2968	Thr	TGT
4	3617-3689	His	GTG
5	3712-3785	Cys	GCA
6	3801-3836+4015-4053*	Leu	TAA
7	4073-4155	Tyr	GTA
8	4166-4250	Ser	GCT
9	4255-4328	Asp	GTC
10	4458-4530	Glu	TTC
11	4540-4613	Pro	TGG
12	12763-12834	Gln	TTG
13	12848-12918	Trp	CCA
14	16194-16265	Gly	TCC
15	16559-16640	Ser	TGA
16	30486-30557	Val	TAC
17	30568-30539	Arg	TCT
18	30666-30572	Leu	TAG
19	30848-30920	Ala	TGC
20	32630-32701	Ile	GAT
21	30827-30755	Asn	GTT
22	30440-30368	Arg	ACG
23	30358-30285	Met	CAT
24	27547-27476	Thr	TGT
25	12735-12664	Phe	GAA
26	4428-4357	Lys	TTT

*:イントロンを除去した配列でtRNA-Leuが検出された。数字はイントロンが入った配列に対応する位置を表す。

**:*rp14*上に検出されたtRNA-Lysはこの一覧から除いた。

A) *Neospora caninum* アピコプラストゲノム



B) *Toxoplasma gondii* アピコプラストゲノム

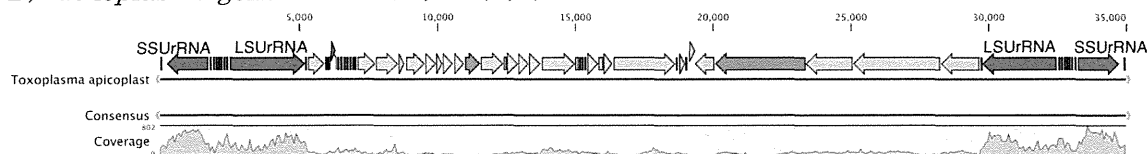


図 8 *Neospora caninum* と *Toxoplasma gondii* のアピコプラストゲノム配列

方法に従い、公共データベースの次世代シーケンサーの生データより、*S. fayeri* と同様に計算機上でアピコプラストゲノム配列を作成した。リードマッピングにより確認試験すると、SSU rRNA と LSU rRNA の領域は同じ比率のカバレッジが得られており、これらは 2 コピーずつ存在すると考えられた。ただし、*Toxoplasma* は他の遺伝子とのカバレッジに差が大きく、SSU と LSU が同じ比率で存在するのは良いとして、コピー数はもっと多い可能性が示唆された。

表 3 アピコプラストゲノムの遺伝子一覧 (数字は塩基長)

	<i>rps2</i>	<i>rps3</i>	<i>rps4</i>	<i>rps5</i>	<i>rps7</i>	<i>rps8</i>	<i>rps11</i>	<i>rps12</i>	<i>rps17</i>	<i>rps19</i>
<i>S. fayeri</i>	681	666	606	804	456	426	402	366	222	252
<i>T. gondii</i>	702	675	597	807	411	354	408	366	222	213
<i>N. cininum</i>	702	675	618	819	411	354	405	366	222	219
U87145	702	675	597	807	411	-	408	366	222	213
AY217738	702	627	603	696	372	360	399	363	204	267

	<i>rpl2</i>	<i>rpl4</i>	<i>rpl6</i>	<i>rpl11</i>	<i>rpl14</i>	<i>rpl16</i>	<i>rpl36</i>
<i>S. fayeri</i>	807	636	558	384	366	399	-
<i>T. gondii</i>	804	636	-	396	366	390	114
<i>N. cininum</i>	804	636	549	396	366	399	114
U87145	804	636	549	396	366	390	114
AY217738	822	642	549	384	366	390	150

	ORF B	ORF C	ORF D	ORF E	ORF F
<i>S. fayeri</i>	159	231	204	318	171
<i>T. gondii</i>	132	210	225	318	177
<i>N. cininum</i>	132	213	225	318	177
U87145	132	210	225	318	177
AY217738	138	267	300	327	204

	<i>rpoB</i>	<i>rpoC1</i>	<i>rpoC2</i>	ef-Tu	<i>clp</i>	<i>ycf24</i>
<i>S. fayeri</i>	3,159	1,704	-	1,209	2,289	1,398
<i>T. gondii</i>	3,159	1,698	-	1,209	2,265	1,398
<i>N. cininum</i>	3,153	1,698	-	1,212	2,265	1,398
U87145	3,156	1,698	-	1,269	2,298	1,398
AY217738	3,180	1,716	1,773	1,212	2,226	1,473

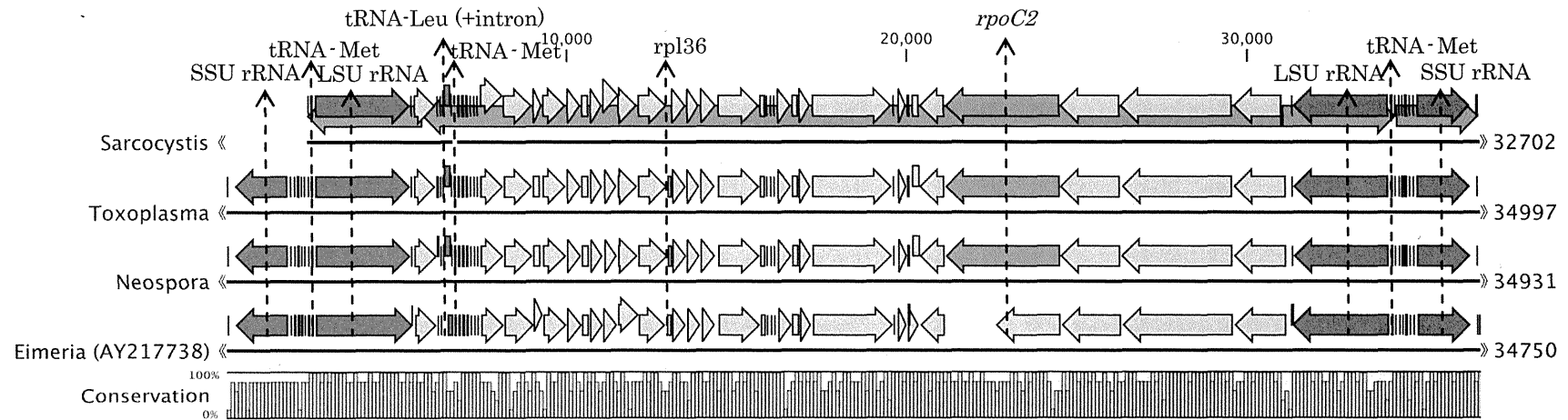


図9 アピコプラストゲノム配列のアライメントの全体模式図

本研究で作成した *S. fayeri*、*T. gondii*、*N. caninum* の配列と、AY217738 のアライメントを作成し、アピコプラストゲノムの相同性を確認した。この図では、*T. gondii* とほぼ同一の U87145 を省略した。本研究で問題となった、SSU rRNA、LSU rRNA、tRNA-Met、イントロンが入った tRNA-Leu、*rpoC2*、*rpl36* 遺伝子について、矢印で位置を示した。

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
Ohnishi, T., Oyama, R., Furusawa, H., Ohba, N., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y.	<i>Kudoa septempunctata</i> was recognised by toll-like receptor 2 produced by a RAW 264 macrophage-like cell line.	Food Addit Contam Part A Chem.	30	1365-1369	2013
Ohnishi, T., Furusawa, H., Yoshinari, T., Yamazaki, A., Horikawa, K., Kamata, Y., Sugita-Konishi	<i>Electron microscopic study of Kudoa septempunctata</i> infecting <i>Paralichthys olivaceus</i> (olive flounder).	Jpn J Infect Dis.	66	348-350	2013
Kikuchi, Y., Ohnishi, T., Furusawa, H., Kawai, T., Fukuda, Y., Yokoyama, H., Sugita-Konishi, Y.	ELISA Detection of <i>Kudoa septempunctata</i> in Raw <i>Paralichthys olivaceus</i> (Olive Flounder) using a Chicken Anti- <i>Kudoa</i> Antiserum.	Biocontrol Sci.	18	193-197	2013
Li, YC., Sato, H., Tanaka, S., Ohnishi, T., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y.	Characterization of the ribosomal RNA gene of <i>Kudoa neothunni</i> (Myxosporea: Multivalvulida) in tunas (<i>Thunnus</i> spp.) and <i>Kudoa scomberi</i> n. sp. in a chub mackerel (<i>Scomber japonicus</i>).	Parasitol Res.	112	1991-2003	2013
Ohnishi, T., Akuzawa, S.,	Inactivation of <i>Ku-</i>	Biocontrol Science		印刷中	

Furusawa, H., Yoshinari, T., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y.	<i>doa septempunctata</i> in Olive Flounder Meat by Liquid Freezing.				
Kamata Y., Saito M., Irikura D., Yahata Y., Ohnishi T., BEsso T., Inui T., Watanabe M., Sugita-Konishi Y.	A toxin isolated from <i>Sarcocystis feyeri</i> in raw horse-meat may be responsible for food poisoning.	J. Food Prot.		印刷中	
Li Y-C, Sato H	Two novel myxosporean species (Myxosporea: Bivalvulida), <i>Myxobolus marumotoi</i> n. sp. and <i>Cardimyxobolus japonensis</i> n. sp., from the dark sleeper, <i>Odontobutis obscura</i> , in Japan.	Parasitol Res.		印刷中	
大西貴弘	<i>Kudoa septempunctata</i> 感染症	化学療法の領域	29	258-263	2013
大西貴弘, 古沢博子, 佐古浩, 乙竹充, 福田穰, 吉成知也, 山崎朗子, 鎌田洋一, 小西良子	クドア食中毒および <i>Kudoa septempunctata</i> の季節による特徴	日本食品微生物学会雑誌	30	125-131	2013
小西良子, 鎌田 洋一, 大西 貴弘	新しい寄生虫性食中毒	感染症	43	25-28	2013
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	日本食品衛生学雑誌	54	198-203	2013

	究				
佐藤 宏	粘液孢子虫類の種 鑑別・分類体系が 直面する課題	獣医寄生虫誌	12	105-116	2013

