

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14850

研究課題名(和文) 病原微生物の潜伏環境としての原生生物の役割

研究課題名(英文) The role of protozoa in the emergence of diseases

研究代表者

中尾 亮 (Nakao, Ryo)

北海道大学・獣医学研究院・准教授

研究者番号：50633955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、環境中に生息するアメーバ等の原生生物が感染症の流行に重要な役割を担うのではないかと仮説を立て、原生生物が保有する微生物叢を解析した。タイ王国ナコーンラーヨック県で環境水および土壌を採取し解析に供した。その結果、各サンプルで約200属を超える細菌群を検出したが、当地で流行する感染症の病原体は検出されなかった。真核生物叢解析では得られた配列のほとんどが藻類由来のものとなった。ペプチド核酸を用いて、優占する生物由来の配列の増幅を抑制する解析系の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this project was to understand the role of protozoa in the emergence of diseases by analyzing microbial diversity harbored by protozoan population in the environment. Water and soil samples were collected in Nakhon Nayok, Thailand and subjected to high-throughput sequencing analysis. More than 200 different bacterial genera were obtained in each sample. However, there was no pathogenic bacterial lineage detected in the analyzed samples. In the eukaryote diversity analysis based on 18S ribosomal RNA (rRNA) amplicons, we found that most of the reads obtained were from algae but not from protozoa. In order to reduce the reads from specific organisms in 18S rRNA PCR, we developed a blocking PCR method using a PNA (Peptide Nucleic Acids) specifically designed for target organisms. This method can be applied to future studies to analyze protozoan diversity in the samples from disease endemic areas.

研究分野：感染症

キーワード：原生生物 細菌叢 真核生物叢 タイ ペプチド核酸 PNA

1. 研究開始当初の背景

自由生活性アメーバなどの原生生物は、土壌、水環境、動物体内など様々な環境に広く存在している。その生活様式は微生物を食食し活発に増殖する栄養体のステージと、乾燥や栄養状態の悪化により被囊し、休眠状態となるシストのステージからなる。一部の微生物は、原生生物に食食された後の消化機構を回避し、共生微生物として原生生物内にとどまることが知られている。この現象はマクロファージの食食・消化からの回避メカニズムと極めて類似することから、原生生物内の微生物の多くは哺乳動物に対しても病原性を示す可能性が高いと考えられている。

レジオネラ菌などアメーバ内での増殖が古くから知られているものに加え、他の病原体についても原生生物内で増殖するとの報告が増えている。しかしながら、その多くは実験室アメーバ株を用いた *in vitro* の限られた条件下での観察に過ぎず、自然界の多様な原生生物が病原微生物の存続にどのように関わるかは不明である。

2. 研究の目的

本研究では、環境中に生息するアメーバ等の原生生物が「病原体の自然界での潜伏」と「環境菌から病原菌への進化」において、重要な役割を担うのではないかと仮説を検証する。感染症流行地において環境材料を採集し、原生生物が保有する微生物叢を網羅的に解析することを目的とした。

3. 研究の方法

【環境サンプルの採集】

タイ王国マヒドン大学シリラート病院免疫学部門の Sunee Korbsrisate 教授の研究グループの協力で、タイ王国ナコーンナーヨーク県で環境水および土壌を採取した (図1)。



図1: サンプル採集地点

同国では、中部の農村地帯を中心に、*Burkholderia pseudomallei* が病原体となる類鼻疽が流行しているが、その流行動態や土壌中での菌体の潜伏様式は分かっていない。

【サンプル処理】

採取した土壌は滅菌水中に溶かし、環境水とともにポアサイズ異なる複数のフィルター (順に 100 μm、10 μm、5 μm、0.22 μm) で減圧濾過を行った。それぞれのフィルターから PowerWater® DNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories 社) を用いて DNA を抽出した。

【原生生物叢・細菌叢解析】

各フィルターから抽出した DNA を材料に、原核生物 16S リボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) および真核生物 18S rDNA の超可変領域を対象とした PCR を実施した。増幅産物を Illumina MiSeq で解読し、得られたシーケンスリードを相同性検索に供し、含有する原生生物種および細菌種を同定した。

【特定生物種配列の増幅阻害試験】

最優占種などの特定の生物由来の遺伝子の増幅を阻害するために、ペプチド核酸 (PNA: Peptide Nucleic Acids) 技術と DP0 (Dual Priming Oligonucleotide) 技術を用いたプロッキング PCR 法をそれぞれ開発した。ターゲット A 種と非ターゲット B 種の 18S rDNA 配列を組み込んだプラスミドをそれぞれ作製し、PCR 反応における阻害効果を比較した。

4. 研究成果

サンプリングは合計 37 地点で行なったが、代表例として 4 地点 (A-D) の環境水のデータを提示する。まず、一般的に環境水の細菌叢解析に用いられる 0.22 μm 径フィルター上の上位細菌組成は図2の通りであった。すなわち、全ての地点において *Arsenophonus* 属細菌が最優占細菌属として検出された。B および C 地点では、*Arcobacter* 属細菌が上位を占めるなど、地点間の差異も検出された。A、B、C、D 地点でそれぞれ、236 属、271 属、246 属、230 属の異なる細菌群が検出された。

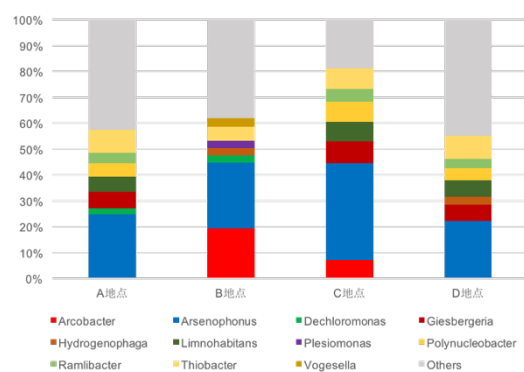


図2: 0.22 μm 径フィルター上の細菌組成

一般的な大きさの原生生物の捕集を目的とした 10 μm 径フィルターから抽出した DNA を材料に、細菌組成および真核生物組成を解析した。図3に示すように、それぞれの地点で得られた上位細菌組成は、各地点で異なる結果となった。例えば、D 地点の 0.22 μm 径フィルターにおいては *Arcobacter* 属細菌が上位

細菌属としては検出されなかったものの、10 μ m 径フィルター上では、最優占細菌属として検出された。A、B、C、D 地点でそれぞれ、208 属、266 属、235 属、202 属の異なる細菌群が検出され、10 μ m 径フィルター上にも多様な細菌群が捕集されることが明らかになった。

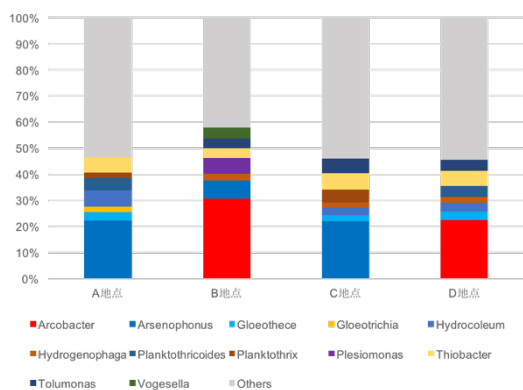


図 3: 10 μ m 径フィルター上の細菌組成

次に、真核生物の組成解析結果を図 4 に示す。全ての地点で、最優占種として *Cyclotella* 属藻類が、第二優占種として *Cryptomonas* 属藻類が検出された。上記 2 属の藻類由来配列が、全体の 8-9 割のリードを占める結果となった。C 地点では、原生生物に分類される *Obertruria* 属原虫が全体の約 4%の割合でのみ検出された。

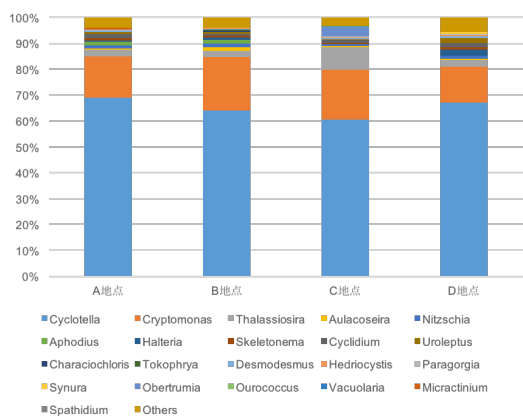


図 4: 10 μ m 径フィルター上の真核生物組成

上記の結果から、真核生物の解析には、優占する生物由来の 18S rDNA 配列の PCR 増幅抑制技術の開発が求められた。そこで、PNA および DPO 技術によるブロッキングプライマーをそれぞれ設計した。PCR 反応に添加することで、ターゲット A 種由来 18S rDNA 配列および非ターゲット B 種由来 18S rDNA 配列の増幅効率を評価した。その結果、PNA および DPO の両方で、ターゲット A 種由来 18S rDNA 配列の増幅抑制が見られた (図 5)。しかしながら、DPO では非ターゲット B 種由来 18S rDNA 配列の増幅抑制も 2.5pM 以上の濃度でみられた。一方で、PNA では非ターゲット B 種由来 18S rDNA

配列の増幅抑制はみられなかった。このことは、PNA を利用したブロッキング PCR 系は DPO に比べ、より選択的にターゲット生物由来の配列増幅を抑制できることを示している。

PNA 添加濃度(pM)	0	1.0	2.5	5.0	7.5
ターゲットA種	+	+	-	-	-
非ターゲットB種	+	+	+	+	+

DPO 添加濃度(pM)	0	1.0	2.5	5.0	7.5
ターゲットA種	+	-	-	-	-
非ターゲットB種	+	+	-	-	-

+, 増幅あり、-, 増幅なし

図 5: PNA および DPO による PCR 増幅結果

本研究では、タイ王国における環境サンプル中の細菌群および真核生物群の解析を行った。残念ながら、当地で流行する類鼻疽等の感染症に関連する知見は得られなかった。今後、サンプリングの時期や手法に改良を加え、規模を拡大して解析を実施することが必要と考えられた。本研究で開発した特定真核生物のブロッキング PCR 系を応用することで、原生生物の組成解析の解像度が上がることが期待できる。感染症流行地における原生生物叢の解析に応用することで、病原体の自然界での潜伏や進化における原生生物の役割の解明が進むことが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Qiu Y, Kaneko C, Kajihara M, Ngonda S, Simulundu E, Muleya W, Thu MJ, Hang'ombe MB, Katakura K, Takada A, Sawa H, Simuunza M, Nakao R. Tick-borne haemoparasites and Anaplasmataceae in domestic dogs in Zambia. *Ticks Tick Borne Dis.* 2018. 9(4):988-995. 査読有
2. Chitanga S, Simulundu E, Simuunza MC, Changula K, Qiu Y, Kajihara M, Nakao R, Syakalima M, Takada A, Mweene AS, Mukaratirwa S, Hang'ombe BM. First molecular detection and genetic characterization of *Coxiella burnetii* in Zambian dogs and rodents. *Parasit Vectors.* 2018. 11(1):40. 査読有
3. Moendeg KJ, Angeles JMM, Nakao R, Leonardo LR, Fontanilla IKC, Goto Y, Kirinoki M, Villacorte EA, Rivera PT, Inoue N, Chigusa Y, Kawazu SI. Geographic strain differentiation of *Schistosoma japonicum* in the Philippines using microsatellite markers. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017. 11(7):e0005749. 査読有
4. Hasebe R, Nakao R, Ohnuma A, Yamasaki T, Sawa H, Takai S, Horiuchi M. *Listeria monocytogenes* serotype 4b strains replicate in monocytes/macrophages more than the other serotypes. *J Vet Med Sci.* 2017. 79(6):962-969.

査読有

5. Nakao R, Matsuno K, Qiu Y, Maruyama J, Eguchi N, Nao N, Kajihara M, Yoshii K, Sawa H, Takada A, Sugimoto C. Putative RNA viral sequences detected in an *Ixodes scapularis*-derived cell line. *Ticks Tick Borne Dis.* 2017. 8(1):103-111. 査読有
6. Nakao R, Abe T, Funayama S, Sugimoto C. Horizontally transferred genetic elements in the tsetse fly genome: an alignment-free clustering approach using Batch Learning Self-Organising Map (BLSOM). *Biomed Res Int.* 2016. 2016:3164624. 査読有
7. Nakao R, Jongejan F, Sugimoto C. Draft genome sequences of three strains of *Ehrlichia ruminantium*, a tick-borne pathogen of ruminants, isolated from Zimbabwe, The Gambia, and Ghana. *Genome Announc.* 2016. 4(3). 査読有
8. Watanabe K, Nakao R, Fujishima M, Tachibana M, Shimizu T, Watarai M. Ciliate *Paramecium* is a natural reservoir of *Legionella pneumophila*. *Sci Rep.* 2016. 6:24322. 査読有
9. Watanabe K, Suzuki H, Nakao R, Shimizu T, Watarai M. Draft genome sequences of five *Legionella pneumophila* strains isolated from environmental water samples. *Genome Announc.* 2015. 3(3). 査読有

[学会発表] (計 6 件)

1. Akter S, Nakao R, Katakura K. Potential of cell-free DNA as a novel diagnostic biomarker for parasite infections in dog. 26th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP). Kuala Lumpur Convention Centre (Malaysia). 4 September 2017
2. 中尾 亮、木下豪太、邱 永晋、杉本千尋、片倉 賢. ペプチド核酸を用いたマダニ保有原生物叢解析法の開発. 第 159 回日本獣医学会学術集会. 日本大学生物資源科学部 (神奈川県藤沢市). 2016 年 9 月 6-8 日
3. Bawm S, Phyu AZ, Htun LL, Nakao R, Katakura K. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cats in Myanmar and detection of the parasite DNA from the feline faecal oocysts. 第 159 回日本獣医学会学術集会. 日本大学生物資源科学部 (神奈川県藤沢市). 2016 年 9 月 6-8 日
4. Akter S, Nakao R, Alam MZ, Yasin G, Katakura K. Molecular and serological evidence of Leishmania infection in stray dogs from visceral leishmaniasis-endemic areas of Bangladesh. 第 159 回日本獣医学会学術集会. 日本大学生物資源科学部 (神奈川県藤沢市). 2016 年 9 月 6-8 日
5. 今里裕平、中尾 亮、入江隆夫、考口裕一、松本 淳、八木欣平、片倉 賢. 幼虫期 *Echinococcus multilocularis* の根室株 miRNA 解析. 第 159 回日本獣医学会学術集会. 日

本大学生物資源科学部 (神奈川県藤沢市). 2016 年 9 月 6-8 日

6. Nakao R, Abe T, Qiu Y, Thu MJ, Sugimoto C. First isolation of Chlamydiae from an ixodid tick collected in Japan. 16th International Symposium on Microbial Ecology. Montreal (Canada), 21-26 August 2016

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

北海道大学大学院獣医学研究院寄生虫学教室
ホームページ

<http://www.vetmed.hokudai.ac.jp/organization/parasitol/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中尾 亮 (NAKAO RYO)

北海道大学・獣医学研究院・准教授

研究者番号: 50633955

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

阿部 貴志 (ABE TAKASHI)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号: 30390628

(4) 研究協力者

なし