

## 致死性病原体ネグレリアフォーレリの全ゲノム解析

安 川 洋 生\*

(2016年3月3日受理)

Hiro YASUKAWA

Whole Genome Analysis of the Pathogenic Amoeba *Naegleria fowleri* Isolated from a Japanese Patient

### 要旨

ネグレリアフォーレリ (*Naegleria fowleri*) は温水を好む病原性アメーバで、ヒトの鼻腔から大脳に侵入し大脳組織の軟化や出血を伴う壊死（原発性アメーバ性髄膜脳炎; PAM）を引き起こす。PAMの進行は急速で有効な治療法もなく、約2週間でほとんどの患者が死に至り、臨床では僅かな生存例があるのみである。筆者は、ネグレリアフォーレリの分子生物学的解析を行い本病原体の特性と病原性を理解するとともに迅速簡便な検出法の開発を目的として、本邦で分離された株について次世代シーケンサによる全ゲノム解析を行った。その結果、本株のゲノムサイズは27.61 Mb, GC含量は35.7%, 遺伝子数は15108であることが分かった。また、青色光受容ドメインを有するタンパク質が2種類コードされていることが分かり、本病原体が青色光に応答する可能性が示唆された。

### 1. 緒言

ネグレリアフォーレリ (*Naegleria fowleri*) は温水環境を好む真核微生物であり、極めて致死率の高い原発性アメーバ性髄膜脳炎 (primary amoebic meningoencephalitis; PAM) を引き起こすことから、殺人アメーバとも呼ばれている。PAMは、鼻腔内に入ったネグレリアフォーレリが嗅粘膜から嗅

球を介して大脳に侵入することで発症し、大脳の軟化や出血を伴う壊死がみとめられる病気である。感染後の症状の進行は急速で、約2週間ではほとんどの感染者が死に至る。ネグレリアフォーレリは川や湖、温水施設、塩素処理が不十分なプール等に生息しており、これらは私たちの身近な生活範囲にあるため注意が必要である。アメリカでは1962-2013年で132件の感染例が報告されており（フロリダ州の34例、テキサス州の32例、など南部で報告が多い）、18歳以下の犠牲者が全体の8割を超える。日本国内でも棲息が確認されており（De Jonckheere et al., 1991）、感染死亡例も報告されている（Sugita et al., 1999）。世界全体では2012年までに310例が報告されており、報告数は近年増加している（病原体の検出方法の進歩によると思われる）（El-Maaty & Hamza, 2012）。

このように重篤な病状を引き起こす病原体であるため鋭意研究が行われているが、病原因子や発症機序に関しては未だに多くが不明である。ネグレリアフォーレリが鼻腔から大脳に至るのは迷走の結果であるのか、それとも神経細胞に本病原体と相互作用する何らかの親和性因子が有るのか、あるいは中枢神経系に何らかの誘因因子が有るのか、また大脳の破壊に用いられる因子（孔形成タンパク質やタンパク質分解酵素等）にはどのような種類が有りそれらはどのような生化学的性質を

\* 岩手大学教育学部

有するのか、等はPAMの発症機序を理解するうえでも、発症予防法や治療法を開発するためにも重要なポイントであるが、現在のところ不明な点が多い。

現時点ではPAMの有効な治療法がないため感染を予防することが重要であり、そのためには高感度で迅速なネグレリアフォーレリ検出法の開発が必要である。従来より本病原体の検出・同定には、採水試料に含まれるアメーバを培養し、増殖したアメーバについて顕微鏡観察やアイソザイムパターン解析を行って判定する方法がとられていた。しかし、アメーバは形態的特徴に乏しいため形態観察による同定はあまり有効ではなく、アイソザイムパターンによる同定は時間と労力を要するため迅速な同定ができない。そこで、高感度かつ迅速で簡便な検出・同定法の開発が求められており、例えばネグレリアフォーレリに固有の塩基配列を探索しこれを標的としたPCR法やLAMP法が検出・同定法の候補として考えられる。ネグレリアフォーレリに固有の塩基配列を探索するには、当該病原体がコードする塩基配列をゲノムデータベースと照合し候補を選択することになるが、照合作業のためにはそれに先立ってゲノム情報を解析する必要がある。そこで筆者は次世代シーケンサを用いてネグレリアフォーレリの全ゲノム解析を行った。本稿では筆者の行ったゲノム解析の成果の一部について記述する。

## 2. 材料と方法

日本人感染者から分離されたネグレリアフォーレリ kurume (Sugita et al., 1999) のDNAを精製し、イルミナ社製の次世代シーケンサ HiSeq2000にて解析した。塩基情報の読み取りとアセンブルは北海道システムサイエンス株式会社にて、得られた塩基情報の解析は北海道システムサイエンス株式会社および東北化学薬品株式会社生命システム情報研究所にて行った。また、比較検討のためにネグレリアフォーレリ KUL およびネグレリアフォーレリ NF66のDNAを精製し実験に使用した。

## 3. 結果と考察

次世代シーケンサにより得られた情報のクオリティーの目安となる sequence contigs は2493, N50 of contigs は62162, coverage は140であった。塩基情報を解析した結果、ネグレリアフォーレリ kurume のゲノムサイズは27.61 Mb, GC 含量は35.7%, 遺伝子数は15108であることが分かった。遺伝子オントロジー (Gene Ontology) 解析を行ったところ、生物学的プロセス (Biological process) に分類される遺伝子は3760種、分子機能 (Molecular Function) に分類される遺伝子は6303種、細胞の構成要素 (Cellular Component) に分類される遺伝子は1124種であった。

ネグレリアフォーレリと同属で非病原性のネグレリアグルベリ (*N.gruberi*) については全ゲノムが既に解析されており、ゲノムサイズは40.96 Mb, GC 含量は33.1%, 遺伝子数は15727と報告されている (Fritz-Laylin et al, 2010)。同属の生物種ではあるがネグレリアフォーレリ kurume のゲノム構造はかなり異なっていることが分かった。両者のゲノムを比較したところ、ネグレリアグルベリがコードせずネグレリアフォーレリ kurume がコードしている遺伝子は183種であった。この内の多くについては翻訳産物の機能予測が困難であったが、13種については次のタンパク質のオーソログをコードしていた。ヒストン-リジン N-メチルトランスフェラーゼ NSD3 イソフォーム X1 [*J.jaculus*], ラクトシルセラミド 4-アルファ-ガラクトシルトランスフェラーゼ [*E.telfairi*], DNA ポリメラーゼ デルタサブユニット3 [*A.forsteri*], O-アセチル-ADP-リボースデアセチラーゼ 1 [*A.carolinensis*], システインプロテアーゼ ATG4A [*X.laervis*], FAD-linked スルフィドリルオキシダーゼ ERV2, ミトコンドリア前駆体 [*C.tropicalis*], テロメラーゼ逆転写酵素 [*C.melo*], テロメラーゼ逆転写酵素 [*M.ochrogaster*], グリコシルトランスフェラーゼ [*Lacinutrix* sp. 5H-3-7-4], スフィンゴシン-1-リン酸ホスファターゼ 2-like [*N.vitripennis*], リボヌクレアーゼ Z [*R.slithyformis*], conserved

oligomeric Golgi complex component, putative [*R.communis*] およびアルファ/ベータヒドラーゼ [*Polaromonas* sp. CF318]。これら13種を除いた170種の遺伝子について、それらの機能を推定（あるいは決定）するために解析を続けるとともに、ネグレリアフォーレリ固有の塩基配列（ネグレリアグルベリを含め他のどの生物もコードしていない塩基配列）が含まれるか否かも解析する方針である。ネグレリアフォーレリに固有の塩基配列が見つれば、それを標的とすることで本病原体を高感度に検出できる検出系が構築できるであろう。検出系にはPCR法、リアルタイムPCR法、LAMP法などが有効であると思われる。これらは特別な訓練を必要せず誰でも行うことができる簡単な検出方法であり、短時間で結果が分かる。現在、種々のデータベースを用いて、ネグレリアフォーレリの高感度検出に使える塩基配列の探索を行っている。

また、ネグレリアフォーレリ *kurume* の全ゲノム解析の結果、本病原体がBLUFドメイン (sensors of blue-light using FAD の略称であり青色光センサーとして機能する; Conrad et al., 2014) を有するタンパク質を2種類コードしていることが分かった。これらをNfBLUFP1およびNfBLUFP2と名付け、更に解析を続けた。NfBLUFP1は293個のアミノ酸残基から成り、N末側にBLUFドメインが配置されている。ネグレリアフォーレリ *kurume* とは別の株であるネグレリアフォーレリ KUL とネグレリアフォーレリ NF66についても当該タンパク質をコードする塩基配列をクローニングし解析したところ、ネグレリアフォーレリ NF66で一カ所のSNPを確認した（アミノ酸に変化はなかった）。本タンパク質のBLUFドメインが実際に青色光に応答するか否かに関しては、このドメインの下流にアデニル酸シクラーゼドメインを融合させたタンパク質を構築し、これを用いて解析を行った。その結果、NfBLUFP1のBLUFドメインが確かに青色光に応答することが確認された (Yasukawa et al., 2013)。なお、NfBLUFP1はBLUFドメイン以外に特徴のあるアミノ酸配列は

みとめられず、ネグレリアフォーレリ細胞内における本タンパク質の機能は不明である。また、BLUFドメイン以外のアミノ酸配列についてデータベースを検索したが、ネグレリアフォーレリ以外のどの生物からも相同性の高いタンパク質が見つからず、本病原体に特異的な遺伝子産物である可能性がある。

一方、NfBLUFP2は670個のアミノ酸残基から成り、C末側にBLUFドメインが配置されている。このBLUFドメインについても、アデニル酸シクラーゼドメインとの融合タンパク質を構築して解析したところ、やはり青色光応答を示すことが確認された（未発表）。データベース解析により、NfBLUFP2はネグレリアグルベリのタンパク質 Ngr45871（1284個のアミノ酸残基から成る機能不明のタンパク質）と部分的に相同であることが分かったが機能は不明である。ただし、NfBLUFP2は分子内に核局在シグナルと推定されるアミノ酸配列がみとめられるため、ネグレリアフォーレリの核に局在して青色光に応答する因子であると考えられる。

これまでネグレリアフォーレリの光応答に関する知見はなかったが、筆者の行った解析から本病原体が青色光に対して応答する可能性が強く示された。今後の研究を待つ必要があるが、本病原体の光応答性を理解することによってその性質を利用した駆除法やPAMの治療法が開発されるかもしれない。

## 謝辞

本稿に記載の研究成果は、八木田健司博士（国立感染症研究所寄生動物部）、原樹博士（久留米大学医学部）、渡辺正勝博士（総合研究大学院大学先導科学研究科）、伊関峰生博士（総合研究大学院大学先導科学研究科、現・東邦大学薬学部）の協力と、喜多彩香氏（富山大学大学院理工学教育部、現・辰巳化学株式会社）、今野法子氏（富山大学大学院理工学教育部、現・富士化学工業株式会社）、佐藤彩氏（富山大学大学院理工学教育部、現・株式会社池田模範堂）、羽根田ゆかり氏

(富山大学大学院理工学教育部, 現・株式会社鹿島塾), 笹川洸氏 (岩手大学大学院教育学研究科), 田畑優希氏 (岩手大学教育学部) の努力により得られた。

## 参考文献

Conrad, K.S., Manahan, C.C. & Crane, B.R. (2014) *Nat.Chem.Biol.*, 10, pp801-809.

El-Maaty, D.A.A. & Hamza, S.R. (2012) *Primary Amoebic Meningoencephalitis* (ISSN:0258-3216), 5, pp93-104.

Fritz-Laylin, L.K., Prochnik, S.E., Ginger, M.L., Dacks, J.B., Carpenter, M.L., Field, M.C., Kuo, A., Paredez, A., Chapman, J., Pham, J., Shu, S., Neupane, R., Cipriano, M., Mancuso, J., Tu, H., Salamov, A., Lindquist, E., Shapiro, H., Lucas, S., Grigoriev, I.V., Cande, W.Z., Fulton, C., Rokhsar, D.S. & Dawson, S.C. (2010) *Cell*, 140, pp631-642.

De Jonckheere, J.F., Yagita, K., Kuroki, T. & Endo, T. (1991) *Jpn.J.Parasitol.*, 40, pp352-357.

Sugita, Y., Fujii, T., Hayashi, I., Aoki, T., Yokoyama, T., Marimatsu, M., Fukuma, T. & Takamiya, Y. (1999) *Pathol.Int.*, 49, pp468-470.

Yasukawa, H., Sato, A., Kita, A., Kodaira, K., Iseki, M., Takahashi, T., Shibusawa, M., Watanabe, M. & Yagita, K. (2013) *J.Gen.Appl.Microbiol.*, 59, pp361-369.

## 参考となる資料

喜多彩香 平成23年度富山大学工学部学位論文「病原性 *Naegleria* 属アメーバがコードする光活性化 cAMP 合成酵素の探索」

今野法子 平成23年度富山大学工学部学位論文「光活性化アデニル酸シクラーゼを用いた大腸菌バイオフィーム形成の光操作」

佐藤彩 平成23年度富山大学工学部学位論文「病原性アメーバ *Naegleria fowleri* の青色光受容ドメインの探索」

羽根田ゆかり 平成23年度富山大学工学部学位論文「光活性化 cAMP 合成酵素を用いたアミノグリコシド系抗生物質菌体内移行の光操作」

佐藤彩 平成25年度富山大学大学院理工学教育部学位論文「ネグレリア属アメーバがコードする光活性化アデニル酸シクラーゼの探索」

田畑優希 平成27年度岩手大学教育学部学位論文「*Naegleria fowleri* の全ゲノム解析により見いだされた新規タンパク質 NfBLUF2 の解析」

*Naegleria fowleri* - Primary Amoebic Meningoencephalitis (PAM), Centers for Disease Control and Prevention, <http://www.cdc.gov/parasites/naegleria/>

*Naegleria fowleri*, Free Living Amebic Infections, DPDx - Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern, Centers for Disease Control and Prevention, <http://www.cdc.gov/dpdx/freeLivingAmebic/index.html>

## 追記

ネグレリアフォーレリを遺伝資源として捉え、本生物から見つかった NfBLUF1 と NfBLUF2 を新規な生命科学実験ツールの出発材料と考えることもできる。本稿に記載の融合タンパク質は、青色光によって活性化し cAMP を合成する光活性化アデニル酸シクラーゼとして機能した。cAMP は細胞の様々な機能に関与する情報伝達分子であるため、これらの融合タンパク質を用いることにより細胞機能を光で操作することが可能になると期待される。今後は光感受性を変更するようなアミノ酸置換体や cAMP 合成活性を変更するよう

なアミノ酸置換体を構築して、生命科学実験に利用しやすいツールの開発を予定している。また、NfBLUFP2に関しては、例えばこれが光で活性化する転写調節因子であった場合、任意の遺伝子の発現を光で操作する新規実験ツールを開発するための出発材料となり得る。今後は本タンパク質の局在や機能の解析とともに、新規実験ツールの開発にも注力する予定である。