

## 論文の内容の要旨

氏名：井村貴之

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

論文題名：鳥類血液原虫の分子疫学と原虫特異的ゲノムの解析

鳥類の血液に寄生する鳥マラリア (*Plasmodium*, *Haemoproteus*) 原虫やロイコチトゾーン (*Leucocytozoon*) 属原虫は、蚊やブユなどの吸血性昆虫により媒介され、原虫種によっては感染した宿主鳥類が貧血や衰弱などの症状を呈し死亡することもある。これらの原虫は国内の各種鳥類でも感染が見られ、養鶏産業への被害や飼育下鳥類の致死的影響が報告されており、獣医学上重要な病原体である。

鳥類血液原虫は、これまでに 200 種以上が世界中の宿主鳥類で感染が認められている。多くは不顕性であると考えられているが、抵抗性を持たない鳥類に原虫が感染した場合、個体群に壊滅的な影響を及ぼすことが知られている。近年の地球温暖化によるベクター昆虫の生息可能範囲拡大に伴い、媒介される原虫の分布状況も変化し、原虫との接点がなかった地域の鳥類個体群への影響が懸念される。そのため、現時点における各地の鳥類に感染する原虫種や分布状況、媒介昆虫種などの情報を収集し、原虫の伝播機序を解明することが重要となる。

近年、ヒトマラリア原虫の全ゲノム情報が明らかになり、原虫の生存に関わる様々な分子機構が解明され、分子疫学的調査や原虫特異的分子機構を標的としたワクチン開発などの感染防除対策に応用されている。一方、鳥類血液原虫では、一部の種でミトコンドリアゲノム情報が調べられているが、ヒトマラリア原虫に比べて原虫の生物学を理解するための分子基盤の解明は進んでいない。原虫の分子生物学的特徴が明らかになれば、分子マーカーを用いた原虫の感染状況の調査や、効率的に原虫の発育を制御する手法の開発が可能となるなど、原虫の伝播機構および感染制御へ向けた分子基盤の解明につながると期待される。

これまで、国内の宿主鳥類およびベクター昆虫における原虫保有状況や吸血活動が明らかにされてきたが、原虫の感染動態や希少鳥種における伝播機構は十分に解明されていなかった。原虫の分子生物学的情報を応用することにより、原虫保有状況を追跡し、ベクターからの原虫 DNA 検出により伝播サイクルが明らかになることが期待される。さらに、鳥類血液寄生原虫の生存に関わる分子基盤解明のための基礎情報が不足している。

そこで本研究では、分子疫学的手法による鳥類血液原虫の感染動態および伝播機構の解明と、原虫特異的オルガネラのゲノム解析を目的とした。

はじめに、原虫遺伝子をマーカーとして、高標高地に生息する野鳥における原虫感染動態を定点調査し（第 1 章）、原虫の伝播経路の推定のためにベクターにおける原虫保有状況と吸血源動物種を特定して伝播サイクルの解明を試みた（第 2 章）。次いで、原虫感染制御への応用を視野に、原虫の特異的オルガネラが持つゲノム情報の解明を試みた（第 3 章）。

### 第 1 章 定点調査による野鳥の鳥類血液原虫保有状況および経年モニタリング

国内の野鳥における鳥類血液原虫感染については、分子生物学的解析法を用いた原虫保有状況や分子系統解析などの疫学的知見が蓄積されているが、ある地域における経年的な感染状況に関する情報はきわめて少ない。そこで定点観測が可能な環境における野鳥の鳥類血液原虫感染状況を経年的に調査し、感染動態と環境要因との関係を推定した。

2007 年から 2010 年の間、5 月～11 月に月 1 回ずつ、埼玉県内の東京大学秩父演習林（標高 1,650m 付近）において、霞網で捕獲した鳥類を個体識別後、翼下静脈から採血した。原虫感染の有無を、血液塗抹による原虫の形態学的検索および原虫 mtDNA *cytb* 遺伝子を標的とした nested-PCR 法により確認した。原虫の分子系統関係は検出された DNA の塩基配列を決定して解析した。

調査したスズメ目鳥類 522 個体の血液原虫感染率は 18.7% であった。内訳は *Plasmodium* 属原虫が 1.5%、*Leucocytozoon* 属原虫が 18.8% であった。鳥種別の感染率は、コガラ (*Parus montanus*) が 85.7% (18/21

羽)、ヒガラ(*P. ater*)が 75% (18/24 羽) と比較的高率であった。

今回、再捕獲された個体から興味深い原虫感染動態が明らかになった。すなわち、継続的な原虫感染が認められた個体(継続感染)や、二回目以降に検出された原虫系統が以前の系統と異なっていた個体(系統の転換)、さらに長期に渡る持続感染個体(最長 14 ヶ月間)および混合感染個体の存在が示唆された。今回の調査地のような個体識別が可能な環境において、野鳥の血液原虫の分子マーカーを用いた経年モニタリングを継続することにより、鳥類と寄生原虫の相互関係の解析が進展すると考えられた。

## 第 2 章 *Leucocytozoon* 属原虫の媒介昆虫種の推定

鳥類血液原虫は吸血性昆虫によって媒介されるが、国内の野鳥における *Leucocytozoon* 属原虫のベクターとなる昆虫は同定されていない。一般に *Leucocytozoon* 属原虫はブユ類の吸血によって伝播されることが知られている。*Leucocytozoon* 属原虫のベクターであることを示すには、その昆虫が原虫を保有しており、宿主鳥類を吸血していることを明らかにする必要がある。北アルプスに生息するニホンライチョウ(*Lagopus muta japonicus*)では *Leucocytozoon lovati* の感染が認められており、同山系に分布する各種ブユからは同種の *Leucocytozoon* DNA が検出されている。しかしこれらのブユがライチョウを吸血しているか不明であった。そこで、北アルプスに生息する各種ブユを採取し、分子生物学的手法を用いて吸血対象動物を調べた。

ブユの虫体内内容物から DNA を抽出し、PCR により脊椎動物遺伝子の増幅を試みた。その結果、アシマダラブユ(*Simulium japonicum*)、およびオウブユ群(*Prosimulium hirtipes* group)からライチョウの DNA が検出された。また、アシマダラブユがもっとも多くライチョウを吸血していることが示唆された。これまでに、アシマダラブユ、ウチダツノマユブユ(*S. uchida*)およびオウブユからライチョウが保有する *L. lovati* と同一の塩基配列が検出されている。よって、調査山系では、主にアシマダラブユがライチョウの *Leucocytozoon* 属原虫のベクターとなっている可能性が示唆された。このように、宿主鳥類およびベクター候補昆虫から原虫 DNA を検出して分子系統関係を比較することにより、国内のライチョウ以外の野鳥にも見られる *Leucocytozoon* 属原虫の感染サイクルが明らかになると期待される。

## 第 3 章 鳥類血液原虫アピコプラストのゲノム解析

*Leucocytozoon* 属原虫および鳥マラリア原虫は、宿主にはない原虫特有の細胞小器官であるアピコプラストを持つアピコンプレクス門(Apicomplexa)原虫に分類される。アピコプラストは、このグループの原虫の進化の過程で、光合成細菌を取り込んだ紅藻類の祖先由来の二次共生色素体と考えられている。ヒトマラリア原虫(*Plasmodium falciparum*)では、アピコプラストは原虫の生存に必須なヘムを合成する重要な代謝経路の場であることが知られている。マラリア原虫では、ヘム合成に関わる遺伝子群は核にコードされているが、発現したタンパクはミトコンドリアとアピコプラストに輸送されてヘム合成が行われる。ミトコンドリアもアピコプラストもそれぞれゲノム DNA を持っており、原虫の増殖時には複製される。アピコプラストの機能やゲノム DNA 複製のコントロールが可能になれば、原虫の感染戦略を効果的に調節できる可能性がある。ヒトマラリア原虫のアピコプラストは、アピコンプレクス門原虫に共通する薬剤標的として注目されており、アピコプラストゲノム DNA もすべて解読されている。しかし、鳥類のアピコンプレクス門原虫のアピコプラストに関しては、機能の解析以前にゲノム DNA がほとんど明らかになっておらず、一部のアピコプラストゲノム DNA のみが報告されている。そこで本章では、鳥類のアピコンプレクス門原虫である *L. caulleryi* のアピコプラストゲノム DNA の全塩基配列を明らかにすることを目的とした。

*L. caulleryi* 感染ニワトリ血液から、遠心分離により感染血液と比重が近いと考えられる白血球層を回収し、蛍光二重染色を行った。染色した細胞群をフローサイトメトリーにより分離し、非感染血液と比較して感染血液特異的な分画を採取した。分画には *L. caulleryi* のガメトサイトが多数認められ、ゲノム解析のために DNA を抽出し、次世代シーケンサーにより網羅的に塩基配列を決定した。得られたゲノム DNA 断

片を用いて、すでに明らかになっている *L. caulleryi* アピコプラストゲノム DNA の部分配列や、同じアピココンプレクス門原虫である熱帯熱マラリア原虫のアピコプラスト全ゲノム DNA をリファレンスシーケンスとしてマッピングし、*L. caulleryi* アピコプラストの全ゲノム DNA の構成を試みた。その結果、*L. caulleryi* アピコプラストゲノム DNA は全長 34,779 bp の環状構造を持つ分子である可能性が示唆された。また、推定コード遺伝子の種類は、一つの ORF を除いて熱帯熱マラリア原虫と同様であった。すなわち、*L. caulleryi* のアピコプラストゲノムは、熱帯熱マラリア原虫と遺伝子構成が近似し、分子系統関係も近縁であった。よって、*L. caulleryi* のアピコプラストも、熱帯熱マラリア原虫アピコプラストと類似する機能を持つ可能性があると考えられる。

## 総括

本研究では鳥類血液原虫に関する分子疫学的手法による感染動態および伝播機構の解明と、原虫特異的オルガネラのゲノム解読を目的とした各種解析を行った。

第 1 章では、原虫遺伝子をマーカーに、定点捕獲が可能な調査地における野鳥の鳥類血液原虫の保有状況を検討し、長期間持続感染している例や、異なる系統の再感染例など、自然界における鳥類血液原虫の様々な感染動態が明らかになった。

第 2 章では、国内のブユが *Leucocytozoon* 属原虫に感染している宿主鳥類を吸血していることを分子生物学的に解明し、本原虫の国内における媒介昆虫種を推定した。

第 3 章では、*L. caulleryi* において初めてアピコプラストゲノムの全長を明らかにした。塩基長や遺伝子の種類など、ゲノム構造は既知のヒトマラリア原虫とほぼ同様であることが示唆された。

以上、病原体の分子生物学的特徴を用いて、野外における原虫の感染動態や、感染サイクルが明らかになり、さらに原虫特異的な生理機構の解明やゲノム基盤創薬に応用可能な基礎的情報が得られた。よって、本研究成果は今後の鳥類血液原虫の感染制御へ向けた研究に貢献すると思われる。