

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25450436

研究課題名(和文) コクシジウム原虫の腸管内発育ステージにおける低酸素適応エネルギー代謝の解明

研究課題名(英文) Analyses of energy metabolism adapted to a low oxygen environment in developmental stages of Eimeria

研究代表者

松林 誠 (Matsubayashi, Makoto)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：00321076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：鶏コクシジウム症の制圧は、鶏畜産物の生産現場において、重要な課題である。本研究では、安全な新規薬剤の開発を目指した。病原性の高い *Eimeria tenella* について、ミトコンドリア精製方法の確立および酵素活性測定系を構築することができた。この測定系を用いて、各種化合物の阻害効果を解析したところ、いくつかの化合物で呼吸鎖活性の阻害が確認できた。また、侵入型虫体を精製し、これらの化合物での殺虫効果を解析した結果、 μM のオーダーで殺虫効果がみられた。今回確立した解析系は、*Eimeria* 属原虫の呼吸鎖代謝経路の解明および新規シード化合物の薬剤スクリーニングに有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Control of chicken coccidia is important issue in poultry industry. The object of this study is focused on producing the safe and new anti-coccidiostat. Consequently, we successfully constructed the methods of purification of *Eimeria tenella* mitochondria and assay system of the mitochondria activity. Using the systems, we could found some compounds could inhibit the activities in vitro. Furthermore, these compounds could kill the purified sporozoites and merozoites. These results can show utility for clarifying the respiratory chain activity of *Eimeria* spp. and finding seed compounds against the parasites.

研究分野：寄生虫学

キーワード：コクシジウム 呼吸鎖 低酸素 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

鶏コクシジウム症の制圧は、鶏畜産物の生産現場において、重要な課題である。鶏が本原虫に感染した場合、水様性、血様性の下痢症を呈し、肥育高率の低下、産卵率の低下等をきたす。現在使用されている抗コクシジウム剤は、投与鶏への副作用を有し、また人体への影響を考慮し、低濃度で飼料添加される。しかし、原虫の生活環を完全に遮断することはできず、感染源であるオーシストが持続的に鶏舎内に排出される。そのため、本原虫感染に対して、安全で、確実に感染を阻止できる薬剤の開発が希求されている。

2. 研究の目的

鶏コクシジウムの中で最も病原性の高い *Eimeria tenella* は、盲腸粘膜固有層に寄生し、その無性生殖期において、シゾントが約数十倍の大きさとなり、内部に200ものメロゾイトを包蔵する。我々は、この発育の場となる腸管内は低酸素環境下であり、一般に知られる代謝経路とは異なる酸素を用いないエネルギー代謝系が作動し、寄生適応していると推測している。本研究課題では、*Eimeria* 原虫のステージ変換による代謝適応、およびステージ特異的な代謝経路を明らかにし標的分子を同定し、鶏や人体に影響のない安全な薬剤を創出に繋げることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *E. tenella* の生鮮オーシストを28℃で培養し、経時的に孢子形成中のオーシストを回収し、また *in vitro* で脱囊させたスポロゾイトから total RNA を精製した。cDNA を合成後、Genome Analyzer Xにより塩基配列を決定した。Assemble の後、得られた contig について、NCBI database 等により BLAST 検索を行い、アノテーションを行った。*E. tenella* の代謝関連酵素の遺伝子配列を抽出した。いくつかの代謝関連酵素について、Real-time PCR により発現の定量解析を行った。得られた基盤データを基に、エネルギー産生を担うミトコンドリア複合体の部分配列を得て、RACE 法により全長を解読した。予測されるアミノ酸配列からペプチド抗体、および作出したりコンビナントタンパク質のポリクローナル抗体を作製した。

(2) タンパク質レベルで原虫ミトコンドリアの酵素活性を測定するため、以下の解析を行った。*E. tenella* の虫体の破碎は、既報の方法であるテフロン性ホモジナイザー等を用いた方法、および N₂ キャピテーションによる方法を試験した。得られたミトコンドリアを用いて、コハク酸、リンゴ酸、グリセロール三リン酸、NADH、ジヒドロオロト酸を基質として、シトクロム c の吸光度変化により種々の酵素活性を測定した。また、呼吸鎖を阻害することが知られるいく

つかの化合物により、酵素活性の阻害効果を測定した。

4. 研究成果

(1) *de novo assemble* の結果、25,880 の Contig が得られた。BLAST 検索では、有意にヒットした Contig のうち、77.8% が *Toxoplasma gondii* 由来の遺伝子であった。*E. tenella* より解析が進んでいる *T. gondii* のアノテーションが有効利用できた。得られた Contig には、他種生物等で知られる糖代謝に関連する代謝経路の酵素のうち、70%の遺伝子が含まれていることが分かった。Real-time PCR による定量解析により、発育ステージ毎に比較し、代謝経路の活性状況を確認することができた。結果、外界発育期では、孢子形成48hr後に解糖系およびTCAサイクル作動によるエネルギー代謝が最大となることが分かった。この解析系を腸管内発育期虫体に適応することにより、解糖系の活性状況を比較することが可能であると考えられた。ミトコンドリア複合体IIのペプチド抗体は、原虫タンパク質に反応性は認められなかった。作製したリコンビナント Iron-sulfur および Flavoprotein タンパク質に対するポリクローナル抗体は、推定される分子量と同様のバンドとして検出された。

(2) *E. tenella* の虫体の破碎は、各種ホモジナイザーでは不十分であり、高圧の N₂ キャピテーションが有効であった。その後、遠心分離によりミトコンドリア分画を精製した。NADH を基質とした比活性が呼吸鎖の中で最も高かった。また、呼吸鎖を阻害することが知られるいくつかの化合物で、酵素活性阻害が確認できた。阻害効果のみられたいくつかの化合物で、精製スポロゾイトおよびメロゾイトによる殺滅効果を評価した結果、μM のオーダーで殺虫効果がみられた。

今回、確立したミトコンドリア精製方法、および酵素活性の測定系は、今後、*Eimeria* 属原虫の薬剤開発に繋がる呼吸鎖代謝経路の解明および新規薬剤スクリーニングに有用であると考えられた。

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24件以下すべて査読あり。

1: Matsuura Y, Matsubayashi M, Nukata S, Shibahara T, Ayukawa O, Kondo Y, Matsuura T, Uni S, Furuya M, Tani H, Tsuji N, Sasai K. Report of fatal mixed infection with *Cryptosporidium parvum* and *Giardia intestinalis* in neonatal calves. Acta Parasitol. 2017;62(1):214-220. doi: 10.1515/ap-2017-0026.

2: Matsubayashi M, Sasagawa Y, Aita T,

- Tokoro M, Haritani M, Shibahara T. First report of mixed *Entamoeba polecki* (ST 1) and *E. suis* infection in piglets shedding abnormal feces by histopathological and molecular surveys. *Acta Parasitol.* 2016;61(4):665-670. doi: 10.1515/ap-2016-0093.
- 3: Hatta T, Imamura K, Yamamoto T, Matsubayashi M, Tsuji N, Tsutsui T. A Large-Scale Survey of *Trichinella* spp. Infection in Japanese Wild Boars. *Jpn J Infect Dis.* 2017;70(2):219-220. doi: 10.7883/yoken.JJID.2016.258.
- 4: Soma T, Matsubayashi M, Sasai K. Detection of kobuvirus RNA in Japanese domestic dogs. *J Vet Med Sci.* 2016;78(11):1731-1735.
- 5: Matsubayashi M, Minoura C, Kimura S, Tani H, Furuya M, Lillehoj HS, Matsuda H, Takenaka S, Hatta T, Tsuji N, Sasai K. Identification of *Eimeria acervulina* conoid antigen using chicken monoclonal antibody. *Parasitol Res.* 2016;115(11):4123-4128.
- 6: Matsubayashi M, Takayama H, Kusumoto M, Murata M, Uchiyama Y, Kaji M, Sasai K, Yamaguchi R, Shibahara T. First report of molecular identification of *Cystoisospora suis* in piglets with lethal diarrhea in Japan. *Acta Parasitol.* 2016;61(2):406-11. doi: 10.1515/ap-2016-0054.
- 7: Matsubayashi M, Kawahara F, Hatta T, Yamagishi J, Miyoshi T, Anisuzzaman, Sasai K, Isobe T, Kita K, Tsuji N. Transcriptional profiles of virulent and precocious strains of *Eimeria tenella* at sporozoite stage; novel biological insight into attenuated asexual development. *Infect Genet Evol.* 2016;40:54-62. doi: 10.1016/j.meegid.2016.02.021.
- 8: Ono Y, Matsubayashi M, Kawaguchi H, Tsujio M, Mizuno M, Tanaka T, Masatani T, Matsui T, Matsuo T. Course of induced infection by *Eimeria kriegsmanni* in immunocompetent and immunodeficient mice. *Parasitol Res.* 2016;115(1):211-5. doi: 10.1007/s00436-015-4737-z.
- 9: Matsubayashi M, Murakoshi N, Komatsu T, Tokoro M, Haritani M, Shibahara T. Genetic identification of *Entamoeba polecki* subtype 3 from pigs in Japan and characterisation of its pathogenic role in ulcerative colitis. *Infect Genet Evol.* 2015;36:8-14. doi: 10.1016/j.meegid.2015.08.030.
- 10: Okada S, Furuya M, Takenaka S, Fukui A, Matsubayashi M, Tani H, Sasai K. Localization of heat shock protein 110 in canine mammary gland tumors. *Vet Immunol Immunopathol.* 2015;167(3-4):139-46. doi: 10.1016/j.vetimm.2015.07.012.
- 11: Takeo T, Tanaka T, Matsubayashi M, Tsujio M, Umemiya-Shirafuji R, Tsuji N, Fujisaki K, Matsui T, Matsuo T. Evaluation of *Eimeria kriegsmanni* as a murine model for testing the efficacy of anti-parasitic agents. *Acta Parasitol.* 2015;60(2):190-5. doi: 10.1515/ap-2015-0027.
- 12: Uni S, Fukuda M, Agatsuma T, Bain O, Otsuka Y, Nakatani J, Matsubayashi M, Harada M, Omar H, Ramli R, Hashim R, Azirun MS, Takaoka H. *Onchocerca takaokai* n. sp. (Nematoda: Filarioidea) in Japanese wild boars (*Sus scrofa leucomystax*): Description and molecular identification of intradermal females. *Parasitol Int.* 2015;64(6):493-502. doi: 10.1016/j.parint.2015.07.001.
- 13: Matsubayashi M, Kanamori K, Sadahiro M, Tokoro M, Abe N, Haritani M, Shibahara T. First molecular identification of *Entamoeba polecki* in a piglet in Japan and implications for aggravation of ileitis by coinfection with *Lawsonia intracellularis*. *Parasitol Res.* 2015;114(8):3069-73. doi: 10.1007/s00436-015-4509-9.
- 14: Jakalski M, Wakaguri H, Kischka TG, Nishikawa Y, Kawazu S, Matsubayashi M, Kawahara F, Tsuji N, Cao S, Sunaga F, Xuan X, Okubo K, Igarashi I, Tuda J, Mongan AE, Eshita Y, Maeda R, Makalowski W, Suzuki Y, Yamagishi J. DB-AT: a 2015 update to the Full-parasites database brings a multitude of new transcriptomic data for apicomplexan parasites. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(Database issue):D631-6. doi: 10.1093/nar/gku1240.
- 15: Saeki J, Katsukawa C, Matsubayashi M, Nakanishi H, Furuya M, Tani H, Sasai K. The detection of toxigenic *Corynebacterium ulcerans* from cats with nasal inflammation in Japan. *Epidemiol Infect.* 2015;143(12):2660-5. doi: 10.1017/S0950268814003550.
- 16: Hashimoto K, Tanaka T, Matsubayashi M, Endo K, Umemiya-Shirafuji R, Matsui T, Matsuo T. Host specificity and in vivo infectivities of the mouse coccidian parasites *Eimeria kriegsmanni*. *Acta Parasitol.* 2014;59(2):337-42. doi: 10.2478/s11686-014-0251-1.
- 17: Takeo T, Tanaka T, Matsubayashi M, Maeda H, Kusakisako K, Matsui T, Mochizuki M, Matsuo T. Molecular and

- phylogenetic characterizations of an *Eimeria kriegsmanni* Yakimoff & Gouseff, 1938 (Apicomplexa: Eimeriidae) mouse intestinal protozoan parasite by partial 18S ribosomal RNA gene sequence analysis. *Parasitol Int.* 2014;63(4):627-30. doi: 10.1016/j.parint.2014.04.004.
- 18: Yaguchi Y, Okabayashi S, Abe N, Masatou H, Iida S, Teramoto I, Matsubayashi M, Shibahara T. Genetic analysis of *Enterobius vermicularis* isolated from a chimpanzee with lethal hemorrhagic colitis and pathology of the associated lesions. *Parasitol Res.* 2014;113(11):4105-9. doi: 10.1007/s00436-014-4080-9.
- 19: Matsubayashi M, Suzuta F, Terayama Y, Shimojo K, Yui T, Haritani M, Shibahara T. Ultrastructural characteristics and molecular identification of *Entamoeba suis* isolated from pigs with hemorrhagic colitis: implications for pathogenicity. *Parasitol Res.* 2014;113(8):3023-8. doi: 10.1007/s00436-014-3965-y.
- 20: Matsubayashi M, Hatta T, Miyoshi T, Anisuzzaman, Sasai K, Shimura K, Isobe T, Kita K, Tsuji N. High-throughput RNA sequencing profiles and transcriptional evidence of aerobic respiratory enzymes in sporulating oocysts and sporozoites of *Eimeria tenella*. *Infect Genet Evol.* 2013;18:269-76. doi: 10.1016/j.meegid.2013.06.002.
- 21: Ananta SM, Suharno, Hidayat A, Matsubayashi M. Survey on gastrointestinal parasites and detection of *Cryptosporidium* spp. on cattle in West Java, Indonesia. *Asian Pac J Trop Med.* 2014;7(3):197-201. doi: 10.1016/S1995-7645(14)60020-1.
- 22: Matsubayashi M, Hatta T, Miyoshi T, Anisuzzaman, Sasai K, Yamaji K, Shimura K, Isobe T, Kita K, Tsuji N. Localization of eimeripain, an *Eimeria tenella* cathepsin B-like cysteine protease, during asexual and sexual intracellular development in chicken ceca. *J Vet Med Sci.* 2014;76(4):531-7.
- 23: Yui T, Nakajima T, Yamamoto N, Kon M, Abe N, Matsubayashi M, Shibahara T. Age-related detection and molecular characterization of *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium scrofarum* in pre- and post-weaned piglets and adult pigs in Japan. *Parasitol Res.* 2014;113(1):359-65. doi: 10.1007/s00436-013-3662-2.
- 24: Matsubayashi M, Teramoto-Kimata I, Uni S, Lillehoj HS, Matsuda H, Furuya M, Tani H, Sasai K. Elongation factor-1 is a novel protein associated with host cell invasion and a potential protective antigen of *Cryptosporidium parvum*. *J Biol Chem.* 2013;288(47):34111-20. doi: 10.1074/jbc.M113.515544.
- [学会発表](計9件)
- 1: 松林 誠, 辻尾祐志, 正谷達膳, 田仲哲也, 松井利博, 松尾智英. マウス寄生性コクシジウム *Eimeria kriegsmanni* 感染の再活性化. 水野真伸, 第157回日本獣医学会講演要旨集, 332. 2016年9月6-8日 日本大学(藤沢).
- 2: 松林 誠, 村越奈穂子, 小松徹也, 所正治, 播谷 亮, 芝原友幸. 豚に寄生する *Entamoeba* 属原虫の遺伝子型の同定と病原性. 第157回日本獣医学会講演要旨集, 334. 2016年9月6-8日 日本大学(藤沢).
- 3: 高橋和瑛, 松林 誠, 稲岡 ダニエル 健, 八田岳士, 寺本 勲, 金子 明, 所正治, 古家 優, 谷 浩行, 辻 尚利, 笹井和美, 北 潔. *Cryptosporidium parvum* における呼吸鎖関連酵素の特性解析. 第157回日本獣医学会講演要旨集, 333. 2016年9月6-8日 日本大学(藤沢).
- 4: 松林 誠, 川原史也, 八田岳士, 山岸潤也, 磯部 尚, 寺本 勲, 金子 明, 笹井和美, 北 潔, 辻 尚利. 幼雛における *Eimeria tenella* 弱毒株の作出および病理組織学的解析. 第85回日本寄生虫学会大会プログラム・抄録集, P55. 2016年3月19-20日 宮崎市民プラザ(宮崎).
- 5: 芝原友幸, 鈴田史子, 金森健太, 村越奈穂子, 小松徹也, 松林 誠, 阿部仁一郎, 播谷 亮, 所正治. 豚の大腸から見出された *Entamoeba* 属原虫の種および遺伝子型の同定と病理組織学的解析. 第85回日本寄生虫学会大会プログラム・抄録集, P46. 2016年3月19-20日 宮崎市民プラザ(宮崎).
- 6: 松林 誠, 稲岡 ダニエル 健, 小松谷啓介, 八田岳士, 三好猛晴, 磯部 尚, 川原史也, 山岸潤也, 彦坂健児, 佐藤 暖, 志波智生, 原田繁春, 北 潔, 辻 尚利. *Eimeria tenella* のミトコンドリア呼吸鎖酵素活性の測定と阻害剤による虫体殺滅効果. 第158回日本獣医学会講演要旨集, 305. 2015年9月7-9日 北里大学(十和田).
- 7: 松林 誠, 稲岡 ダニエル 健, 小松谷啓介, 八田岳士, 三好猛晴, 磯部 尚, 川原史也, 山岸潤也, 彦坂健児, 佐藤 暖, 志波智生, 原田繁春, 北 潔, 辻 尚利. *Eimeria tenella* のミトコンドリア呼吸鎖酵素活性と阻害剤による虫体殺滅効果. 第84回日本寄生虫学会大会プログラム・抄録集, P74. 2015年3月21-22日 杏林大学(三鷹).
- 8: 小野結菜, 松林 誠, 川口博明, 辻尾祐志, 田仲哲也, 三好宣彰, 松井利博, 松

尾智英. マウス寄生性コクシジウム *Eimeria kriegsmanni* の生活環に関する形態学的観察. 第 157 回日本獣医学会講演要旨集、355. 2014 年 9 月 9-12 日 北海道大学(札幌).

- 9: 松林 誠, 稲岡 ダニエル 健, 小松谷 啓介, 八田岳土, 三好猛晴, 磯部 尚, 川原史也, 山岸潤也, 彦坂健児, 佐藤 暖, 志波智生, 原田繁春, 北 潔, 辻 尚利. *Eimeria tenella* スポロゾイトのミトコンドリア精製法の確立と呼吸鎖酵素活性. 第 157 回日本獣医学会講演要旨集、355. 2014 年 9 月 9-12 日北海道大学(札幌).

〔図書〕(計 2 件)

- 1: 松林 誠 (分担). 鶏病検査マニュアル 鶏病研究会編. 11. 血液の原虫検査法 (P39-41), 12. 糞便の虫卵検査法 (P42-44), 18. ネズミ対策 (p64-67). 2016 年(総 73 ページ).
- 2: 松林 誠 (分担). 「*Eimeria*」 『細菌・真菌・ウイルス便覧』 書籍(技術情報協会). P372-375. 2014 年(総 417 ページ).

〔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

<http://www.vet.osakafu-u.ac.jp/intpre/>

/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松林 誠 (Makoto Matsubayashi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：00321076

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし