

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22700773

研究課題名（和文）安全な鶏肉供給を目指した薬剤を使用しない新規原虫感染制御法の開発

研究課題名（英文）Development of novel controlling of protozoa without anti-drugs for serving of safety chicken meat

研究代表者

松林 誠 (MATSUBAYASHI MAKOTO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究所・細菌・寄生虫研究領域・主任研究員

研究者番号：00321076

研究成果の概要（和文）：鶏に寄生する *Eimeria* 原虫は、下痢を主徴とする鶏コクシジウム症を引き起こす。感染鶏は重症例では致死する等、本原虫による養鶏産業における被害は大きい。我々は、*E. tenella* 原虫について、外界発育期と盲腸粘膜内での発育期において、網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、*E. tenella* 新規遺伝子と考えられる多くの遺伝子配列情報を得ることができた。また最も病原性が高い第2代無性生殖期でのマイクロアレイ解析では、増殖および分化それぞれに関与すると考えられる遺伝子群を選定することができた。これらの結果は、ワクチン抗原等、新規ターゲット遺伝子となる可能性があり、新規防除法の開発に繋がる。

研究成果の概要（英文）：Chicken coccidiosis is caused by protozoan parasites of *Eimeria* spp. and mainly characterized as diarrhea. These parasites are responsible for significant economic losses to the worldwide poultry industry. We performed comprehensive gene expression analyses on extracellular sporulation and intestinal developmental stages of *E. tenella* to understand their biology for the infection. By sequencing of cDNA using the next generation sequencer, assembled contigs were found to contain novel genes of *E. tenella*. The up- or down- regulated genes at proliferation and differentiation of the second generation schizonts in infected chicken ceca were identified by microarray analysis. These results suggested that the identified genes could be novel targets such as vaccine antigens to control the disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：食と環境

1. 研究開始当初の背景

鶏肉の需要は、この10年連続で増加して

いる。一方、養鶏現場では、集約による大規模経営化が進み、種々の感染症予防の観点か

らワクチン接種や薬剤投与が頻繁に行われている。中でも制御が困難とされているのは寄生虫（原虫）感染症の鶏コクシジウム症である。本症は *Eimeria* 原虫によって引き起こされるが、鶏が本原虫に感染すると、肥育効率の著しい低下や重篤例では致死するなど、養鶏農家にとって経済的損失が大きい。対策としては、安価で簡便な抗コクシジウム剤の飼料添加が行われているが、本剤は発症予防薬であり、感染を完全に抑止することはできない。また、鶏肉への薬剤残留問題や薬剤耐性原虫株を生み出す危険性がある。よって、より防除効果があり、食品衛生的に安全な新しい防除法の開発が強く望まれている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、現行の防除法に代わり、鶏宿主に副作用がなく、我々ヒトにとっても安全な鶏肉の提供を可能とする、新規防除法の開発を目指す。まずは本原虫の生物学にアプローチし、宿主体内での原虫の分化・増殖機構および感染機序の解明を試みる。そして、原虫の生活環が完結するうえで必須となる分子の選定を行い、これらをターゲットとする新しい防除法の開発を行う。

3. 研究の方法

(1) 高病原性である *E. tenella* について、以下の解析を行った。*Eimeria* 原虫は、ゲノム解読が未完了であるため、まず精製が比較的容易な外界発育期ステージにおいて、網羅的に発現遺伝子情報を解析した。孢子形成期虫体から経時的に mRNA を精製し、cDNA を作製し、超高速シーケンサーにより塩基配列を決定した。また、得られた塩基配列について、assemble を行い、Blast 検索によりアノテーション付けを行った。

(2) *E. tenella* の寄生部位は盲腸粘膜であ

るが、詳細な生活環は不明である。経時的に感染盲腸を採取し、病理組織切片を作製して、生活環を同定した。また、顕微鏡下で第2代無性生殖期虫体を選別し、レーザーマイクロダイセクション(LMD)を用いてこのステージの虫体のみを粘膜固有層から単離し、mRNA を精製した。そして、RT-PCR により原虫特異遺伝子の増幅を行った。

(3) 第2代無性生殖期の分化・増殖機構を明らかにするため、以下の解析を実施した。第2代無性生殖期をさらに4段階の発育期(未成熟初期、同中期、同後期および成熟期)に分けそれぞれ LMD により分取し、cDNA を合成した。NCBI 等に登録されている *E. tenella* の遺伝子情報から *E. tenella* 特異マイクロアレイを構築し、発育段階における up、down-regulate する遺伝子を選定した。

(4) 組織内でのシゾントの発育に関与すると考えられる遺伝子について、我々が保有する遺伝子配列データを基に RACE を行い、全長を解読した。また、シグナルペプチドを除いた配列を PCR にて増幅し、プラスミドベクターに組み込み、大腸菌によりリコンビナントタンパク質を発現させた。発現させたタンパク質は精製後、酵素活性等の *in vitro* での解析を行った。また、得られたリコンビナントタンパク質をウサギに免疫し、ポリクローナル抗体を作製し、以後の解析のためのマーカーとした。本抗体を用い、虫体内での局在、および発育期別の発現をタンパク質レベルで解析した。

4. 研究成果

(1) assemble を行った結果、25,000 を超える contig 配列が得られた。既知の *Eimeria* 遺伝子と相同性の高かったものは3割程度であった。これより、今回の解析結果には *E. tenella* の新規遺伝子が多く含まれている

可能性が示唆された。さらに別種 Apicomplexa の登録配列での Blast 相同性検索を行ったところ、*Toxoplasma* の遺伝子情報が有効利用でき、追加してこれら *Eimeria* 新規遺伝子の annotation 付けを行うことができた。この結果、孢子形成期において、解糖系および酸化的リン酸化等のエネルギー代謝経路の存在が明らかとなった。

(2) 病理組織学的観察により、同時期に複数の発育期ステージの虫体が混在することが分かった。また、発育期中で、第2代無性生殖期が最も病原性が高く、この時期において、鶏は激しい血便を呈し、致死することが確認できた。また、LMD により本ステージ虫体を単離したところ、mRNA は分解はされておらず、高品質な状態で精製でき、RT-PCR による遺伝子増幅も可能であることが分かった。

(3) マイクロアレイ解析の結果、第2代無性生殖期の増殖と分化のそれぞれのステージで、細胞骨格、細胞分裂関連遺伝子の他に、いくつか原虫特異的と考えられる遺伝子が強発現していることが分かった。現在、リアルタイムPCRによる up-regulate の確認を行っている。これらの発現上昇遺伝子は、病態発現と密接に関連し、防除に向けた新規ターゲット分子となる可能性が考えられた。

(4) 原虫の分化・増殖に関連すると考えられた2遺伝子について、大腸菌により組換え体タンパク質を発現させた結果、水溶性画分として回収することができた。本タンパク質に対するマーカーとして、ポリクローナル抗体を作製し、盲腸組織内発育虫体との反応性を解析した。その結果、これらのタンパク質は未成熟虫体で強発現しており、成熟後には反応は消失していることが分かった。これらの分子は、シゾントの成熟に関与する遺伝子である可能性が示唆された。

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7件) 全て査読有り

1. Ananta SM, Suharno, Hidayat A, Matsubayashi M (CA). Survey on gastrointestinal parasites and detection of *Cryptosporidium* spp. on cattle in West Java, Indonesia. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. In press.
2. Nagano-Koyashiki S, Matsubayashi M(CA), Kimata I, Furuya M, Tani H, Sasai K. Infectivity of *Cryptosporidium andersoni* Kawatabi type relative to the small number of oocysts in immunodeficient and immunocompetent neonatal and adult mice. Parasitol Int. 2013. 62(2):109-11. doi: 10.1016/j.parint.2012.11.001.
3. Matsubayashi M, Hatta T, Miyoshi T, Anisuzzaman, Alim MA, Yamaji K, Shimura K, Isobe T, Tsuji N. Synchronous development of *Eimeria tenella* in chicken caeca and utility of laser microdissection for purification of single stage schizont RNA. Parasitology. 2012. 139(12):1553-61. doi: 10.1017/S0031182012001072.
4. Matsubayashi M, Carreno RA, Tani H, Yoshiuchi R, Kanai T, Kimata I, Uni S, Furuya M, Sasai K. Phylogenetic identification of *Cystoisospora* spp. from dogs, cats, and raccoon dogs in Japan. Vet Parasitol. 2011. 176(2-3):270-4. doi:10.1016/j.vetpar.2010.11.008.
5. Matsubayashi M, Ando H, Kimata I, Takase

- H, Nakagawa H, Furuya M, Tani H, Sasai K. Effect of low pH on the morphology and viability of *Cryptosporidium andersoni* sporozoites and histopathology in the stomachs of infected mice. *Int J Parasitol.* 2011. 41(3-4):287-92. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.09.009.
6. Matsubayashi M, Ando H, Kimata I, Nakagawa H, Furuya M, Tani H, Sasai K. Morphological changes and viability of *Cryptosporidium parvum* sporozoites after excystation in cell-free culture media. *Parasitology.* 2010. 137(13):1861-6. doi: 10.1017/S0031182010000685.
7. Yoshiuchi R, Matsubayashi M, Kimata I, Furuya M, Tani H, Sasai K. Survey and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in owned companion animal, dogs and cats, in Japan. *Vet Parasitol.* 2010. 174(3-4):313-6. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.09.004.
- [学会発表] (計 8 件)
1. 松林 誠, 八田岳士, 三好猛晴, アニスザマン, 山地佳代子, 志村亀夫, 坂元君年, 笹井和美, 磯部 尚, 北 潔, 辻 尚利. マイクロアレイを用いた *Eimeria tenella* 無性生殖期のトランスクリプトーム解析. 第 82 回日本寄生虫学会大会プログラム・抄録集, 83. 2013. 3. 29~31 東京医科歯科大学
2. 松林 誠, 八田岳士, 三好猛晴, Anisuzzaman, Alim M. Abdul, 山地佳代子, 志村亀夫, 磯部 尚, 坂元君年, 北 潔, 辻 尚利. *Eimeria tenella* 無性生殖期のトランスクリプトーム解析. 第 10 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム. 10, 39. 2012. 10. 12~13 群馬大学
3. 松林 誠, 八田岳士, 三好 猛晴, M. アニスザマン, 志村 亀夫, 磯部 尚, 坂元君年, 北 潔, 辻 尚利. *Eimeria tenella* の鶏盲腸寄生期虫体に対するミトコンドリア呼吸鎖阻害剤の原虫殺滅作用. 第 154 回日本獣医学会講演要旨集, 209. 2012. 9. 14~16 岩手大学
4. Matsubayashi M, Hatta T, Miyoshi T, Anisuzzaman, Alim MA, Yamaji K, Kameo S, Isobe T, Tsuji N. Transcriptome analysis on the asexual second-generation development of *Eimeria tenella* in the chicken ceca using specific DNA microarray. Thailand - Japan Joint Conference on Animal Health 2012: The 25th Year Anniversary of National Institute of Animal Health, May 30 - 31, 2012. Program and Abstracts of Papers, 43-46. 2012.
5. 松林 誠, 八田岳士, 三好猛晴, アニスザマン, アリム アブドゥル, 山地佳代子, 志村亀夫, 磯部尚, 坂元君年, 北 潔, 辻 尚利. *Eimeria tenella* 侵入型虫体のミトコンドリア呼吸鎖阻害剤 *in vitro* 感受性試験. 第 81 回日本寄生虫学会大会プログラム・抄録集, 65. 2012. 3. 23~24 兵庫医科大学
6. 松林 誠, 八田岳士, 三好猛晴, M アニスザマン, アリム アブドゥル, 山地佳代子, 志村亀夫, 磯部 尚, 辻 尚利. 鶏 *Eimeria* 外界発育ステージの網羅的発現遺伝子解析. 第 152 回日本獣医学会講演要旨集, 200. 2011. 9. 19~21 大阪府立大学
7. Matsubayashi M, Hatta T, Miyoshi T, Anisuzzaman, Alim MA, Yamaji K, Shimura K, Isobe T, Tsuji N. Identification of

expressed genes in the second-generation stage of *Eimeria tenella* by microarray analysis. 17th Japanese-German Cooperative Symposium on Protozoan Disease. Program and Abstracts of Papers, 26. 2011. 9. 12~16
奈良女子大学

8. 松林 誠, 八田岳士, 三好猛晴, M. アニスザマン, アリム アブドゥル, 山地佳代子, 志村亀夫, 磯部 尚, 辻 尚利. *Eimeria tenella* の孢子形成期およびスポロゾイトのトランスクリプトーム解析. 第 80 回日本寄生虫学会大会プログラム・抄録集, P56. 2011. 3. 29~30 東京慈恵会医科大学

[図書] (計 2 件)

1. 松林 誠. *Eimeria* spp. (細菌・真菌・ウイルス便覧』書籍(技術情報協会)) 2013. 印刷中.
2. 松林 誠、古屋敷(長野)早希、木俣 勲、木太俊雅、古家 優、谷 浩行、笹井和美
本邦で検出された *Cryptosporidium andersoni* novel type について (Recent Advances in Medical Science: Parasites and their Human and Animal Hosts ((医学の進歩：寄生虫とその宿主たるヒトと動物)). 編集、宇仁茂彦、木俣勲. 版權：第 65 回日本寄生虫学会西日本支部大会事務局. 2010. P57-60.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松林 誠 (MATSUBAYASHI MAKOTO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究所・細菌・寄生虫研究領域・主任研究員

研究者番号：00321076