

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19320

研究課題名（和文）ユーラシアの東西で異なるトキソプラズマの病原性遺伝子の同定とその拡散の歴史

研究課題名（英文）Identification of different toxoplasma virulence genes in the east and west of Eurasia and the history of their spread

研究代表者

高島 康弘（Takashima, Yasuhiro）

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：20333552

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：わが国で分離されたトキソプラズマ株のうち、予想と実際の病原性が大きく乖離している1株のゲノム情報について分析を行ったが、病原性に関わることが知られているいずれの遺伝子座においても、従来報告された配列との間で変異が認められなかった。一方で一部の遺伝子のコピー数が異なった。以上の成果から、東ユーラシア地域のトキソプラズマ株において複数コピーされている遺伝子の重複や欠損がおこっているためであることが示唆された。このことが非典型的な病原性に関与している可能性がある。また、世界に分布を広げつつある欧州・北米型株は、現時点で少なくともロシア・タタルスタン共和国まで拡散していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トキソプラズマの遺伝子タイピングに基づく疫学的研究は世界中で行われている。しかし現状では申請者が見出したような、東部ユーラシアに特有の「高病原性Type II, Type III株」を機械的に低病原性・非病原性と誤判定している可能性が高い。これは本原虫感染症のリスク評価を誤らせる重大な懸念事項である。本研究の成果により、東部ユーラシア株の遺伝子構造が明らかになり、遺伝子タイピングによる病原性評価にか道を開いた。

研究成果の概要（英文）：Among the Toxoplasma strains isolated in Japan, we analyzed the genomic information of one strain whose expected and actual virulence differ greatly, and we analyzed it at any locus known to be involved in virulence. No mutation was found between any of the previously reported sequences. On the other hand, the copy numbers of some genes were different. These results suggest that duplication or deletion of multiple copied genes occurs in Toxoplasma strains in East Eurasia. This may be involved in atypical pathogenicity. He also revealed that European and North American stocks, which are expanding their distribution throughout the world, are currently spreading to at least Russia and the Republic of Tatarstan.

研究分野：獣医学

キーワード：トキソプラズマ 病原性 ユーラシア大陸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

トキソプラズマは世界中に分布しているが他の病原体に比べて遺伝的多様性が極めて低いとされる。例えば世界各地で分離された 100 以上の株がわずか 3 つの遺伝子クローンに分類されている [Howe and Sibley, 1995]。またこの分類に用いられた遺伝子座は必ずしも病原性に直接関係するものばかりではないが、クローンごとに病原性が異なることも知られている [Sibley and Boothroyd, 1992]。その後さまざまな検証を経て、トキソプラズマを遺伝子型ごとに、高病原性の Type I, 低病原性の Type II および非病原性の Type III に分類する「3 クローン仮説」が現在では広く受け入れられるに至った。ところが申請者らがわが国の分離株について解析したところ、遺伝子型は Type Type III に分類されながら非常に高い病原性を示す株など非定形高病原性株が複数見出された。あらためて 1980 代後半からの世界の研究の潮流を振り返ると、「3 クローン仮説」は当時研究が盛んであった欧米・北米の株から得られたデータをもとに提唱されていることが分かる。日本分離株がこの仮説に従わないという我々の予備データは、普遍的な真理と思われていた「3 クローン仮説」が、実は欧州・北米のローカルな状況を説明しているに過ぎなかったことを示している。同様に近年、アジアにおいて Type I, II, III とは違う遺伝子型のトキソプラズマが多数分離されている。現在トキソプラズマの遺伝子タイピングに基づく疫学的研究は世界中で行われている。しかし現状では上記の背景から東部ユーラシアに特有の「高病原性 Type II, Type III 株」を機械的に低病原性・非病原性と誤判定している可能性が高い。これは本原虫感染症のリスク評価を誤らせる重大な懸念事項である。また既知の「欧州・北米型の原虫」がユーラシア大陸のどの位置まで東進しているのかを把握する必要がある。

2. 研究の目的

1) 東部ユーラシア型原虫がもつ新規病原性遺伝子・アレルの同定

多様性の比較的高い(しかし病原性には直接関与しない)5 - 6 個の遺伝子配列による分類では Type II または Type III となるが、「3 クローン仮説」に反して、非常に強い病原性を持つ株を既に国内で分離している。このようなこれまで見られなかった新しいタイプの株、すなわち「東部ユーラシア型」の原虫に特有な遺伝子座、およびそのハプロタイプを同定する。

2) 「牧畜の歴史 1 万年」のなかで東部ユーラシア型原虫と欧州・北米型原虫が住み分けた歴史の解明

「3 クローン仮説」が規定する欧州・北米型の 3 タイプの株は、人類がネコを家畜化し牧畜をはじめた約 1 万年前に欧州～中近東で生まれ、わずか 1 万年の間に世界の広い地域で土着のクローンを駆逐して圧倒的多数を占めるに至ったと考えられる [Boyle et al., 2006]。その範囲は欧州を超え北米大陸全域にまで至るが、ユーラシア大陸において東側へどこまで広がっているのかは分からない。そこで欧州・北米型株分布の東端を知るべく、ロシアにける本株の分布を調べる。

3. 研究の方法

1) 東部ユーラシア型原虫がもつ新規病原性遺伝子・アレルの同定

申請者らが日本で分離した「東部ユーラシア型」の原虫株について現在全ゲノムシーケンスを実施中し、得られた「東部ユーラシア型」のゲノム情報と既に公開されている欧州起源の株

のゲノム情報を比較し、塩基配列に違いのある領域を検索する。

2)「牧畜の歴史1万年」のなかで東部ユーラシア型原虫と欧州・北米型原虫が住み分けた歴史ロシア各地のネコの糞便、野生動物あるいは家畜からトキソプラズマ DNA を分離し、1.および2.の過程で明らかにした「東部ユーラシア型に特有の遺伝子配列」を有するか否か調べる。

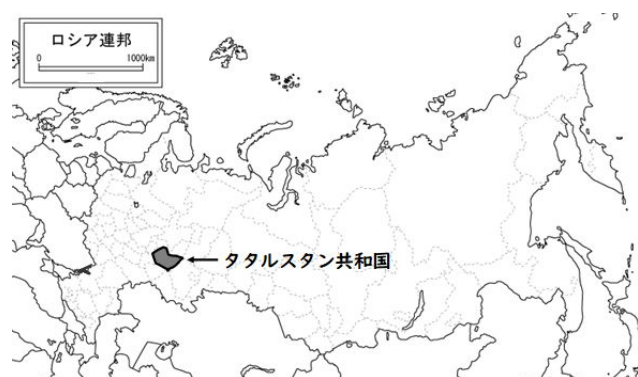
4. 研究成果

1) 東部ユーラシア型原虫がもつ新規病原性遺伝子・アレルの同定

わが国で分離されたトキソプラズマ株のうち、既存の手法で分類した遺伝子型から予想される病原性と、実際にマウスやブタに感染させて確認した病原体が異なる株を選抜した。このような条件に一致する株は複数得られたが、特に予想と実際の病原性が大きく乖離している1株について詳細な分析を行った。この株は岐阜県のネコからえられたものであり、本報告書においては以下「岐阜株」とする。この株は既知の手法では非病原性の Type III と分離されるが、実際にはマウスに中～強毒性を示す。まず岐阜株のゲノム DNA の塩基配列を次世代シーケンサーで明らかにし、ドラフトゲノムを得た。ところが病原性に関わることが知られているいずれの遺伝子座においても、非病原性の典型的な Type III と比べて、変異が認められなかった。プロモーター領域についても分析を行ったが、プロモーター活性に大きな影響を与えると思われる変異は見出されなかった。そこで各遺伝子座のコピー数に着目した。病原性に関わると知られている遺伝子の多くはゲノム上に複数回コピーされている。ところが比較的短いリードをアセンブリして作成したドラフトゲノムからは正確なコピー数が分からなかった。この問題を解決するためロングリード型のシーケンサーでゲノム情報を取得しなおした。ロングリード型シーケンサーは長いリードが得られる一方、塩基の読み間違い頻度が高く正確性にモンゴウがある。そこで正確性の高い従来の次世代シーケンサーで得たドラフトゲノム情報と比較検証しながら、全ゲノムの配列を再構築した。その結果、岐阜株と典型的 Type III 株の間にコードするアミノ酸配列が変わるような変異は非常に少ないが、いくつかの遺伝子において、そのコピー数が異なることが明らかになった。以上の成果から、東ユーラシア地域で病原性の比較的高い Type III 株が得られるのは、この地域の株において複数コピーされている遺伝子の重複や欠損がおこっているためであることが示唆された。

2)「牧畜の歴史1万年」のなかで東部ユーラシア型原虫と欧州・北米型原虫が住み分けた歴史の解明

ロシア各地のネコ、野生動物ならびに家畜からトキソプラズマのゲノム DNA を検出することを試み、得られた DNA についてはその遺伝子型を確定した。多くの検体では感染虫体数が少なく、トキソプラズマゲノム上のマルチコピーの遺伝子を標的とした PCR は陽性となるものの、シングルコピーの遺伝子座については PCR による増幅がうまくいかなかった。



そこで事前にトキソプラズマの genome だけを増幅する過程を加えたり、プローブを用いて宿主 DNA を除く過程を加えるなどして PCR 効率を向上させた。このような手法も応用して遺伝子型の特定をしたところ、首都であるモスクワから 700 km 程度東に位置するロシア連邦・タタルス

タン共和国(上図)のミンクから欧州 Type I 型である可能性が極めて高い株の DNA が多数検出された。いっぽう調査したミンク、テンおよびキツネからは、これ以外の遺伝子型のトキソプラズマ DNA は得られなかった。これらの結果は少なくとも欧州型トキソプラズマ株がタタールスタン共和国において他の株に比べて優勢になっていることを強く示唆している。これまで西ヨーロッパ各国、北米、中国及び日本におけるトキソプラズマの遺伝子型は報告が多数あったが、ユーラシア中央部に位置するロシアのデータがほとんどなかった。したがって欧州型トキソプラズマがどこまで東進しているのか不明であったが、本研究の成果により、少なくともヨーロッパロシアまでは拡散していることが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shuralev EA, Shamaev ND, Mukminov MN, Nagamune K, Taniguchi Y, Saito T, Kitoh K, Arleevskaya MI, Fedotova AY, Abdulmanova DR, Aleksandrova NM, Efimova MA, Yarullin AI, Valeeva AR, Khaertynov KS, Takashima Y.	4. 巻 67
2. 論文標題 Toxoplasma gondii seroprevalence in goats, cats and humans in Russia.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Parasitol Int.	6. 最初と最後の頁 112-114
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.parint.2017.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shamaev Nikolai D., Shuralev Eduard A., Petrov Sergey V., Kazaryan Gevorg G., Aleksandrova Natalya M., Valeeva Anna R., Khaertynov Kamil S., Mukminov Malik N., Kitoh Katsuya, Takashima Yasuhiro	4. 巻 76
2. 論文標題 Seroprevalence and B1 gene genotyping of Toxoplasma gondii in farmed European mink in the Republic of Tatarstan, Russia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102067 ~ 102067
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.parint.2020.102067	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Taniguchi Yuji, Yanagihara Itaru, Nakura Yukiko, Ichikawa Chihiro, Saito Taizo, Appiah-Kwarteng Cornelia, Matsuzaki Motomichi, Fukumoto Junpei, Nagamune Kisaburo, Kyan Hisako, Takasu Masaki, Kitoh Katsuya, Takashima Yasuhiro	4. 巻 72
2. 論文標題 A Toxoplasma gondii strain isolated in Okinawa, Japan shows high virulence in Microminipigs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 101935 ~ 101935
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.parint.2019.101935	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 谷口祐二、柳原格、名倉由紀子、松崎素道、福本隼平、喜屋武向子、鬼頭克也、永宗喜三郎、高島康弘
2. 発表標題 トキソプラズマ国内分離株の豚における病原性
3. 学会等名 第88回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shuralev EA, Shamaev ND, Mukminov MN, Nagamune K, Taniguchi Y, Saito T, Kitoh K, Arleevskaya MI, Fedotova AY, Abdulmanova DR, Aleksandrova NM, Efimova MA, Yarullin AI, Valeeva AR, Khaertynov KS, Takashima Y.
2. 発表標題 ロシアにおけるToxoplasma gondiiの疫学調査
3. 学会等名 第160回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	永宗 喜三郎 (Nagamune Kisaburo) (90314418)	国立感染症研究所・寄生動物部・室長 (82603)	
研究分担者	海野 明広 (Unno Akihiro) (50628592)	愛知県衛生研究所・生物学部医動物研究室・主任 (83907)	