

ハトコクシジウム原虫の分子系統学的解析

松原 立真, 福田 康弘, 村越 ふみ, 中井 裕
(東北大・院農学・環境システム生物学)

Molecular taxonomy of *Eimeria* sp. from pigeon (*Columba livia domestica*) in Japan

Ryuma MATSUBARA, Yasuhiro FUKUDA, Fumi MURAKOSHI and Yutaka NAKAI
(Grad. Sch. Agr. Sci., Lab. Sustainable Environm. Biol., Tohoku Univ.)

SUMMARY

The genus *Eimeria* is a group of obligate parasitic protists of the phylum Apicomplexa. They are known to be a major threat to animal production. This genus includes numerous species of which the taxonomic status is unclear. More molecular data are necessary as supplementary data for classification. However, especially in wildlife-host *Eimeria*, collecting such molecular data is difficult because the oocyst population is usually heterogenic. Moreover, the establishment of a clone line is impossible because of their strict host specificity. To overcome such problems, we developed the Single Oocyst Multiplex (SOM) PCR method and analyzed molecular phylogenetic relations on pigeon-host *Eimeria* as a research model. Oocysts were collected from *Columba livia domestica* and classified as *E. columbarum* based on their morphological characteristics. According to phylogenetic analysis of nuclear 18S rRNA gene, pigeon *Eimeria* formed a monophyletic group within an avian coccidian clade. In concatenated analyses with nuclear 18S rRNA gene and ORF470 gene on the apicoplast genome, the pigeon *Eimeria* clade comprised three different sister clades. Similarity of both ITS1 and 18S rRNA gene nucleotide sequences indicated that three lineages might be treated as distinct species. Moreover, nucleotide similarity on ITS1 region suggested the presence of different species within a clade argued above. This work is the first description of molecular data on pigeon-host *Eimeria*.

[背景と目的] アイメリア類 (*Eimeria* spp.) はアルベオラータのアピコンプレクサの1属で、経口感染を経て消化管に感染する寄生性の原生生物である。本原虫の

分類と記載は、宿主体外のオーシストの形態、宿主種、寄生部位や生活環に基づき、現在まで1,000種以上が記載された¹⁾。しかし、形態的特徴に基づくこれまでの

分類体系は、系統関係や生理学的な形質の差を反映しない可能性が指摘され²⁾、分子情報を含む新しい系統分類の検討が必須である。だが、野生動物由来種での感染試験は不可能で、それらの株を確立できない。そのため顕微鏡下で単離したオーシストによる PCR が行われているが、得られる遺伝子情報が限られ、その分子系統解析の精度が問題であった。

本研究は、野生動物に由来するアイメリア原虫の系統分類のため、ハト由来原虫株をモデルとして分子系統解析を行った。精度のよい分子系統解析のため、単離した単一のオーシストを鋳型とし multiplex PCR を行う (Single Oocyst Multiplex PCR: SOM-PCR) 手法を新しく開発し、その系統解析結果と形態的特徴による従来の分類体系とを比較検証した。

[方法]

供試原虫

東京都西部の動物医院で飼育されたカワラバト (*Columba livia domestica*) より分離したオーシストを用いた。オーシストはショ糖浮遊法にて糞便から精製し、孢子形成処理の後、4°C で保存した。

形態の記録と SOM-PCR

各オーシストを倒立顕微鏡下で分離し、国際分類規約に従い各オーシストの形態的特徴を記載して種を同定した。分離した単一のオーシストを鋳型とし、核ゲノムにコードされる 18S rRNA 遺伝子、ITS1 と ITS2 の 3 領域とアピコプラスト (色素体) ゲノムにコードされる ORF470 の計 4 遺伝子座を標的とした SOM-PCR を行った。プライマーは、近縁種で相同な塩基配列から設計した。各 PCR 増幅産物は、ITS のみクローニングし、全てダイレクトシーケンスにて塩基配列を決定した。

分子系統解析

アライメントは ClustalX で行い、目視確認した。置換モデルの検討は MrAIC.pl 1.4.4 と kakusan 4 を用い、ML 法は PhyML と Treefinder で、Bayes 法は MrBayes にて行った。

[結果] 分離したハト由来原虫は、形態的に異なる 3 種類のオーシストで構成されるが、すべて *Eimeria columbarum* として同定された。

18S rRNA 遺伝子の系統解析より、本研究で分離されたハト由来原虫は単系統であり、鳥類を宿主とするクレードに含まれ、七面鳥を宿主とする *E. meleagridis* と最も近縁であった。

SOM-PCR により得られた 18S rRNA 遺伝子とアピコプラストゲノムの ORF470 遺伝子の塩基配列による連結解析より、*E. columbarum* 内に、3 クレードが認

められた。このうち 1 クレードは遺伝的距離が近い 2 つのオーシストで構成された。これらの形態学的特徴は各オーシストで異なり、18S rRNA 遺伝子の相似性は 97% 以下で、ITS1 領域では 40% 前後であった。

[考察] ハトを宿主とするコクシジウム原虫として、これまでアイメリア属 13 種とイソスポラ属 1 種、および未分類の 1 種が報告されている。しかしこれら記載された原虫種については、その分類が妥当でないとする指摘もあり、Duszynski ら (2000) は、ハトを宿主とするアイメリアは、最大でも 2 種ほどしか存在しないとしている³⁾。だが、この基盤となる形態や文献記載そのものが不明瞭で、いまだに統一した見解はない。この状況で、一律の分子情報による系統分類は、分類体系の検討にきわめて有効である。

既知のアイメリア属原虫の近縁種間では 18S rRNA 遺伝子の相似性は 97-99% 程度であり、また同様に ITS1 領域の相似性は 50% 以下である。一方、同種内の異なる系統間では 90% 以上であった。また Kawahara (2010) らは、ウシのアイメリア原虫の近縁種間で ITS1 領域の相似性は 30% 程度、系統間では相似性は 90% 以上であると述べている⁴⁾。以上の点を *E. columbarum* で得られたデータと比較した結果、本種内に示された 3 クレードは、18S rRNA 遺伝子と ITS1 領域で十分な変異があり、それぞれが隠蔽種であると結論した。

一方、上記の複数のオーシストによるクレード内部で、それぞれの ITS1 領域の相似性は 50-65% であった。これは種内変異とみなせる相似性より低く、別種であると示唆される。今後の研究にて、より多くの検体と多くの遺伝子の検討が必要だろう。

本研究より、*E. columbarum* に複数の隠蔽種が存在すると示唆された。類似した形態的特徴を示すオーシストに複数の種が含まれている例は過去にもあり⁵⁾。形態的特徴に基づく分類が系統関係を反映せず、アイメリアの分類に分子情報が不可欠であることが改めて示された。

[文献]

- 1) Levine (1980) *In: The Biology of the Coccidia*. Long L.P. (ed.). University Park Press, Baltimore, pp. 3-33.
- 2) Long and Joyner (1984) *J. Protozool.* 31, 535-541.
- 3) Duszynski et al. (2000) <http://www.k-state.edu/parasitology/worldcoccidia/COLUMBIFORMES/>
- 4) Kawahara et al. (2010) *Vet. Parasitol.*, 174, 49-57.
- 5) 及川 (1976) ニワトリコクシジウム症の病態生理学。及川弘 (編), 土山印刷, pp.1-13.