

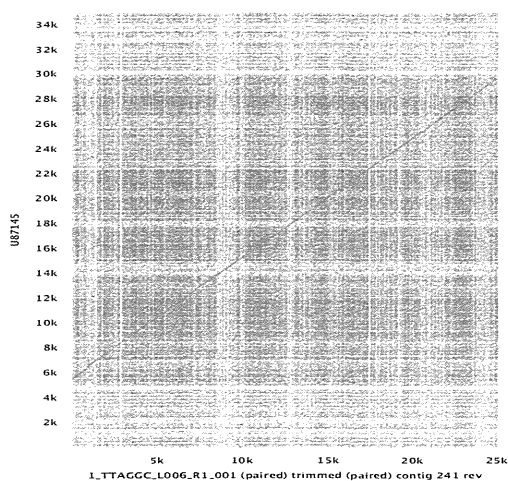
表 1 ペアードエンドリードのペアの関係が維持されたコンティグの例

コンティグ#	Consensus length	Total read count	Single reads	Reads in pairs	Average coverage
2056 m...	220145	110184	1408	108776	48.87
1464 m...	184414	92104	1882	90222	48.85
1174 m...	152026	77000	792	76208	49.48
1331 m...	147916	76472	1454	75018	50.70
167 ma...	139885	68959	963	67996	48.18
418 ma...	136441	67602	998	66604	48.28
1499 m...	132556	64101	1315	62786	47.12

表 2 ペアの関係が維持されなかったコンティグの例

コンティグ#	Consensus length	Total read count	Single reads	Reads in pairs	Average coverage
13394 ...	529	25149	18343	6806	4,461.47
9957 ma...	517	20440	18328	2112	3,690.79
3516 ma...	627	20630	15804	4826	3,112.36
17785 ...	835	16082	15650	432	1,813.69
3179 ma...	703	21884	15086	6798	2,996.57
6481 ma...	867	17564	14906	2658	1,916.90
3353 ma...	4537	19052	13320	5732	407.77
435 map...	2054	56164	13156	43008	2,696.46

A) *Toxoplasma* アピコプラスト



B) ウマミトコンドリアゲノム

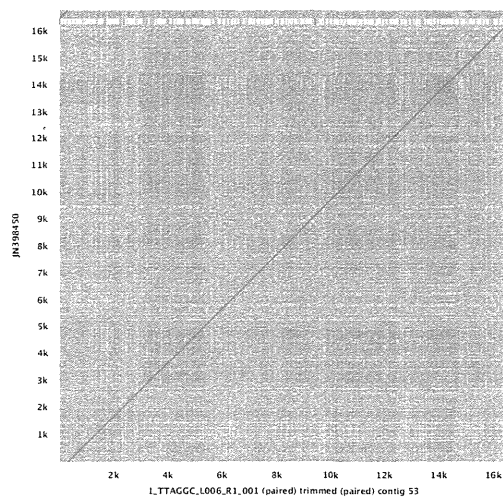
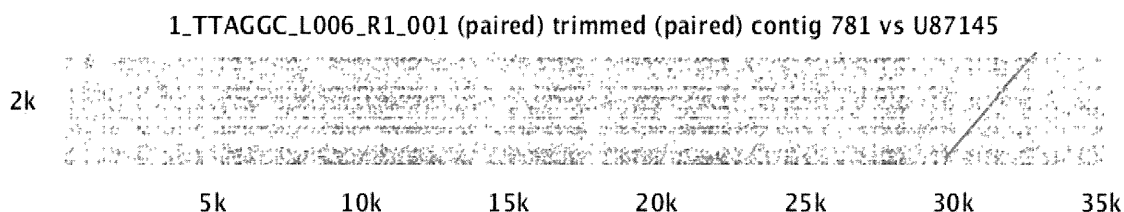


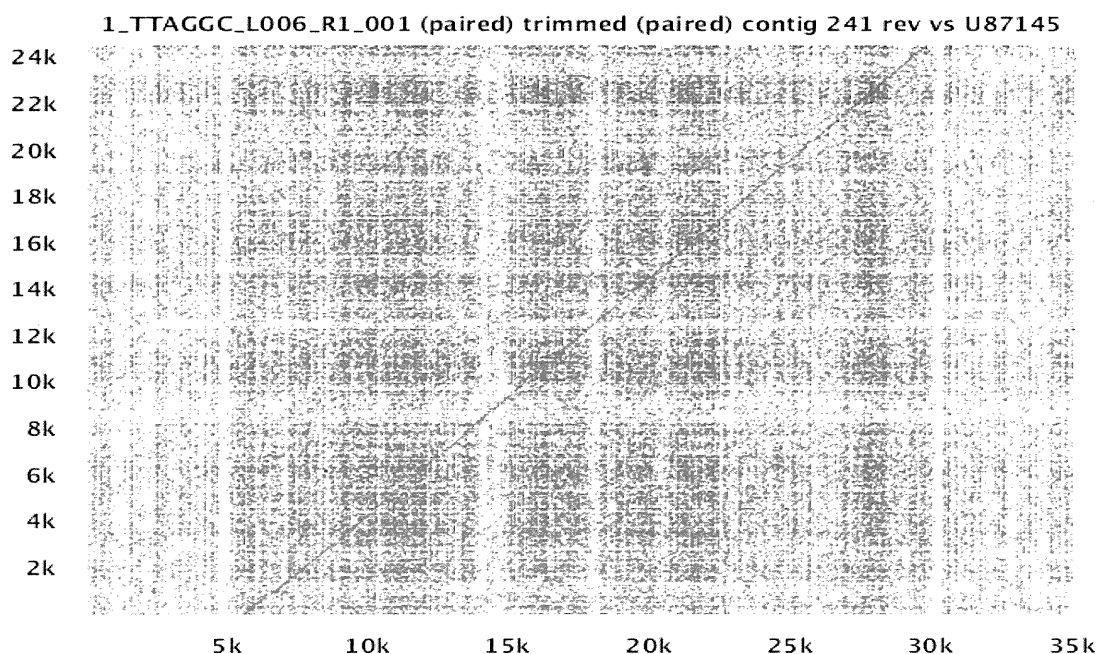
図 3 アピコプラストとウマミトコンドリアゲノムの相同性プロット

A)縦軸は *Toxoplasma* アピコプラストゲノム、横軸はサルコシステイスのコンティグ、B) 縦軸はウマミトコンドリアゲノム、横軸はサルコシステイスのコンティグ、左下から右上に伸びる直線が相同性を表す。

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)

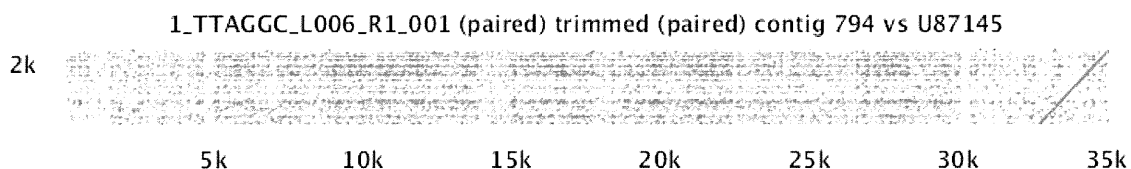


図4 *Toxoplasma gondii* アピコプラストゲノム配列と相同性のあったコンティグ
de novo assemble によって作成したコンティグと *Toxoplasma gondii* アピコプラストと相
 同性のある 3 つのコンティグの相同性をドットプロットで示した。縦軸が検出されたコン
 ティグ、横軸が *T. gondii* のアピコプラスト配列。左下から右上に伸びる直線が相同性を表
 す。

表 3 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

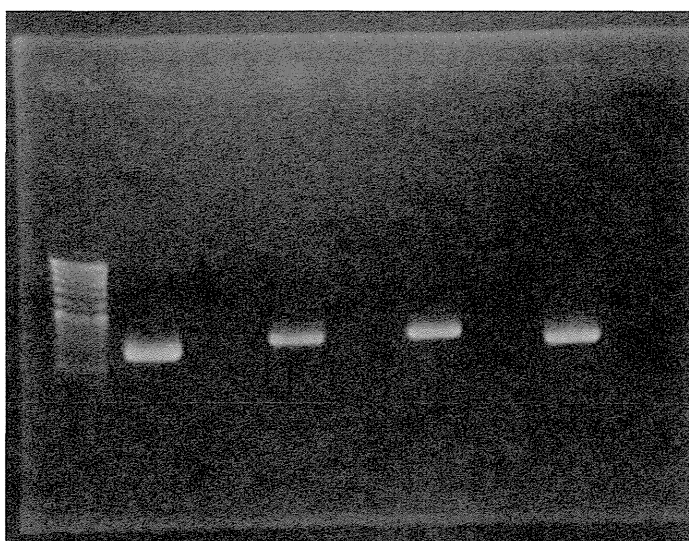


図 5 コンティグ間の接続確認用 PCR

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。

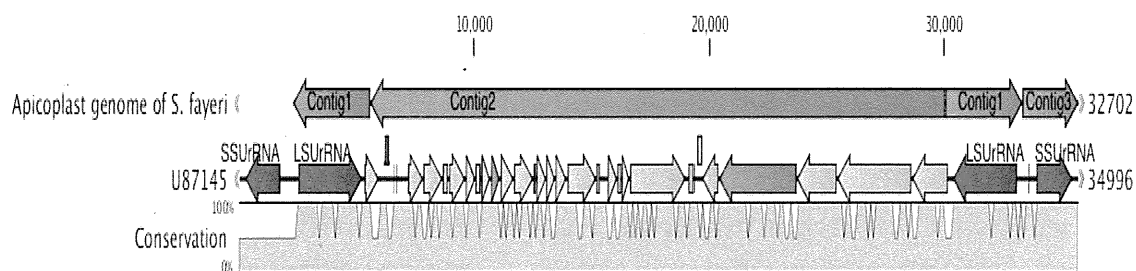


図 6 完成した *S. fayeri* アピコプラストゲノムの想定配列

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。

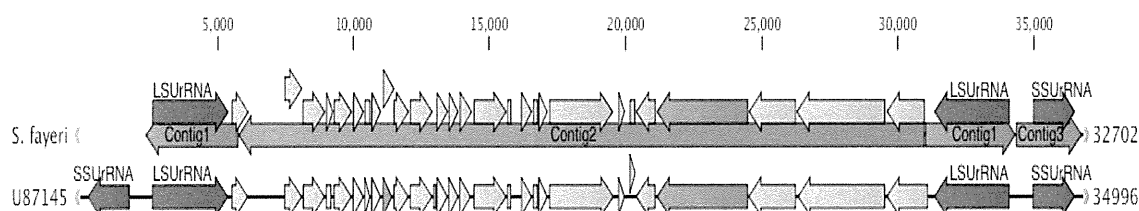
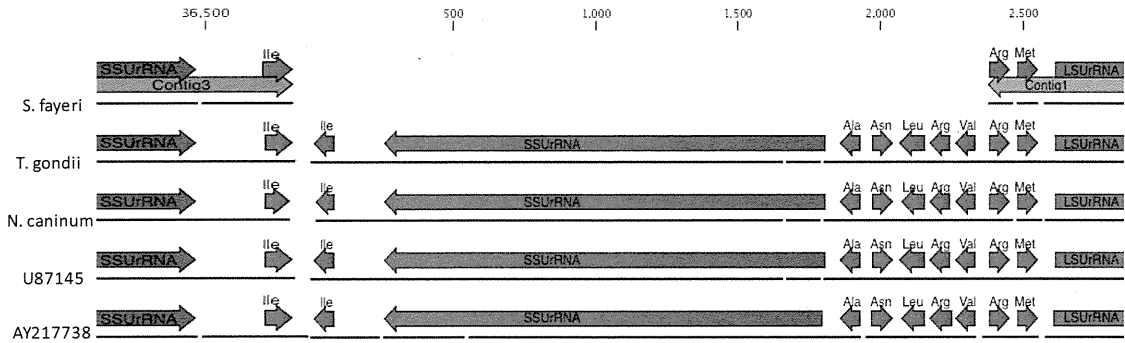


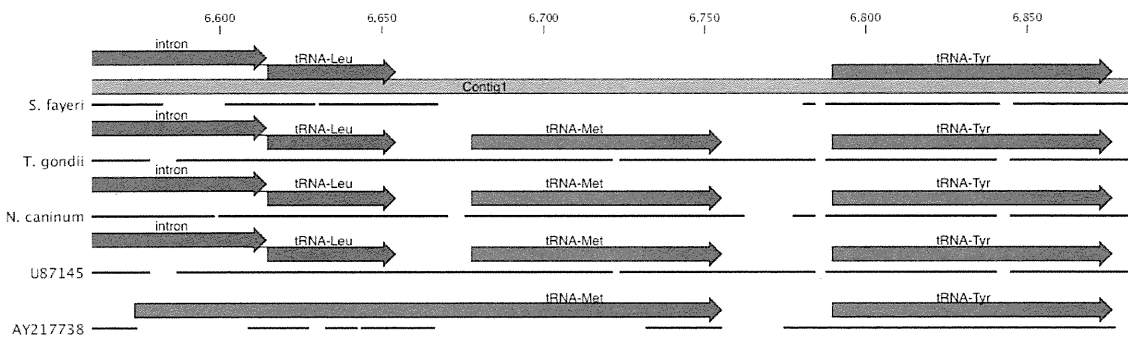
図 7 アノテーション付与

図 6 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

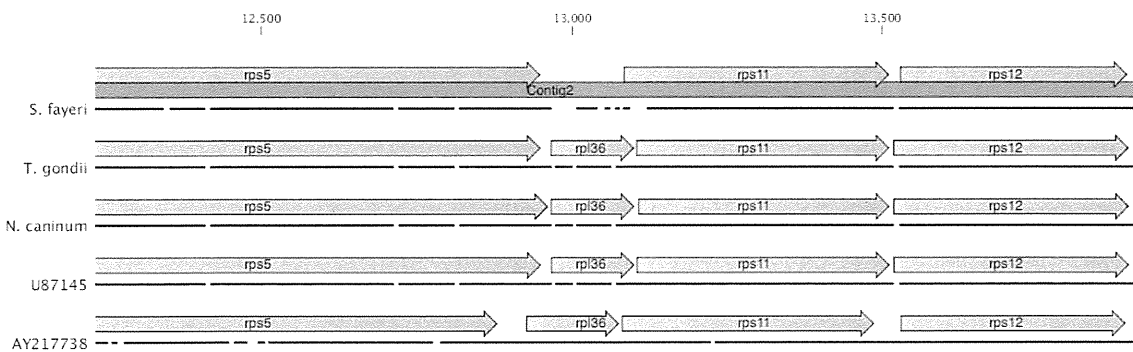


図 8 欠失した遺伝子領域の部分拡大

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 4 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。

**:*rpl4*上に検出されたtRNA-Lysはこの一覧から除いた。

表 5 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

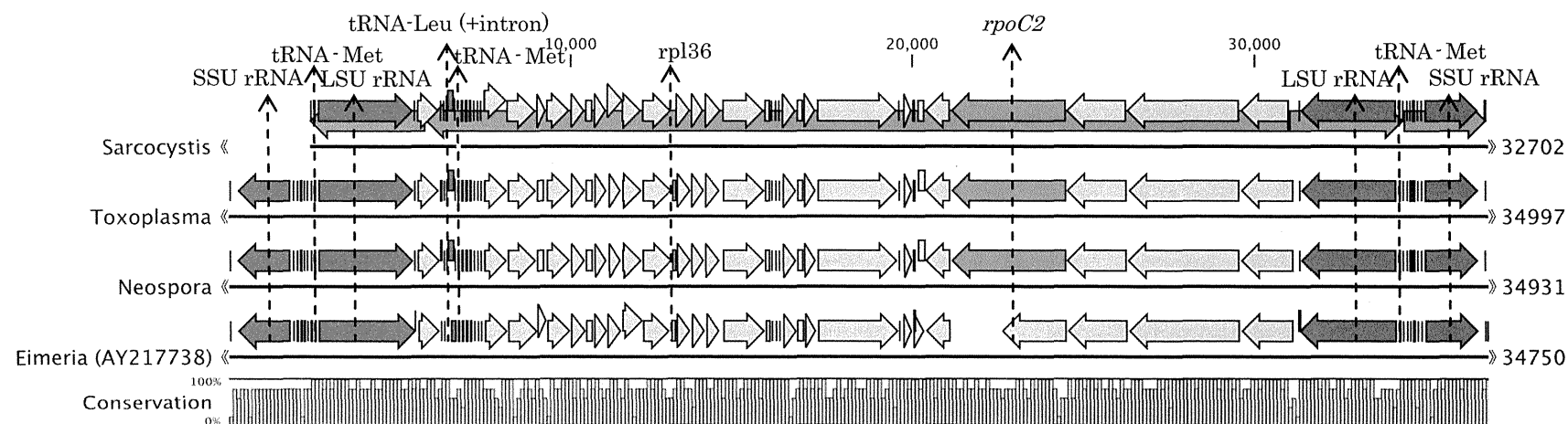


図9 アピコプラストゲノム配列のアライメントの全体模式図

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
Matsukane Y, Sato H, Tanaka S, Kamata Y, Sugita-Konishi Y	<i>Kudoa iwatai</i> and two novel <i>Kudoa</i> spp., <i>K. trachuri</i> n. sp. and <i>K. thunni</i> n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida), from daily consumed marine fish in western Japan.	Parasitol Res	108	913-926	2011
Kawaia, T., Sekizuka, T., Yahata, Y., Kuroda, M., Kumeda, Y., Iijima, Y., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y., Ohnishi, T.	Identification of <i>Kudoa septempunctata</i> as the causative agent of novel food poisoning outbreaks in Japan by consumption of <i>Paralichthys olivaceus</i> in raw.	Clinical Infectious Diseases	54	1046-1052	2012
Iijima, Y., Nakanishi, N., Furusawa, H., Ohnishi, T., Sugita-Konishi, Y.	Inter-Laboratory Validation and Applications of Quantitative Real-Time PCR for the Detection of <i>Kudoa septempunctata</i> in Olive Flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>).	Jpn. J. Infect. Dis.	65	436-438	2012
Li, Y.C., Sato, H., Kamata, Y., Ohnishi, T., Sugita-Konishi, Y.	Three novel myxobolid species of genera <i>Henneguya</i> and <i>Myxobolus</i>	Parasitol. Res.	111	819-826	2012

	(Myxosporea: Bivalvulida) from marine fish in Japan.				
Harada, T., Kawai, T., Jinnai, M., Ohnishi, T., Sugita-Konishi, Y., Kumeda, Y.	Detection of <i>Kudoa septempunctata</i> 18S ribosomal DNA in patient fecal samples from novel food-borne outbreaks caused by consumption of raw olive flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>).	J. Clin. Microbiol.	50	2964-2968	2012
Harada, T., Kawai, T., Sato, H., Yokoyama, H., and Kumeda, Y	Development of a quantitative polymerase chain reaction assay for detection of <i>Kudoa septempunctata</i> in olive flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>).	Int. J. Food Microbiol.	156	161-167	2012
Ohnishi, T., Kikuchi, Y., Furusawa, H., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y.	<i>Kudoa septempunctata</i> invasion increases the permeability of human intestinal epithelial monolayer.	Foodborne.Pathog. Dis.	10	137-142	2013
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.,	<i>Electron microscopic study of Kudoa</i>	Jpn J Infect Dis.	66	348-350	2013

Horikawa, K., Kamata, Y., Sugita-Konishi	<i>sempunctata</i> infecting <i>Paralichthys olivaceus</i> (olive flounder).				
Kikuchi, Y., Ohnishi, T., Furusawa, H., Kawai, T., Fukuda, Y., Yokoyama, H., Sugita-Konishi, Y.	ELISA Detection of <i>Kudoa sempunctata</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> (Myxosporaea: 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., Furusawa, H., Yoshinari, T., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y.	Inactivation of <i>Kudoa sempunctata</i> in Olive Flounder Meat by Liquid Freezing.	Biocontrol Science		印刷中	
Kamata Y., Saito M., Irikura D., Yahata Y., Ohnishi T., BEssho T., Inui T., Watanabe M., Sugita-Konishi Y.	A toxin isolated from <i>Sarcocystis fayeri</i> in raw horse-meat may be responsible for food poisoning.	J. Food Prot.		印刷中	
Li Y-C, Sato H	Two novel myxo-	Parasitol Res.		印刷中	

	sporean 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.				
大西貴弘	<i>Kudoa Septempunctata</i> を病因微生物とする食中毒	食品衛生研究	61	13-20	2011
大西貴弘	食中毒原因物質としての”クドア”に関する最新の知見	モダンメディア	58	205-209	2011
佐藤 宏	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	2011
鎌田洋一	寄生虫毒素性食中毒－馬に寄生する <i>Sarcocystis fayeri</i> 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
鎌田洋一	ザルコシスティ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
佐藤 宏	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	2-6	2012
佐藤 宏	随伴侵入生物としての脊椎動物寄生蠕虫.	地球環境	17	183-192	2012

大西 真、黒田 誠、八幡裕一郎	ゲノムから見た感染症 網羅的ゲノム解析によるヒラメ喫食に関連する嘔吐下痢症の原因物質の探索	NEUROINFECTION	17	35-41	2012
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
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 <i>Sarcosystis</i> 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
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	日本食品衛生学雑誌	54	198-203	2013
佐藤 宏	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	105-116	2013

