

## セスジアカムカデ中のアピコンプレクサ寄生虫のリボソーム RNA 系統解析

宮田凌佑 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 稲垣祐司 (筑波大学 生命環境系)

## 背景、目的

アピコンプレクサ門は寄生性原生動物から構成される系統群であり、マラリア原虫やトキソプラズマといったヒトや家畜の病原性寄生虫を含む。アピコンプレクサ門の共通祖先は光合成能を持つ真核藻だったと考えられ、これまで研究されたアピコンプレクサ寄生虫のほとんどの種が光合成能を失った色素体(アピコプラスト)を細胞内に保持している。しかし、真核藻からどのような過程を経て現在のアピコンプレクサ寄生虫に進化したのか、それとともに色素体がどのような進化を経て非光合成化したのか、その詳細はいまだ明らかになっていない。この問題を解明するには、まずアピコンプレクサ寄生虫間の頑健な系統関係を解明する必要がある。

アピコンプレクサ門に属するグレガリナは、系統的に広範な無脊椎動物に寄生する。先行研究による 18S rDNA 配列に基づく系統解析では、グレガリナはアピコンプレクサクレード中で早期に分岐したことが示唆された。従って、これまで研究されてきたアピコンプレクサ寄生虫同様にグレガリナも非光合成性色素体を保持するならば、これまで研究されてきたアピコプラストよりも祖先的形質を保持している可能性がある。しかし、18S rDNA 配列に基づく系統解析には、アピコンプレクサクレード中でのグレガリナの系統的な位置を確定するだけの進化的情報が不足している。そこで、80 遺伝子程度の配列データに基づく系統解析によりグレガリナの系統的な位置を確定することを最終目標とし、本研究ではグレガリナの遺伝子転写物の塩基配列を網羅的に決定するトランスクリプトーム解析の実施を目指した。

グレガリナには海産の無脊椎動物に寄生する種と、陸上の節足動物に寄生する種が知られている。陸上の節足動物は海産無脊椎動物よりも入手が容易であるため、本研究では陸上の節足動物に寄生するグレガリナ(陸生グレガリナ)、特に筑波大学構内で容易に採集できるセスジアカムカデ *Scolopocryptops rubiginosus* の消化管中の寄生虫を研究対象とした。

本発表では、セスジアカムカデ寄生虫がアピコンプレクサ門に属することを確認するために、まず 18S rDNA 遺伝子の塩基配列を決定し、系統解析を行った。

## 材料、方法

## 1. 18S rDNA 配列の取得

9月中旬から10月下旬にかけて筑波大学構内にてセスジアカムカデの採集を行った。冷凍麻酔を行った後解剖し、消化管を取り出した。寄生虫が確認された消化管から、パスツールピペットを用いて寄生虫細胞を単離した。その後、セスジアカムカデの組織等のコンタミネーションを除くため、蒸留水によって寄生虫細胞を洗浄した。洗浄した寄生虫1細胞をテンプレートとし、PCRによって18S rDNA配列の増幅を試みた。PCRのプライマーには、既知の陸生グレガリナ18S rDNA配列に特異的なプライマーを設計し、実験に用いた。増幅産物をクローニングし、その後

塩基配列を決定した。決定した塩基配列をクエリとしてNCBIのデータベースに対しBLAST検索を行った。

## 2. 取得した18S rDNAを用いた系統解析

NCBIのデータベースから、既知のグレガリナの18S rDNA配列を収集した。さらに、先行研究(Wakeman et al. 2013; Janoušková et al. 2015)でアピコンプレクサ寄生虫と相同性を示した環境配列を加えた。これらGenbankデータベースから取得した配列と、本研究で取得した配列を含むアライメントをMAFFTによって作成し(合計140配列×835ポジション)、RAxMLを用いて最尤法による系統解析を行った。塩基置換モデルには、座位間での置換速度差をガンマ分布により補正したGTRモデルを用いた。系統解析では、10個の初期樹形から樹形探索を行うことで最尤系統樹を得た。さらに、推測された最尤系統樹の信頼性を評価するため、100個のリサンプリングデータに基づくブートストラップ解析を行った。

## 結果、考察

22個体のセスジアカムカデの解剖を行ったところ、4個体の消化管に多数の寄生虫が観察された。これらの寄生虫のうち26細胞を単離し、それぞれを鋳型にPCRを行った結果、合計1206塩基長のDNA断片の増幅に成功した。このrDNA配列は、アピコンプレクサ寄生虫であるクリトスポリジウムやアピコンプレクサ門に近縁なコルポデラの18S rDNA配列に高い相同性を示したが、塩基配列が完全に一致する配列はGenBankデータベース中に存在しなかった。つづいてムカデ寄生虫配列について系統解析を行い、既知のアピコンプレクサ寄生虫配列とクレードを形成することを確認した。ただし、今回決定したムカデ寄生虫配列は、既知の陸生グレガリナ配列を含め、特定の配列やサブクレードへの強い近縁性は検出できなかった。以上の結果から、セスジアカムカデ寄生虫はアピコンプレクサ門に属するが、これまで研究されてきた陸生グレガリナとは近縁でないと結論づけた。

現在、セスジアカムカデ中のアピコンプレクサ寄生虫から全RNAを抽出し、トランスクリプトーム解析の準備を行っている。今後、トランスクリプトームデータを基盤とした~80遺伝子配列データに基づく系統解析を行い、この寄生虫と他のアピコンプレクサ寄生虫との系統関係を頑健に推測する。また系統解析と並行し、トランスクリプトームデータ中に退化色素体で機能するタンパク質遺伝子の探索を行う予定である。