

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20614

研究課題名（和文）集団ゲノミクスで解き明かす、東アジアのトキソプラズマの移動の歴史

研究課題名（英文）Population genomics reveals the migratory history of *Toxoplasma gondii* in East Asia.

研究代表者

猪原 史成（Ihara, Fumiaki）

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：00800773

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：これまで日本のトキソプラズマに関する詳細なゲノム研究は行われておらず、日本にいるトキソプラズマの危険性や起源についてはよく分かっていませんでした。日本および中国由来の計17株のトキソプラズマの全ゲノムを解析した結果、日本のトキソプラズマ集団は、ユーラシア大陸および南北アメリカ大陸の系統との間で独自の遺伝的混血が進んでいることが判明しました。特に注目すべきは、沖縄で確認された新型超強毒株が、中南米系統と同じルーツを持つ弱毒型株と、本土由来とみられる弱毒型株との交雑によって生じ、その病原性が著しく強くなっていることが示唆される点です。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全ゲノムシーケンスが一般的な現在も、トキソプラズマの分子疫学調査の多くはわずかな数のマーカー遺伝子から得られる一塩基多型（SNP）の情報に依存している。性的組換えによってゲノムがダイナミックに変化するトキソプラズマにおいて、不十分な数のマーカーに基づく分類法は多様性を過小評価し、遺伝子型の誤判定を引き起こす。本研究は、東アジアのトキソプラズマを対象とした世界初の集団ゲノミクス研究であり、極東アジア株のゲノム構造を明らかにした。さらに、南北アメリカ大陸のトキソプラズマと共通した新規の祖先系統を特定し、東アジアのトキソプラズマの進化史の解明に寄与する知見が提供された。

研究成果の概要（英文）：Detailed genomic studies on *Toxoplasma gondii* have not been conducted in Japan, and little was known about the risks and origins of *Toxoplasma* in Japan. We performed whole-genome analysis of 17 isolates from Japan and China, revealing that the Japanese *Toxoplasma* population has undergone unique genetic admixture with strains from Eurasia and the Americas. Particularly, this study strongly suggests that a highly virulent strain isolated in Okinawa emerged due to sexual reproduction between a low-virulence strain sharing roots with the South/Central American strains and low-virulence strain from mainland Japan, indicating a marked increase in virulence.

研究分野：寄生虫学

キーワード：トキソプラズマ 集団ゲノミクス 病原体の進化

1. 研究開始当初の背景

トキソプラズマは世界人口の約3割の感染が見込まれている細胞内寄生原虫である。免疫機能の低下した患者におけるトキソプラズマ脳炎や、胎児期の垂直感染による流産、視力障害や発達遅延などを引き起こす先天性トキソプラズマ症が問題とされる。欧米でヒトや家畜の症例の大半を占めるハプログループ(HG)2や3は弱毒型として知られ、正常なヒトで重症化することは稀であるが、中南米の症例では健康なヒトであっても眼トキソプラズマ症などの臨床症状をもたらす例が多く報告されている。この要因として、強毒型が持つ病原性因子が考えられている。日本国内でも、ほぼ毎年ヒトと家畜のトキソプラズマ症が報告されているが、本格的なリスク評価は行われておらず、どのような遺伝子型が分布しているかよく分かっていない。国内に分布するトキソプラズマの遺伝子型を調べた研究は数件あるが、それらは低解像度な解析であった。我々は、研究開始当初に利用可能であった4株のゲノムを用いてゲノムワイド祖先分析を行った。その結果、これらのトキソプラズマのゲノムは欧米系統、北米系統、中国系統のゲノムで構成された混血型3株と弱毒HG3の1株であることが明らかとなり、我が国の主要なトキソプラズマが他の地域で標準的な系統と異なる遺伝的混血の集団であることが示唆された。(右図)



2. 研究の目的

そこで本研究はまず、国内に分布するトキソプラズマの集団構造の解明を目的とした。そのためまず、①日本のトキソプラズマの収集および新規株の分離を行なった。次に、②より多くのゲノム情報を入手する目的で、ターゲット濃縮シークエンス法を世界で初めてトキソプラズマに適用し、生きた分離株としては失われてしまった系統のゲノム情報を復元した。③得られたゲノム情報をもとに集団ゲノミクス手法で世界的なトキソプラズマ集団とゲノム比較解析を行った。本研究によって、世界的なトキソプラズマの移動の歴史についての知見が得られるだけでなく、日本のトキソプラズマの遺伝学的な性質を明らかとすることで、我が国にとって適切な公衆衛生学的な施策を考えるための基盤的知見を提供する。

3. 研究の方法

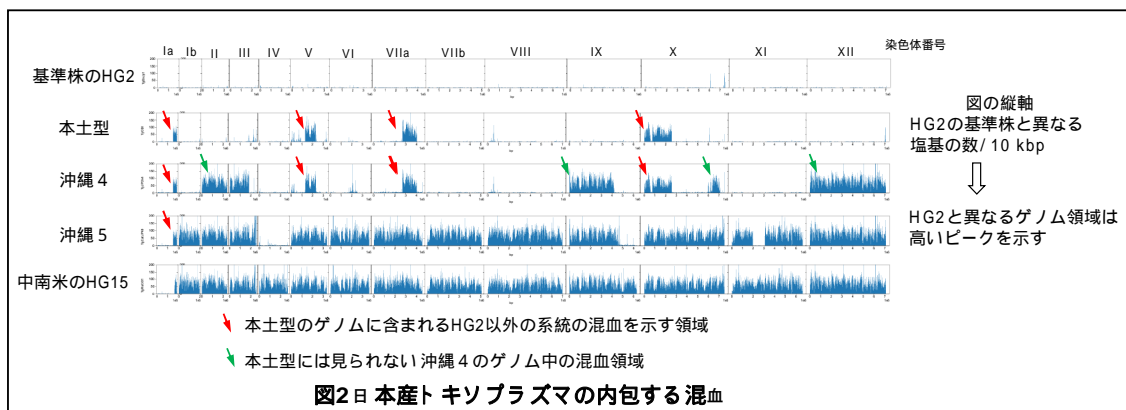
① 国内のトキソプラズマ研究者らと共同研究とすることで、過去に国内で分離された計7株(北海道1, 東京2, 岐阜1, 沖縄3)のトキソプラズマの分与を受けた。次に、新規株の樹立を企図して、各地で狩猟された野生動物(クマ、水鳥、シカ、イノシシ、ノネズミ)のサンプルを収集した。最終的に300以上の検体からイノシシ由来の2系統の新規株の樹立に成功した(TgBoJp1とTgBoJp2と命名)。上記の9系統について、精製したタキゾイト虫体からゲノムDNAを抽出し、NovaSeqを用いて全ゲノムシークエンス解析を行った。

② 凍結サンプルとして分与されたものの、一部(北海道1, 沖縄6)の系統は解凍しても原虫の増殖が認められず生きた分離株としては失われた。そこで、ゲノム濃縮システム(SureSelect Target Enrichment System)を活用して、感染動物細胞のDNAから直接寄生虫ゲノムのシークエンスを実施した。その結果、3系統については0.1%未満の寄生虫DNAを含むサンプルから30倍平均ゲノムカバレッジを得ることができた。残りの4系統についても高精度なSNPを全体の10-74%の割合で取得することができた。これらの株は、全ゲノムの集団構造解析には不適合であったが、大きな偏りなく各染色体のSNP情報(4万~32万SNPs)を持っていることから、正確な遺伝子型の決定には十分であった。

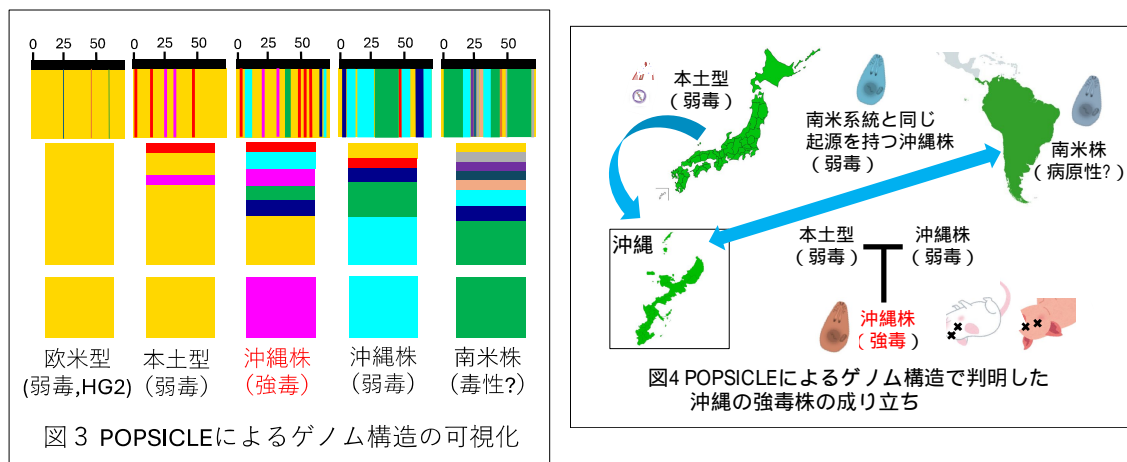
③ ①で収集されたシークエンスデータに、世界各地の各ハプログループを代表する系統を加えたデータセットを構築した。標準株であるHG2のME49株を参照配列としてマッピングを行い、GATKv4を用いてSNPを検出した。SNPを元に核ゲノムの系統解析に加えて、母系遺伝するため組換えの生じないオルガネラの系譜を比較分析することで日本集団の起源を明らかとした。さらに、祖先分析を行い共通して保存された領域と異なる歴史を辿ったゲノム領域の系統関係を特定した。②で取得したシークエンスデータは、集団構造解析とは別に遺伝子型判定のための遺伝的距離解析のみに使用した。

4. 研究成果

本研究では、日本国内のトキソプラズマ株とデータベースに登録されている世界各地の65株のゲノムを比較分析した。遺伝的解析の結果、日本のトキソプラズマは欧米で広くみられるHG2のゲノムを持ちながら、他の系統との顕著な遺伝的混血が見られた。特に注目すべきは、近年沖縄で分離された高病原性の【沖縄4】株で、さらに多様な遺伝的混血を持つことが判明した。また、【沖縄5】は中南米でのみ見られるHG15と類似していることが明らかになった(図2)。ゲノム濃縮で部分的なシーケンスデータを取得した系統を用いた遺伝的距離解析によって、沖縄4や沖縄5のような系統がこの他にも存在していることが確認された。このことは、稀な組換えや輸入によって持ち込まれたイレギュラーではなく、沖縄で蔓延している系統であることを示唆している。



共同著者であるアメリカ国立アレルギー・感染症研究所の Grigg 博士のラボで開発された「POPSICLE」というツールを使用して、トキソプラズマゲノムの組換え構造を直感的に視覚化した。その結果、日本で広く見られる混血株がHG2(黄)、中国に分布するHG13(赤)そして未知の系統(ピンク)から構成されていることが確認された。さらに、未知の系統の起源が北アメリカ大陸の野生ネコ科動物(ピューマ)からであることが推測され、日本列島におけるユーラシア大陸および北アメリカ大陸の系統間の独自の遺伝的交流が明らかとなった(図3)。



【沖縄5】の詳細な構造分析では、中南米のHG15と類似した祖先構成が見られたが、独自の祖先系統(シアン)のゲノムが大きな割合を占めることが発見された。この祖先系統(シアン)は実質的に中南米の2株にしか見られず、沖縄固有のトキソプラズマとの遺伝的な繋がりが確認された。さらに、【沖縄4】は日本土着の系統と【沖縄5】の交雑から生じた新型強毒株であることが判明し、マウスやミニブタでの実験からもその強い病原性が確認されている。また、【沖縄5】のゲノムの40%を占める祖先系統(シアン)が中南米では断片化した形跡のみで確認され、中南米のトキソプラズマの一部が東アジアに起源を持つ可能性が示唆された(図4)。

トキソプラズマは遺伝的特性によって病原性が大きく異なるため、地域固有の株の特性を理解することは、効果的な対応戦略を開発するために重要な情報となる。この研究によって得られた知見をもとに、沖縄の強毒型トキソプラズマとヒトやブタの病気との関連を調査し、他の地域、特に日本本土への本系統の拡散を防止するための監視体制の構築・強化が求められる。総じて、本邦での遺伝的に多様なトキソプラズマが生じる独特なメカニズムに基づいて、日本のトキソプラズマ症の予防および管理の方法を再考する必要があることを示唆している。

本研究は、日本のトキソプラズマ集団に関する詳細な遺伝学的解析としての役割だけでなく、トキソプラズマの伝播と進化についてのミッシングリンクを繋ぐ報告としての側面を持つ。トキソプラズマの集団ゲノム構造は、欧米のグループの先行研究によってヨーロッパ、アメリカ大陸で流行する系統については理解されつつある。しかし、アジア、アフリカのゲノム情報が十分でなく、特に東アジアのトキソプラズマゲノムは中国の1株に限定されていたために、広大なアジア大陸の情報は欠如していた。本研究は、極東アジアの限られた国（日本と中国）であるが、そのゲノム構造はこれまでに想定されていたアジア-アフリカ、アジア-北アメリカ大陸間の繋がりを支持するものに加えて、沖縄と中南米で同じ起源を持つと考えられ祖先系統が特定された。今後、未解析の地域、特に東南アジアのトキソプラズマゲノムを調査し、アジアと北米・中南米のトキソプラズマ間の遺伝的な繋がりを深く理解することによって、未だ不明な点が多いアジアのトキソプラズマと他の地域との繋がりが明らかとなることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fumiaki Ihara, H. Kyan, Y. Takashima, F. Ono, Kei Hayashi, T. Matsuo, M. Igarashi, Y. Nishikawa, Kenji Hikosaka, H. Sakamoto, S. Nakamura, D. Motooka, K. Yamauchi, M. Ichikawa-Seki, S. Fukumoto, M. Sasaki, H. Ikadai, K. Kusakisako, Y. Ohari, A. Yoshida, M. Sasai, M.E. Grigg, and M. Yamamoto	4. 巻 -
2. 論文標題 Far-East Asian Toxoplasma isolates share ancestry with North and South/Central American recombinant lineages.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-024-47625-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Fumiaki Ihara, Masahiro Yamamoto	4. 巻 5
2. 論文標題 The role of IFN- γ -mediated host immune responses in monitoring and the elimination of Toxoplasma gondii infection	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 199-210
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxae001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 猪原史成, 喜屋武尚子, 高島康弘, 小野文子, 林慶, 松尾智英, 五十嵐慎, 西川義文, 山内貴義, 関まどか, 福本晋也, 佐々木基樹, 筏井宏美, 草木迫浩大, 尾針由真, 吉田彩子, 笹井美和, 山本雅裕
2. 発表標題 Population genome analysis of Toxoplasma gondii isolated from an island in Southern Japan identifies unknown ancestral lineages linking T. gondii in East Asia and the Americas
3. 学会等名 日本進化学会大25回大会
4. 発表年 2023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
連携研究者	高島 康弘 (Takashima Yasuhiro) (20333552)	岐阜大学・応用生命科学部・准教授 (13701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関