

機関番号：35409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570098

研究課題名(和文) ミトコンドリアゲノム解析によるダニ類の系統と進化の解明

研究課題名(英文) Phylogenetic and Evolutional Analysis of Acari by  
Mitochondrial Genome Arrangement Determination and Sequencing

研究代表者

福長 将仁 (FUKUNAGA MASAHIRO)

福山大学・薬学部・教授

研究者番号：20132483

研究成果の概要(和文)：動物ミトコンドリアゲノムは37の遺伝子とひとつの制御領域から成っているものが多い。またこれらの遺伝子構成は比較的保存されていて大きな変化はない。しかし Acariformes に属するダニ類では遺伝子構成が再編されていることが我々の検索から明らかになったのでこの上目に属するダニ類を網羅的に検索、系統的関係を調べた。その結果この上目に分類されるダニ類においてミトコンドリアゲノムは独自の進化を遂げたことが推察された。

研究成果の概要(英文)：Most of animal mitochondrial genome consisted of 37 genes and one control region. And also gene arrangement is rather conserved in their genome. However, we found that some mite species classified into Acariformes have different mitochondrial gene arrangement. So that we investigated whole mitochondrial genome sequencing in order to determine their phylogenetic disposition of such organisms. The results showed the unique gene order in the species and supposed that frequent and drastic gene rearrangement occurred in the mite group at levels of the evolutionary ladder.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：ミトコンドリアゲノム、系統解析、Acariformes、ツツガムシ、遺伝子構成、進化、適応放散

1. 研究開始当初の背景

(1) 節足動物媒介感染症であるツツガムシ病は国内の再興感染症として近年増加傾向に

ある。これは塩素系殺虫剤の使用禁止に伴って媒介ダニが自然界で増加したためと考えられる。この感染症は春—夏型と秋—冬の二

峰性でそれぞれアカツツガムシ、フトゲツツガムシが媒介することも明らかになっていった。しかしながらツツガムシ病原体であるリケッチアに関しては全ゲノムが解明されるなど遺伝子を用いた解析が進んでいるものの媒介ダニについては形態分類のみで、系統解析は全く行われていなかった。

(2) これまで我々はライム病ボレリアの研究を行ってその遺伝的多様性ととも地域性、さらにはダニの種類との適応関係を明らかにしていた。これは媒介ダニのミトコンドリア塩基配列を利用してボレリア細菌の遺伝子による系統とダニの系統比較を合わせて行った結果えられたものでダニの分化に伴う寄生ボレリアの適応進化の結果と考えられた。また同時にミトコンドリアゲノム上の遺伝子構成も生物の進化を考える上で重要であることも明らかにしていた。

## 2. 研究の目的

(1) ツツガムシの生態や遺伝的背景・適応放散を理解することはこのダニによる媒介感染症征圧を考える上で重要な知見となる。

(2) これらのツツガムシのミトコンドリアゲノム解析、塩基配列による系統解析や遺伝子構成解析はこのダニの進化のみならず節足動物の分化の道筋を理解することにつながるようになる。

(3) ミトコンドリア遺伝子は染色体のそれに比較して変化率が高く近縁な生物種の定量的な位置関係を明らかに出来る。またダニの保有するリケッチアとの共生あるいは適応進化を解明することにもつながる。

## 3. 研究の方法

(1) 実験材料の収集：研究協力者の高橋のフィールドワークにより *Leptotrombidium*, *Ascoshengastia*, *Eutrombicula*, *Gahrlipeia*, *Neotrombicula*, *Walchia* のほか Yellow chgge, Red chigger など採集、冷凍保存したものを使用した。

(2) 全長約 14kb のミトコンドリアゲノムを 3～6 のクラスター毎に PCR で増幅、プライマーウォークまたはランダムシーケンスにより全配列または部分配列を得た。

(3) ミトコンドリア遺伝子は GENETYX-MAC または DNA-Star で解析後 BLAST-search をおこなって確定した。それぞれの tRNA 遺伝子はアンチコドンのステムループを視覚的にサーチして決めた。また系統解析とブートストラップ解析は国立遺伝学研究所の解析サーバーを用いておこなった。

## 4. 研究成果

(1) タイとマレーシアで採集された *Leptotrombidium deliense* のミトコンドリア塩基配列比較による地域特性の検討：形態分類で

は両者は同種とされていてチトクローム酸化酵素 I の塩基配列では同義置換が多く見られるもののアミノ酸では 2 つの置換に留まった。しかし 16rRNA 配列を用いた系統樹

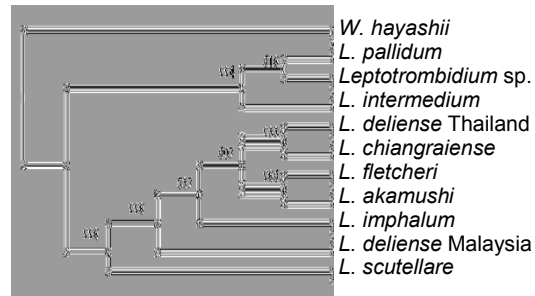


図 1. ツツガムシの系統樹

数字はブートストラップ値をあらわす。

では 2 者は大きく離れて位置し、別種を考慮すべき位置関係であった。したがってこの種の分類は再検討する必要がある。

この種は東南アジアにおいてツツガムシ病を伝播する主要なものであるがいずれもリケッチア媒介種であるかどうかは依然不明である。これに鹿児島県中ノ島で採集された、形態分類では *L. deliense* を系統樹に加えるとチトクローム酸化酵素 I の比較でも別のクレードに分岐しむしるタテツツガムシ *L. scutellare* と近縁であった。このようにツツガムシの形態分類では遺伝子比較による分類と大きく異なっていることがあり、一般に生物分類において形態と遺伝子分類が一致していることを考慮するとこのケースは特殊な例と言える。

(2) *Walchia* 属 *W. masoni* の形態の異なる固体を千葉県鴨川と神奈川県丹沢にて採集、これらの固体については染色体 18SrRNA 遺伝子配列も合わせて検討した。その結果異なるふたつの地点で採集された固体の染色体ならびにミトコンドリア配列いずれも種内変異の範囲内であり、加えて *Gahrlipeia saduski* も近縁でありこれら全てが同種である可能性が考えられる。ここでもこのクラスに分類されるダニ種の遺伝的考察による再検討が必要であることが強く示唆された。

(3) ミトコンドリア遺伝子構成配列に関してはすでに *Leptotrombidium* 種内での再編成、*Walchia* や *Gahrlipeia* そのほかですでに我々が報告したものと異なる配列は見いだすことが出来なかった。またいくつかのミトコンドリア遺伝子配列に基づく系統樹はいずれの遺伝子を用いても同様な結果でありミトコンドリアゲノム塩基配列による系統樹の信頼性が確かめられた。一方ミトコンドリアは細胞内のオルガネラであり、染色体の遺伝子とは独立に進化している可能性もある。このため本研究ではこれらツツガムシおよび

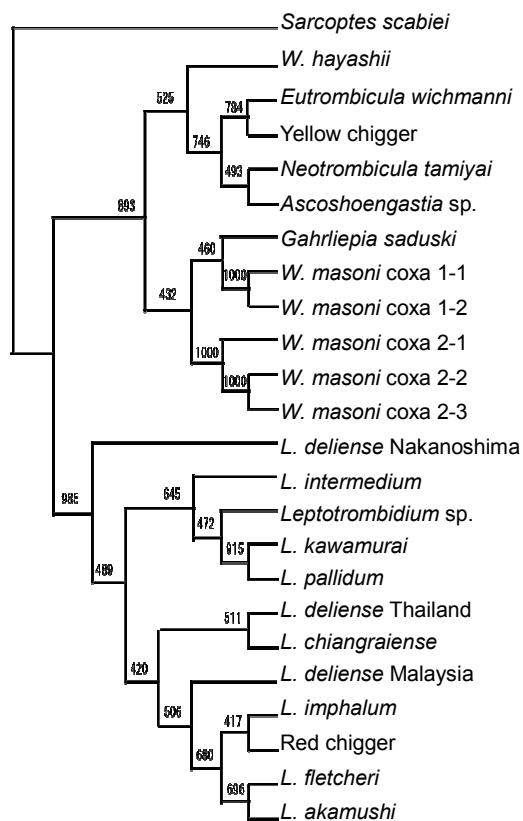


図2. ツツガムシと類縁ダニの系統樹  
染色体上の rRNA 遺伝子配列による系統樹で、  
外部標準にはヒゼンダニを用いた。

類縁のダニの染色体遺伝子についても塩基配列を得て系統比較を行った。

この図にみられるようにミトコンドリア遺伝子配列を用いる場合とよく一致していてミトコンドリア配列を用いることの正当性が確かめられた。しかしながら染色体遺伝子配列でも鹿児島県中ノ島産 *L. deliense* はタイやマレーシア産と大きく異なり、また *W. masoni* のコクサの違いによる分類の適正の問題など多くの疑問が明らかになった。

ツツガムシを含むこれらの生物群はミトコンドリアゲノム再編成が頻繁に起こっており、ミトコンドリアのみならずこれら生物の進化あるいは分化とその過程におけるゲノムの変化を明らかにしていく上で重要なグループと考えられるので今後の研究の進展が期待される。

## 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3件)

- ① Goromaru, T., Sasaki, T., Fujii, R., Ichiki, T., Takahashi, K., Fukunaga, M., and Eto, S. Antimicrobial

Susceptibility of antibiotic-Resistant lactic acid bacteria and Clostridium butyricum preparations to fluoroquinolones. Jpn. J. Pharm. Health Care Sci. 査読有, 34, 2010、59-63.

- ② Tabuchi N, Kataoka-Ushijima Y, Talbert A, Mitani H, Fukunaga M. Absence of transovarial transmission of Borrelia duttonii, a tick-borne relapsing fever agent, by the vector tick Ornithodoros moubata. Vector Borne Zoonotic Dis. 査読有, 2008 8:607-613.
- ③ 福長将仁, 田淵紀彦, ボレリアと宿主、媒介動物のインターフェイスにおける発現調節 日本細菌学雑誌 査読有, 65 (3) 2010、343-353.

[学会発表] (計11件)

- ① 田淵紀彦, 福長将仁  
回帰熱ボレリアのddRT-PCR法による遺伝子発現解析第82回 日本感染症学会総会 2008年4月17日~18日 島根
- ② 三谷春美, 福長将仁  
ツツガムシのミトコンドリア遺伝子構成解析第16回 ダニと疾患のインターフェースに関するセミナー 熊野古道大会 2008年 5月30日~6月1日 和歌山
- ④ 田淵紀彦, 豊田栄司, 福長将仁 回帰熱ボレリア新規蛋白質p35の同定 第20回微生物シンポジウム 2008年9月3日~4日 岐阜 長良川
- ⑤ 豊田栄司, 田淵紀彦, 福長将仁 ダニ媒介性回帰熱ボレリアBorrelia duttonii菌体表層蛋白質P35の同定 第61回日本細菌学会中国・四国支部総会 2008年10月18日~19日 愛媛
- ⑥ 村上礼隆, 田淵紀彦, 豊田栄司, 三谷春美, 福長将仁 回帰熱ボレリア新規リポ蛋白質P35の同定 第82回日本細菌学会総会 2009年3月12日~14日 名古屋
- ⑦ 福長将仁 第82回日本感染症学会総会(松江) 教育講演「ライム病基礎研究の原状と将来展望」 4月 2008
- ⑧ 三谷春美 節足動物の系統解析のこころみ 第21回微生物シンポジウム 2009年9月3~4日 福山大学
- ⑨ 田淵紀彦 回帰熱ボレリア新規菌体表層タンパク質P35の同定 第21回微生物シンポジウム 2009年9月3日~4日 福山
- ⑩ 田淵紀彦, 福長将仁 回帰熱ボレリア *Borrelia turicatae* 菌体表層蛋白質 VspE の立体構造解析 第63回日本細菌学会中国・四国支部総会 2009年10月16日~17日 広島

- ⑪ 中川貴文、三谷春美、田淵紀彦、宇野勝次、福長将仁、八木元広、大石智洋 薬物アレルギーにおけるRT-PCRの臨床応用-PHAとアレルギー起因薬による免疫反応機構の検討- 第63回 日本細菌学会中国・四国支部総会 2009年10月16日～17日 広島

〔図書〕(計3件)

- ① ファーマシューティカルノート 百瀬弥寿徳編集、尿路感染症、医学評論社、2008、383-388.  
② 医科細菌学改訂第4版、編集笹川、林、スピロヘータ 南江堂 2008、391-395.  
③ 化学療法学-病原微生物・がんと戦う、田中・土屋編著、南江堂 2009 176-182.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fukuyama-u.ac.jp/pharm/htmls/Labo/labs/fukunaga/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福長 将仁 (FUKUNAGA MASAHIKO)

福山大学・薬学部・教授

研究者番号：20132483

(2) 研究分担者

田淵 紀彦 (TABUCHI NORIHIKO)

福山大学・薬学部・講師

研究者番号：60330685