

## COXI 遺伝子塩基配列からの線虫分類の同定方法

遠藤大二<sup>1)</sup>, 瓜田千穂子<sup>2)</sup>, 浅川満彦<sup>2)</sup>

酪農学園大学獣医学群獣医学類 1)放射線生物学教室 2)寄生虫学教室  
江別市文京台緑町 582

[抄録] Cytochrome C Oxydase I 型遺伝子を用いた線虫種の分子同定について、遺伝子上の特徴とそれを利用したプライマーの配置を概説するとともに、イルカの胃内から採取された線虫について、濾紙への捕集を組み合わせた事例を示す。

キーワード; 分子同定、バイオバーコード、COXI、自由生活線虫

### Molecular identification method from nucleotide sequence of COXI

Daiji Endoh 1), Chihoko Urita2), Mitsuhiro Asakawa2),

Laboratory of 2)Parasitology, 1)Radiation Biology, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan

#### Abstract

This manuscript described molecular basis of sequence-based identification or prediction of nematode species using cytochrome c oxidase I gene. Molecular prediction of nematode larvae, which captured on a filter-paper and subjected to DNA-extraction, from a Dolphin was shown.

Key Words; Molecular identification, bio-bacoding, COXI, free-living nematode

#### 【はじめに】

検体から採材された線虫の分類・同定は、寄生虫学研究の基本といえる。研究文献上は形態同定から分子同定に主流が移っている。分子同定の理論的背景である分子系統学では、生物のもつタンパク質のアミノ酸配列や遺伝子の塩基配列を用いて系統解析を行い、生物が進化してきた道筋(系統)を理解する。具体的に分子同定を実施する際には、短い遺伝子マーカーを利用して DNA の配列から種が推定される。バーコードと同様、短いコードを読み取ることにより付帯情報を特定することから、広く用いられている特定の遺伝子の塩基配列から種を推定する方法は、DNA バーコーディング (DNA barcoding) と呼ばれる (Hebert ら, 2003; Stoeckle 2003)。DNA バーコーディングには、細胞当たりのコピー数が大きい遺伝子として、ゲノム上に繰り返し存在しているリボゾーム RNA 領域や細胞中に多数存在するミトコンドリアゲノム上の遺伝子が用いられる。DNA バーコーディングは多くの報告がある遺伝子がより広く用いられる傾向があり、植物・昆虫など研究領域ごとに用いられる遺伝子が異なる。線虫に関する研究ではミトコンドリアゲノム上の

COXI 遺伝子が最も多く用いられている。本稿では、イルカから分離された鞭虫類の同定を事例として、COXI を用いた分子同定の仕組みと方法を解説した上で、実施例を紹介する。

#### 【DNA バーコーディングと COXI 遺伝子】

遺伝子の塩基配列からの種の同定は、対象とする生物種が遺伝子の塩基配列が最も類似している種と最も近縁であるという考え方に基づいている。この考え方は、ポーリングらによる分子進化理論と木村資生の中立進化説に考え方に基づいている。すなわち、遺伝子の塩基配列は生物種の世代の経過とともに、ほぼ同じ速度で変化していくため、種の分離が古い種間ほど塩基配列の変化が大きく、逆に塩基配列の変化が小さい種間は近縁であるという理論にもとづいている。ただし、遺伝子ごとに変化の速度が異なっており、生存上重要性の高い遺伝子ほど変化の速度が遅く、塩基配列が「進化上保存されている」または単に「保存されている」と記述される。これらのことから、異種間での相同性が高い遺伝子を「保存されている遺伝子」という。

遺伝子の塩基配列を比較するためには、PCR で該当する遺伝子を増幅する必要があるため、

PCR 増幅の対象としては保存性の高い遺伝子が選ばれる。しかしながら、種を同定するためには、種間での相同性がある程度低い「保存されていない」領域が増幅される必要がある。そのために、機能と保存性が異なる複数の領域から構成される遺伝子が選ばれる。細胞膜または細胞内の膜上に存在して、内部と外部に露出している領域がそれぞれ機能を持つ遺伝子群の場合膜内に局在して膜に蛋白質を固定する役割の領域は一般的に保存性が高く、膜の外部に露出している領域は種間の相違が比較的大きい。

ミトコンドリアゲノム上に遺伝子が存在しており、膜上に存在するタイプの遺伝子として Cytochrome c Oxydase サブユニット I (COXI) 遺伝子がこれらの条件を満たすため、種の同定に多く使われてきた。種の同定には、遺伝子の塩基配列の報告数が多いほうが相同性の高い種が存在する可能性が高くなるため、さらに多くの研究者が該当遺伝子の塩基配列を決定するようになり、特定の塩基配列で種を同定する傾向が強まった。このような特定の遺伝子の特定の領域による種の同定は、バーコードのようにコードによって実体を同定することから DNA バーコーディングと呼ばれている。

COXI 遺伝子は 12 個の膜貫通領域 (M1-M12) とその間の領域 (外側 E 領域、内側 I 領域) から構成される (図 1)。最も多く使われる Primer は 1 番目の膜貫通領域と 6 つ目の膜貫通領域にハイブリダイズする M1-M6 プライマーが用いられている。自由生活線虫も含めて種を同定する場合には、このプライマーによる塩基配列情報では種の推定に情報が不足するため、I3-M11 プライマーによって、COXI 領域の 3' 側の情報が利用されるようになっている (Erpenbeck D ら、2006)。本稿では、M1-M6 プライマーおよび I3-M11 プライマーにより COXI 遺伝子ふたつの領域の塩基配列から、線虫種を予測した。

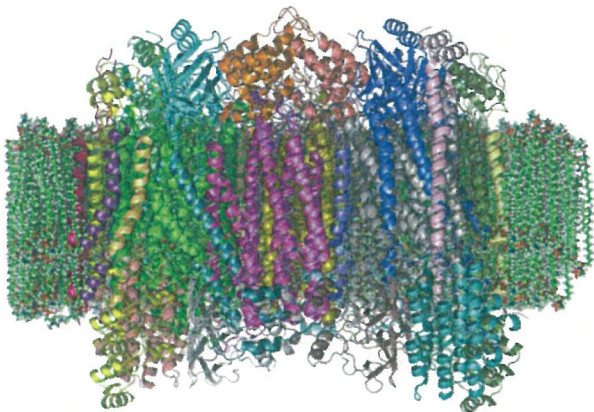


図 1 COXI 蛋白質の膜内での立体構造 (Wikimeida)

【方法】

(1) 幼虫の分取 非侵襲的な線虫幼虫の採取

海の中道水族館で飼育されたハナゴンドウ胃内からカテーテルにより多数の線虫が検出。70% エタノールの濃度になるように保存された。

(2) 幼虫の分離と DNA の抽出

エタノール内に固定された幼虫は、遠心で集めることができなかった。エタノールや他の胃内容物を除き、幼虫を濾紙に滴下し、ろ紙ごと DNA 抽出の対象にした。ろ紙からはろ紙を構成する植物成分が抽出される可能性があり、DNA 抽出中に DNA を吸着する可能性があるため、DNA および RNA 抽出用の RNASound 濾紙 (RNASound paper) を用いた。対照として、通常利用用の東洋濾紙 TOYONO5 を使用した。DNA 抽出には、QIAGEN の DNA Extraction Mini Kit for Tissue を用いた。濾紙から抽出された線虫 DNA 量については、濃度が低く確認できなかったため、PCR による増幅で抽出を確認した。

(3) COXI 遺伝子の増幅

M1-M6 領域を増幅する LC01490 - HC02198 プライマー (LC01490: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3', HC02198: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') および I3-M11 領域を増幅する JB3-Jb5 プライマー (JB3: 5'-TTTTTTGGGCATCCTGATGTTTAT-3', JB5: 5'-AGCACCTAAACTTAAAAACATAATGAAAATG-3') を使用して COXI 遺伝子を増幅した。

表 1 COXI 蛋白質の膜貫通領域のアミノ酸残基位置とプライマー設計位置 (NCBI Genbank)

膜貫通領域番号	アミノ酸残基位置	アミノ酸残基数	プライマー増幅位置	
			M1-M6	I3-M11
M1	25 - 45	21	↑ ↓	↑ ↓
M2	71 - 91	21		
M3	108 - 128	21		
M4	152 - 172	21		
M5	190 - 210	21		
M6	241 - 261	21		
M7	274 - 294	21	↑ ↓	
M8	317 - 337	21		
M9	344 - 364	21		
M10	387 - 407	21		
M11	420 - 440	21		
M12	459 - 479	21		

(4) 塩基配列の決定

塩基配列決定のため、PCR 産物を PCR-DNA クリーンアップキット (Sigma-Aldrich) 精製後、受託塩基配列サービスに依頼した。

【結果】

表 2 に濾紙から抽出された DNA を鋳型とした

PCR の結果を示す(表 2)。濾紙を用いて抽出した DNA を鋳型とした PCR は幼虫 1 匹でも成功したことから、効率の高い方法であることが示された。幼虫を採取する濾紙の媒体としては、RNA 抽出用の濾紙の方が、一般の濾紙に比べ抽出効率が高いことが予想されるが、今回の実験では十分な比較を実施していないため、論拠は得られなかった。全般に増幅率は高く、幼虫一匹でも増幅が認められた。続けて増幅された PCR 産物を鋳型として塩基配列を決定した(図 2)。決定された塩基配列を既知の配列と比較したところ、M1-M6 および I3-M11 双方の増幅産物とも、鞭虫の COXI 遺伝子と最も強い 70% 相同性が高く、採取された線虫がその近縁種であることが示唆された。

表 2 COXI プライマーによる増幅結果

ろ紙上の幼虫数	JB3-JB5		LCO1490-HCO2198	
	RNASoud	TOYON <sub>5</sub>	RNA Soud	TOYON <sub>5</sub>
10	2/2*	1/2	1/2	1/2
5	2/2	-	1/2	-
2	2/2	-	0/2	-
1	2/2	-	1/2	-

\*: PCR 試行あたりの増幅成功回数

図 2 COXI プライマーにより決定された塩基配列

I3-M11 Primer  
 >JB3\_JB5\_10\_f  
 GTATCATGGAAGCGATATCAGAGAAGCGTTTGAGAGAACA  
 ACTCCAGTTAATCCACCGAAGNAAAAGATGAGAAACCT  
 AAAGTAAACAGGAAGGAGTATTTTATCTTAAACTACCCCA  
 TAGAGGAATCTAAGCAAGAGAATATTTTATTCCACTAGG  
 TACAGCTTAACTTAGTAGCTGCTGTGAAATAAGCTCTTG  
 TATCAACATCTAATCCAACACTAAACATGTGATGAGATCAA  
 ACTAACAAACCTAAGATACCTATTGAGAACATGGCATAAAC  
 CATTCCCTAAATATCCGAAGATAGGTTACCTGAAAATGTGG  
 ATACTATATGGCTTACTATACCAAAACCCGGAATAATTAAG  
 ATTTAAACCTCAGGATGCCCAAAAAAGCTA  
 >JB3\_JB5\_10\_r  
 CGATATCAAGAGAAGCGTTTGATAGAACAACCTCCAGTTAAT  
 CCACCAATAGTAAATAAAGCTAAGAAACCTAAAGTAAACAC  
 TAAAGGAGTAGTATATCTTAAACTACCCCATAAAGTGTAG  
 CTAATCAAGAGAATATTTTATAACAGTAGGTACAGCTATA  
 ACCATAGTAGCTGCTGAAAATAAGCTCTTGATCAACATC  
 TAATCCAACACTAAACATGTGATGAGATCAAACCTAAGAAAC  
 CTAAGATACCTATTGAGAACATGGCATAAACCTTCCATAA  
 TATCCGAAGATAGGTTTACCTGAGAATGTGGATACTATATG  
 GCTTACTATACCAAAACCCGGAATAATTAAGATATAAACCT

CAGGATGCCCAAAAAAACN  
 >JB3\_JB5\_01\_f  
 TGTGAATGGTAAGTACTACAAGATCTGCTAGCTCTAGCAAG  
 TCAATAGTCGGTTACCTTGGCNGGTNNANGCCATGANGNNA  
 TAGGTGTTTTAGGTTTCGTGGTTTGAAGTACCTCATGTAC  
 AAAGTAGGTTTAGATATNAACACAAGATCCTATTGGGAGCT  
 GCAACTTAAATAATTACNTACCTACAGGAATAAAAAATATTC  
 AGTTGATTAGCTACTTGTAT

M1-M6 Primer

>LH10\_f  
 TNTCGTGAAAAGCTATATCTAAAGAAGCNTTTGCTAATACA  
 ACTCTGAAAAACCTCCAACANTAAACATCTATACAGATCC  
 TAATGCAAATAGGATTGGAGGTGTTAAGTGAAAGATCCAC  
 CGTAAACAAGTAACATACTCAACTGAATATTTTAAATACCTGTA  
 GGCACCTGCTATTATTAAGTTGCCNCTGTAAAATACACTCT  
 TGTATCCACATCTAAACCAACACTGTACATGTGGTGGCTTC  
 AAACAACAAAACCTAACACACCTATAAACATCATATCGTAT  
 ACCATACCAAGATATCCGAATATTGATTTGTTAGAACTTGC  
 TGATATTGTTGACTTATTATACCAAATCCTGGTATAACTA  
 GTATATAAACCTCAGGATGCCCAAAAAAATAN  
 >LH10\_rLH10\_r  
 GTGTAAAGCTATATCAAAAGAAGCGTCTGCTAATTCAACTC  
 CTGATAAACCTCCAACATTATACATAAAATACAAATCATAAT  
 GCAGATAGGATTGTAGGTGTTAAGTGAAAGATCCACCGTA  
 ACAAGTAGCTAATCAACTGAATATTTTAAATACCTGTAGGCA  
 CTGCTATTATTAAGTTGCATCTGTAAAATACACTCTTGTA  
 TCCACATCTAAACCAACACTGTGCATGTGGTGGCTTCAAAC  
 AACAAAACCTAACACACCTATAAACATCATATCGGATACCA  
 GACCAAGATATCCCAATATTGATTTGTTAGAACTTGTCTGAT  
 ATTGTTGACTTATTATACCAAATCCTGGTATAACTAGTAT  
 ATAAACCTCAGGATGCCCAAAAAAATANGCN

【考察】

COXI 遺伝子の増幅による種の同定は、遺伝子内に保存性の高い領域と、進化上の相違が大きな領域の双方が存在することを利用してプライマーが設計されているが、保存性の高い領域を鋳型としたプライマーは、多数のプライマーが歴史的に試されており、現在用いられている M1-M6 および I3-M11 プライマーはいずれも汎用性が高いプライマーといえる。濾紙を用いた幼虫の抽出方法は、このような汎用性の高いプライマーとの組み合わせにより、高い増幅率を示した(表 2)。遺伝子データベースを対象とした DNA の相同性探索では、多数の候補から選定されるため、偶発的に相同性が高いような場合には、同一の遺伝子の異なる領域の配列は異なる動物種との相同性を示すことが多い。それに対し、今回の結果は、異なる領域の配列がいずれも鞭虫との相同性を示したところから、その近縁種であることが示唆される。

ただし、イルカにおける鞭虫の寄生は報告が無いため、今後、さらなる形態学的観察と、異なる遺伝子の分子同定が求められる。

種の同定には至らなかったが、一匹の幼虫からでも PCR が成功したことは、コンタミの影響を実体鏡で除去しながら分子同定を勧められることを示唆しており、有力な方法と考えられる。本研究で利用された濾紙を用いた幼虫の採取は、昆虫や植物線虫の研究などで用いられて

いるが、近年 DNA の捕集に直接に用いられている FTA ペーパーや RNASound 濾紙などは、核酸の吸着を抑えているため、抽出を有利にする可能性が高い。本研究では、有意な変化は見られなかったが、今後の観察においても、RNASound 濾紙を利用した DNA 抽出が望ましいことが予想される。

#### 【謝辞】

本研究を遂行にあたり、貴重な診断材料をご提供下さった国内水族館各位に深謝する。

#### 【文献】

- 1) Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard J.R.: Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 270: 313-332, 2003.
- 2) Stoeckle M.: Taxonomy, DNA and the bar code of life. Bioscience, 53:2-3, 2003.
- 3) Erpenbeck D, Hooper JNA, Worheide G: CO1 phylogenies in diploblasts and the 'Barcoding of Life' - are we sequencing a suboptimal partition? Mol Ecol Notes 6: 550-553, 2006.