

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570090

研究課題名(和文) DNA塩基配列分析による霊長類と蟯虫類の共進化の研究-原猿類からヒトまで-

研究課題名(英文) Study on coevolution of primates and their pinworms by DNA sequence analysis - From prosimians to humans -

研究代表者

長谷川英男(HASEGAWA HIDEO)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：00126442

研究成果の概要(和文):

世界各地の野生および飼育霊長類およびヒトに寄生する様々な蟯虫類を集め、その形態学的な同定を行なうと共に、18S rDNA および mtDNA *Cox1* 領域の塩基配列による系統樹によって、霊長類との共進化過程の検証を行なった。これらの2分子の解析では原猿類と新世界霊長類の分岐のような古い年代を正しく反映することはできなかったが、より新しい時代の分岐は霊長類進化の順序と一致し、分子的にも共進化を支持する結果が得られた。ヒト蟯虫には *Cox1* 塩基配列に大きく3型がみられ、A型は日本、韓国などアジアのヒト、B型は東アフリカからヨーロッパのヒトにみられ、在日ブラジル人にも証明された他、飼育チンパンジーに見られた。C型はこれまで飼育チンパンジーのみに証明されているが、本来は西アフリカのヒトに寄生するものと考えられる。分子系統樹ではまずC型が分岐し、次にB型とA型が分岐しており、人類の分散に連動してこれら3型が形成されたものと考えられた。

研究成果の概要(英文):

Various pinworms were collected from humans, wild and captive primates over the world. They were identified morphologically, and 18S rDNA and mtDNA *Cox1* gene were sequenced. Neighbor-joining analysis based on these molecules could not depict phylogenetic tree congruent with the splitting order for prosimians and the New-World primates. However, the order of divergence the Old-world primates is congruent with that of host primates, supporting coevolution hypothesis. Three types were present in human pinworms: Type A is parasitic in Asian people; Type B in East Africans and Europeans, and also Brazilians residing in Japan; Type C has been collected from captive chimpanzees only, but is supposed to be parasitic in east African people. Phylogenetic analysis revealed that Type C split first, B and A were then diverged. It is surmised that these types were formed with dispersal of modern humans.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類

キーワード：蟯虫類、霊長類、共進化、DNA、塩基配列、系統、線虫類、寄生虫

1. 研究開始当初の背景

霊長類と蟻虫が密接に関連して進化したという仮説は今から約 80 年も前に Cameron (1929) によって提示されたが、それは経験に基づく主観的な着想であり、現代生物学ではより客観的な手法によって証明される必要があった。1980~90 年代に Brooks and Glen (1982) や Hugot (1999) は形態に基づく分岐分析でその仮説を検証し、共進化を支持する結果を得た。しかし形態が不十分にしか分かっていない種類も多く、また形態を原始形質と派生形質に判定する際には主観が入る余地が残るため、さらに客観的な DNA 塩基配列の分析に基づく研究が期待されていた。代表者らは先にヒトと飼育チンパンジー寄生のヒト蟻虫 *Enterobius (E.) vermicularis*、チンパンジー寄生のチンパンジー蟻虫 *E. (E.) anthropopithecii*、新大陸産霊長類寄生のヨザル蟻虫 *Trypanoxyuris micron*、クモザル蟻虫 *T. atelis* について、mtDNA *Cox1* 領域の塩基配列に基づいて系統解析を行った (Nakano, Okamoto, Ikeda & Hasegawa, 2006)。その結果、分岐順序は宿主霊長類の分岐順序と一致していたが、ヒト蟻虫には明瞭に分かれた 3 群があり、ヒト (日本人) 寄生は全て A 型であった。B 型と C 型は飼育チンパンジーに寄生することを見出した。B 型と C 型はチンパンジーが捕獲され、現地で飼育される間に、ヒトから感染したものと推定された。系統解析ではチンパンジー蟻虫とヒト蟻虫が分岐した後でまず C 型が A 型と B 型の共通祖先から分岐し、その後 A 型と B 型が分岐したことを示した。特に C 型は分岐年代がかなり古いことが示唆された。この分析に用いた塩基配列は 353 対と短いため、より長い塩基配列や他の DNA 領域に基づいた分析が必要であった。代表者らはプライマーの設計を工夫し、その約 2 倍の塩基対の解読に成功した。その分析結果もまた、上記と同様な系統樹を示した。すなわち現存するヒト蟻虫の系統には、ヒト属 *Homo* の進化や分散に関連した分岐がみられることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究は世界各地のヒトおよび霊長類から蟻虫類を採取し、その DNA を抽出して核 DNA の rDNA 領域、mtDNA の *Cox1* 領域等の塩基配列を決定し、それを基に、原猿類寄生蟻虫 *Lemuricola* 属、新世界霊長類 (広鼻猿類) 寄生蟻虫 *Trypanoxyuris* 属、旧世界霊長類 (狭鼻猿類) 寄生蟻虫 *Enterobius* 属を含めた分子系統樹を作成し、ヒト蟻虫 3 群の分岐年代を推定し、ヒト蟻虫の系統とヒトの進化・分散との関連を証明することを目的として計画された。

また野生状態で霊長類の同一宿主に蟻虫

の 2 種が寄生するとされたものがいくつかあるが、それらは多型 polymorphism であり、実際は 1 種寄生が原則と考えられる。代表者らはこれまで、ヒト蟻虫 2 種説を形態・発育史・分子の解析によって否定しており、他の 2 種混在説についてもより厳密な観察によって真偽を確定する。これらを総合して、霊長類の進化の中で、蟻虫がどのように共進化したのかを解明しようとするものである。

3. 研究の方法

(1) 国内外のヒトや動物園・研究機関で飼育されているチンパンジーから蟻虫類の成虫あるいは卵を採取する。国内外野生霊長類研究者の協力を得て、野生霊長類の糞便から蟻虫類を採取する。

(2) 虫体の一部はグリセリンアルコールで透徹し、微分干渉顕微鏡を用いて形態観察と計測を行い、また走査型電子顕微鏡によって微細構造を観察し、種を同定する。

(3) 虫体や虫卵から DNA を抽出し、核 rDNA 領域、mtDNA *Cox1* を PCR 法によって増幅し、キャピラリー・シーケンサー (ABI プリズム 3130) によって塩基配列を解読する。

(4) 得られる塩基配列に基づいて系統樹を作成し、霊長類寄生蟻虫類の分岐順序と時期を推定する。

(5) 特にヒト蟻虫については分岐時期を人類のアフリカからの分散時期と比較し、ヒト蟻虫と人類の進化・分散の関係を推定する。

4. 研究成果

(1) 収集した材料と形態学的同定。

ヒト蟻虫：既に保有していた材料に加えて、日本人由来材料、スーダン人由来材料、ギリシャ人由来材料 (いずれも肛囲検査法で採取された虫卵)、チェコ国飼育チンパンジー由来虫体を入手した。

ヒト以外のヒト科霊長類寄生蟻虫：アフリカの野生チンパンジー (タンザニア産、ガボン産) 53 頭、ボノボ (コンゴ産) 55 頭、ゴリラ (ガボン産) 241 頭、ボルネオの野生オランウータン 36 頭の糞便を調べ、ガボンのチンパンジーからチンパンジー蟻虫 *E. (E.) anthropopithecii*、ボルネオ島のオランウータンから *Pongobius hugoti* および 1 新種 *Pongobius foitovae* を検出し、他の寄生虫とともに記載報告した。

ヒト科以外の旧世界霊長類寄生蟻虫：アフ

リカ産では、ウガンダのアカコロブスより *Enterobius (Coloenterobius) colobis* を得て再記載し、雌の二型性を指摘した。また南アフリカ産ヒビの糞便約 600 個体分の提供を受け、検査したが、蟯虫類は発見できなかった。アジア産では、ニホンザルから初めてとなるマカク蟯虫 *Enterobius (E.) macaci* を山口県と奈良県から得た。スリランカ産ラングール類の糞便 53 個体分から *Enterobius* 亜属の蟯虫を検出した。ベトナム産マカクの糞便 20 個体分を調べたが、蟯虫類は検出されなかった。

新世界霊長類寄生蟯虫：野生アルゼンチンホエザルからホエザル蟯虫 *Trypanoxyuris minutus* 近縁種を得た。また飼育ケナガクモザルとウーリーモンキーからクモザル蟯虫 *Trypanoxyuris atelis* を得た。飼育アカテタマリン 2 頭、コモンマーモセット 2 頭、リスザル 50 頭、フサオマキザル 18 頭を調べたが、蟯虫類は検出できなかった。

原猿類寄生蟯虫：マダガスカル島のチャイロキツネザルより蟯虫類の少なくとも 4 種を得た。飼育ワオキツネザル 2 頭、スローリス 2 頭を調べたが蟯虫寄生は証明されなかった。

(2) DNA 塩基配列解読と系統解析

前述のようにこれまでは日本人寄生ヒト蟯虫は全て A 型であったが、韓国人やタイ人寄生虫体も A 型であることが知られた。しかし日本国内でブラジル系移住者の多い地域で 2 例の B 型蟯虫を検出した。またスーダン人寄生蟯虫も B 型であることが証明された。さらにギリシャ・アテネ大学 Dr. Piperaki の協力によって同国のヒト由来ヒト蟯虫の *Cox1* 配列を解析したところ、全て B 型に属することが証明された。これらのことは、アジアではヒト蟯虫は A 型であるが、東アフリカからヨーロッパにかけては B 型であり、それが南アメリカにもヒトの移動で移入されたことを示唆している。チェコ共和国で飼育されているチンパンジーに寄生するヒト蟯虫も B 型であることが判明した。B 型がアフリカのヒトに寄生していることは、飼育チンパンジーの B 型ヒト蟯虫が、捕獲後にヒトから感染したという仮説を支持するものである。しかしこれまでのところヒトから C 型ヒト蟯虫は証明できなかった。

約 30 年前に行なわれた海外在留邦人の健康調査の際の蟯虫検査セロファンに付着していた蟯虫卵から DNA を抽出して調べたとこ

ろ、アフリカや南米の在留邦人もほとんどが A 型で、日本のヒト蟯虫が派遣先で維持されていることを見出した。ただしインドネシア在住邦人 1 例から得た蟯虫は未知の型 (D 型) であった。

ニホンザルから得た *E. macaci* の DNA 塩基配列分析を行なった。

原猿類寄生蟯虫ではチャイロキツネザル寄生の *Lemuricola bauchoti*、*L. baltazardi*、*L. vauceli* について DNA 塩基配列を解析した。

新世界霊長類では、飼育ジェフロイクモザル、ケナガクモザルとウーリーモンキーに寄生するクモザル蟯虫 *Trypanoxyuris atelis* の *Cox1* および 18S rDNA 塩基配列を比較し、これらの間に明瞭な差異を認めた。そこで形態を再精査したところ、交接刺に差異を認め、それぞれが別亜種を形成する可能性が示唆された。これは中南米でクモザル類と蟯虫類が共進化した経緯を示す所見と考えられる。

18S rDNA 塩基配列に基づいた系統解析では、まず新世界霊長類寄生蟯虫が分岐し、次いで原猿類寄生蟯虫と旧世界霊長類寄生蟯虫が分かれるなど、霊長類宿主の系統と矛盾する系統樹となった (図 1)。しかし旧世界霊長類寄生種の間ではまずマカク蟯虫が分岐し、ついでチンパンジー蟯虫、最後にヒト蟯虫が分かれている。これは旧世界霊長類の進化過程と一致していた。



図 1 . 18S rDNA に基づく NJ 系統樹

しかし 18S rDNA は種内・属内の変異に乏しく、mtDNA *Cox1* の A、B、C 型虫体の 18S rDNA 塩基配列はほとんど同一のため、系統樹でそれらに対応した分岐は認められない。そこで mtDNA *Cox1* でこれらヒト蟯虫の系統解析を試みた (図 2)。

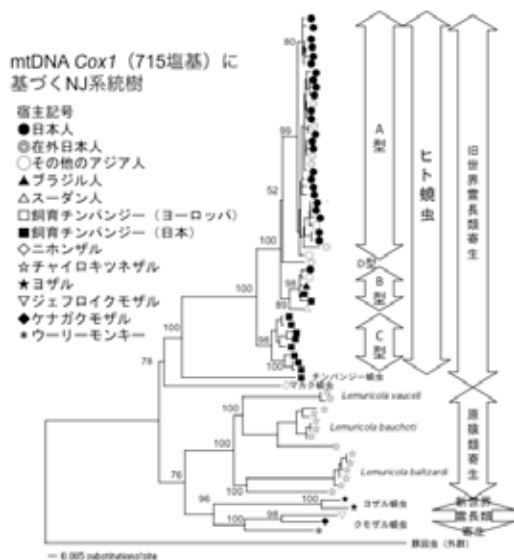


図 2 . mtDNA *Cox1* に基づく NJ 系統樹

この系統樹では、18S rDNA の場合と異なり、まず原猿類寄生種と新世界霊長類寄生種の共通祖先と旧世界霊長類寄生種が分岐している。原猿類寄生蟻虫類も新世界霊長類寄生蟻虫類も種類、宿主に応じた分岐をしており、その分岐年代はかなり古いことが示唆される。旧世界霊長類寄生種における分岐は 18S rDNA の結果と同じく、まずマカク蟻虫が分岐し、次いでチンパンジー蟻虫とヒト蟻虫が分岐している。さらにヒト蟻虫はまず C 型が A、B、D 型の共通祖先から別れ、次いで B 型と A、D 型の共通祖先が分岐し、後者から D 型 A 型が分岐している。A、B、C 3 型内は最近になって細かく分かれたことが伺える (図 2)。

霊長類寄生蟻虫類の 18S rDNA に基づく系統樹も mtDNA *Cox1* に基づく系統樹も、霊長類の起源に近い古い時代の分岐順序を正確に反映することはできなかったが、それより後の分岐順序はおおよそ霊長類の系統に一致したものであった。これらの解析結果を基に、霊長類とその蟻虫類の共進化は次のように要約される。(図 3)

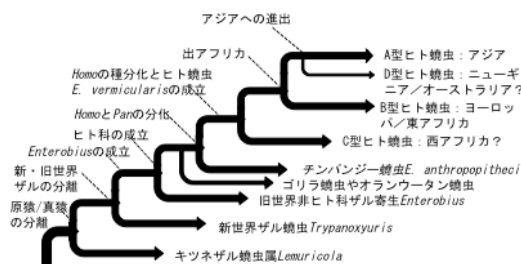


図 3 霊長類寄生蟻虫の進化

まず原猿類と真猿類が別れ、原猿類では *Lemuricola* 属が種分化した。真猿類は次いで新大陸へ渡った群と旧大陸に残った群に別れ、前者と共に新大陸に渡った蟻虫は *Trypanoxyuris* 属へ種分化した。旧大陸では *Enterobius* 属種が分化し、ヒト科の出現と分化に対応してチンパンジー蟻虫、ゴリラ蟻虫、ヒト蟻虫の祖先が分岐した。ヒト蟻虫は原生人類の祖先がアフリカから出る前に C 型を派生し、この型は西アフリカへ分散した。出アフリカは複数回行なわれたが、アジアへ進出した人類は A 型蟻虫を、ヨーロッパへ進出した人類は B 型蟻虫を持っていたと考えられる。D 型はニューギニアやオーストラリアへ渡った人類に寄生して運ばれた可能性がある。このように霊長類と蟻虫類は原猿類からヒトまで共進化したことが DNA 塩基配列解析からも支持された。

蟻虫類は検出されなかったが、*Streptopharagus pigmentatus* の大量感染を伴って死亡したニホンザルの剖検症例を報告した。

霊長類の糞便からの蟻虫をはじめとした小型寄生虫の検出方法、形態観察法、および DNA 塩基配列から推定される霊長類寄生蟻虫類の系統樹を Cambridge University Press 刊行の単行本 *Primate Parasite Ecology* に発表し、併せて霊長類寄生虫卵図譜を同書の appendix に掲載した。

霊長類寄生蟻虫研究から派生した研究成果として、(i)インドネシア中部スラウェシに棲息する *Bunomys chrysocomus* に寄生する蟻虫が *Syphacia* 属の新種であることを発見し、命名記載した。(ii)ヨーロッパの動物園で飼育された後、本来チンパンジーの分布しないビクトリア湖のルポンド島に導入され、定着したチンパンジー個体群の寄生虫感染状況を蟻虫類も含めてまとめ、論文発表した。これらの寄生虫にはチンパンジー蟻虫 *E. (E.) anthropopithecii* のようにチンパンジー固有でチンパンジーとともに導入されたものと、*Protospirura muricola* のように現地で新たに獲得されたものが混在していた。(iii)系統比較のためコウモリ寄生線虫 *Riouxgolvania* sp. の rDNA 全 6530 塩基の配列を解読した。

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8件)

Hayakawa, S., Hernandez, A. D., Suzuki M., Sugaya, K., Koda, H., Hasegawa, H., Endo, H. 2011: Necropsy case report for an old wild Japanese macaque (*Macaca fusucata yakui*) from Yakushima Island. Primate Research 査読有(印刷中)

Kuze, N., Hasegawa, H. 他6名 2010: Parasites found from the feces of Bornean orangutans in Danum Valley, Sabah, Malaysia, with a redescription of *Pongobius hugoti* and the description of a new species of *Pongobius* (Nematoda: Oxyuridae). Journal of Parasitology 査読有, 96(5): 954-960.

Hasegawa, H., Sato, H., Ikeda, Y. 他10名 2010: Molecular identification of the causative agent of human strongyloidiasis acquired in Tanzania: Dispersal and diversity of *Strongyloides* spp. and their hosts. Parasitology International 査読有, 59: 407-413.

Petrzerkova, K. J., Hasegawa, H., 他7名 2010: Gastrointestinal parasites of the chimpanzee population introduced onto Rubondo Island National Park, Tanzania. American Journal of Primatology 査読有, 72(4): 307-316

Dewi, K. and Hasegawa, H. 2010: A new *Syphacia* species (Nematoda: Oxyuridae) collected from *Bunomys* spp. (Rodentia: Muridae) in Central Sulawesi, Indonesia. Journal of Parasitology 査読有, 96(1): 125-128.

Hasegawa, H. and Nishikawa, K. 2009: New species of kathlaniid (Nematoda: Cosmocercoidea) collected from hynobiid salamanders in Japan. Journal of Parasitology 査読有, 95(1): 186-190.

Hasegawa, H., Hayashida, S., Ikeda, Y. and Sato, H. 2009: Hyper-variable regions in 18S rDNA of *Strongyloides* spp. as markers for species specific diagnosis. Parasitology Research 査読有, 104(4): 869-874.

Hasegawa, H., Greiner, E. C. and Gillespie T. R. 2008: Morphology of *Enterobius* (*Colobenterobius*) *colobis* Vuylstéke, 1964 (Nematoda: Oxyuridae: Enterobiinae) collected from an ashy red colobus, *Procolobus rufomitratu tephrosceles* (Elliot, 1907) (Primates: Cercopithecidae: Colobinae) in Uganda. Journal of Parasitology 査読有, 94(5): 1082-1086.

Hasegawa, H., Sato, H., Iwakiri, E., Ikeda, Y.

and Une, Y. 2008: Helminths collected from imported pet murids, with special reference to concomitant infection of the golden hamster with three pinworm species of the genus *Syphacia* (Nematoda: Oxyuridae). Journal of Parasitology 査読有, 94(3): 752-754.

[学会発表](計5件)

Hayakawa, S., Hasegawa, H., 他5名: The necropsy report on a wild and very old Japanese macaque (*Macaca fuscata yakui*). International Primatological Society XXIII Congress, 2010年9月16日, 京都.

巖城隆, 郡山尚紀, 西田利貞, 長谷川英男: 日本産・アフリカ産の霊長類寄生の *Streptopharagus* 属線虫の形態について. 第79回日本寄生虫学会大会. 2010年5月20日, 旭川.

長谷川英男, 佐藤雅彦他2名: モモジロコウモリの耳介皮膚に寄生する特異な囊状線虫と rDNA 塩基配列からみたその起源. 第79回日本寄生虫学会大会. 2010年5月20日, 旭川.

長谷川英男: 霊長類と寄生線虫の共進化. 平成22年度熱帯医学研究拠点研究集会, 2010年11月26日, 長崎大学熱帯医学研究所, 長崎市.

長谷川英男, 佐藤宏他8名: アフリカ産大型霊長類に寄生する糞線虫属—人体症例との関係. 第78回日本寄生虫学会大会. 2009年3月28日, 東京.

Hasegawa, H., Sato, H., Hayashida, S., Noda, S., Ikeda, Y.: Molecular diagnosis of strongyloidiasis. XVIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria. 2008年10月2日 韓国済州市.

[図書](計2件)

Hasegawa, H. 2009: Methods of collection and identification of minute nematodes from the feces of primates, with special application to coevolutionary study of pinworms. In: M. H. Huffman & C. A. Chapman (eds.): Primate Parasite Ecology, Cambridge Univ. Press, 29-46.

Hasegawa, H., Chapman, C. A. and Huffman, M. Useful diagnostic references and images of protozoans, helminths, and nematodes commonly found in wild primates. In: M. H. Huffman & C. A. Chapman (eds.): Primate Parasite Ecology, Cambridge Univ. Press, 507-513.

6. 研究組織

(1)研究代表者

長谷川英男 (HASEGAWA HIDEO)

大分大学・医学部・教授
研究者番号：00126442

(2)研究分担者

佐藤 宏 (SATO HIROSHI)
山口大学・農学部・教授
研究者番号：90211945

池田八果穂 (IKEDA YATSUKAHO)
大分大学・医学部・講師
研究者番号：80363547