

多包虫エキノкокスの cDNA ライブラリー作製と ミトコンドリア遺伝子の実験的位置づけ

Construction of cDNA Libraries and Mapping of
Mitochondrial Genes of *Echinococcus multilocularis*

澤田 幸治 山野 公明 八木 欣平
古屋 宏二 田村 正秀

Yukiharu SAWADA, Kimiaki YAMANO, Kinpei YAGI,
Koji FURUYA and Masahide TAMURA

The echinococcosis endemic in Hokkaido, Japan, is caused by *Echinococcus multilocularis* (*E. m.*). The extract prepared from the larval cysts formed in experimentally transmitted cotton rats is used as the diagnostic antigen for serological test of inhabitants. The extracted antigen is excellent to minimize false negative cases in mass screening, but at the same time, has some variety in quality between preparations and often cross-reacts with other parasitosis. To improve the test by providing purified recombinant antigens, expression cDNA libraries were constructed on a λ phage vector using RNAs prepared from the larval cyst and the protoscolex fractions. Among 192 clones randomly isolated from the cyst library were identified 10 *E. m.* cDNAs, 9 homologous to the known cDNAs for other species and 38 *E. m.* mitochondrial 12S rRNA clones, as well as 104 unidentified ones. The latter included at least 92 independent genes, suggesting high complexity of the library. Comparison of the nucleotide sequences of mitochondrial cDNA clones, such as 12S rRNA and cytochrome oxidase subunits 1 and 3, with the deposited *E. m.* mitochondrial DNA sequence revealed that the speculated 5' ends of these genes were established experimentally by plural cDNA clones for each gene. The 3' ends also mapped within 1-4 nucleotides from the speculated positions on the mitochondrial DNA sequence. These results suggested that the cDNA library has enough quality to be used in the screening and analysis of antigenic cDNA clones.

Key words : *Echinococcus multilocularis* (多包条虫) ; cDNA library (cDNA ライブラリー) ; recombinant antigens (組み換え抗原) ; mitochondrial genes (ミトコンドリア遺伝子)

緒 言

エキノкокス症 (E 症) は包条虫属に属する *Echinococcus multilocularis* (多包条虫), *E. granulosus* (単包条虫), *E. vogeli* 及び *E. oligathrus* の幼虫を原因とする寄生虫性疾患である¹⁾。このうち単包条虫は全大陸に、多包条虫は北半球に分布しており、いずれもヒト及び家畜に人獣共通寄生虫感染症である包虫症を起こす¹⁾。特に単包虫症は世界各地の牧羊地帯で羊の約半数に、また牧羊者10万人当たり数人から数十人の割合で報告されるなど、畜産上ならびに公衆衛生上の問題となっている²⁾。

北海道における E 症は多包虫症であり、北海道における重要な寄生虫感染症³⁾ として、血清検査による住民検診が実施されている。この血清診断用抗原は実験的にコトナラットに感染増殖させた多包虫エキノкокスの幼虫組織から

抽出調製され、多包虫エキノкокスのほとんどの抗原成分を含むため、血清診断において偽陰性率が低く、一次検診のマススクリーニング用抗原として優れている⁴⁾。しかし、近縁の寄生虫との交差反応がみられたり、ロット間に品質の差がみられるなど、改良の余地もある⁴⁾。

平成11年4月に施行されたいわゆる「感染症新法」により E 症が4類感染症に分類され、また単包虫症も届出の対象になったため、これらの鑑別診断が求められるようになった⁵⁾。これまで国内では単包虫症の報告は少ない⁶⁾ が、最近の海外渡航者、外国人就労者の増加などから、単包虫症を疑う症例の増加が予想される⁷⁾。鑑別診断にはさらに特異性の高い抗原が要求される一方、診断率の向上には高い検出感度が必要である。これらの要求を満たす抗原の探索が諸外国を中心に進められてきているが、これまでのところ単一抗原で十分な成績が得られているとはいえない⁸⁻¹³⁾。

われわれは複数の純化抗原の組み合わせによる血清診断の改善を目指して、特定の遺伝子を遺伝子集団から選択する（遺伝子クローニング）技術を用いて多包虫純化抗原の生産に取り組むこととした。ここでは、幼虫組織（cyst, シスト）及び原頭節（protoscolex）由来のRNAをもとに発現型 cDNA ライブラリーを作製し、これらのライブラリーの多様性や個々の cDNA クローンの両末端の構造など、ランダムに分離した cDNA クローンの解析から得られた結果を報告する。

材料と方法

1. 多包虫シスト及び原頭節からの RNA 調製と cDNA の合成

多包虫エキノコックス (Em) の虫卵を実験感染させた後、15週経過したコトラットの肝に形成されたシスト及びシストの内容液から調製した原頭節画分を RNA 調製材料とした。

実験用ハサミで細切したシスト片 (300~400 mg) あるいは原頭節画分 (約300 mg) を滅菌ホモジェナイザーを用いて乳剤化し、2度の ISOGEN (ニッポンジーン社) 処理により RNA を精製した。シスト片2片から調製した RNA(1)及び(2)の収量は各々227 μ g 及び247 μ g, 原頭節からの収量は208 μ g であった。ポリ A(+) RNA 画分は PolyAtract mRNA Isolation Systems (Promega 社) を用いて調製した。RNA サンプル(1)~(4)の収量は各々0.5 μ g, 1.0 μ g, 1.75 μ g, 3.25 μ g であった。これらの試料については2-プロパノール沈殿により濃縮し、70%エタノールでリンス後、1 μ g/3 μ L に調製した。

cDNA の合成には SMARTTM cDNA 構築キット (Clontech 社) を用いた。3 μ L の polyA(+) RNA (1 μ g) を鋳型として、SMART III oligo, CDS III/3' の各 PCR プライマー及び MMTV RTase を用いて第1鎖 cDNA を合成した。この第1鎖 cDNA 合成産物 (11 μ L) を 5' PCR primer 及び CDS III/3' の各 PCR プライマーを用いて PCR 法により3サイクル増幅した。増幅産物の2分の1を除蛋白処理後、さらに5サイクル増幅した。この cDNA を除蛋白処理及び制限酵素 *Sfi*I 処理後、CHROMA spin-400カラムを用いて分画し、1.1%アガロースゲル (0.5 μ g/mL の臭化エチジウムを含む) で各分画の3 μ L ずつを100 V で12分間電気泳動した。cDNA を含む最初の3, 4分画を1本のチューブに集め、エタノール沈殿により cDNA を回収した。

2. 未増幅ライブラリーの作製と cDNA 組み換えファージのランダム・クローニング

分画したシスト及び原頭節由来 cDNA を T4 DNA リガーゼ反応 (全量5 μ L) により上記 cDNA 構築キットに添付の λ Triplex 2 ベクター・アームに連結した後、ライゲーション反応産物を Gigapack III Gold Packaging Extract (Stratagene 社) と混合してファージ粒子を形成させ、未増幅ライブラリーとした。

5倍希釈したライブラリーを1 μ L ずつ200 μ L の大腸菌

XL 1-Blue (10 mM 硫酸マグネシウム処理) に加えて混合し、トプアガー法でファージの感染増殖により生じたプラークを数えて感染価を測定した。また、LacZ α 相補性試験¹⁴⁾ により組み換え率を測定した。

未増幅ライブラリーの感染価測定用と同様に調製したトプアガー・プレート上に形成されたプラークをシスト由来未増幅ライブラリーから192個、原頭節由来未増幅ライブラリーから336個分離した。

3. プラスミドの調製とシーケンス解析

本研究に用いた λ Triplex 2 ファージベクターのクローニング部位はファージ DNA 配列内に組み込まれた pTriplex EX 2 プラスミド DNA 配列内にあり、この pTriplex EX 2 プラスミド DNA 配列の両側に配列特異的 DNA 組み換え酵素 Cre の標的配列 loxP が1コピーずつ存在する。分離した各プラークに含まれるファージを Cre 発現大腸菌 BM 25.8 に感染させて生成したコロニーから各 pTriplex EX 2 プラスミドを回収した。これらのプラスミド DNA を大腸菌 XL 1-Blue へ導入 (形質転換) し、生成したコロニーからプラスミド DNA を調製して塩基配列解析実験に用いた。

プラスミド DNA はボーリング法¹⁵⁾, RPM キット (BIO 101社) 及び DNA 自動分離装置 PI-50 α (クラボウ社) により調製した。大腸菌への導入 (形質転換) には DNA と RNA の混合溶液のまま用い、制限酵素による切断及び塩基配列解析実験には RNase 処理してから用いた。調製したプラスミド DNA を制限酵素 *Eco*RI 及び *Xho*I により切断してアガロース・ゲル電気泳動を行い、組み換えられた cDNA のサイズを調べた。

塩基配列解析には BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Premix (Applied Biosystems 社) を用い、GeneAmp PCR 2400 (Perkin Elmer 社) により反応を行った。反応は95°C10秒間の前処理後、95°C10秒間、50°C 5秒間、60°C 4分間のサイクルシーケンシング反応を25サイクル行った。反応産物を ABI PRISM 377 シーケンサ (Applied Biosystems 社) 及び ABI PRISM 310 ジェネティックアナライザ (Applied Biosystems 社) により解析した。得られた塩基配列データをホモロジー検索プログラム BLAST¹⁶⁾ により DDBJ/EMBL/GenBank に登録されている DNA 塩基配列データと照合した。

結 果

北海道のエキノコックス症の原因となる多包虫エキノコックスの発現型 cDNA ライブラリーを、シスト全体及び原頭節画分に由来するものとの2種類を、 λ ファージベクター上に作製した。ファージ再構成後の未増幅ライブラリーは、シスト由来では 5.0×10^5 個及び 5.0×10^5 個、原頭節由来では 1.6×10^6 個及び 2.3×10^6 個の感染性ファージ (各0.5 mL) を含んでいた。また、LacZ α 相補性試験¹⁴⁾ により非組み換え体を青色に、組み換え体を白色に表示させて組み換え率を調べたところ、シスト及び原頭節由来未増幅ライブラリー

のいずれも98%の組み換え率を示した。

ファージのプラスミドへの変換に用いた大腸菌 BM25.8 はファージを溶原化する性質を持つので、感染したファージの DNA は大腸菌 DNA に組み込まれて遺伝子の働きを抑制され、ファージの複製は起こらない¹⁷⁾。しかし、BM 25.8から調製したプラスミド DNA は量が少なく純度も充分ではないことが明らかとなったので、BM25.8から調製したプラスミド DNA を組み換え酵素 Cre を持たない大腸菌 XL 1-Blue へ簡便法で導入し、生成するコロニーから改めてプラスミド DNA を調製した。

作製した 2 種類の cDNA ライブラリーからランダムにクローンを分離し、本研究では特にシスト由来のクローンを中心に解析を行った。シスト由来の192個のクローンの解析結果は Table 1 に示すように、既登録の遺伝子との有意な相同性（ホモロジー）を示さなかった未知のクローンは104個、既登録の遺伝子と一致して多包虫エキノコックスの mRNA 由来と同定されたクローンは10個、多包虫エキノコックスのミトコンドリア12S rRNA 由来クローンは38個、既登録の他種生物の遺伝子と有意な相同性を示して多包虫エキノコックスの mRNA 由来と推定されたクローンは9個等であった。未知のクローン104個は少なくとも92種の多様な遺伝子から構成されていた。Table 2 に多包虫 mRNA 由来と同定または推定された cDNA クローンの内訳を示す。これらのうちミトコンドリア mRNA 由来は5個であった。ラットやマウスの既登録の遺伝子に高いホモロジーを示して宿主のコトンラット由来と考えられるクローンも10個あった。その内訳を Table 3 に示す。

ミトコンドリア12S rRNA 由来クローンのうち25個を DNA バンクに既登録の多包虫エキノコックスのミトコンドリア DNA 塩基配列¹⁸⁾ と照合したところ、Fig. 1 に示すように5' 末端あるいは3' 末端の塩基配列を共通にもつクローンが多数得られた。これらのクローンの3' 末端には2塩基程度の違いがみられたが、5' 末端の塩基配列は一致し、推定されたコード領域の5' 末端の塩基配列と一致した。

さらに原頭節由来のクローンのうち48個を解析して、ミトコンドリア12S rRNA 由来クローン6個の他にミトコンドリア mRNA 由来が4個確認された。シスト由来の5個のミトコンドリア mRNA 由来クローンを合わせた9個中、チトクロームオキシダーゼのサブユニット1 (CO 1) が4個、サブユニット3 (CO 3) が3個得られた。CO 1 と CO 3 の遺伝子座位はミトコンドリア DNA 上に位置づけられている¹⁸⁾ ので、これらのクローンをミトコンドリア DNA 塩基配列¹⁸⁾ と照合したところ、Fig. 2 及び Fig. 3 に示すようにそれぞれ5' 末端あるいは3' 末端の塩基配列を共通にもつことが示された。4個の CO 1 クローンのうち2個は5' 末端が一致し、上流側に推定された tRNA^{Trp} コード領域の3' 末端に隣接するとともに、3個は3' 末端が2~4塩基の範囲で一致し、推定される CO

Table 1 Classification of Randomly Cloned cDNAs from the Cyst Library

Number of clones	Classification
10	Em mRNAs identical to deposited Em genes
9	Em mRNAs homologous to deposited genes
104	unknown cDNA clones
39	Em rRNAs
1	Em repetitive sequence
10	rat mRNAs (identified/assigned)
1	to be assigned (Em or rat)
12	short insert
5	no plasmid
1	no data

Em, *E. multilocularis*.

Table 2 Identified or Assigned cDNA Clones for *Echinococcus multilocularis*

Number of clones	Gene assignment
4	antigen B subunit-1 (85aa)
1	antigen B subunit-2 (89aa)
2	<i>T. solium</i> immunogenic protein-like
1	actin
1	α -tubulin
1	glutathione S transferase
1	ribosomal protein (S15a-like)
1	fatty acid binding protein
1	thioredoxin peroxidase
1	triose-phosphate isomerase
1	cytochrome oxidase subunit 1
2	cytochrome oxidase subunit 3
1	cytochrome b
1	NADH dehydrogenase subunit 5

Table 3 cDNA Clones Assigned for Cotton Rat

Number of clones	Gene assignment
1	ferritin L chain
1	ferritin H chain
1	MHC class II RT1-B-1
1	glutathione S transferase
1	histon H4
1	CCAAT enhancer binding protein
1	apoptosis regulating protein
1	repetitive sequence on 3' ends
2	unknown

考 察

1コード領域の3'末端のごく近傍に位置していた (Fig. 2). また, 3個のCO3クローンのうち2個は5'末端が一致し, 他の1個も1塩基の差で, 上流側に推定された tRNA^{Cys}コード領域の3'末端に隣接し, 3'末端は3個とも推定されるCO1コード領域の3'端から3塩基以内に位置していた (Fig. 3). これらの解析結果から, 多包虫エキノコックスのミトコンドリア DNA 配列上に cDNA ライブラリーから分離したミトコンドリア由来クローンを位置付けることが可能であることが示された.

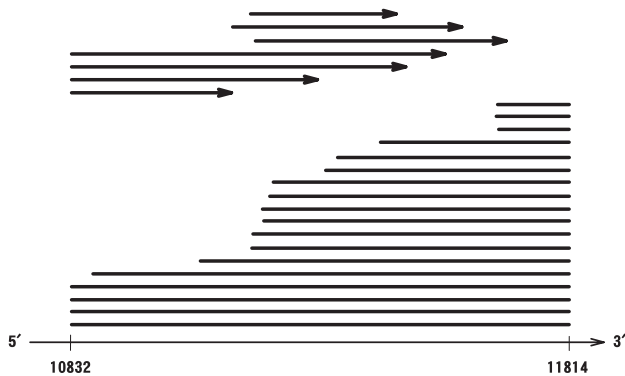


Fig. 1 Localization of cDNA Clones of *E. multilocularis* Mitochondrial 12S Ribosomal RNA

The abscissa represents the nucleotide sequence of *E. multilocularis* mitochondrial 12S ribosomal RNA gene on the mitochondrial DNA sequence¹⁸⁾. The numerics indicate the positions of both ends of the gene. Arrowheads show tentative 3' ends of clones whose sequencing is not completed.

北海道で分離された多包虫エキノコックスの発現型 cDNA ライブラリーを, シスト全体及び原頭節画分由来の2種類を作製した. 未増幅のシスト由来 cDNA ライブラリーからランダムに分離した192個のクローンの解析結果は, このライブラリーが多様な未知遺伝子クローンなどを含むことから, 多数のクローンの分離と解析に使用できることを示したと考えられる.

これらの解析で, ランダムに分離したクローンに rRNA 由来のクローンが約20%含まれていたが, その多くは3'末端と5'末端のいずれかをほぼ正確にもち, rRNAの全長をコードしているクローンも得られた (Fig. 1). これは, 使用したプライマーに関係があると思われる. 通常, cDNA 合成の際にはチミジン (dT) のみが6~12残基連なるオリゴ dT をプライマーに使用する. 本研究で使用した cDNA 合成キットでは, オリゴ dT を基にしたプライマーの3'末端にさらにランダムな2塩基が付加されている. これは, 合成される cDNA の (dT)_n 配列の長さを統一するためである. プライマーの3'末端の2塩基部分が rRNA の3'末端に結合して cDNA 合成が開始されたと考えられる. さらに, 一本鎖 cDNA の5'末端にリンカーとなる塩基を付加して全長 cDNA を得る方法を採用しているため, 5'末端まで正確に含まれる rRNA 全長クローンが得られたのであろう. このように rRNA 全長クローンが得られたことから, 他の遺伝子についても mRNA の全長をコードしているクローンを分離することが可能であると考えられる.

多包虫エキノコックスのミトコンドリア DNA は13,738塩基対の全長が DNA データバンクに登録されており¹⁸⁾, 他種生物のミトコンドリア DNA との塩基配列の相同性に

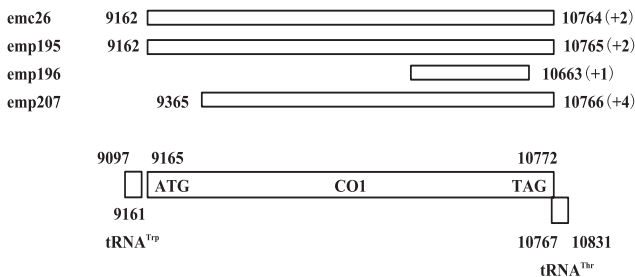


Fig. 2 Mapping of CO1 Transcripts on the Assumed CO1 Region of the Mitochondrial DNA Sequence

An emc clone from the cyst library and three emp clones from the protoscolex library are shown with nucleotide positions of 3' and 5' ends with respect to the mitochondrial DNA sequence¹⁸⁾. The numerics in parentheses indicate the numbers of additional nucleotides present on the 3' ends of the cloned cDNA. The assumed coding regions of the CO1 gene and the adjacent tRNA genes are shown on the bottom. ATG and TAG indicate the initiation and termination sites of the CO1 gene.

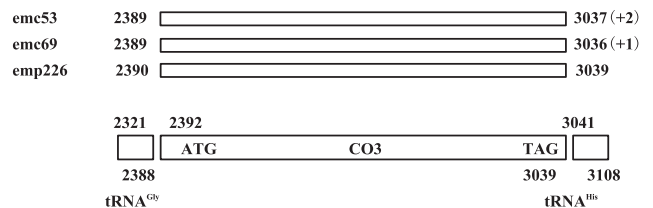


Fig. 3 Mapping of CO3 Transcripts on the Assumed CO3 Region of the Mitochondrial DNA Sequence

Two emc clones from the cyst library and an emp clone from the protoscolex library are shown with nucleotide positions of 3' and 5' ends with respect to the mitochondrial DNA sequence¹⁸⁾. The assumed coding regions of the CO3 gene and the adjacent tRNA genes are shown on the bottom. The numerics in parentheses and ATG and TAG are as in the legend to Fig. 2.

基づいて、12個の蛋白質サブユニット、2個のリボソームRNA、22種のtRNAをコードすると推定されている。ミトコンドリアDNAは特異的なRNAポリメラーゼにより全長が転写されて、プロセシングによりmRNA、rRNA、tRNAを生成する¹⁹⁾。cDNAの5'末端と3'末端を位置付けることはプロセシングの位置を、従って、各々の遺伝子の全長を実験的に決めることになり、遺伝子産物の一次構造を推定する上で重要な情報を与えることになる。

宿主のコトナラット由来と考えられるクローンも10個あった (Table 3) が、これらは多包虫エキノコックスを感染させたコトナラットから病巣 (シスト) を取り出した際に、少量のラット肝組織片が取り除かれずに残ったためと考えられる。ラットはマウスやヒトと遺伝子のホモロジーが高く、マウスやヒトのDNAではほぼ全塩基配列が登録されているので、データベースの検索により、ライブラリーに混入するラット由来クローンは比較的容易に特定することが出来た。

ランダムクローンの解析からシスト由来のライブラリーに多様な遺伝子クローンが含まれることが示されたことから、同じ方法で作成された原頭節由来のcDNAライブラリーも多様性をもつと示唆され、これらを用いて多包虫エキノコックスのcDNAデータベースを作製することが可能と考えられる。一方、このシスト由来のcDNAライブラリーは血清反応陽性クローンを分離する目的にも使用できることが予備的な解析結果から明らかとなっている²⁰⁾。

結 語

北海道でみられるエキノコックス症は多包虫症であり、実験感染させたコトナラットの病巣 (シスト) から調製された抽出抗原を用いて住民の血清検査が行われている。本研究では、診断用抗原としての組み換え抗原の生産を目指して、多包虫シストと原頭節画分からRNAを調製し、ラムダファージベクターを用いてcDNAライブラリーを作成した。シスト由来ライブラリーからランダムに分離した192クローンを解析して、多包虫cDNAクローン10個、既知の他種生物由来のcDNAと相同性を示して多包虫cDNAと推定されたもの9クローン、多包虫のミトコンドリア12S rRNAクローン38個に加えて、未知のcDNAクローン104個を同定した。後者は少なくとも92種類の遺伝子からなり、このライブラリーが多様な遺伝子クローンから構成されていることが示唆された。既登録の多包虫エキノコックスミトコンドリアDNAの塩基配列を参照して、ミトコンドリア12S rRNA、チトクロム酸化酵素サブユニット1及びサブユニット3遺伝子の5'末端を実験的に位置づけた。

本研究は平成13年度より開始された重点領域特別研究「遺伝子操作・細胞融合技術によるエキノコックス症診断用抗原の生産」の一環として行われたことを付記する。

文 献

- 1) Rausch RL : Echinococcus and Hydatid Disease (ed. Thompson RCA and Lymbery AJ), CAB INTERNATIONAL, Wallingford, UK, 1995, p.89
- 2) Schantz PM, Chai J, Craig PS, Eckert J, Jenkins DJ, Macpherson CNL, Thakur A : Echinococcus and Hydatid Disease (ed. Thompson RCA and Lymbery AJ), CAB INTERNATIONAL, Wallingford, UK, 1995, p.233
- 3) 山下次郎 (増補, 神谷正男) : エキノコックス その正体と対策, 北海道大学図書刊行会, 札幌, 1997, p.3
- 4) 川瀬史郎, 佐藤千秋, 山野公明, 八木欣平, 三上大人, 久保亜希子, 加藤芳伸, 古屋宏二, 澤田幸治, 矢野昭起, 本間 寛, 田村正秀 : 重点領域特別研究 遺伝子操作・細胞融合技術によるエキノコックス症診断用抗原の生産, 北海道立衛生研究所 (澤田幸治) 編, 平成13年度報告書, 北海道立衛生研究所, 札幌, 平成14年3月, p.2
- 5) 感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律, 平成10年法律第114号, 平成11年4月1日施行
- 6) 山口富雄 : 感染症, 16, 19 (1986)
- 7) 伊藤 亮, 中尾 稔 : 病原微生物検出情報, 20, 5 (1999)
- 8) Vogel M, Gottstein B, Mueller N, Seebeck T : Mol. Biochem. Parasitol., 31, 117 (1988)
- 9) Frosch PM, Frosch M, Pfister T, Schaad V, Bitter Suermann D : Mol. Biochem. Parasitol., 48, 121 (1991)
- 10) Gottstein B, Jacquier P, Bresson-Hadni S, Eckert J : J. Clin. Microbiol., 31, 373 (1993)
- 11) Felleisen R, Gottstein B : Parasitol., 109, 223 (1994)
- 12) Lightowers MW, Gottstein B : Echinococcus and Hydatid Disease (ed. Thompson RCA and Lymbery AJ), CAB INTERNATIONAL, Wallingford, UK, 1995, p.355
- 13) Jiang L, Wen H, Ito A : Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg., 95, 285 (2001)
- 14) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T : Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, p.1.85
- 15) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T : Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, p.1.29
- 16) Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ : Nucleic Acid Res., 25, 3389 (1997)
- 17) CLONTECH Lab Inc., Ed., SMART™ cDNA Library Construction Kit User Manual, CLONTECH Lab. Inc., Palo Alto, USA, 1999, p.11
- 18) Fukunaga M : DDBJ/EMBL/GenBank Accession Number AB018440
- 19) Tabak HF, Grivell LA, Borst P : CRC Crit. Rev. Biochem., 14, 297 (1983)
- 20) 山野公明, 八木欣平, 澤田幸治 : 道衛研所報, 52, 58 (2002)