

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15120

研究課題名(和文) 鶏コクシジウムの発育鶏卵培養系を利用したアピコプラストゲノム操作の検討

研究課題名(英文) Application of in ovo culturing system of *Eimeria tenella* for innovation of a method to manipulate the apicoplast genome

研究代表者

佐藤 恵春 (Sato, Shigeharu)

東京工業大学・科学技術創成研究院・研究員

研究者番号：80250215

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：マラリアなど様々な感染症の原因となる寄生性原虫アピコンプレクサ類の細胞には、アピコプラストという独特な細胞内小器官が存在する。アピコプラストは内部に独自のゲノムをもち、原虫の増殖にはその発現が必須である。現在は不可能なアピコプラストゲノム的人為的操作による形質転換を可能にする新技術開発に利用するため、生活環の全ての分化ステージの細胞を得ることができる、鶏コクシジウムの発育鶏卵培養系を検討した。鶏卵にインスリンを投与すると漿尿膜の発達が進む傾向が見られ、投与量と接種原虫数を最適化して回収原虫数を増やすことができる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Apicomplexan parasites such as the malaria parasite *Plasmodium* and the chicken cecal coccidium *Eimeria tenella*, have a unique organelle called the apicoplast. The apicoplast contains an extra-nuclear genome whose expression is essential for the parasites' growth. Successful artificial manipulation of the organellar genome has never been reported yet. *E. tenella* can be maintained in the in ovo culturing system. The system produces the parasite of any developmental stages in the species' life cycle, and is expected to be useful to break-through the challenge to manipulate the apicoplast genome. Thus conditions of the system that influence the production of the parasite were assessed. Insulin injected to the egg together with the parasites tend to promote development of the chorioallantoic membrane. This suggests that the maximum number of the parasites produced with one egg can be increased when both the number of the parasites and the amount of insulin injected are optimised.

研究分野：寄生虫学・分子生物学・進化学

キーワード：原虫 アピコンプレクサ類 アピコプラスト 鶏コクシジウム 発育鶏卵培養 形質転換 マラリア  
感染症

## 1. 研究開始当初の背景

アピコンプレクサ類は動物宿主に感染する単細胞真核生物(原虫)の一グループであり、人類の健康にとって最も大きな脅威の一つであるマラリアを引き起こすマラリア原虫や、先天性異常や免疫不全患者の命に関わる感染症を引き起こすトキソプラズマなど、多くの有害な寄生性原虫がそこに含まれる。それぞれの種の生物学を詳細に調べ、これらの原虫による感染症の予防・治療に役立てようとする様々な研究が、国際的に精力的に進められている。

アピコンプレクサ類の細胞には植物の葉緑体と進化的に同起源の特殊なプラスチド「アピコプラスト」が存在し、ミトコンドリアとともにアピコンプレクサ類の増殖に必要な代謝に深く関わっている[1]。アピコプラストはアピコンプレクサ類が感染する動物宿主の細胞には存在しないため、宿主の代謝には影響せず、原虫の増殖のみを特異的に阻害する新規薬剤の標的として有用であると期待されている。

アピコプラスト内部には核のものとは異なる DNA が存在し、そこにはアピコンプレクサ類を通してかなりよく保存されたゲノムがコードされている。アピコプラストゲノムはこのオルガネラの機能発現に必要な遺伝子産物をコードしていると考えられるが、その詳細については現在でもまだ未解明な点が多い。アピコプラストゲノムを人為的に操作し、作成した形質転換体を解析することができれば、そこにコードされたそれぞれの遺伝子の働きやゲノムの複製、遺伝子発現調節などの生理機能の解明につながる多くの知見が得られ、アピコンプレクサ類の生物学の理解、ならびに、原虫による感染症の新しい予防・治療法の開発に大きく貢献すると期待される。しかし、いくつかの種では既によく確立している核ゲノムの操作とは異なり、アピコプラストゲノムの操作はいずれのアピコンプレクサ類原虫においても難しく、これまで成功例の報告は皆無である。

アピコプラストゲノムでは組換えが起こっていることを示す実験結果が得られていることから[2]、オルガネラ内部に DNA を送り届けることができればアピコプラストゲノムが操作された形質転換体を作成することは可能であると予想される。アピコプラストの形状・大きさは、異なるアピコンプレクサ種間ではもちろんのこと、同一種内でも生活環の分化ステージによって差異が大きい。これまでにあまりよく研究されていない分

化ステージにアピコプラストゲノムの操作に適した時期が見つかる可能性がある。

ニワトリの盲腸に寄生する原虫、鶏コクシジウム *Eimeria tenella* は、世界の養鶏産業に年間推計 24 億米ドル(2,700 億円)に達する損害を与えていると言われる、産業上大変に重要なアピコンプレクサ類の一種である。鶏コクシジウムを実験に用いる場合、通常はニワトリ雛に人工的に感染させて増殖させたものを用いる。しかしこの種は、ニワトリに感染させなくても発育鶏卵に感染させる培養系を用いて維持・増殖させることが可能であると報告されている[3]。

## 2. 研究の目的

発育鶏卵を用いた鶏コクシジウムの培養は、原虫を感染させたニワトリを飼養するための特別な動物飼養施設を必要とせず、一般の実験室で行うことができる。そのため、実験にかかるコストを大幅に抑えることができる。ニワトリの盲腸に感染して増殖する分化ステージの原虫でも、感染ニワトリから盲腸を外科手術的に取り出してそこから単離する手間を要さずに手に入れることができる。ニワトリ成体ではなく鶏卵しか使わないので、動物実験代替として動物福祉上の意義も大きい。そこで、鶏卵培養系が鶏コクシジウムの遺伝学的・分子生物学的研究を遂行する上で不可欠の材料を供給するのに有用な系であることを検証し、得られた原虫を用いて鶏コクシジウムのアピコプラストゲノムの人工的操作の可能性を実証するとともに再現性をもつ実用的な技術として確立することを旨とした研究を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 発育鶏卵培養系での鶏コクシジウムの増殖は、実験に使用する鶏卵の品種や培養条件に影響される可能性がある。そこでまず発育鶏卵培養設備を立ち上げ、使用する鶏卵を選定し、その系を用いて培養を行う際の鶏コクシジウム接種のタイミングおよび接種する原虫数の検討を行った。

具体的には、感染ニワトリの糞から回収した鶏コクシジウムのオオシストから人工的に発芽させて得たスポロゾイト 1,000-100,000 個をハンクス平衡塩溶液に懸濁して 100 マイクロリットルとし、37.5 にセットしたふ卵器で孵卵開始後 9-12 日目の発育鶏卵内の卵殻の一部に小穴を開け、そこを通して注射針で漿尿嚢内に接種して感染させた。42 にセットした別のふ卵器内に移

してインキュベートして原虫を分化・増殖させ、接種後3,5,7日目に卵殻を開けて漿尿液および漿尿嚢を回収し、顕微鏡的に原虫の数および分化ステージを観察した。

(2)2012年にJiangらは原虫接種と同時にインスリン(鶏卵1個あたり100U)を投与すると回収オーシスト数が劇的に増大するという報告をした[4]。もしその報告の内容が事実ならば、鶏卵培養系を鶏コクシジウムの細胞を安定して大量に供給することができる培養法として確立させるのに大いに役立つと考えられる。ただし、インスリン100Uは糖尿病治療用注射剤の場合1mLに、1mg/mLのストックならば3.85mLに、それぞれ相当し、簡単に鶏卵に注射できる体積ではないように思われる。

インスリンが漿尿膜の発達に実際にはどのように影響するかを確認するため、37.5で孵卵開始後11日目の発育鶏卵に、鶏卵1個あたり100Uではなく100mUあるいは500mUのインスリンを注射し、42にセットした別の卵器で7日間インキュベートした後、卵殻を開け、回収した漿尿膜の重量を分析用電子天秤で秤量し、インスリンを含まない同体積のハンクス平衡塩溶液を注射した鶏卵のもの重量と比較した。

#### 4. 研究成果

(1)初年度、実験開始にあたり、当時所属機関において安定して入手することができ、かつサイズが大きいブロイラー品種「チャンキー」の発育鶏卵に、オオシストから人工的に発芽させたスポロゾイトを接種し、その後の鶏コクシジウムの分化の様子を観察した。

細胞のサイズや形状から考えた場合最も鶏コクシジウムの形質転換に向いていると予想される分化ステージは二次メロゾイト期であるが、発育鶏卵に接種された原虫は漿尿嚢内でそのステージまでは順調に分化・増殖することが確認された。すなわち、二次メロゾイト期までの分化ステージの細胞は感染ニワトリの盲腸を外科手術的に集めてそこから回収する通常の手法を用いなくても、発育鶏卵培養系によって比較的容易に得られることが確認できた。但し、接種したスポロゾイトの数と観察された二次メロゾイトの数には明確な相関関係が見られなかった。これは接種したスポロゾイトが多すぎた可能性を示唆する。

さらに培養を続けると次世代オーシストが得られはしたが、その数は非常に少なかった。それに加えて胚の発育が中止する鶏卵が

多く、鶏卵培養系だけで原虫を維持・継代しながら目的の実験に使う原虫を得ることを可能にするには綿密・詳細な条件検討が必要であることがわかった。

同年度途中、他機関に異動したが、異動先の機関では発育鶏卵を利用した実験も一般の動物飼養施設に準じた特別な実験室で行う必要があり、同年度内には認可を得て実験を開始することができず、同機関での実験開始は第二年度(最終年度)にずれ込んだ。

第二年度は、当時所属機関では前所属機関での実験で使用したニワトリの品種「チャンキー」の鶏卵の入手が難しく、別の品種「もみじ」を用いて同様の実験を行った。「チャンキー」を用いた時とほぼ同様に、二次メロゾイト期までの分化ステージの原虫は安定して得られたが、次世代オーシストを得ることはかなり難しく、中止卵が多かった。

第二年度途中にさらに別の機関への異動があった。異動後の機関でも「もみじ」を用いて実験を行ったが、期間終了までに鶏卵培養系だけで原虫を維持・継代しながら目的の実験に使う原虫を十分量得ることを可能とする条件の解明には至らなかった。

(2)(1)では接種スポロゾイト数が多いと二次メロゾイト期以降はニワトリ胚の発生が中止してしまう傾向が強くみられた。これは、鶏卵培養系を実験に供する原虫の調製法として有用なものにするには何らかの抜本的な改善が必要であることを示唆している。Jiangらの報告[4]によると、原虫接種と同時にインスリンを投与すると回収オーシスト数が増大する。発育鶏卵の漿尿嚢内に接種された鶏コクシジウムは漿尿膜の上皮細胞に感染してそこで増殖するが、Jiangらはインスリンを投与した鶏卵内では投与量に応じて漿尿膜が肥厚し、条件がそろえば1個の鶏卵から多くの原虫が回収できると説明している。そこで、発育鶏卵にインスリンを投与してその影響をみたところ、実際に漿尿膜が肥厚する傾向が見られた(表1)。ただし、インスリン投与と同時に鶏コクシジウムを接種しても、Jiangらの報告とは異なり回収されるオオシストの数は少ないままであった(data not shown)。とはいえ、例えば彼らの報告に倣って100U注射するなど、条件を変更して至適化すれば、回収できるオーシスト数を増やすことは可能かもしれない。

表1 . 発育鶏卵に投与したインスリンの漿尿膜の発達への影響

インスリン量 (mU/鶏卵)	漿尿膜重量 <sup>1)</sup> (mg)	比 <sup>2)</sup>
0	335	100
	450	
100	364	114
	527	
500	620	168
	689	

1) 各インスリン量につき鶏卵2個それぞれの測定値。

2) 2鶏卵の測定値の和をインスリン量0のものと比較し、インスリン量0のものを100としてあらわした値。

(3) 本研究では、期間中二度の異動の影響もあり、研究課題申請時に予定していたアピコプラストゲノムの人工的操作による原虫形質転換の検討まで至ることができなかったが、インスリンが漿尿膜を肥厚させる効果が確認され、接種原虫数とインスリン投与量を最適化すること等によって鶏卵培養系の効率を改善することができる可能性が示唆された。

今後は、鶏卵培養系を鶏コクシジウムの細胞を安定して大量に供給することができる培養法として確立させ、現在は不可能なアピコプラストゲノムの形質転換技術の開発につなげ、アピコンプレクサ類の生物学に残された謎の解明に役立てたい。

<参考文献>

- [1] McFadden GI. (2014). *Curr. Biol.* 24(7): R262. DOI: 10.1016/j.cub.2014.01.024
- [2] Sato S et al. (2013) *PLoS One* 8(4): e61778. DOI: 10.1371/journal.pone.0061778.
- [3] Long PL. (1965) *Nature* 208(5009): 509. PMID: 5867599.
- [4] Jiang L et al. (2012) *Parasite* 16: 285. DOI: 10.1051/parasite/2012193285.

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 0 件)

[学会発表](計 3 件)

1. 佐藤恵春, 五十嵐郁男, 北潔, "*Theileria equi* のゲノムにはアピコンプレクサ類に特徴的な *pbgs-spp* 二遺伝子クラスターが保存されている". BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会), 2015年12月2日, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市).

2. 佐藤恵春, 三塚綾音, 北潔, 矢幡一英, 金子修, 小椋光, "熱帯熱マラリア原虫のプラストゲノムがコードする ClpC の解析", 第85回日本寄生虫学会年会, 2016年3月20日, 宮崎市民プラザ(宮崎県宮崎市).

3. Shigeharu Sato, "The apicoplast and plant-like haem metabolism in apicomplexan parasites", International Symposium 'Photosynthesis Researches in Tokyo Tech: Energy and Biomass', 2017年1月28日, 東京工業大学(神奈川県横浜市).

[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]

特になし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 恵春 (SATO, Shigeharu)

東京工業大学・科学技術創成研究院・研究員  
研究者番号: 80250125

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし