

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660253

研究課題名(和文)腸管寄生性コクシジウム原虫のシゾン形成機構の解明

研究課題名(英文)Studies on mechanism of schizont formation of gut parasitic coccidian protozoa

研究代表者

辻 尚利(Tsuji, Naotoshi)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：70355171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：鶏コクシジウム症はコクシジウム原虫による致死的な出血性腸炎に特徴づけられ、中でも*Eimeria tenella*は最も重篤な症状を引き起こす。病原性の強い強毒株とこの強毒株から作出した弱毒株(病原性に直接関与する虫体発育期の1つであるシゾンが低増殖性になったもの)についてRNA発現解析を実施した。強毒及び弱毒株の責任遺伝子として、強毒株では代謝関連及び細胞侵入因子、早熟株では細胞分裂、ペプチダーゼ関連遺伝子の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Chicken coccidiosis is caused by *Eimeria* spp. is characterized by watery or hemorrhagic diarrhea, resulting in death in severe cases. *E. tenella* is recognized as the most significant pathogen in the genus. We compared the differential transcription in the Eimerian parasitic stage sporozoite of virulent and precocious strains to gain biological insight into the pathogenicity and precocity. Approximately 90% of the reads from both strains were mapped to the genome, and 16,630 estimated transcript regions were identified. Genes related to proteases, cell attachment proteins, mitochondrial proteins, and transporters were most strongly upregulated in the virulent strain. The expression of genes associated with cell survival, development, or proliferation was strongly upregulated in the precocious strain. These findings suggest that virulent strains survive long before invasion and invade actively/successfully into host cells, whereas proliferative processes appear to affect precocity.

研究分野：寄生虫学

キーワード：獣医学 原虫感染症 シゾン

1. 研究開始当初の背景

(1) 急務となっている現行薬剤に代わる新たなコクシジウム症制圧技術の開発：寄生虫感染の治療はもとより、飼料添加剤などとして日常的に使用されている抗コクシジウム剤は、家畜動物の生産性向上を図る上で極めて重要な役割を果たしているが、その効果、安全性、経済性の面から重大な問題点を含んでいる。また、抗コクシジウム剤のほぼ全ては、既存農薬の転用・流用にすぎない。このような実態が世界的に半世紀以上も継続していることが、現在抱えている薬剤耐性原虫、残留問題などの弊害を招いている。世界的に安全性重視の観点から、EU では飼料添加剤における抗コクシジウム剤の全面禁止を進めている。本来、抗コクシジウム剤の開発は対象であるコクシジウム原虫に特有の代謝・生理の特性に立脚すべきで、この原則から大きく逸脱した開発状況を早急に転換する必要がある。

(2) 抗コクシジウム剤開発のための新たな研究プラットフォームの構築：ヒト・動物を宿主とする寄生虫は、宿主が保有しない各種代謝系を進化的に発達させ、それら代謝系の連携・協調作用のもと、自己の生活環を維持してきている。近年、こうした特異代謝を狙って作用する分子創薬の考えが導入され、標的分子の立体構造情報に基づいた化合物が次世代の抗寄生虫薬として期待されている。

2. 研究の目的

シゾン形成機構を支える分子群を標的とする抗コクシジウム剤の開発 (図1)

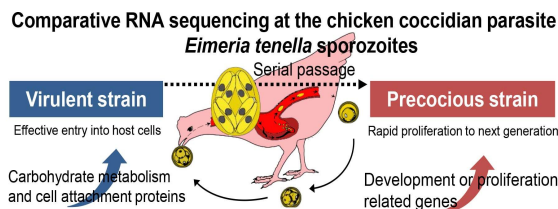


図1. コクシジウム原虫の強毒(virulent)・弱毒(precocious)株の発現 RNA 解析から創薬分子を発掘する。

(1) 盲腸上皮細胞におけるシゾン形成に

参画する分子の応答機構の解明：シゾン形成の発端は何か、またいつどこで始まるのか。また、多数のメロゾイトを包含するシゾンの包囲膜は、一過性の新生オルガネラであることから、その形成過程の形態学的特性を明らかにする。

(2) シゾン形成ネットワークの論理的記述：シゾンに構築されている低酸素応答機構を細胞内外、メロゾイト間に構築されたネットワークとしてとらえ、組織レベルの低酸素応答機構を明らかにする。

3. 研究の方法

メロゾイトの侵入からシゾン包囲膜の崩壊に至る過程を、シゾン形成が減弱した早熟株とその親株である致死性の強毒株を用いて初雛で作製し、器官・細胞レベルでシゾンの形成機構を解析した。すなわち、盲腸上皮細胞に寄生したシゾンの遺伝子発現パターンについて次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析した。この成果をもとに、シゾン・メロゾイトの単離技術とニワトリ-*E. tenella*感染系を用いて、区分けした盲腸からシゾンを単離し、網羅的なトランスクリプトーム解析を行った。我々が先行研究で報告している*E. tenella*ゲノムにおける低酸素応答情報伝達経路に参画する分子群を選抜し、コクシジウム原虫でのドラフトマップを作成した。

4. 研究成果

早熟化された弱毒株は、強毒株に比べスポロシストが盲腸粘膜に迅速に侵入し、それに続く3代ある無性生殖期が著しく短縮または1代欠落し、シゾンの増殖性が低下した特徴を有する。宿主体内発育期の初段階であるスポロゾイトの mRNA から cDNA を合成し、超高速シーケンサーによる塩基配列データを取得し、網羅的に発現遺伝子の比較解析を行った結果、それぞれ1億及び8,000万のリードをアイメリアドラフトゲノム配列データに

マッピングすることができた(図2)。約9割のリードがマッピングされ、強毒株では代謝関連及びロブトリーやマイクロネームなど宿主細胞関連遺伝子の発現量が増大し、弱毒株では細胞分裂に係るペプチダーゼ関連遺伝子の発現量が増大していることが判明、強毒及び弱毒株間で特有の発現パターンが確認できた(図3)。配列多型解析から、1塩基置換が複数確認出来る相同性の低い領域が確認でき、これらの領域には強毒及び弱毒化の責任遺伝子が含まれていることが強く示唆された。

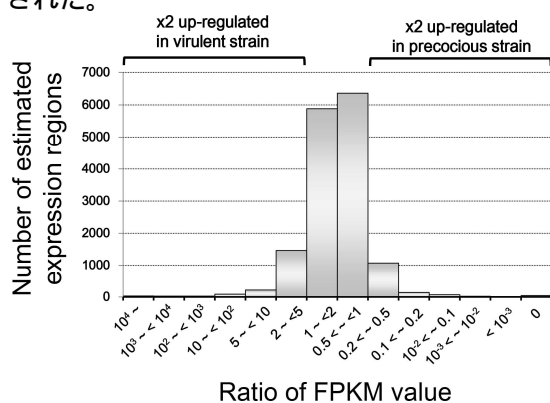


図2. 強毒及び弱毒株間における発現量の比較。

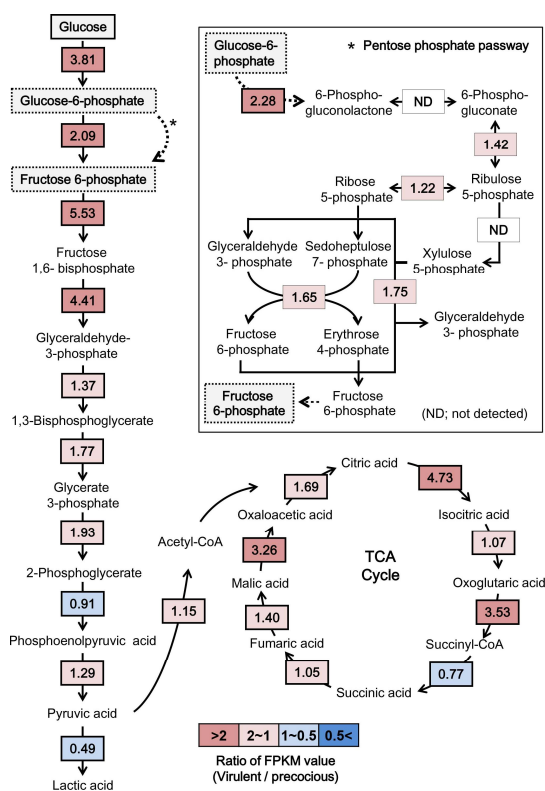


図3. 解糖系、TCA サイクル、ペントースリン酸回路における発現量の違い。

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3件)

Matsubayashi M, Kawahara K, Hatta T, Yamagishi J, Miyoshi T, Anisuzzaman, Sasai K, Isobe T, Kita K, Tsui N. (2016). Transcriptional profiles of virulent and precocious strains of *Eimeria tenella* at sporozoite stage; novel biological insight into attenuated asexual development. Infect Genet Evol. 査読有, 40: 54-62. Doi:10.1016/j.meegid.2016.02.021

Takeo T, Tanaka T, Matsubayashi M, Tsujio M, Umemiya-Shirafuji R, Tsui N, Fujisaki K, Matsui T, Matsuo T. (2015). Evaluation of *Eimeria kriegsmanni* as a murine model for testing the efficacy of anti-parasitic agents. Acta Parasitologica. 査読有, 60:190-195. Doi:10.1515/ap-2015-0027.

Jałalski M, Wakaguri H, Kischka TG, Nishikawa Y, Kawazu SI, Matsubayashi M, Kawahara F, Tsui 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. (2015). DB-AT: a 2015 update to the Full-parasites database brings a multitude of new transcriptomic data for apicomplexan parasites. Nucleic Acids Research. 査読有, 43(Database issue):D631-6. Doi: 10.1093/nar/gku1240.

(学会発表)(計9件)

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。2016年3月19日。宮崎市民プラザ(宮崎市)

長濱 まどか、佐藤 暖、志波 智生、松林 誠、稲岡 ダニエル健、辻 尚利、北 潔、原田 繁春。抗鶏コクシジウム症薬の開発を目指した *Eimeria tenella* Dihydroorotate dehydrogenase の発現・精製と結晶化。第38回日本分子生物学

会年会 (BMB2015) . 2015 年 12 月 2 日 .
神戸ポートアイランド (神戸市中央区)
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 回日本獣医学会学術集会 . 2015 年 9 月 8 日 . 北里大学獣医学部 (十和田市)
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 . 2015 年 3 月 22 日 . 杏林大学 (三鷹市)
稲岡 ダニエル 健、松林 誠、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、辻 尚利、北 潔 . *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 87 回日本生化学会大会 . 2015 年 3 月 21 日 . 国立京都国際会館・グランドプリンスホテル (京都市)
Matsubayashi M、Kawahara F、Hatta T、Miyoshi T、Yamagishi J、Anisuzzaman、Shimura K、Isobe T、Kita K、Iwata A、Tsuji N . A novel biological insight into the comparative transcriptional profiling between virulent and precocious strains at invasive stage of *Eimeria tenella*. 18th Japanese-German Cooperative Symposium on Protozoan Diseases. 2014.10.1. Dresden (Germany)
Matsubayashi M、Kawahara F、Hatta T、Miyoshi T、Yamagishi J、Anisuzzaman、Shimura K、Isobe T、Kita K、Iwata A、Tsuji N . A novel biological insight into the comparative transcriptional profiling between virulent and precocious strains at invasive stage of *Eimeria tenella*. 11th International Coccidiosis Conference. 2014.9.28. Dresden (Germany)
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* 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 . 2014 年 9 月 9 日 . 第 157 回日本獣医学会学術集会 . 北海道大学 (札幌市)
稲岡 ダニエル 健、松林 誠、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、辻 尚利、北 潔 . *Eimeria tenella* スポロゾイト呼吸鎖の生化学的解析 . 第 12 回分子寄生虫マラリアフォーラム . 2014 年 9 月 1 日 . 帯広畜産大学 (帯広市)

〔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〕
<http://web.med.kitasato-u.ac.jp/edures/kiseichu.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

辻 尚利 (TSUJI NAOTOSHI)
北里大学・医学部・教授
研究者番号 : 7 0 3 5 5 1 7 1

(2) 研究分担者

松林 誠 (Matsubayashi Makoto)
大阪府立大学・生命環境科学研究科 (系)・
准教授
研究者番号 : 0 0 3 2 1 0 7 6