

学 位 論 文 要 約

氏 名 土 井 り え

題 目 ウシに寄生する *Sarcocystis cruzi* ブラディゾイトのトランスクリプトーム解析及び定量検査法に関する研究

Sarcocystis 種はヒトを含む哺乳類、鳥類、爬虫類及び魚類などの様々な脊椎動物で感染が確認され、現在に至るまでに 200 以上の種が報告されているが、宿主や生活環が明らかになっている種は 26 種のみである。*Sarcocystis* 種に感染した特異的宿主の多くは非発症であるが、感染した寄生虫の量によっては腸管サルコシスティス症、筋サルコシスティス症、脳脊髄サルコシスティス症を引き起こす。さらに、近年、食肉に寄生する様々な *Sarcocystis* 種が、非特異的宿主であるヒトの食中毒の原因となることが報告された。*Sarcocystis cruzi* もウシでの感染率が高いため、*Sarcocystis* 食中毒のリスクがあると考えられている *Sarcocystis* 種の 1 つであり、食品リスクの推定には、ヒトの発症に必要な病原体数や食品に含まれる病原性物質の量を測定する必要がある。一方で、*Sarcocystis* 種の定量的な検査法は馬の *S. fayeri* の LAMP 法のみで、その他の *Sarcocystis* 種は検出できない。このため、感染家畜、食肉や患者の *Sarcocystis* 感染が確認されても、定量法がないため感染の重篤度や摂取量を推定することができず、原因を特定することが困難である。これらのことから、食肉や感染動物における *Sarcocystis* 種の虫体数を定量的に調査する手法の開発が求められている。

また、近年のゲノムシーケンス技術の進歩により、様々な Apicomplex 門の原虫でゲノム解析が行われ、感染や代謝に関わる様々な遺伝子が報告されている。*Sarcocystis* 属については、2015 年に *S. neurona* の全ゲノム解析が報告されたが、*S. neurona* 以外の *Sarcocystis* 種では、種別同定に用いられているミトコンドリアのチトクロームオキシダーゼ (*cox1*) 遺伝子や 18S リボゾーム遺伝子など、一部の遺伝子配列だけが報告されており、感染や代謝に関わる遺伝子については不明である。

これらのことから、第一章では *S. cruzi* 感染率が高いことが報告されているウシ心臓及び食中毒の原因食品として報告されているシカ肉について、食肉の食中毒リスクの把握を目的として、既存の複数の検査法により *Sarcocystis* の定量的な感染実態調査を実施した。その結果、ウシ心臓とシカ肉では *Sarcocystis* 感染率はほぼ変わらないが、シスト数はシカがウシよりも多いことが判明した。また、食中毒の原因となるブラディゾイトについては、ウシ心臓の約 20% の検体がシカ肉と同等のブラディゾイト数であり、食肉の喫食量によっては食中毒発生のリスクがあると推察された。

第二章では、*S. cruzi* ブラディゾイトのトランスクリプトームについてハイスループットシーケンスにより解析を行い、各トランスクリプトームの塩基配列の推定機能の分析と *S. neurona* 及び *Toxoplasma gondii* の既知遺伝子との比較を行った。トランスクリプトーム解析では、感染や代謝に関連する遺伝子やたんぱく質が複数検出され、*S. cruzi* ブラディゾイトの生活環ステージにおける特異的遺伝子や感染に関わる複数の遺伝子が推定

された。また、ブラディゾイトにおいては細胞の解糖及び糖新生の代謝に関わる遺伝子、ストレス関連遺伝子及びリボゾーム遺伝子の発現が高いことが確認された。

第三章では、トランスクリプトーム解析から得られた Acetyl co-A synthetase (ACS) の遺伝子配列を用い、*S. cruzi* ACS 遺伝子 (*ScACS*) ゲノム配列を初めて特定し、realtime-PCRを用いた定量検査法の構築を試みた。トランスクリプトーム解析から得られた *ScACS* はシングルコピー遺伝子である可能性が高く、*S. neurona* と類似したエキソン/イントロン構造を持ち、2,175 bp のエキソン配列を持つことが初めて明らかとなった。さらに、新たに構築した realtime-PCR を用いた定量検査法の結果は、既存の検査法により肉眼的に定量したブラディゾイト数と高い相関を示し、定量試験法としての有効性が確認された。また、この新規に開発した realtime-PCR は、*Sarcocystis* と同様に筋肉内にシストを形成し *Sarcocystis* 種との鑑別が困難な *T. gondii* は検出されず、特異性も高かった。

本研究の結果、*S. cruzi* の ACS 遺伝子は寄生虫の定量に適していることが明らかとなった。今後、食中毒事例の報告がある馬肉やシカ肉の *Sarcocystis* 種や、牛の好酸球性筋炎 (BEM) 及び好酸球性筋炎の原因とされる *S. cruzi* 以外の *Sarcocystis* 種についても検査法の開発を進め、原因及び病態の解明が必要だと考える。

学 位 論 文 要 約

氏 名	DOI, Rie
題 目	Study on Transcriptome Analysis and Quantitative Method for <i>Sarcocystis cruzi</i> Bradyzoites Infecting Bovines (ウシに寄生する <i>Sarcocystis cruzi</i> ブラディゾイトのトランスクリプトーム解析及び定量検査法に関する研究)

Members of the genus *Sarcocystis*, classified in the family Sarcocystidae of the phylum Apicomplexa, are protozoan parasites reported to infect various vertebrates, including mammals, birds, amphibians, and fish. More than 200 *Sarcocystis* species have been described, among which the exact hosts and life cycles are known for only 26 species.

Sarcocystis occasionally causes intestinal sarcocystosis in the definitive host, muscular sarcocystosis and cerebrospinal sarcocystosis in the intermediate host, depending on the parasite ingestion amount, although *Sarcocystis* infections are asymptomatic when the parasites infect to the specific hosts. On the other hands, *Sarcocystis* infected meats have recently been reported to cause food poisoning in humans. *Sarcocystis cruzi* infects cattle as intermediated hosts and is considered as one of a potential food poisoning source due to its high infection rate in cattle. When estimating the risk of a food poisoning, it is important to determine the number of pathogens required to cause diseases and the amount of the toxins in the food. In general, *Sarcocystis* spp. cannot be quantitatively detected except by the LAMP method in the equine *S. fayeri* test and it is important to develop a quantitative method to estimate the *Sarcocystis* number in the meats and the infected animals. Besides, thought recent advances in genome sequencing technology have led to the genome analysis of several phylum Apicomplexa genera, the whole genome sequence is available of only *S. neurona* among *Sarcocystis* species, and only some gene sequences, such as ribosomal genes and mitochondrial cytochrome oxidase genes, used for species identification have been reported for other species. Therefore, the genome sequence information of *Sarcocystis* species are important to study pathogenesis, treatment and prevention of the parasites.

For the problems above, heart tissues of cattle and meats of deer were examined using several existing methods in the first chapter, to assess the risks of food poisonings by consumption of these animals, and was reported to have a high *S. cruzi* infection rate, as well as deer meat, reported as a causative food poisoning, to quantify the amount of *Sarcocystis* infection in order to understand the risk of meat food poisoning. Consequently, it was found that the average *Sarcocystis* cysts number was higher in tested deer than the one in cattle. In addition, about 20% of bovine heart samples had the same number of bradyzoites as that of deer meat, suggesting potential risk for the food poisoning by meat consumption of the tested cows.

In the second chapter, transcriptome *S. cruzi* bradyzoites was analyzed using high-throughput

sequencing for understanding biology of the parasite, and genomic and functional comparison with *S. neurona* and *T. gondii*. As a result, the genes related to infection and metabolism, and specific genes related to the bradyzoites of *S. cruzi* were identified. In addition, high expression levels were observed in the genes related to cellular glucose metabolisms, stress and ribosome-related proteins in the *S. cruzi* bradyzoites.

In the third chapter, the acetyl Co-A synthetase (ACS) gene of *S. cruzi* (*ScACS*) was determined using the transcriptome sequence obtained in the second chapter. The results revealed *ScACS* has an exon/intron structure similar to that of *S. neurona*, with a 2,175 bp exon length. Furthermore, a specific quantitative assay was developed for quantitative PCR using the primers based on the mRNA and the genomic sequences of *S. cruzi*. The assay was validated with comparison with the results of conventional microscopic results and could distinguish the bradyzoites of *S. cruzi* from the ones of *T. gondii*.

In summary, this study demonstrated potential risks of food poisonings by consumption of *Sarcocystis*-infected meat products of cows and deer based on the numbers of *Sarcocystis* cysts in cardiac tissues of cattle and meats of deer. In addition, this study analyzed the transcriptome of cyst bradyzoites of *S. cruzi*, which included important information regarding metabolism and specific genes of bradyzoites of the parasite. Finally, based on the transcriptome and the genome sequences, a quantitative assay for *S. cruzi* bradyzoites was developed based on detection of *ScACS* with qPCR, whose quantitative ability and specificity was validated with the conventional microscopic test and a *T. gondii* sample. The results of this study are helpful for understanding of the food poisoning risk by *Sarcocystis*-infected animals and biology of *Sarcocystis* parasites including metabolism, stage development and pathogenicity of the parasite. Further studies of *Sarcocystis*, including the ones for the other species, will be necessary to understand pathogenicity in the infected animals and toxicity as the sources for food-poisonings.