

## ネグレリアフォーレリのミトコンドリア DNA の解析 Analysis of *Negleria fowleri* Mitochondrial DNA

○伊藤新太<sup>\*1</sup>, 藤原歩<sup>\*2</sup>, 安川洋生<sup>\*1</sup>

Arata ITOH<sup>\*1</sup>, Ayumi FUJIWARA<sup>\*2</sup>, Hiro YASUKAWA<sup>\*1</sup>

<sup>\*1</sup> 岩手大学教育学部, <sup>\*2</sup> 岩手大学技術部

<sup>\*1</sup> Faculty of Education, Iwate University, <sup>\*2</sup> Division of Technical Support, Iwate University

**【要約】** ゲノムデータベースで公開されている *Naegleria fowleri* (ネグレリアフォーレリ; ヒトの脳に侵入することがある病原性アメーバ) の mtDNA (ミトコンドリア DNA; 本生物種の場合, 約 50000 塩基の環状 DNA) の塩基配列のうち 3 件について, 汎用のワープロソフトとネット上のフリーソフトで解析した. その結果, これらの mtDNA の AT 含量は 74.8% であり, 相互によく似ていることが分かった. また, 約 400 塩基のほぼ同じ配列が 2 回反復している領域が在ることが分かった. 同様の反復配列は近縁種の *N. lovaniensis* と *N. gruberi* (ネグレリアロバニエンシスとネグレリアグルベリ; いずれもヒトに病原性がないとされる) の mtDNA にはみられなかった. このような解析はネット環境が整っていれば比較的容易に実施できるため, 高校の学習に取り入れ生徒の学習意欲の向上に役立つかもしれない. 一方, この解析の過程で見出した反復配列は *N. fowleri* の近縁種にはみられないため, 本病原体を特異的に早期発見するために利用できるかもしれない.

**【キーワード】** ネグレリアフォーレリ, ミトコンドリア, DNA

### I. 緒言

ミトコンドリアは多くの真核生物が有する細胞小器官であり, 高校の生物の教科書では球が引き伸ばされたような形状で内部にひだのある器官として描かれることが多い (それらは電子顕微鏡で観察したミトコンドリアの一面であり, 生きた細胞内のミトコンドリアの姿をとらえたものではない). ミトコンドリアの内部には DNA が存在するが, この点について詳しく学ぶ機会は少ないかもしれない. 当学部の理科サブコースに所属する学生の内 31 名に質問したところ, ミトコンドリアに DNA があることを知っていた学生は 0 名であった (2019 年に 2 年生を対象に実施した学力調査, 及び 2020 年に 2 年生を対象に実施したアンケートの結果).

ミトコンドリアが核とは別に独自の環状 DNA を有するのは, この細胞内器官がかつては細菌であったことの証拠の一つとされている. また, mtDNA の *coxI* 遺伝子 (シトクローム C

オキシダーゼサブユニット 1 をコード) はさまざまな生物種に保存されており, 生物の分類や進化を論じる指標の一つとして重要視されている. 受験対策としてミトコンドリアを単なる ATP 産生の細胞小器官として覚えるのではなく, その由来や, 分子生物学上の重要性などを知る機会があれば, 高校生は新たな視点を得ることができ, 学習意欲が向上するかもしれない.

本稿では, 当研究室が研究対象としている病原性アメーバ *N. fowleri* の mtDNA を材料に, 高額な研究用ソフトウェアではなく, ワープロソフトやネット上で使用可能なフリーソフトで基本的な解析ができることを紹介する. 高校生であればこれらのソフトウェアを容易に使いこなして解析を進めることができると思われる.

なお, *N. fowleri* は温水環境を好むアメーバであり, ヒトの鼻腔から大脳に侵入すると極めて致命率の高いヒト急性アメーバ性髄膜脳炎 (PAM) を引き起こす. 発症後の治療は困難であ

り、感染しないように予防することが重要である。海外では池やプールの他に、家庭内から検出されることもある。本邦においては一部の温泉排水と工場排水から検出されている。

## II. データベースとソフトウェア

### 1. ゲノムデータベース

ネグレリア属アメーバの mtDNA の塩基配列の検索には NCBI のデータベースを利用した。

### 2. 塩基配列の比較解析

塩基配列の相同性の解析には ClustalW を用いた。これは2つ以上の異なる配列を整列させ相同性を比較するソフトウェアである。画面上の所定の位置に比較したい配列を入力すると、それらを整列させた図とアラインドスコア (aligned score ; 相同性の指標) が表示される。相同性の比較に続き系統樹の作成もできる。また、塩基配列だけではなくタンパク質の相同性解析にも使用される。ClustalW は古くから使用されており、簡単で、直感的に操作できるソフトウェアである。

### 3. DNA の構造解析

mtDNA の構造解析には EMBOSS Dotmasher を使用した。このソフトウェアも古くから使用されており、簡単で、直感的に操作できる。2つの異なる塩基配列の一方を x 軸に、他方を y 軸に入力すると両者で一致する塩基の位置を座標にドットをプロットする。パラメーターを適切に設定してノイズを低減すると、2つの配列の間に似た塩基配列、あるいは同じ塩基配列が在る場合には、それに対応する位置にドットが並び斜線を描くように表示される。表示されたラインの長さや位置を読み取ることで、解析対象の DNA の構造をおおよそ理解することができる。また、同一の塩基配列を x 軸と y 軸に配置し、パラメーターを適切に設定してノイズを低減すると、ドットは座標の対角線を描くように配置する。この時、対角線と並行するラインが複数本みられた場合は、解析している DNA のその位置に反復する配列が存在することが推定

される。Dotmasher はタンパク質の構造解析にも使用される。

## III. 結果

### 1. 塩基組成及び相同性

データベースを検索したところ 4 件の *N.fowleri* mtDNA が登録されていた。その内、塩基配列のみが登録されていたのが 1 件、アノテーションが付与されて、推定される遺伝子の種類、位置が示されているのが 3 件であった。これら 3 つの mtDNA には、タンパク質の遺伝子が 46 個、tRNA が 21 個、rRNA が 2 個、コードされていた。これらのアクセス番号を表 1 に示す。本稿ではこれら 3 つの mtDNA について解析した。

表1. ネグレリアフォーレリのmtDNAのアクセス番号

生物名	アクセス番号
<i>N. fowleri</i> V212	JX174181.1
<i>N. fowleri</i> V419	KX580903.1
<i>N. fowleri</i> V511	KX580902.1

これらの mtDNA の総塩基数と AT 含量を表 2 に示す (AT 含量、及び GC 含量は生物種の比較解析に利用される)。総塩基数はデータベース画面に表示されるが、作業の都合で全塩基配列を汎用のワープロソフトにコピーした際に文字カウント機能にてあらためて確認した。AT 含量は、ワープロソフトの文字の検索置換機能を用いて算出した。

表2. ネグレリアフォーレリのmtDNAの塩基組成

生物名	総塩基数	A+T(塩基数)	A+T(%)
<i>N. fowleri</i> V212	49531	37031	74.8
<i>N. fowleri</i> V419	49538	37036	74.8
<i>N. fowleri</i> V511	49541	37042	74.8

次に3種の *N.fowleri* の mtDNA の塩基配列を比較するために ClustalW を用いて整列させ、アラインドスコアを求めた。表 3 の通り、スコア

は相互に 99 であり、これらがよく似ていることが示された。

表3. ネグリアフォーレリのmtDNAの相同性

	V212	V419	V511
<i>N. fowleri</i> V212	100	99	99
<i>N. fowleri</i> V419		100	99
<i>N. fowleri</i> V511			100

### 2. 反復配列の検出

先述の通り、ドットプロット解析は DNA の構造を直感的に理解するのに役立つ。*N. fowleri* V212 の mtDNA に何らかの構造が存在するかを確かめるために x 軸と y 軸に塩基配列を入力し解析した。その結果、図 1A のようにドットは座標の対角線を描くように配置し、それに加えて対角線と並行するラインがみられた(図 1B は当該部分の拡大図)。この図より、*N. fowleri* mtDNA の 20500 塩基付近に反復配列が存在することが強く示唆された。

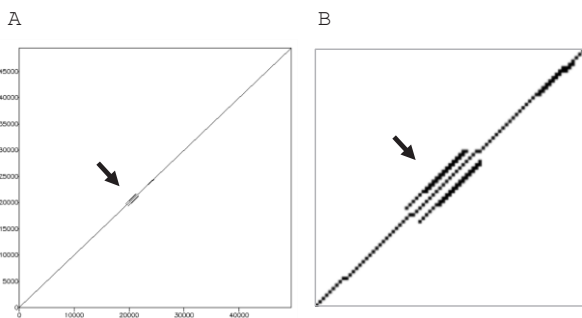


図1. ネグリアフォーレリのmtDNAのドットプロット解析

図には示さないが、*N. fowleri* V419 と *N. fowleri* V511 の mtDNA の塩基配列においても同様の結果を得た。一方、*N. fowleri* の近縁種である *N. lovaniensis* と *N. gruberi* の mtDNA については、反復配列を示唆する明瞭なラインはみられなかった。

### 3. 反復配列の解析

*N. fowleri* V212 mtDNA の反復配列が存在すると思われる領域について、具体的にどのような

塩基配列であるのかを解析した。その結果、mtDNA の 15 番目の遺伝子の途中から始まる約 400 塩基の配列 (DR1) の直後に、よく似た配列 (DR2) が配置しており、約 800 塩基にわたる反復配列を構成していることが分かった。これらを模式的に図 2 に示す。同じ反復配列は *N. fowleri* V419 mtDNA と *N. fowleri* V511 mtDNA にもみられた。

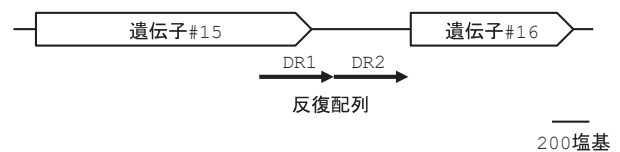


図2. 反復配列周辺の模式図

*N. fowleri* V212 mtDNA の反復する 2 つの塩基配列を整列させ比較した結果を図 3 に示す。両配列で一致する塩基にアスタリスクを付した。

```

DR1 TATTTGAAATGTCCTTCTTTGGCTCTTCGACTAGAACATCTGTTAGTAGTCTTAATTATA 60
DR2 TATTTTAAATGCTTCTTTGACTCTTCGACTAGAACATCTGTTAATAGTCTTAATTATA 60
*****

DR1 TTTTACAATTGTTTTATTTTTGTTTTTTTATTTATCGGAATGGTTATGGGTTTTTTCA 120
DR2 TTTTACAATTGTTTTATTTTTGTTTTTTTATTTATCGGAATGGTTATGGGTTTTTTCA 120
*****

DR1 TCTTATATAGTAAAATATGATGATTTTATCTTTATCTCTAGTGAAAGCTACTATTG 180
DR2 TCATGTATATAAAAATATGATAATTTTATCTTTATCTCTAGTGAAAGCTACTATTG 180
* * * * *

DR1 AATTAGGAAGTTACGATCCTTATTATAGTATTTATAAAGTAAAAACAGGATTGCTCTAGT 240
DR2 AATTAGGAAGTTATGAGCCTT--ATAGTATTTATATAGTAAAAATAGGATTGCTCTCATG 237
*****

DR1 ATATTATTAGACACTTTGACGTAGTGACTATTAAGGTTAGCCTAATAGATTATATCGT 300
DR2 ATATTATTAGACACTTTAACATAGTGACTGTTAAGGTTAGCCTAGTAGATTATATATGT 297
*****

DR1 ATCTTTTTTTTAAATAAATATTAGAATTGGTTAATTTTAGTTGATTATTAATAAATAG 360
DR2 ATCTTTTTTTTAAATAAATATTAGAATTGGTTAATTTTAGTTGGTTATTAATAAATAG 357
*****

DR1 TATATTTATATTTTATGTATAAAGAATTTATAGTATTTTTTATTTTT--A 408
DR2 TATATTTATATTTTATGTATAAAGAATTTATAGTATTTTTTGTTTTTTTA 407
*****
    
```

図3. 反復する塩基配列の比較

## IV. 考察

### 1. 高校での学習として

本稿では *N. fowleri* の mtDNA を材料に、高額で高機能なソフトウェアを使用しなくてもワープロソフトやネット上で使用可能なソフトウェアで基本的な解析をすることができることを示した。高校生であれば容易に解析を進めることができると思われる。この作業の過程で

*N.fowleri* の mtDNA に約 800 塩基にわたる反復配列が見出された。生物の DNA にはさまざまな反復配列が存在しており、極めて重要な機能を有している反復配列もあれば、機能が未知の反復配列もある。*N.fowleri* の mtDNA に存在する反復配列がどのような機能を有しているのかについては、現時点では分からない。

本稿ではアノテーションが付与された情報を出発材料にして解析を行った。一方、先述の通りデータベースにはアノテーション付与されていない mtDNA の塩基配列も登録されている。そのような情報についても、本稿に示した AT 含量の計算（あるいは GC 含量の計算）、全体の相同性の解析、ドットプロット解析であればできる。

どのような遺伝子がコードされているのかを知りたい場合は、塩基配列から遺伝子を予測するためのソフトウェアや検索エンジンを利用する。検索のために世界的によく使われるのは BLAST であり、当研究室でも頻繁に利用している。BLAST の画面に塩基配列を入力し送信すると予測される遺伝子の情報が返信されてくる。非常に有用であるが、本稿で取り上げた約 50kb の塩基配列を入力すると返信されてくる情報量が多すぎて、高校生にはその後の作業が難しくなるかもしれない。

## 2. *N. fowleri* の早期発見に向けた研究として

*N.fowleri* による PAM は有効な治療法がないため適切な感染予防対策（水域を調査しそこに *N.fowleri* をみとめた場合は速やかに遊泳禁止等の措置をとる等）が求められる。水域に本病原体が存在することを迅速かつ高感度で検出するには PCR が適していると思われる。ただし、これが有効に機能するためには標的となる塩基配列が *N.fowleri* に固有であること（誤って他の生物種を検出しないように）、及び多コピーであること（検出が容易になる）が望ましい。当研究室は、邦人患者から分離した *N.fowleri* の全ゲノム解析を行い、本病原体が青色光に応答するタンパク質を 2 種類コードしていることを明らか

にした（Yasukawa et al., 2013; 佐藤 & 安川, 2013; 安川, 2016）。これらのタンパク質は近縁種の *N.gruberi* にはみられないため *N.fowleri* に固有であるかもしれないが、核 DNA にコードされておりコピー数が少ない。一方、本研究の過程で見出した *N.fowleri* mtDNA 内部の反復配列は近縁種の mtDNA にはみられなかったことから *N.fowleri* に固有の塩基配列であることが期待される。また、mtDNA は細胞あたりのコピー数が多いことが予想され、検出感度の点でも期待が持てるかもしれない。

## 参考文献

Yasukawa, H. et al (2013): Identification of photoactivated adenylyl cyclase in *Naegleria australiensis* and BLUF-containing protein in *Naegleria fowleri*, *Journal of General and Applied Microbiology*, 59(5), pp361-369.

佐藤彩 & 安川洋生 (2013): 致死性病原体フォーラーネグレリアの高感度検出, *日本科学教育学会研究会研究論文集*, 28(1), pp25-26.

安川洋生 (2016): 致死性病原体ネグレリアフォーレリの全ゲノム解析, *岩手大学教育実践総合センター紀要*, 15, pp125-129.