

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2012～2015

課題番号：24406013

研究課題名(和文) アジアにおける新種病原アメーバの分布とゲノム多様性に関する研究

研究課題名(英文) Studies on geographical distribution and genomic diversity of a new pathogenic *Entamoeba* species in Asia

研究代表者

橘 裕司 (TACHIBANA, Hiroshi)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：10147168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：新種の病原アメーバである*Entamoeba nuttalli*は、ネパールやミャンマーのアカゲザル、タイのカニクイザル、スリランカのトクザル、中国のチベットモンキーなどの野生マカクの糞便から検出された。一方で、赤痢アメーバはこれらの野生マカクから検出されなかった。これまでに80株以上の*E. nuttalli*を分離培養した。セリンリッチ蛋白質遺伝子やtRNA関連縦列型反復配列の多型は、宿主マカクの地理的分布の違いと関連していた。また、*E. nuttalli* 標準株(P19-061405)について、ドラフトゲノム配列を決定した。

研究成果の概要(英文)： *Entamoeba nuttalli*, a new pathogenic species, was detected in fecal samples from rhesus macaques in Nepal and Myanmar, long-tailed macaques in Thailand, toque macaques in Sri Lanka, and Tibetan macaques in China. On the other hand, *E. histolytica* was not found in these samples. More than 80 strains of *E. nuttalli* were cultured successfully. Diversity of serine-rich protein genes and tRNA-linked short tandem repeat sequences was correlated with geographical distribution of host macaques. Draft genome sequence of *E. nuttalli* P19-061405 strain was determined.

研究分野：寄生原虫学

キーワード：原虫 *Entamoeba nuttalli* マカク 疫学 遺伝子多様性 ゲノム 人獣共通感染症 アジア

### 1. 研究開始当初の背景

霊長類の腸管寄生アメーバの中で、赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) は唯一の病原アメーバと考えられてきた。研究代表者らは、アカゲザルやカニクイザルから分離したアメーバが、赤痢アメーバとは形態的に差がないものの、遺伝的に異なる新しい病原アメーバであることを明らかにし、*Entamoeba nuttalli* という学名を復活させた。しかし、このアメーバ種が野生マカクに広く感染しているのか、マカクの種によって *E. nuttalli* にも多様性があるのか、また、*E. nuttalli* はヒトにも感染するのにかついで、これまで明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

マカクには約 20 種が知られているが、アフリカに生息する 1 種を除いて、全てアジアに生息している。本研究では、まず、アジア各地の野生マカクにおける *E. nuttalli* 感染の実態を明らかにする。*E. nuttalli* 感染が確認された場合には、*E. nuttalli* の分離培養を試みる。分離株が得られれば、株間の遺伝的多様性を明らかにする。更に、赤痢アメーバとの違いをゲノムレベルで明らかにし、宿主の進化や拡散と寄生アメーバとの関係解明を試みる。また、*E. nuttalli* が人獣共通感染症の病原体であるかどうかを検索する。

### 3. 研究の方法

アジア各地のサル生息地において、新鮮な糞便を採取した。鏡検によって、アメーバ感染の有無を検索した。4 核シスト陽性検体は、田辺・千葉培地による細菌共棲培養や YIMDHA-S 培地による *Crithidia fasciculata* との共棲培養を行い、*E. nuttalli* などのアメーバ株の分離を試みた。更に、一部の分離株については完全無菌培養に馴化させた。また、糞便から DNA を抽出し、赤痢アメーバ、*E. nuttalli*、*E. dispar*、*E. chattoni* (*E. polecki* ST2)、大腸アメーバ (*E. coli*)、*E. moshkovskii* などに特異的なプライマーを用いて PCR を行い、感染アメーバ種を明らかにした。18S rRNA 遺伝子と 5.8S rRNA 遺伝子、ITS1 と ITS2 を含む約 2.4kb の領域について PCR 増幅し、塩基配列を決定した。セリンリッチ蛋白質遺伝子や tRNA 関連縦列型反復配列の 6 座位について、PCR 増幅した後、塩基配列を決定した。また、サル生息域の住民の糞便検体を入手し、鏡検と PCR 法により、感染アメーバの検出と同定を行った。

*E. nuttalli* P19-061405 株のゲノム DNA ライブラリーを作製し、57 個の SMRT cell を用い、PacBio RS により塩基配列を決定した。

### 4. 研究成果

(1) ネパールのアカゲザルから分離した *E. nuttalli* の遺伝子多型解析

ネパールのカトマンズにおいて、4 地域

(Swayambhunath, Pashupatinath, Vajra Yogini, Thapathali) に生息する野生アカゲザルから分離した 15 株の *E. nuttalli* について、tRNA 関連縦列型反復配列の 6 座位を解析した。座位 A-L では、8 株において複数の遺伝子型が存在し、11 タイプの遺伝子型が確認された。その他の座位では、2~4 タイプの遺伝子型が観察された。これらの組み合わせにより、15 株は 10 タイプに分類された。

(2) スリランカのトクザルから分離した *E. nuttalli* の遺伝子多型解析

スリランカの 5 地域 (Polonnaruwa, Sigiriya, Dambulla, Kandy, Peradeniya) でトクザルから分離した 15 株の *E. nuttalli* について、セリンリッチ蛋白質遺伝子を解析した。遺伝子型は 4 タイプ存在したが、このうちの 1 タイプは 11 株において確認され、広範囲に分布していることが判明した。アイソエンザイム分析において、ヘキソキナーゼの易動度が特異なパターンを示し、等電点の違いは遺伝子型によっても確認できた。

(3) タイ中央部のカニクイザルにおける *E. nuttalli* の分布状況と分離株の遺伝子多型解析

タイ中央部の 5 地域 (Phetchaburi, Ratchaburi, Chonburi, Lopburi, Saraburi) において、野生カニクイザルの糞便を採集した。PCR 法により、*E. nuttalli* が 44% の検体において検出された。赤痢アメーバや *E. dispar* は全く検出されなかった。田辺・千葉培地を用いた培養により、25 株の *E. nuttalli* を分離した。野生カニクイザルからは初めての分離であった。このうちの 4 株について、完全無菌培養に成功した。セリン蛋白質遺伝子の解析では、アミノ酸配列で 9 タイプ、塩基配列では 11 タイプが認められた。また、tRNA 関連縦列型反復配列では、それぞれの座位において、6~10 タイプが存在した。これらの遺伝子型の組み合わせにより、25 株は 15 タイプに分類された。遺伝子型の違いは、分離株の地理的分布の違いをよく反映していた。

(4) タイ南部のカニクイザルとブタオザルにおける *E. nuttalli* の分布状況と分離株の遺伝子多型解析

タイ南部の 3 地域 (Krabi, Nakhon Sri Thammarat, Phang Nga) に生息する野生カニクイザルにおいて、*E. nuttalli* の陽性率は 53% であった。また、Nakhon Sri Thammarat において、飼育ブタオザルからも *E. nuttalli* が検出された。これらの検体から、赤痢アメーバや *E. dispar* は検出されなかった。カニクイザルから 6 株、ブタオザルからも 1 株の *E. nuttalli* を分離培養した。このうちの 3 株を完全無菌化した。18S rRNA 遺伝子では、タイ中央部のカニクイザルから分離された *E. nuttalli* 株と差異は認められなかったが、セリンリッチ蛋白質遺伝子の配列では、地域差

を反映する多様性が確認された。

(5) ミャンマーのアカゲザルにおける *E. nuttalli* の分布状況と分離株の遺伝子多型解析

ミャンマー中央部の Taung Kalat (TK) と Pho Win Taung (PWT) の寺院に生息する野生アカゲザルの糞便において、PCR 法による *E. nuttalli* の陽性率は 49%と 31%であった。赤痢アメーバは全く検出されず、*E. dispar* は PWT のみで、6%の検体から検出された。細菌共棲培養によって、TK で 6 株、PWT で 8 株を分離し、このうち TK で分離した 1 株については完全無菌化に成功した。セリンリッチ蛋白質遺伝子の解析では、2 つの地域で 2 タイプずつ、計 4 タイプが存在した。tRNA 関連縦列型反復配列については、TK 由来株で A-L に 2 タイプが認められたのを除き、2 つの地域で異なるタイプが 1 種類ずつ観察された。このことから、*E. nuttalli* の遺伝子型の違いは分離株の地理的分布の違いをよく反映しているものの、ミャンマー分離株の多型性は、ネパール分離株やタイ分離株に比較して小さいと考えられた。

(6) 中国のチベットモンキーにおける *E. nuttalli* の分布状況と分離株の遺伝子多型解析

中国の峨眉山に生息する野生チベットモンキーの糞便において、PCR 法による *E. nuttalli* の陽性率は 17%であった。一方、赤痢アメーバと *E. dispar* は全て陰性であった。培養によって *E. nuttalli* の 6 株を分離し、18S rRNA 遺伝子を解析したところ、これまでに中国のアカゲザルから分離した *E. nuttalli* 株の配列と一致した。しかし、tRNA 関連縦列型反復配列について解析したところ、峨眉山のチベットモンキーに特異的な配列が確認された。ネパールと中国のアカゲザルから分離した *E. nuttalli* 株間では 18S rRNA 遺伝子の配列が異なることから、*E. nuttalli* の遺伝子型に関して、宿主の種よりも地理的な要因の方がより強く関連していることが示唆された。

(7) サル生息域住民からの *E. nuttalli* の検索

ネパールのカトマンズにおいて、住民の糞便検体から *E. nuttalli* の検索を試みた。赤痢アメーバと *E. dispar* は検出されたが、*E. nuttalli* は全て陰性であった。しかし、*E. chattoni* が検出され、アカゲザルからヒトへのアメーバ感染が生じていると考えられた。

(8) *E. nuttalli* 標準株のゲノム解析

リード長 1kb 以上のリードから、約 2Gb の配列データを取得した。アセンブルを進め、コンティグ数 395 のドラフトゲノム配列を構築した。

(9) 今後の展望

本研究課題により、アジアに生息するマカクにおいて広範な *E. nuttalli* 感染が確認され、分離株では地理的分布の違いを反映する遺伝子多型も確認された。標準株の全ゲノム解析も進行しており、今後、他の分離株も含めた比較ゲノム解析が可能である。更に対象とする調査地域とヒトを含めた宿主範囲を広げることにより、宿主霊長類の移動・拡散・進化と腸管寄生アメーバの多型化・共進化の関係を解明できると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 15 件)

Hiroshi Tachibana, Tetsuo Yanagi, Meng Feng, K. B. Anura T. Bandara, Seiki Kobayashi, Xunjia Cheng, Kenji Hirayama, R. P. V. Jayanthe Rajapakse. Isolation and molecular characterization of *Entamoeba nuttalli* strains showing novel isoenzyme patterns from wild toque macaques in Sri Lanka, J. Euk. Microbiol., 査読有, 63:171-180, 2016 DOI:10.1111/jeu.12265

Yue Guan, Meng Feng, Junlong Cai, Xiangyang Min, Xingyu Zhou, Qing Xu, Ning Tan, Xunjia Cheng, Hiroshi Tachibana. Comparative analysis of genotypic diversity in *Entamoeba nuttalli* isolates from Tibetan macaques and rhesus macaques in China, Infect. Genet. Evol., 査読有, 38:126-131, 2016 DOI:10.1016/j.meegid.2015.12.014

Meng Feng, Tomoyoshi Komiyama, Tetuo Yanagi, Xunjia Cheng, Jeevan B. Sherchand, Hiroshi Tachibana. Correlation between genotypes of tRNA-linked short tandem repeats in *Entamoeba nuttalli* isolates and the geographical distribution of host rhesus macaques, Parasitol. Res., 査読有, 113:367-374, 2014 DOI:10.1007/s00436-013-3664-0

Hiroshi Tachibana, Tetsuo yanagi, Chamala Lama, Kishor Pandey, Meng Feng, Seiki Kobayashi, Jeevan B. Sherchand. Prevalence of *Entamoeba nuttalli* infection in wild rhesus macaques in Nepal and characterization of the parasite isolates, Parasitol. Int., 査読有, 62:230-235, 2013 DOI:10.1016/j.parint.2013.01.004

Meng Feng, Junlong Cai, Xiangyang Min,

Yongfeng Fu, Qing Xu, Hiroshi Tachibana, Xunjia Cheng. Prevalence and genetic diversity of *Entamoeba* species infecting macaques in southwest China, Parasitol. Res., 査読有, 112:1529-1536, 2013  
DOI:10.1007/s00436-013-3299-1

[学会発表](計 19 件)

橘 裕司 他、スリランカのトクザルから分離した腸管寄生アメーバ *Entamoeba nuttalli* における遺伝子多型と病原性の解析、第 31 回日本霊長類学会大会、2015 年 7 月 18-20 日、京都大学百周年時計台記念館(京都府・京都市)

橘 裕司 他、ミャンマーに生息するアカゲザルからの *Entamoeba nuttalli* の分離とその遺伝子多型解析、第 84 回日本寄生虫学会大会、2015 年 3 月 21-22 日、杏林大学三鷹キャンパス(東京都・三鷹市)

橘 裕司 他、ネパールのアカゲザルから分離した腸管寄生アメーバ *Entamoeba nuttalli* における遺伝子多型の解析、第 30 回日本霊長類学会大会、2014 年 7 月 4-6 日、大阪科学技術センタービル(大阪府・吹田市)

橘 裕司 他、次世代ならびに次々世代シーケンサーを用いた病原アメーバ *Entamoeba nuttalli* の全ゲノムシーケンシング解析、第 83 回日本寄生虫学会大会、2014 年 3 月 27-28 日、愛媛大学城北キャンパス(愛媛県・松山市)

Meng Feng, *et al.*, Correlation between tRNA-linked short tandem repeats genes in *Entamoeba nuttalli* isolates and the geographical distribution of host macaques, 第 83 回日本寄生虫学会大会、2014 年 3 月 27-28 日、愛媛大学城北キャンパス(愛媛県・松山市)

橘 裕司 他、タイのヒトとマカクにおける腸管寄生アメーバの感染状況と *Entamoeba nuttalli* 分離株の性状解析、第 54 回日本熱帯医学会大会、2013 年 10 月 4-5 日、長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)

Meng Feng, *et al.*, Prevalence and genetic diversity of *Entamoeba* species infecting macaques in Southwest China, 第 82 回日本寄生虫学会大会、2013 年 3 月 29-31 日、東京医科歯科大学湯島キャンパス(東京都・文京区)

橘 裕司 他、タイ中央部における野生カニクイザルからの *Entamoeba nuttalli* の

分離とその性状解析、第 82 回日本寄生虫学会大会、2013 年 3 月 29-31 日、東京医科歯科大学湯島キャンパス(東京都・文京区)

Hiroshi Tachibana, *et al.*, Isolation and characterization of *Entamoeba nuttalli* from wild macaques in Asia, International Workshop on Enteric Protozoan Infections, 2013 年 2 月 22 日、国立感染症研究所(東京都・新宿区)

橘 裕司 他、ネパールのカトマンズにおける腸管寄生アメーバ感染の疫学研究、第 53 回日本熱帯医学会大会、2012 年 9 月 5-6 日、とかちプラザ(北海道・帯広市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

橘 裕司 (TACHIBANA, Hiroshi)  
東海大学・医学部・教授  
研究者番号：10147168

### (2) 研究分担者

小林 正規 (KOBAYASHI, Seiki)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：70112688

小見山 智義 (KOMIYAMA, Tomoyoshi)  
東海大学・医学部・准教授  
研究者番号：60439685

牧内 貴志 (MAKIUCHI, Takashi)  
東海大学・医学部・助教  
研究者番号：80587709