

鶏コクシジウムの新規薬剤開発を目指した盲腸内発育期の環境適応代謝経路に関する研究

松林 誠¹⁾, 八田岳士¹⁾, 辻 尚利¹⁾

Studies on metabolic pathways essential for developmental stages of chicken *Eimeria* for controlling coccidiosis

Makoto MATSUBAYASHI¹⁾, Takeshi HATTA¹⁾ & Naotoshi TSUJI¹⁾

背景と目的

鶏コクシジウム症は、*Eimeria* 属原虫の感染によって起こる。現在、約7種類の*Eimeria*が知られているが、中でも病原性が高いとされるのは*E. tenella*であり、感染鶏は下痢、血便を呈し、重症例では死亡する。予防薬としてポリエーテル系抗生物質や治療薬としてサルファ剤等が用いられているが、鶏への強い副作用や薬剤耐性株の出現が問題となっている。また、鶏畜産物への薬剤残留問題から、これらの薬剤の使用には厳しい制限が設けられている。オーシストは各種消毒薬により殺滅することができず環境中で長期間生存可能であるため、養鶏場が*Eimeria*に汚染された場合、清浄化は極めて困難となる。このように、養鶏産業においてコクシジウム症防圧対策の成否は、生産性向上に直結する。しかし、現行の防圧法は、これらの抗コクシジウム剤に深く依存しているのが実情である。よって、これら防圧法に代わり、宿主である鶏に副作用がなく食品衛生の観点からも安全で、原虫特異的に作用する新たな薬剤開発の戦略が希求されている。

*E. tenella*の生活環は、外界発育期と宿主体内発育期の2つのステージからなる。感染鶏から糞便とともに排泄されたオーシストは、一定の酸素、温度、湿度の環境下でスポロシストとさらにその内部に侵入型虫体であるスポロゾイトを形成する。この孢子形成オーシストを新たな鶏が摂取すると、腸管内で脱囊したスポロゾイトは盲腸粘膜組織に侵入し、数回の無性生殖後に有性生殖を

行う。しかしながら、寄生部位となる盲腸組織内における*E. tenella*の詳細な生活環は不明であった。

*E. tenella*の宿主体内での発育の場である消化管内は、酸素分圧の低い低酸素環境であると考えられる。先行研究として解析が進んでいる回虫等は、寄生する消化管内の低酸素環境下において、酸素を利用しない糖分解経路によりATPを合成することができる。つまり、外界での自由生活期から宿主の腸管内へと発育期の変換に伴い、我々哺乳類とは大きく異なる独自のエネルギー代謝系（嫌氣的エネルギー代謝）を用いて寄生適応している¹⁾。本研究では、鶏コクシジウム症の新規防圧法の開発に向け、*E. tenella*の分化・増殖機構を明らかにするため原虫が保有する特異代謝経路の同定、および腸管内発育期の虫体の生存基盤を支える分子の同定を試みることを目的とした。

研究の概要

1. 外界発育期トランスクリプトーム解析による基盤情報整備

*E. tenella*は、推定で約60 Mbpのゲノムを有するが、未だ全ゲノムの解読には至っていない。そのため、*E. tenella*は同じアピコンプレックス門に属し全ゲノムが解読されているマラリアやトキソプラズマ原虫に比して、遺伝子配列情報が限られている。そこで、著者らは網羅的かつ迅速に*E. tenella*のmRNA遺伝子情報を得るため、動物衛生研究所で継代維持されている*E. tenella* NIAH株を用いて以下の解析を行った。対象とした発育期は、高純度の精製が可能な外界発育期（孢子形成期）であるオーシストとスポロゾイトとした。方法は、

1) 農研機構 動物衛生研究所 細菌・寄生虫研究領域

感染鶏の糞便から精製したオーシストについて、28℃培養0～96時間後の（未）孢子形成オーシスト、および *in vitro* で脱囊させたスポロゾイトから mRNA を精製した。断片化した mRNA から cDNA を合成し、超高速シーケンサーにより塩基配列の決定を行った。得られたリードについて assemble を行った結果、25,880 の contig 配列が得られ、Blastx 検索の結果、7,780 contig (30.1%) が既存の登録配列と相同性が高かった (E -value < $1e-6$)。相同性の低かった配列には、これまでに報告のない *E. tenella* の新規遺伝子が多く含まれている可能性が考えられた。相同性の高かった contig のうち、*E. tenella* のものはわずか 513 contig (6.6%) であり、6,051 contig (77.8%) はトキソプラズマ原虫由来のものであった (図1)。これにより、遺伝的に近縁であるトキソプラズマ原虫の遺伝子情報が有効利用できることが明らかにされた。Blastx 検索により contig に付加された遺伝子情報を精査すると、これまで遺伝子発現レベルでの知見がなかった *Eimeria* のエネルギー産生等に係る代謝経路、つまり TCA サイクル、解糖系、ペントースリン酸系代謝酵素が数多く含まれていた。これらの配列は、宿主体内発育期との発現比較を行う上で貴重な基盤情報となり、外界発育期では我々哺乳類と同様の代謝経路を有することが明らかにされた²⁾。

2. 宿主体内発育期の同定と単離方法の確立

E. tenella の盲腸組織内における詳細な生活環を明らかにするため、以下の解析を行った。幼雛にオーシストを投与し、*E. tenella* の感染盲腸を経時的、部位別に採取し、病理組織切片を作製し、本原虫の詳細な生活環を解析した。また、同定が困難な未発育の微小虫体の検

出には、発育ステージ間で広く交差反応する抗体を作製し免疫染色を行った。その結果、盲腸組織内での *E. tenella* の生活環は、3世代の無性生殖期とその後の有性生殖期（ミクロ・マクロガメトサイトの発育）からなることを確認した³⁾。第2代無性生殖期のみ寄生部位が盲腸深層の粘膜固有層におよび（その他の発育期は上皮細胞内にとどまる）、この時にシズントは5倍以上の大きさに膨張し、内部に200以上の侵入型虫体（メロゾイト）を包蔵していた。この第2代無性生殖期のシズントの発育に伴い、感染鶏の盲腸組織に出血が起こり感染4日目に血便が排泄された。盲腸の寄生部位は、主に盲腸中部と深部であり、第3代無性生殖期から浅部付近にも寄生が確認された。発育ステージが移行する時期には、同時期に2ないし3世代の虫体が混在しており、従来の Percoll を使用する方法⁴⁾では単一の発育期の虫体の精製は困難であることが明らかにされた。

著者らは、単一の発育期の虫体を得るため、顕微鏡下で組織標本にレーザー光を照射して切出しが可能なレーザーマイクロダイセクション (LMD) の使用を検討した。方法は、感染盲腸を RNAase free 下で切り出し即座に凍結した。-20℃下において薄切切片を作製し、トルイジンブルーにて短時間の簡易染色を行った。顕微鏡下で粘膜固有層の第2代シズントを形態的に同定し、LMDにより切り取り total RNA の抽出後、cDNA を合成した。約10,000個のシズントを切り出した結果、分解のない約0.8 μgの良質な RNA が抽出でき、RT-PCRでの増幅も可能であることが明らかにされた³⁾。本方法により、*E. tenella* 無性生殖期において単一の発育期のトランスクリプトーム解析が可能となった。

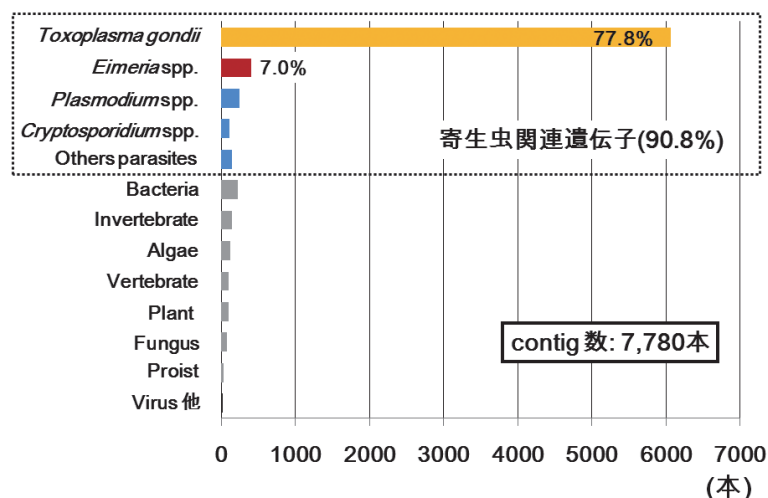


図1. Blastx 検索による有意 (E -value < $1e-6$) に遺伝子情報が付加された contig の内訳

3. 第2代無性生殖期のマイクロアレイ解析

最も病原性の高い第2代無性生殖期について、網羅的に変動遺伝子を同定するためマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析を行った。方法は、NCBI等に登録されている *E. tenella* の EST 情報からプローブを作成し、*E. tenella* 特異マイクロアレイを構築した。上述2の方法により、鶏感染盲腸を採取し、顕微鏡下で第2代シズントを形態的に4つのステージ（1：虫体の直径 15 μm 以下の発育初期未成熟シズント，2：15～30 μm の発育中期未成熟シズント，3：30 μm 以上の発育後期未成熟シズント，4：30 μm 以上のメロゾイト包含成熟シズント）に分類し、それぞれの虫体を LMD により切り取り分取した。それぞれ total RNA を抽出後、cDNA を合成しハイブリダイゼーションを行い、蛍光強度値による発現定量を行った。マイクロアレイのプローブとした遺伝子情報については最適化を行うため、CLC Genomics Workbench を用いて再 Blastx 検索を行い最新のアノテーション付けをし、階層型クラスタリング等のデータマイニングを実施した。その結果、シズントの細胞分裂期（分類ステージ1から2，および2から3）、メロゾイト形成に係る分化期（3から4）に、それぞれ 412, 523, 190 の遺伝子が up-regulate していることが明らかにされた。その一部は、蛋白質レベルでもシズントの分化期に発現が確認された（図2）⁵⁾。また、嫌氣的エネルギー代謝の中心を担うミトコンドリア⁶⁾について、第2代無性生殖期でその複合体の発現が確認された⁷⁾。以上より、第2代無性生殖期において高発現す

る遺伝子を同定することができ、これらはシズントの分化・増殖に必須である遺伝子を含む可能性がある。また、盲腸組織内での発育期において、ミトコンドリアが機能性を有する可能性が示唆された。

4. 宿主体内発育期における環境適応代謝経路の解明

E. tenella の盲腸内での発育期における、エネルギー代謝に係る基盤情報を得るため以下の解析を行った。まず、Mattig らの方法⁸⁾を改良し、第2代のメロゾイトを短時間かつ高純度で精製する方法を確立した。この精製メロゾイト、およびスポロゾイトを RPMI に浮遊し、有酸素（20% O₂）または低酸素（5% O₂）環境下で生存率を計測した結果、両環境下で虫体生存率に差はみられず生存には酸素が必要でないことが明らかにされた。次いで、5% O₂ 下において、ミトコンドリア複合体機能を阻害する化合物を添加したところ、スポロゾイトでは生存に影響はみられず、メロゾイトでは殺滅効果が観察された。これにより、盲腸で分化・増殖するメロゾイトは、外界発育期のスポロゾイトとは異なるエネルギー代謝経路を有する可能性が考えられた。現在、精製ミトコンドリアを用いて、生化学的手法により酵素活性を計測し、また阻害化合物添加による *in vitro* での活性抑制効果を解析中である。また、呼吸鎖の中心を担うミトコンドリア複合体について、RACE 法により全塩基配列の解析を進めている。現在のところ、全長の解読が完了した2つのサブユニットを両虫体間で比較した結果、発育ステージ間では100%一致していた。以上より、盲腸内で分化・増殖する無性生殖期虫体は外界発育期とは異なるエネルギー代謝を有し、残りの未解読の複合体サブユニットの構造が異なる可能性が考えられた。

今後に向けて

本研究課題の目標は、第2代シズントの分化・増殖、および生存基盤に関わる原虫特異遺伝子（我々哺乳類や鳥類とは構造的に全く異なることが推測される）を同定し、これらの遺伝子を *E. tenella* の生活環を完全に遮断する薬剤ターゲット（または、ワクチンターゲット）とすることである。最も強い病態を発現する第2代無性生殖期は、癌細胞のように組織内で爆発的に増殖し、周辺組織を破壊する。この発育期の虫体にはミトコンドリアは退化せず明瞭なクリステ構造を有すること（未発表）、そして、いくつかの呼吸鎖複合体の発現が確認できている。一方で、第2代シズントは癌細胞のように好氣的代謝である酸化的リン酸化を抑制し、意図的に解糖

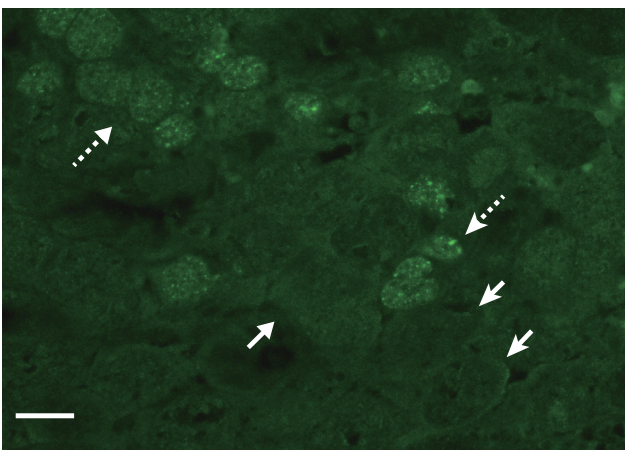


図2. システインプロテアーゼを認識する抗体による免疫染色。破線矢印は盲腸組織内で発育する第2代無性生殖期の未成熟シズント，実線矢印は成熟シズント（反応は消失）。シズント成熟過程において発現している。Scale bar = 20 μm 。

系のみを亢進して増殖や転移に必要な ATP を産生する (Warburg 効果と呼ばれる)⁹⁾ 可能性も, 完全には否定できていない。今後は, 第2代無性生殖期の *de novo* シーケンス解析による網羅的発現解析, および複数の複合体にターゲットを絞った詳細な発現解析により環境適応代謝経路を明らかにしていく。

謝 辞

本研究は平成 23 ~ 24 年度動物衛生研究所重点強化研究課題として実施し, 一部は科学研究費補助金 (若手 B; 課題番号 22700773, 基盤 C; 課題番号 23580445) の助成を受けて実施したものである。

引用文献

- 1) 北 潔: 寄生虫ミトコンドリアにおけるダイナミックな代謝変換. 医学のあゆみ. 232, 766-772 (2010).
- 2) Matsubayashi, M., Hatta, T., Miyoshi, T., et al.: High-throughput RNA sequencing profiles and transcriptional evidence of aerobic respiratory enzymes in sporulating oocysts and sporozoites of *Eimeria tenella*. Infect. Genet. Evol. 18, 269-276 (2013).
- 3) Matsubayashi, M., Hatta, T., Miyoshi, T., et al.: Synchronous development of *Eimeria tenella* in chicken caeca and utility of laser microdissection for purification of single stage schizont RNA. Parasitology. 139, 1553-61 (2012).
- 4) Geysen, J., Ausma, J. & vanden Bossche, H.: Simultaneous purification of merozoites and schizonts of *Eimeria tenella* (Apicomplexa) by Percoll flotation and assessment of cell viability with a double fluorescent dye assay. J. Parasitol. 77, 989-93 (1991).
- 5) Matsubayashi, M., Hatta, T., Miyoshi, T., et al.: Localization of Eimeripain, an *Eimeria tenella* Cathepsin B-Like Cysteine Protease, during Asexual and Sexual Intracellular Development in Chicken Ceca. J. Vet. Med. Sci. 印刷中 (2014).
- 6) Harada, S., Inaoka, D.K., Ohmori, J., et al.: Diversity of parasite complex II. Biochim. Biophys. Acta. 1827, 658-67 (2013).
- 7) Matsubayashi, M., Hatta, T., Miyoshi, T., et al.: Transcriptome analysis on the asexual second-generation development of *Eimeria tenella* in the chicken ceca using specific DNA microarray. Thailand - Japan Joint Conference on Animal Health 2012: The 25th Year Anniversary of National Institute of Animal Health, May 30 - 31. Program and Abstracts of Papers. 43-46 (2012).
- 8) Mattig, F.R., Drössigk, U. & Entzeroth, R.: A simple method for the purification of *Eimeria tenella* sporozoites. Appl. Parasitol. 34, 139-142 (1993).
- 9) Warburg, O.: On the origin of cancer cells. Science. 123, 309-314 (1956).