

- conditions. *Fish. Mar. Serv. Tech. Rep.* 1130: 1-39.
53. Whipps, C. M. 2004. Phylogeny and taxonomy of parasites of the Multivalvulida (Myxozoa: Myxosporea) based on comparative DNA sequence analysis. Ph.D. thesis, Oregon State University, 2004, 128pp.
54. Whipps, C. M. and Diggles, B. K. 2006. *Kudoa alliaria* in flesh of Argentinian hoki *Macruronus magellanicus* (Gadiformes; Merlucciidae). *Dis. Aquat. Organ.* 69: 259-263.
55. Whipps, C. M. and Kent, M. L. 2006. Phylogeography of the cosmopolitan marine parasite *Kudoa thyrsites* (Myxozoa: Myxosporea). *J. Eukaryot. Microbiol.* 53: 364-373.
56. Whipps, C. M., Adlard, R. D., Bryant, M. S. and Kent, M. L. 2003. Two unusual myxozoans, *Kudoa quadricornis* n. sp. (Multivalvulida) from the muscle of goldspotted trevally (*Carangoides fulvoguttatus*) and *Kudoa permulticapsula* n. sp. (Multivalvulida) from the muscle of Spanish mackerel (*Scomberomorus commerson*) from the Great Barrier Reef, Australia. *J. Parasitol.* 89: 168-173.
57. Whipps, C. M., Grossel, G., Adlard, R. D., Yokoyama, H., Bryant, M. S., Munday, B. L. and Kent, M. L. 2004. Phylogeny of the Multivalvulidae (Myxozoa: Myxosporea) based upon comparative rDNA sequence analysis. *J. Parasitol.* 90: 618-622.
58. Wolf, K. and Markiw. M. E. 1984. Biology contravenes taxonomy in the Myxozoa: new discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts. *Science* 225: 1449-1452.
59. Yanagida, T., Nomura, Y., Kimura, T., Fukuda, Y., Yokoyama, H. and Ogawa, K. 2004. Molecular and morphological redescription of enteric myxozoans, *Enteromyxum leei* (formerly *Myxidium* sp. TP) and *Enteromyxum fugu* comb. n. (syn. *Myxidium fugu*) from cultured tiger puffer. *Fish Pathol.* 39: 137-143.
60. 安永統男, 畑井喜司雄, 小川七朗, 安元進. 1981. 養殖スズキおよび養殖イシダイの脳内に見出された粘液胞子虫. *魚病研究* 16: 51-54.
61. 横山 博: 魚類に寄生する粘液胞子虫の生活環と起源. *原生動物誌* 37: 1-9, 2004.
62. Yokoyama, H. and Masuda, K. 2001. *Kudoa* sp. (Myxozoa) causing a post-mortem myoliquefaction of North-Pacific giant octopus *Paroctopus dofleini* (Cephalopoda: Octopodidae). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 21: 266-268.
63. Yokoyama, H., Grabner, D. and Shirakashi, S. 2012. Transmission Biology of the Myxozoa. In: Health and Environment in Aquaculture, Carvalho, E. (ed.), InTech. [DOI: 10.5772/29571], 42pp.
64. Yokoyama, H., Whipps, C. M., Kent, M. L., Mizuno, K. and Kawakami, H. 2004. *Kudoa thyrsites* from Japanese flounder and *Kudoa lateolabracis* n. sp. from Chinese sea bass: Causative myxozoans of post-mortem myoliquefaction. *Fish Pathol.* 39: 79-85.
65. Zhang, J., Meng, F., Yokoyama, H., Miyahara, J., Takami, I. and Ogawa, K. 2010. Myxosporean and microsporidian infections in cultured Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* in Japan. *Fish. Sci.*, 76: 981-990.
66. Zhou, L. S. and Li-Chan, E. C. Y. 2009. Effects of *Kudoa* spores, endogenous

protease activity and frozen storage on cooked texture of minced Pacific hake (*Merluccius porductus*). *Food Chem.*, 113: 1076-1082.

67. Zrzavý, J. and Hypša, V. 2003. Myxozoa, *Polyodium*, and the origin of the Bilateria: The phylogenetic position of “Endocnidozoa” in light of the rediscovery of *Buddenbrockia*. *Cladistics* 19: 164-169.

H. 研究発表

論文発表

1. Matsukane Y, Sato H, Tanaka S, Kamata Y, Sugita-Konishi Y (2011) *Kudoa iwatai* and two novel *Kudoa* spp., *K. trachuri* n. sp. and *K. thunni* n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida), from daily consumed marine fish in western Japan. *Parasitol Res* 108: 913-926
2. 佐藤 宏 (2011) 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.
3. Harada T, Kawai T, Sato H, Yokoyama H, Kumeda Y (2012) Development of a quantitative PCR assay for detection of *Kudoa septempunctata* in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Int J Food Microbiol* 156: 161-167
4. Li Y-L, Sato H, Kamata Y, Ohnishi T, Sugita-Konishi Y (2012) Three novel myxobolid species of genera *Henneguya* and *Myxobolus* (Myxosporea: Bivalvulida) from marine fish in Japan. *Parasitol Res* 111: 819-826
5. 佐藤 宏 (2012) 連載「動物病理学の今」第5回 最近話題の人獣共通寄生虫病. *病理と臨床* 30(8): 2-6
6. 佐藤 宏 (2012) 随伴侵入生物としての脊椎動物寄生蠕虫. *地球環境* 17(2): 183-192
7. Li Y-L, Sato H, Tanaka S, Ohnishi T, Kamata Y, Sugita-Konishi Y (2013) Characterization of the ribosomal RNA gene of *Kudoa neothunni* (Myxosporea: Myxozoa: Multivalvulida) in tunas (*Thunnus* spp.) and *Kudoa scomberi* n. sp. in a chub mackerel (*Scomber japonicus*). *Parasitol Res* 112: 1991-2003
8. 佐藤 宏 (2013) 粘液胞子虫類の種鑑別・分類体系が直面する課題. *獣医寄生虫誌* 12(2): 105-116.
9. Li Y-C, Sato H (2014) Two novel myxosporean species (Myxosporea: Bivalvulida), *Myxobolus marumotoi* n. sp. and *Cardimyxobolus japonensis* n. sp., from the dark sleeper, *Odontobutis obscura*, in Japan. *Parasitol Res* [Published online: 31 January 2014, DOI 10.1007/s00436-014-3776-1]

学会発表

1. Sato H, Tanaka S, Kamata Y, Sugita-Konishi Y, Ohnishi T: Molecular characterization of *Kudoa* spp. found in commercially available marine fish: a possible cause of gastrointestinal symptoms of Japanese people taking raw fish slices. BIT' s 1st Annual World Congress of Microbes-2011, Beijing, China (Beijing International Convention Center), (2011. 8. 1).
2. 佐藤 宏: お刺身文化の危機か? クドア粘液胞子虫症. 第 33 回北海道大学獣医学学術交流基金群講演会, 札幌市(北海道大学獣医学部講堂), (2011. 11. 1).
3. 佐藤 宏: 身近な寄生虫の世界～食品と寄生虫～平成 23 年度獣医公衆衛生講習会(山口県獣医師会), 山口市(山口県獣医師会会館), (2011. 11. 5).
4. 佐藤 宏: 身近な寄生虫の世界～食品と寄生虫～. 第 41 回全国市場食品衛生検査所協議会全国大会講演, 山口市(山口市翠山荘), (2012. 1. 20).
5. 佐藤 宏: 身近な寄生虫と食中毒. 公益法人愛知県獣医師会公衆衛生部会学術勉強会, 愛知県蒲郡市三谷町(サンヒルズ三河湾), (2012. 08. 05).
6. 佐藤 宏: 身近な寄生虫と食品-粘液胞子虫、住肉胞子虫、アニサキスを中心として一. 岡崎市保健所開設 10 周年記念事業(食品衛生月間)特別講演会, 愛知県岡崎市 (岡崎市福祉会館), (2012. 08. 06).
7. 佐藤 宏: 生鮮海産魚の生食を原因とするクドア食中毒. 平成 24 年度獣医学術学会北海道地区学会シンポジウム, 江別市 (酪農学園大学), (2012. 09. 06).
8. 佐藤 宏: 生活環境と寄生虫症. 山口県獣医師会平成 24 年度公衆衛生講習会, 山口市 (山口県獣医師会館), (2012. 11. 17).
9. 佐藤 宏: 身近な寄生虫と食品-粘液胞子虫、住肉胞子虫、アニサキスを中心として一. 岐阜市保健所: 食の安全に関する講演会, 岐阜市 (岐阜市福祉健康センター), (2012. 11. 22).
10. 李 迎春, 都築秀明, 佐藤 宏, Lea Jimenez, 大西貴弘, 小西良子: キハダマグロ寄生 *Kudoa neothunni* にみられた rDNA 二型性. 第 156 回日本獣医学会学術集会, 岐阜市(岐阜大学), (2013. 09. 20-22).
11. 李 迎春, 友知久幸, 迫田菜摘, 山木誠也, 佐藤 宏: 山口市内のドンコに寄生する *Myxobolus* 属粘液胞子虫. 第 156 回日本獣医学会学術集会, 岐阜市(岐阜大学), (2013. 09. 20-22).
12. Binh Thi Tran, 李 迎春, Patrice Makouloutou, 山木誠也, 友知久幸, 迫

- 田菜摘, 佐藤 宏: ベトナム産ニホンイトヨリダイから検出された粘液胞子虫 *Unicapsula pyramidata*. 第156回日本獣医学会学術集会, 岐阜市(岐阜大学), (2013.09.20-22).
13. 李 迎春, 都築秀明, Lea Jimenez, 大西貴弘, 小西良子, 佐藤 宏: キハダマグロ筋肉寄生の *Kudoa neothunni* および *Kudoa thunni* の種内 rDNA 遺伝子の変異について. 第69回日本寄生虫学会 西日本支部大会, 高松市(香川大学), (2013.10.19-20).
14. Sato H, Li Y-C, Jimenez LA, Tsuduki H, Ohnishi T, Sugita-Konishi Y: Two genetic lineages of *Kudoa neothunni* in tunas (*Thunnus* spp.) distributed in the western Pacific Ocean and consumed in Asian countries. Aquaculture 2013, Poster presentation [P2.061], Las Palmas, Gran Canaria, Spain, (2013.11.3-6).
15. 佐藤 宏, Ying-Chun Li, Bin Thi Tran, 大西貴弘: 瀬戸内産マハゼからの国内未記録 *Unicapsula* sp. ならびにベトナム産ニホンイトヨリダイからの *Unicapsula pyramidata* について. 第83回日本寄生虫学会大会, 松山市(愛媛大学), (2014.03.27-28).
16. Ying-Chun Li, 友知久幸, 山木誠也, 佐藤 宏: 山口市内の淡水魚ドンコの筋肉寄生 *Myxobolus* sp. と腸壁寄生の *Cardimyxobolus* sp. について. 第83回日本寄生虫学会大会, 松山市(愛媛大学), (2014.03.27-28).

総合研究（分担）報告書

獣肉中の危害物質の解析とその検査法ならびに
野生動物肉の食品危害性に関する研究

鎌田 洋一

平成 23～25 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）

総合研究（分担）報告書

獣肉中の危害物質の解析とその検査法ならびに野生動物肉の食品危害性に関する研究

分担研究者 鎌田 洋一（岩手大学農学部 共同獣医学科）

平成 14 年ころから認知され始めた原因不明食中毒の中で、獣肉が共通食になっている事例があり、検討の結果、馬肉に含まれる住肉胞子虫の 1 種 *Sarcocystis fayeri*（和名 フェイヤー住肉胞子虫）が病因物質であることが明らかになった。本分担研究では、*S. fayeri* が持つ、下痢誘発活性を示す物質について解析した。また、住肉胞子虫が家畜を含む、各種の動物に寄生することから、野生動物肉の危害性について調査研究を行った。さらに、住肉胞子虫の遺伝子検査法を、病因論的観点から、質的に向上させる検査法の開発を目指した。馬肉食中毒における下痢症状は、*S. fayeri* のブラディゾイト中に含まれる、病原タンパク質によって誘発されることを明らかにした。同タンパク質をコードする遺伝子をクローニングした。同病原タンパク質は 118 個のアミノ酸で構成されており、組換えタンパク質に下痢誘発活性が認められた。野生のシカは駆除と同時に食肉転用が広まりつつある。シカ肉を喫食して食中毒症状を呈した有症苦情事例が発生し、シカ肉中に住肉胞子虫、および、上記毒性タンパク質と免疫学的性状が一致するタンパク質の存在を認め、野生動物肉に対して住肉胞子虫の危害性を考慮する必要があることを認めた。住肉胞子虫に対する遺伝子検査法は、18S rRNA 遺伝子という種の同定に利用される遺伝子を対象として構築されており、病原性に関する遺伝子を対象としていなかった。上記毒性タンパク質の一部を標的に、また、厚生労働省が通知した方法論を尊重して 16S rRNA 遺伝子の同時検出法を検討したところ、両者の検出が可能な条件を見出した。今後、精密な条件設定を行い、食中毒診断や獣肉の安全性を検査する方法の一つとできる可能性が示された。

A. 研究目的

近年、食後数時間程度（4～8 時間）で一過性の下痢や嘔吐が起り、翌日には回復するといった比較的軽症の有症事例が全国的に報告されている¹⁾。厚生労働省がこの

ような事例について全国調査を実施したところ、患者が摂取した共通食として生食用鮮魚介類以外では馬刺しが含まれていた事例があり、有症事例に関連した馬刺しの残品から住肉胞子虫の 1 種である *Sarcocystis fayeri* の感染が認められた。

平成24年8月厚生労働省は、生鮮馬肉を喫食後、短い潜伏期で下痢、嘔吐、吐き気、腹痛を症状とする事例において、馬肉から *S. fayeri* が検出された場合、食中毒として報告するよう、発出した。*S. fayeri* には腸管病原性を担う、分子量 15K Da の毒性タンパク質があり、馬肉食中毒の直接の病原性タンパク質であることが明らかにされている²⁾。

住肉胞子虫は筋肉内にシストを形成する原虫で、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウマ等の家畜の筋肉部位に寄生している³⁾。住肉胞子虫の寄生は家畜に限られたものではなく、イノシシやシカ等野生動物にも寄生する。野生のシカについては *Sarcocystis* 属の寄生状況が報告されている^{4, 5, 6)}。最近では、シカなどの野生動物を食肉として有効活用する取り組みがある。ジビエ料理と称し、積極的なシカ肉の利用を産業化に結びつける試みが一部の自治体で、推進されている。

S. fayeri を検査する方法を厚生労働省は通知している⁷⁾。その方法は、虫体を顕微鏡下で検出ほか、住肉胞子虫がもつ、種を同定する際に多用される 18S rRNA 遺伝子を標的としている。本法は厚生労働省の指定のため、科学行政的には重要な意義を有する。一方、病因論的には、直接の病原性物質を対象としての検査ではなく、疾病診断の観点からは不十分との指摘がある。

本分担研究では以下の点について検討した。*S. fayeri* が示す病原性を担う物質を同定し、その性状を解析した。住肉胞子虫が持つ病原性は、馬肉に関してのみ認知され、証明されたが、他に多くの動物種が住肉胞子虫の中間宿主となるため、全国の食

中毒検査者に関心を呼んだ。シカ肉を喫食して食中毒症状を発した事例に遭遇した。患者喫食シカ肉中に住肉胞子虫を認め、有症苦情事例として解析を行った。厚生労働省が通知した遺伝子検査法に加え、病因論的に補完した、病原物質を標的とした住肉胞子虫遺伝子検査法の改良を試みた。

B. 研究方法

1. *S. fayeri* 毒性タンパク質遺伝子のクローニングと性状解析

馬肉より *S. fayeri* のシストを 50 収集し、タンパク質を抽出した。ゲル濾過法により分子量分画を行った。従来の研究からわかっていた、分子量 15 KDa 付近のタンパク質を回収し、内部アミノ酸配列を調べた。

Degenerate primer を用いた、PCR 法を用い、上記毒性タンパク質の cDNA をクローニングした。pGEM-T ベクターに挿入後、塩基配列を明らかにした。また、組換えタンパク質作製の pHAT ベクターに挿入し、大腸菌を用いての、組換え毒性タンパク質作出システムを構築した。各種の性状を解析した。

2. シカ肉を喫食しての有症苦情事例の解析

平成 23 年 2 月、滋賀県で発生した事例を解析した。既知の食中毒細菌、食中毒ウイルスが検出されなかった事例で、シカ肉が共通食になっており、原因不明食中毒に相当した。シカ肉の、住肉胞子虫検査を実施

した。顕微鏡検査、遺伝子検査に引き続き、顕微鏡下での種の同定、また、*S. fayeri* が持つ毒性タンパク質に対しての抗体も用いての検査を実施した。

3. 住肉孢子虫に対する遺伝子検査法の改良

厚生労働省が通知した、住肉孢子虫に関する遺伝子検査法は、同寄生虫の 18S rRNA 遺伝子を標的として構築されている。同遺伝子は、種の同定や遺伝学的系統樹作の作製を行う際に標的となる。感染症の診断や病原体の検出時には、通常、その微生物の病原性を担う物質に対して検査を行い、疾病との直接的関係を証明することを行う。

S. fayeri の毒性タンパク質遺伝子の塩基配列を参考にし、また、科学行政の重要性も鑑み、18S rRNA 遺伝子と毒性タンパク質遺伝子の両方を検出する遺伝子検査法を構築した。

18S rRNA 遺伝子検出のための、PCR 用プライマーは、厚生労働省が通知した塩基配列そのものを利用した。毒性タンパク質の遺伝子解析から、同遺伝子が 2 つのエクソンからなることがわかり、PCR 法を用いて、各エクソンと、18S rRNA 遺伝子の双方を検出できる条件を検討した。

C. 研究結果

1. *S. fayeri* 毒性タンパク質遺伝子のクローニングと性状解析

S. fayeri ブラディゾイト由来のタンパ

ク質から、分子量 15 KDa タンパク質の内部アミノ酸配列を同定した。その配列をタンパク質データベースで検索をしたところ、トキソプラズマおよびコクシジウムが持つアクチン束調整タンパク質と相同性があることが示された。決定できたアミノ酸配列を塩基配列に転化したオリゴ DNA をプライマーとして PCR を行い、15 KDa タンパク質の cDNA を増幅し、クローニングベクターに挿入した。全塩基配列を決定した。全長の塩基配列を用いて DNA データベースを検索したところ、アミノ酸配列での検索と同様、コクシジウムおよびトキソプラズマの、アクチン脱重合因子と高い相同性があることが示された。

組換えタンパク質を作製するプラスミドである pHAT ベクターに、15 KDa タンパク質 cDNA を挿入し、大腸菌 BL21 株の形質転換を行い、Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside によってタンパク質の発現を誘導した。TALON カラムクロマトグラフィーの手法で、菌体から組換えタンパク質を精製した。ウサギ腸管ループレストは、検査対象物質の、下痢毒性を証明する動物実験モデルであるが、作製した組換え 15 KDa タンパク質を試験したところ、その下痢原性が証明された。また、組換え 15 KDa タンパク質に重合アクチンを単量体化させる活性があったことから、本タンパク質はアクチン脱重合因子であることが証明され、*S. fayeri* の毒性タンパク質は、フェイヤー住肉孢子虫脱重合因子、*S. fayeri* Actin

Depolymerizing Factor (S. f ADF)との呼称が適切となる。

2. シカ肉を喫食しての有症苦情事例の解析

患者喫食残品のシカ肉について、顕微鏡による虫体の検を試みた。肉片からDNAを抽出し、厚生労働省の通知どおりの手法で住肉胞子虫に対する遺伝子検査を実施した。シカ肉からは、紡錘形、三日月形のブラディゾイトを含んだシストが検出された。シストの形態から、*S. wapici*、*S. sybillencis*、および未同定の大型シストが検出された。肉片から抽出したDNAに対し、遺伝子検査を実施したところ、非特異的なバンドも検出されたが、厚生労働省が通知する 1,100 bp のバンドの増幅が認められた。

肉片の組織標本を作製し、毒性タンパク質に対する抗体を用いて観察したところ、毒性タンパク質と免疫学的交差性を示すシグナルが観察され、シカ肉中には、住肉胞子虫由来の食品危害性があることが確認された。

3. 住肉胞子虫遺伝子検査法の改良

S. fayeri の毒性タンパク質の遺伝子構造を検討した。毒性タンパク質遺伝子は 2 個のエクソンから構成されていた。5' 端は 250 bp (エクソン-1)、3' 側のエクソンは 150 bp (エクソン-2) からなっていた。両エクソンを単一で検出できる PCR 条件を検討した。アニーリング温度がそれぞれ異なる

り、エクソン-1 は 66°C、エクソン-2 は 60°C が適していた。18S rRNA 遺伝子と各エクソンとの同時検出を試みた。PCR によるエクソン-1 の増幅は明瞭だったが、18S rRNA 遺伝子の増幅は認められなかった。一方、エクソン-2 と 18S rRNA の同時検出は可能だった。ただし、至適条件ではなく、今後の検討が必要だった。

D. 考察

原因不明食中毒の一つ、馬肉が共通食の事例について解析し、馬肉中に含まれる住肉胞子虫の 1 種が原因であることを明らかにした。同胞子虫は *S. fayeri*、和名フェイヤー住肉胞子虫で、ウマは中間宿主となる。馬肉食中毒の主症状の下痢を発症させる物質の探査を行った。*S. fayeri* のシスト (ブラディゾイト) 抽出タンパク質中から毒性タンパク質を分離した。アミノ酸配列と塩基配列の相同性を利用し、同毒性タンパク質の cDNA をクローニングした。同タンパク質の組換え体を作製し、実験的に、調整した毒性タンパク質に下痢原性を確認した。同タンパク質は、住肉胞子虫が属するアピコンプレックス門原虫が保有するアクチン脱重合因子と相同性を示した。組換え毒性タンパク質は、脱重合活性を示した。以上から、馬肉を共通食とする食中毒は、フェイヤー住肉胞子虫のアクチン脱重合因子によって、その下痢症状が引き起こされると結論した。学術的には、寄生虫毒素性食中毒という新しい食中毒カテゴリーを提

示したことになる。

住肉胞子虫は、草食動物を中間宿主とする原虫で、ウマだけでなく、ブタ、ヤギ、めん羊といった家畜、さらには、シカ、イノシシなどの野生動物にも寄生する。増えすぎた野生動物や、人里へ降りてきた野生動物の駆除と利用を両立させる試みが、我が国のいろいろな自治体で進んでいる。

馬肉食中毒の解析情報が周知される中、シカ肉を共通食とする有症苦情事例が起こった。食中毒細菌やノロウイルスが陰性の事例で、シカ肉の検査の結果、3種類の住肉胞子虫が検出された。それらの住肉胞子虫の種は、ウマに寄生する *S. fayeri* とは異なるが、*S. fayeri* の毒性タンパク質であるアクチン脱重合因子と抗原性が一致する種であることが確認された。これらの事実は、野生動物肉に住肉胞子虫の危害があることを実証するもので、シカ、イノシシ等、食用に転用される動物肉の安全性確保を考える際、寄生虫性食中毒も、重要な検討項目となることを示唆している。

馬肉中の住肉胞子虫についての遺伝子検査法が厚生労働省より通知されている。同遺伝子検査法は、住肉胞子虫の 18S rRNA を標的に構築されている。18S rRNA 遺伝子は、その塩基配列により、種の同定や遺伝学的系統樹作製に頻用されている。一方、感染症の診断や、病原性微生物の存在の証明には、それらが持つ、病原性因子についての検証を行い、病因論的な意義を立脚させるのが常である。厚生労働省の通知に

は、科学行政的に重要で、住肉胞子虫の遺伝子検査の場合でも、18S rRNA 遺伝子を検出する必要はある。そこで、18S rRNA と毒性タンパク質遺伝子の両方を同時に検出する PCR による遺伝子検査法の開発を試みた。毒性タンパク質の遺伝子は2分されていて、3'側のエクソンと 18S rRNA 遺伝子の同時検出の可能性が認められた。

獣肉中にある危害性物質の解析ならびに野生動物の住肉胞子虫に対する危害性について検証した。また、住肉胞子虫の遺伝子検査法に、病因論的意義を追加できる可能性を見出した。これらの知見は、生鮮食品を共通食とする食中毒の制御や、畜肉食品の安全性確保のための行政的施策や学問的貢献に寄与するものと考えられる。

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. 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
3. 遠藤卓郎、黒木俊郎：ザルコシスチス（住肉胞子虫）。食中毒予防必携 第 2 版。

p290-293、社団法人 日本食品衛生協会、東京、2007

4. 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)
5. 斉藤守弘、柴田 穰、久保政則、板垣 博：野生ホンジョウジ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)13)
6. 斉藤守弘：住肉胞子虫および住肉胞子虫症。日獣会誌、42、383 - 388(1989)
7. 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

F. 研究発表

論文発表

1. 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
2. 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

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

総説発表

1. 鎌田洋一：寄生虫毒素性食中毒 - 馬に寄生する *Sarcocystis fayeri* の構成タンパク質が食中毒を誘発する -、日本獣医師会雑誌、65、705 - 710、2012
2. 鎌田洋一：ザルコシステイスが含まれる馬肉による食中毒、日本食品微生物学雑誌、29、47 - 52、2012

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。

総合研究（分担）報告書

馬肉生食による食中毒の病因物質とされる

Sarcocystis fayeri のゲノム解析

野崎 智義

平成 23～25 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）

総合（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。生鮮馬肉からサルコシストを得て、ChipSeq の変法を用いてライブラリを構築した。作成したライブラリより Illumina HiSeq2000 シーケンサーを用いて読み込みを行った結果、1.67 億リード、16.7Gbase の配列が得られた。CLC Genomics Workbench を用いて *de novo assemble* を行った結果、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。カバレッジは 50 倍あり、ペアードエンドリードのペアーがよく維持されており、ゲノム全域の配列がほぼ取得できたと考えられた。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 *Toxoplasma 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ことから、ここでアピコプラストゲノムに着目した。アピコプラストゲノムの配列は 3 つのコンティグに分かれていたことから、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、*Toxoplasma* に比べると、SSU rRNA 遺伝子の 1 コピーが少ない分、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、アピコプラストゲノムには 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。植物等で必須遺伝子ではないとされる、*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、*Sarcocystis* 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。

当初、生鮮馬肉から得た 12 サルコシストより核酸を抽出したが、核酸 DNA が少なかったことから、GenomiPhi で増幅を行った後に、ライブラリを構築した。このライブラリより Illumina GAIIx シーケンサーを用いて 3600 万リード、2.9Gbase を取得した。ABYSS を用いて *de novo* assemble を行った結果、最終的に N50 が 57bp、最大コンティグ長が 7,639bp、総塩基長が 19,245,883bp、コンティグ数 318,497 本が得られていた。近縁の *Toxoplasma* のゲノムサイズ 60Mbase に比べて、1/3 の 20Mbase 弱に留まり、データ量が不足していた。その後に未報告の公表資料ではあるが、*S. fayeri* に近縁の *S. neurona* のゲノムプロジェクトが米国で進行していることが判明し、そのゲノムサイズは 124Mbase であると見積もられていた¹⁾。また、GenomiPhi による増幅のバイアスも心配された。従って、新鮮馬肉から新たにサルコシストを得て、GenomiPhi に頼らないライブラリの構築と、十分量のデータ取得を目指すこととした。

S. fayeri の塩基配列は登録がなく、配

列の評価には下痢症状の誘発が推測される 15kDa タンパク質の配列、18S rRNA 遺伝子が足がかりになる。近縁の *S. Neurona* はゲノム解析が進行中とされるが、配列の登録と報告がなされていない。近縁でゲノム解析が進んでいる *T. gondii* の配列が有効と考えられる。

Sarcocystis と *Toxoplasma* は apicomplexa に属し、apicomplexa は細胞小器官のアピコプラストを有する特徴がある。アピコプラストは、紅藻の二次共生によって形成された、退化した色素体である^{2,3)}。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。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^{2,3)}。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。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)、脂肪酸生合成阻害剤の 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)、イソプレノイド生合成阻害剤の 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。これら薬剤の *S. fayeri* に対する有効性に興味をもたれるところで、特にアピコプラストゲノムに着目して解析を進めることとした。

B. 研究方法

Sarcocystis が含まれる馬肉試料として、熊本県の馬肉生産事業者より生鮮馬肉を取得した。ここから切り出した一部馬肉より、

22G 注射針を用いて馬肉を切削し、実体顕微鏡下でザルコシストを取り出した。小分けした状態で冷凍保存し、一部試料より核酸抽出を行い、残りは将来の解析に備えた。

核酸抽出に、QiaAmp DNA mini kit (Qiagen) を使用した。核酸定量には Qubit dsDNA HS Assay Kits (Invitrogen) を使用した。試料に含まれる SSU rRNA のコピー数をリアルタイム PCR 法で確認した⁴⁾。

ライブラリ構築に、ChIP-Seq DNA Sample Prep Kit (Illumina) を使用した。ただし、ゲノム DNA とタンパク質の相互作用、クロスリンク固定、免疫沈降の処理を行わず、単にゲノム DNA の分断とライブラリ構築のために使用した。

次世代シーケンサーに MiSeq ならびに HiSeq2000 (いずれも Illumina) を使用した。ライブラリ構築とシーケンスリード読み取りは、Operon にて行った。*de novo* assemble に CLC Genomics Workbench (Ver. 5.5 以降) を使用した。計算条件は、当初は初期設定で行ったが、最終的には最小コンティグ長を 500bp とし、アセンブル前のウマゲノムの除去は行わなかった。また、配列のトリム処理を厳密に行い、品質 0.01 (塩基の確度 99%) を指定し、長さ 50 未満の配列を破棄した。アセンブルには、ペアードエンドリードを限定して使用した。HiSeq の 100+100 のペアードエンドリード、MiSeq の 150+150 のペアードエンドリードを同時に用いて、混合アセンブルを行った。

SSU rRNA の PCR には、Pritt ら (2008) の報告したプライマー⁵⁾ を使用し、事例残品と、本研究で使用した抽出 DNA を鋳型に使用した。古典サンガーシーケンスにより直接塩基配列決定を行った。病原性との関連が推測されている 15kDa タンパク質の配列を本研究班の共同研究者より入手した。

アピコプラストゲノムの構造決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。近縁の *T. gondii*

のアピコプラスト配列 (U87145、以下 U87145 と略) と、*Eimeria tenella* (AY217738) を参考に用いた。これらを参考にコンティグの並びを予測し、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た。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 を使用して、接続部分にまたがって増幅するプライマーを設計し、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分離し、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 を参考に、マニュアル操作で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、tRNAscan-SE (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>) を使用して確認した⁶⁾。幾つかは tRNAscan-SE の結果に従って数塩基の位置を調整した。

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 *E. 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

ゲノム配列決定に使用する *Sarcocystis* が、食中毒の事例残品と同じ遺伝子を有することを、SSU rRNA の一部配列 500bp 弱を用いて確認した。結果には示さないが、配列が 100% 一致したことから、今回取得した *Sarcocystis* は以前のものと同等とみなした。

方法に従い、ライブラリ構築を行い、MiSeq により試験的に配列を取得した。MiSeq からは 1060 万リード、1.59Gbase の配列が得られた。*S. fayeri* の 15kDa タンパク質遺伝子と SSU rRNA の配列が含まれ、これら配列のカバレッジはそれぞれ x5, x24 であった。これとは別に、リードを一部抜粋して公共データベースに対して Blastn 検索を行い、近縁の *Toxoplasma* 等にヒットした。以上の結果、取得した配列は目的の *Sarcocystis* の配列と考えられ、続けて HiSeq による読み取りを実施した。同じラ

イブラリより、HiSeq からは 1.67 億リード、16.7Gbase の配列が得られた。*de novo assemble* を行い、
N50(bp): 3,349
Max(bp): 220,145
Total (bp): 126,606,435
Contigs: 68,209
の結果が得られた。

S. neurona のゲノムサイズ 124Mb に対しては、同程度の塩基長が得られた。病原性疑いの 15kDa タンパク質の配列は、12kb 強のコンティグとして、アセンブルの結果に含まれていた (図 1A)。上流側、下流側に十分な長さの配列が続いており、ペアードエンドリードのペアーの関係が良好に維持されており (図 1B)、本遺伝子の検討に有用と考えられた。

個々のコンティグのカバレッジとコンティグ長の関係をプロットすると、50 倍のカバレッジのコンティグ長が大きく伸びている様子が得られた (図 2)。前述の、15kDa タンパク質の配列のカバレッジも、50 倍と揃っていた。このことから、ライブラリの構築は物理的なゲノム DNA の断片化により均一に行われ、アセンブルされた *Sarcocystis* の配列は一定のカバレッジに集まっていると考えられた。実際、ペアードエンドリードのペアーがよく維持されているコンティグが 50 倍のカバレッジに多数存在した。(表 1、2)。

コンティグ長が 10kb 以上と長く、カバレッジが数千倍と大きい 2 点については (図 2)、*Toxoplasma* のアピコプラストゲノムに近縁の配列であること、ウマのミトコンドリアゲノムであることが相同性検索の結果判明した (図 3A、B)。それぞれカバレッジとサイズは x1,700 倍で 20kb、x2,500 倍で 16kb であった。アピコプラストゲノム (U87145 等) には rDNA の配列が複数含まれており、それが理由でコンティグが 1 本につながらず、PCR と古典サンガーシーケンスによるギャップクローニングが必要な状態であった。ウマミトコンドリアゲノム

については、リードマッピングを行うことで登録配列（JN398450）と100%（16657bp/16657bp）一致した。このウマミトコンドリアゲノム配列は、馬肉の由来の推定に有用と考えられた。

近縁種である *T. gondii* のアピコプラストゲノムの配列（U87145）を参考に、*S. fayeri* アピコプラストゲノムの構造を決定した。*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とその近辺の領域、SSU rRNAとその近辺の領域、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4）。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3）。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5）。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（図6）。

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6）。作成したアライメントはお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7）。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^{2, 7)}。

tRNAのアノテーションは、tRNAScan-SEの結果に従った。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コピーと一緒に無くなった（図8A）。また、別の場所のtRNA-Metが欠失していた（図8B）。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4）。

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8C）。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^{8, 9)}。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⁹⁾。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。

比較の参考にするため、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。

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5、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。繰り返しになるが、*S. fayeri* での変化は、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 8A) の一方、tRNA-Met の一つ (図 8B)、*rpl36* (図 8C) が欠失していた。従って、*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。薬剤の標的となる遺伝子が残っており、近縁種で有効な薬剤の、*S. fayeri* に対する有効性が期待された。

D. 結論

生鮮馬肉からザルコシストを得てライブラリを作成し、次世代シーケンサーによりリードデータを取得した。HiSeq から 1.67 億リード、16.7Gbase の配列が得られた。CLC Genomics Workbench を用いて *de novo* assemble を行い、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 本が得られた。近縁の *S. neurona* の 124Mbase に対して、同等の配列長であった。カバレッジは 50 倍あり、ペアードエンドリードのペアーがよく維持されており、ゲノム全域の配列がほぼ取得できたと考えられた。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 *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。アピコプラストは生存に必須と考えられていることから、アピコプラストに着目し、その構造配列を決定し、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決定した。完成したゲノムの大きさは 32,702bp で、*Toxoplasma* に比べると、SSU

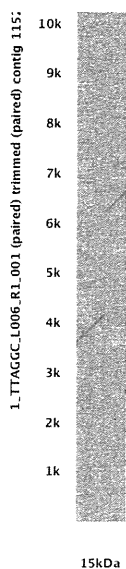
rRNA 遺伝子の 1 コピーが少ない分、2kb ほど小さかった。他のアピコプラストゲノムと同様に AT の割合が 79%と著しく高く、終止コドンの UGA は Tryptophan として読まれていると想像された。アノテーションの結果は、tRNA 遺伝子が 26、rRNA 遺伝子が 3、*rps* 遺伝子が 10、*rpl* 遺伝子が 6、その他の遺伝子に ORF B、C、D、E、F、*rpoB*、*rpoC1*、*clp*、elongation factor-Tu、*ycf24* homolog が含まれていた。*rpl36* 遺伝子が欠失していたが、薬剤の標的となる遺伝子が残っており、近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。

E. 参考文献

1. DK. Howe. Sarcocystis neurona Genome Sequencing Project. http://www.ca.uky.edu/gluck/HoweDK_Proj_GenSeq.asp (2013 年 4 月 15 日 確認)
2. Sato S. The apicomplexan plastid and its evolution. Cell Mol Life Sci 2011;68:1285-96.
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. 食品中の有害微生物を対象としたライブラリーシステム等の構築、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 (研究代表者小西良子)、平成 23 年度総括・分担研究報告書、p 151-161、2012.
5. Pritt B. et al., (2008) Detection of *Sarcocystis* parasite in retail beef: A regional survey combining histological and genetic detection methods. J. food Protection. 71(10):2144-2147
6. 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
7. Ohama T, Inagaki Y, Bessho Y, Osawa S (2008) Evolving genetic code. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 84:58-74
8. 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.
9. 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) 15kDa タンパク質



B) リードの状況

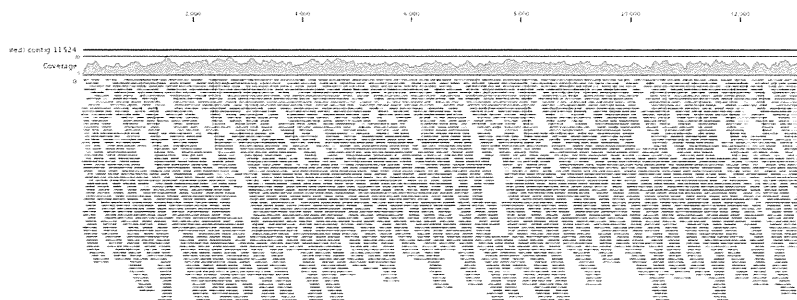


図 1 病原性疑いの 15kDa タンパク質の配列の検出

A: ドットプロットによる相同性の図示、横軸は基準となる 15kDa タンパク質の mRNA 配列、縦軸はコンティグの DNA 配列、左下から右上に伸びる直線が相同な部分を表し、途中で切れるのはイントロンによるもの。B: リードマッピングの結果、青い小さな横線は両鎖から読まれた配列が対応していることを表す。緑と赤は片側だけの場合、黄色は他の領域にも同じ配列がある非特異的な一致を表す。

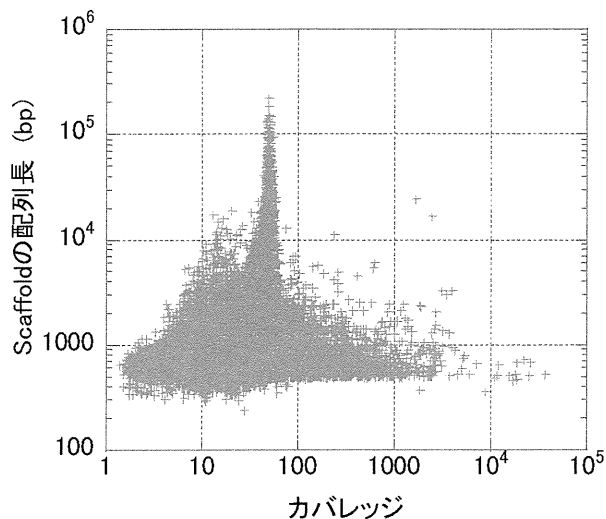


図 2 カバレッジとコンティグ (Scaffolds) 長のドットプロット

十字点 1 つがコンティグ 1 つを表し、縦軸はコンティグの長さ、横軸は各コンティグのカバレッジに対応する。