

Acanthamoeba 分離株のミトコンドリア DNA および
18S rDNA による遺伝子型別

八木田 健司¹, 泉山 信司¹, 小村 麻子¹, 亀岡 洋祐², 遠藤 卓郎¹
(¹国立感染症研究所・寄生動物部, ²(独)医薬基盤研究所・遺伝子バンク)

Genotyping of *Acanthamoeba* strains based on mitochondrial DNA RFLPs
and 18S rDNA sequences

Kenji YAGITA¹, Shinji IZUMIYAMA¹, Mako OMURA¹, Yosuke KAMEOKA² and Takuro ENDO¹
(¹Dept. Parasitol., Natl. Inst. Infect. Dis., ²Lab. Genetic Resources, Natl. Inst. Biomedical Innovation)

SUMMARY

Recent molecular studies of the genus *Acanthamoeba* have revealed that DNA analysis is more reliable than morphology of the cyst or the trophozoites to identify a genus. We extensively studied the relationships between mitochondrial (mt) DNA RFLP types and 18S rDNA sequence types for genotypic identification of *Acanthamoeba*. We examined 99 isolates from keratitis patients and some authentic strains. Mt RFLPs were obtained by BglII and EcoRI digestion of whole mt DNA extracted from cultures. A partial 18S rDNA region (ASA.S1) that contains a diagnostic fragment was sequenced using extracted genomic DNA. The 7 most common mt RFLP types (which include most of the keratitis isolates) had T4 sequences, while the other less common mt RFLP types (found in Japanese isolates) had T3 and T5 sequences. All the major mt RFLP types, except for JAC/E4, were distributed in different sub-clusters in the T4 clade. This means that most of the 18S rDNA sub-clusters consist of multiple mt RFLP types. Interestingly, the isolates of the JAC/E4 type shared a single 18S rDNA sequence. In conclusion, it seems that both the major mt RFLPs and the genotype T4 of 18S rDNA sequence types are able to distinguish the specific clades within *Acanthamoeba* that are associated with human keratitis. This suggests that *Acanthamoeba* strains with any of the 7 major mt DNA types can be classified as T4 in the absence of sequencing data.

【目的】*Acanthamoeba* 属は環境中に存在する一般的な小型自由生活性アメーバであるが、ヒト（あるいは動物）に対シアメーバ角膜炎あるいはアメーバ性肉芽腫性脳炎の病原因子となるものが含まれる。同アメーバは形態的な特徴に基づく種同定が極めて難しく、現在 *Acanthamoeba* 属の同定法にはミトコンドリア (mt) whole genome の RFLP 解析法¹⁾あるいは 18S rDNA 遺伝子の高変異領域の塩基配列解析^{2,3)}による T タイピング法などが用いられる。これらの遺伝的タイピングの結果により、角膜炎あるいは脳炎に関連する *Acanthamoeba* はある特定の遺伝的集団に収束する傾向がみられるというデータが集積しつつある。本研究では、臨床分離株に関するこれらの遺伝的タイピングによる解析から DNA タイプと感染性との関連性を調べることで、*Acanthamoeba* 属の病原性解明につなげたいと考えている。本学会では、これまで行われていなかった mtDNA の RFLP タイピング (mtRFLP タイピング) と 18S rDNA の T タイピングの関係を明らかにするとともに、臨床分離株の詳細な遺伝学的解析に関する結果を報告する。

【材料と方法】国内・国外の角膜炎分離株 (99 株) ならびに参照株を加え 107 株を解析した。アメーバは PYGC 培地により無菌増殖した、あるいは大腸菌塗布寒天培地にて増殖した栄養体を材料として用いた。mtDNA はアルカリ抽出法により調整し、BglIII ならびに EcoRI (6 塩基認識制限酵素) を用いて RFLP 解析を行った¹⁾。一方、抽出した全ゲノム DNA を用いて 18SrDNA 遺伝子の高変異領域 (ASA.S1) の PCR 増幅を行い³⁾、その産物のダイレクトシーケンス (約 400bp) を行い、シーケンスデータを得た。それに基づき系統樹 (NJ 法) を作成し 18SrDNA 遺伝子によるクラスター形成を調べるとともに、GeneBank に登録された T タイプ既知の 18SrDNA 遺伝子配列を利用して T タイピングを行い mtRFLP タイプとの関係を調べた。

【結果と考察】角膜炎分離株のほとんどは mtRFLP の主要 7 タイプ (Ma、Castellanii、JAC/E2、Aikas、Cook、JAC/E4 ならびに JAC/E5) に分類され、これらは 18SrDNA 遺伝子解析から T4 タイプに分類された。T4 タイプは現在知られる T1 から T15 タイプの中で、最も臨床分離株からの検出頻度が高い (角膜炎分離株に関してはおよそ 94%)³⁾ ことが知られており、*Acanthamoeba* の角膜炎分離株は mtDNA ならびに 18SrDNA の 2 種類の遺伝的解析から、一定の集団に収束することが示された。本研究では、国内分離された株の一部が mtRFLP の JAC/E25 タイプあるいは JAC/E27 タイプに分類されたが、これらは低頻度ながら角膜炎分離株に見られる T3 あるいは T5 に各々分類されることが示された。さらに細かく 18SrDNA 遺伝子によるクラスター形成と mtRFLP タイプとの関係を見ると、T4 は多数のサブクラスターより構成されたが、JAC/E4 タイプを除いた主要 6 タイプは一定のサブクラスターに収束せず、複数の異なるサブクラスターに分散した。即ち、T4 内サブクラスターは複数の mtRFLP タイプより構成されることが示された。これに対して JAC/E4 タイプは、その分離株が世界的に分布するにも関わらず、単一の 18SrDNA シークエンスを示すという興味深い結果が示された。以上の結果は、主要な mtRFLP タイプと T4 タイプは各々、*Acanthamoeba* 属の中の角膜炎に密接に関連した遺伝的集団を特徴付けるものであること、また 7 種類の主要な mtRFLP タイプの株に関しては、その株の 18SrDNA シークエンスデータが得られなくても T4 タイプと同定できる関係にあることが示された。

【文献】

- Yagita K. et al. (1999) *Parsitol Res.*, 85:284-289.
Gast R.J. et al. (1996) *J. Euk. Microbiol.*, 43:498-504.
Booton G.C. et al. (2005) *J.Clin.Microbiol.*, 43:1689-1693.