

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月15日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590376

研究課題名（和文）条虫類の系統分類や集団遺伝解析に用いる核 DNA マーカーの開発

研究課題名（英文）Development of nuclear DNA markers for phylogenetic classification and population genetic analyses

研究代表者

中尾 稔 (NAKAO MINORU)

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70155670

研究成果の概要（和文）：条虫類の系統分類や集団遺伝解析に用いる核 DNA マーカーとしてシングルローカスの蛋白遺伝子を分離し、条虫類一般に用いることができる PCR プライマーを設計した。このマーカーを用いてテニア科条虫の系統解析を行い、この科を *Taenia*, *Hydatigera*, *Versteria*, *Echinococcus* の4属に改訂した。

研究成果の概要（英文）：Single-locus nuclear DNA markers for phylogenetic classification and population genetic analyses have been developed for cestodes, and universal PCR primers to amplify the marker loci were designed. A phylogenetic analysis of taeniid cestodes using the markers accelerated the taxonomic revision of the Taeniidae. The family have been divided into the genera *Taenia*, *Hydatigera*, *Versteria* and *Echinococcus*.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 2011年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 2012年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：条虫類、系統分類、核 DNA マーカー

1. 研究開始当初の背景

条虫類の系統分類に使える DNA マーカーは主にミトコンドリア DNA (mtDNA) が使われてきた。しかし、母系遺伝の mtDNA だけでは正確な系統関係を反映しない場合があるので、核 DNA マーカーを併用する必要がある。従来使われてきた核 DNA マーカーはリボソーム RNA 遺伝子やその ITS 領域であり、これらは多重遺伝子であるため、集団遺伝解析へ応用できなかった。そこで、条虫類の系統解析や集団遺伝解析に使うことのできるシングルローカスの核 DNA マーカー

が望まれ、本研究が開始された。特に、条虫類の中でもテニア科 (Taeniidae) はテニア属 (*Taenia*) とエキノコックス属 (*Echinococcus*) から構成され、テニア科全体の進化史の解明、並びにテニア属の分類群としての正当性の評価が待望されていた。

2. 研究の目的

条虫類は人獣共通感染症の病原体として重要性の高い寄生虫である。これらの種の分類については19世紀以来、多くの知見が累積したものの、系統解析については不十分な

ままで、一部の科で形態を用いた数値分類やミトコンドリアDNA分類が試みられてきたに過ぎない。この停滞の原因のひとつとして、適切な核DNAマーカーが不足していることがあげられる。本研究では、条虫類の系統解析や集団遺伝学的解析に利用可能なシングルローカスの核DNAマーカー（淘汰圧の偏りが少ないことが予想されるハウスキーピング蛋白遺伝子）をクローニングすることを主目的とし、エキノコックス属、テニア属、裂頭条虫属で核DNAマーカーの有用性を検討する。また、核ゲノムに散在性に分布するレトロトランスポゾン（SINE、短鎖散在反復配列）を単離し、SINE配列の挿入を基準としてエキノコックス属で進化系統樹を推定することも二次的な目的とした。

条虫類は成虫と幼虫の形態学的特徴に基づいて分類される。特に、ヒトで最も病害性が強いエキノコックス属は近年まで単包条虫 *E. granulosus*、多包条虫 *E. multilocularis*、*E. oligarthus*、*E. vogeli* の4種の形態種にまとめられていたが、1990年代よりmtDNAを用いた分子分類が導入され、単包条虫に顕著にみられたmtDNA多型は“遺伝子型 genotype”として分類されるようになった。この分子分類は中間宿主の違いにより区分されていた単包条虫の“系統 strain”とよく一致した。遺伝子型による単包条虫の分類は世界各地の疫学的解析に貢献したが、分子系統学的観点からみると、側系統群である単包条虫を単一の種として扱うことは明らかな間違いであった。そこで分類学的改訂がなされ、単包条虫という形態種は *E. granulosus sensu stricto*、*E. equinus*、*E. orteppi*、*E. canadensis* に分割されたが、*E. canadensis* はブタ・ラクダ・シカなど中間宿主の異なる系統を含んでいるため、更なる遺伝学的解析が必要となった。本研究では、*E. canadensis* の集団遺伝解析を核DNAマーカーで実施することも目標とした。

また、テニア属はかつて存在した幾つかの属 (*Multiceps*、*Taeniarhynchus*、*Hydatigera*、*Fossor*、*Tetratirotaenia*、*Monordotaenia*、*Fimbriotaenia*) が形態学的にシノニムとしてまとめられた分類群で、mtDNAの多型解析により側系統群であることが示唆されている。テニア属は家畜やヒトを宿主とする有鉤条虫、無鉤条虫、アジア条虫などが病原体として重要視されるが、その他の種は食肉目を中心として広範囲の野生哺乳類を宿主とするため、標本の収集が容易ではない。本研究では、核DNAマーカーに基づくテニア属の分類学的改訂も目標とした。

3. 研究の方法

シングルローカスであると予想される蛋白遺伝子について、アミノ酸配列に翻訳した

際の保存性の高い領域から縮合プライマーを設計し、PCR法により標的遺伝子を各種条虫類を用いて増幅する。増幅産物の塩基配列に基づき、3'-RACEと5'-RACE法により、全長配列を決定し、条虫類一般に用いることの出来るPCRプライマーを設計する。得られた核DNAマーカーの有用性はエキノコックス属、テニア属、裂頭条虫属の代表的な種を用いて検討する。

エキノコックス属については、*E. canadensis* (genotypes G6 to G10) のサンプルをできる限り収集し、核DNAマーカー毎にハプロタイプの出現度を調べる。genotype間での交雑の有無を根拠として *E. canadensis* の種の妥当性を検討する。

また、テニア属については、mtDNA系統解析により側系統群であることが類推されていたため、新たに開発した核DNAマーカー、並びに従来から使われていたリボソームRNA遺伝子 (18S rDNA) やミトコンドリア全ゲノム配列を用いて最尤法やベイジ法により系統解析を行ない、属の分類学的改訂に着手した。

レトロトランスポゾンについては、多包条虫ゲノムライブラリーをAluファミリーやtRNAを起源とするSINE配列を用いてスクリーニングして分離する。特異的プライマーを設計してエキノコックス属各種からSINEを増幅し、SINE挿入に基づいた系統樹を作成する。

4. 研究成果

3種類のハウスキーピング遺伝子を標的とし、RNA polymerase II second largest subunit (*rpb2*)、phosphoenolpyruvate carboxykinase (*pepck*)、DNA polymerase delta (*pold*) の蛋白遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定してテニア科条虫類一般に用いることができるPCRプライマーを設計できた (Knapp et al., 2011)。しかし、裂頭条虫類については *rpb2* と *pepck* 遺伝子を単離したのみで、コレクションした種類数が少なかったため、ユニバーサルプライマーの設計には至らなかった。

また、エキノコックス属の系統関係を解析するために短鎖散在反復配列SINEのクローニングを試みたが、適当なものを分離することができず、SINE用PCRプライマーの設計には失敗した。

しかし、核蛋白遺伝子マーカーはシングルローカスであると考えられたため、これらを用い、さらに核18SリボソームRNA遺伝子、ミトコンドリアゲノムの解析も加え、エキノコックス属とテニア属の系統関係を推定することができた。

核遺伝子を用いたエキノコックス属の系統解析によれば、遺伝子の変異が種間で少な

いことから、この属は進化史の中で最近生まれた若いグループであると考えられた (Knapp et al., 2011)。また、南米に分布する *E. oligarthus* と *E. vogeli* が核遺伝子の解析から姉妹種であることが判明した。南米にはもともと肉食目哺乳類は分布せず、現在の南米産肉食目哺乳類は300万年前にパナマ地峡が陸続きになった際に北米から侵入した祖先種から派生したものである。従って *E. oligarthus* と *E. vogeli* の祖先種も肉食目祖先種と共に南米に侵入したことが考えられた。そこで、パナマ地峡形成の300万年前を基準として、エキノコックスの種分化が開始された時期を推定したところ、中新世の終末期 (580万年前) となった (Knapp et al., 2011)。

E. canadensis の集団遺伝学的解析については収集した分離株の数が少ないため、結論を出す段階ではないが、ミトコンドリア遺伝子型 (genotypes G6 to G10) が異なるもの間で共通の核遺伝子ハプロタイプがみられ、交配がみられるものと想像できることから、これらの genotypes は同一種として扱うことが妥当と考えられた。また、極東ロシアには G6, G8, G10 の遺伝子型が同所的に存在することが明らかとなり (Nakao et al., a research article-in-pre in *Parasitology*)、今後の集団遺伝学的調査が期待されている。

エキノコックス属の分類に関しては、上記の *E. canadensis* 遺伝子型の扱いを除いて、全種の系統分類学的検討が終了したため、その成果はレビュー論文としてまとめた (Nakao et al., a review article-in-pre in *International Journal for Parasitology*)。

テニア属の分類に関しては、主に核 DNA マーカーによる系統解析によって側系統群であることが判明したため、属の改訂に着手した。*Taenia taeniaeformis* とその近縁種のために、テニア属のシノニムとされていた *Hydatigera* 属を復活させ、*Taenia mustelae* はエキノコックス属と姉妹関係にあったため、この種のために *Versteria* 属を新設した (図1) (Nakao et al., 2013)。この分類学的改訂によって、テニア属として残ったグループがあるが、これは2つの単系統群を内包しているため、今後、解析タクサの数を増やして、更なる改訂を行なう必要がある。

以上、本研究は当初に計画したとおりに遂行できなかったこともあるが、核 DNA マーカーを確立するという点では概ね目的を達した。特にほぼ50年ぶりにテニア属の分類学的改訂に着手出来たことは想像以上の成果と言って良い。今後、医学・獣医学領域で重要性の高いテニア科条虫の進化過程や宿主寄生体関係の構築過程を研究する上で今回の改訂は極めて重要な基盤となると思われる。特に、医学的に重要なエキノコック

ス属の姉妹群として *Versteria* 属を特定したこと (図1) は、エキノコックスの進化史を解明する上で大変意義深く、国際的にも評価されている。

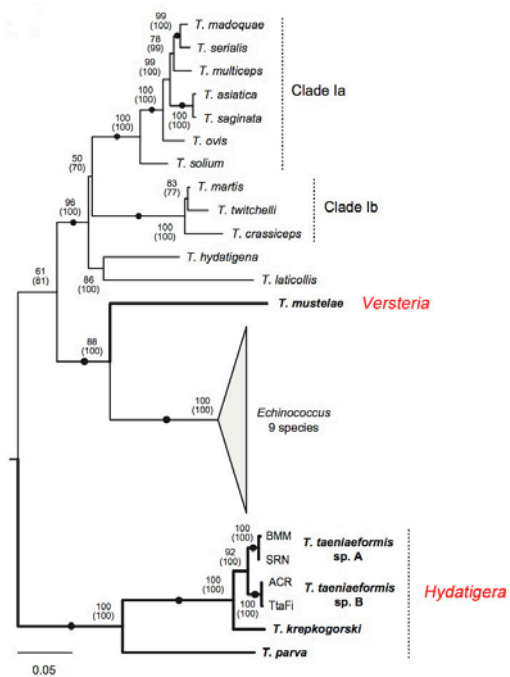


図1 核 DNA マーカーから推定したテニア科条虫の分子系統樹 (赤字は改訂した属名)

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4件)

① Knapp J, Nakao M, Yanagida T, Okamoto M, Saarma U, Lavikainen A, Ito A. Phylogenetic relationships within *Echinococcus* and *Taenia* tapeworms (Cestoda: Taeniidae): an inference from nuclear protein-coding genes. *Molecular and Phylogenetic Evolution* 2011; 61(3): 628-38. doi: 10.1016/j.ympev.2011.07.022. (査読有)

② Nakao M, Lavikainen A, Iwaki T, Haukisalmi V, Konyaev S, Oku Y, Okamoto M, Ito A. Molecular phylogeny of the genus *Taenia* (Cestoda: Taeniidae): Proposals for the resurrection of *Hydatigera* Lamarck, 1816 and the creation of a new genus *Versteria*. *International Journal for Parasitology* 2013; 43(6): 427-37. doi: 10.1016/j.ijpara.2012.11.014. (査読有)

③ Nakao M, Yanagida T, Konyaev S, Lavikainen A, Ito A. Mitochondrial phylogeny of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae) with emphasis on relationships among *Echinococcus canadensis* genotypes. *Parasitology* 2013; in press. (査読有)

④ Nakao M, Lavikainen A, Yanagida T, Ito A. Phylogeny-based taxonomy of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). *International Journal for Parasitology* 2013; in press. (査読有)

〔学会発表〕(計3件)

① 核DNAマーカーから推定したテニア科条虫の分岐年代、中尾 稔、Knapp Jenny、柳田哲矢、伊藤 亮、第80回日本寄生虫学会大会、2011年7月17日～18日、東京慈恵会医科大学.

② ミトコンドリアゲノムから推定したテニア科条虫の系統関係、中尾 稔、伊藤 亮、第81回日本寄生虫学会大会、2012年3月23日～24日、兵庫医科大学.

③ テニア科条虫の分類学的改訂、中尾 稔、第82回日本寄生虫学会大会、2013年3月29日～31日、東京医科歯科大学.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中尾 稔 (NAKAO MINORU)
旭川医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70155670

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：