

台湾台北県産及び 日本産ウエステルマン肺吸虫アイソザイムの 集団遺伝学的研究 — ウエステルマン肺吸虫3倍体の起源についての考察 —

吾妻 健¹⁾ 波部重久²⁾ 横川宗雄³⁾

(昭和62年5月30日受領)

要 旨

1. 本研究では台湾台北県産（以下台湾産と略す）及び日本産のウエステルマン肺吸虫の2倍体について集団遺伝学的観点からデンプルゲル電気泳動を用いて分析し、日本産の3倍体と比較して、3者の類縁関係を検討した。分析に用いた酵素はAK, EST, GDH, GOT, GPI, GPT, G6PD, HK, LAP, MDH (*MDH-I*, *-II*), ME, PGM, 6PGD, TO (*TO-I*, *-II*)の14種類、16遺伝子座である。
2. 日本産の秋田及び千葉の両集団は変異性に乏しく、平均のheterozygosity (\bar{H})は、それぞれ0.000, 0.031であったが、台湾産では4遺伝子座(25%)で多型がみられ、 \bar{H} も0.116と高く極めて変異性に富んでいた。これらの多型的遺伝子座での観察遺伝子型頻度は、Hardy-weinberg平衡の法則から期待される頻度と一致した。
3. 台湾産と日本産の2倍体について、集団間の遺伝的類縁関係を量的に表す指標であるNeiの遺伝距離Dを求めると平均 \bar{D} は0.1134であった。
4. 台湾産の2倍体と日本産3倍体と比較すると、2つの遺伝子座GOT及びPGMにおいて、日本産の2倍体には存在しないいくつかの共通遺伝子が見出された。このことから台湾産は日本産3倍体の起源と考えられる未知の種と極めて近い関係にあることが示唆された。

Key words: lung fluke, *Paragonimus westermani*, triploid, isozyme, enzyme electrophoresis, population genetics

緒 言

最近、我々(吾妻・波部)は、日本産ウエステルマン肺吸虫の2倍体と3倍体の15種類の酵素(18遺伝子座)をデンプルゲル電気泳動法により比較したところ、その18遺伝子座のうち5遺伝子座(*DIA*, *GOT*, *HK*, *LGG-3*, *PGM*)において、3倍体の泳動パターンが常に2倍体のものと異なることを見出した(Agatsuma & Habe, 1985)。さらに3倍体では、韓国産も含めて集団内にも集団間にも全く変異がみられないことが分かり、この3倍体の起源はさほど古くないものと推定した。そして、日本各地に見られる多くの3倍体集団は、おそらく終宿主である哺乳動物の移動に伴って、最近急激に分布を拡大したものと考えた(Agatsuma & Habe, 未発表)。

また、我々は、3倍体において調査した18遺伝子座のうち5遺伝子座で、即ち約27%の遺伝子座で、すべての

個体がどの集団(4集団)においてもヘテロの状態であったことを報告したが(Agatsuma & Habe, 1985)、この数値は、今まで報告されてきた多くの生物種のheterozygosityの平均が約10%であることを考慮すると(Nei, 1972)、極めて高い値であることから、単純な突然変異の蓄積により生じたと考えるよりは、むしろ近縁種間あるいは亜種間などにおける雑種形成、即ちゲノムの導入にもとづくものと解釈した方が妥当であると論じた。この解釈はHirai *et al.* (1985)の独立に行なった染色体の研究によっても支持された。すなわち彼らはCバンドパターンを分析して、日本産および韓国産の3倍体が異質3倍体であることを証明した。以来我々は、日本産ウエステルマン肺吸虫の3倍体が外部からのゲノムの導入を伴って生じたとの作業仮説を下に、その起源であると考えられる未知の近縁種を追及している。

今回は、台湾産の2倍体の1集団並びに日本産の2倍体及び3倍体のいくつかの集団の酵素を分析し、比較検討したので、その結果を報告する。

1)高知医科大学寄生虫学教室

2)福岡大学医学部寄生虫学教室

3)千葉大学医学部寄生虫学教室(名誉教授)

材料及び方法

台湾産のウエステルマン肺吸虫 2 倍体は台湾の台北県泰平 (TP) のミヤザキサワガニ (*Geothelphusa miyazakii*) より採集した。日本産の 2 倍体は、秋田県の西木村 (AK), 千葉県の大多喜町 (CB), 三重県の伊賀地方 (ME), 及び大分県の院内 (OT) より採集したサワガニ (*Geothelphusa dehaani*) から、また 3 倍体は長崎県の対馬より採集したモクズガニ (*Eriocheir japonicus*) から得た。採集したメタセルカリアは、イヌに経口的に投与し、200日~300日後に成虫を回収した。各地域におけるウエステルマン肺吸虫の染色体の核型は、Terasaki (1977; 1980), 波部・宮崎 (1982), 杉山ら (1983), Hirai *et al.* (1985) 及び Kanazawa *et al.* (1986) により確認されている。今回調査した酵素は次の14種類

である: Adenylate kinase (AK: EC 2. 7. 4. 3), esterase (EST: EC 3. 1. 1. 1), glucosephosphate isomerase (GPI: EC 5. 3. 1. 9), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD: EC 1. 1. 1. 49), glutamate dehydrogenase (GDH: EC 1. 4. 1. 3), glutamic oxaloacetic transaminase (GOT: EC 2. 6. 1. 1), glutamic pyruvate transaminase (GPT: EC 2. 6. 1. 2), hexokinase (HK: EC 2. 7. 1. 1), leucine aminopeptidase (LAP: EC 3. 4. 1. 1), malate dehydrogenase (MDH: EC 1. 1. 1. 37), malic enzyme (ME: EC 1. 1. 1. 40), phosphoglucomutase (PGM: EC 2. 7. 5. 1), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD: EC 1. 1. 1. 44), tetrazolium oxidase (TO: EC 1. 15. 1. 1)。各酵素につき調べた個体数、泳動条件及び泳動バッファーは、Table 1, 2及び3に示してある。酵

Table 1 The examined number of the *Paragonimus westermani* individuals from 6 localities of Japan and Taiwan

		Japan					Taiwan
		Akita* (AK) 2n	Chiba* (CB) 2n	Mie* (ME) 2n	Ohita* (OT) 2n	Tsushima† (TM) 3n	Taipin* (TP) 2n
1	AK	7	23	25	15	30	30
2	EST	7	23	25	15	30	30
3	GDH	7	23	25	15	30	30
4	GOT	7	42	20	15	30	45
5	GPI	7	23	19	15	30	44
6	GPT	7	23	25	15	30	30
7	G6PD	7	23	25	15	30	30
8	HK	7	42	20	15	30	25
9	LAP	7	23	25	15	30	30
10	MDH	7	23	25	15	30	30
11	ME	7	23	25	15	30	30
12	PGM	7	42	21	15	30	42
13	6PGD	7	23	25	15	30	30
14	TO	7	23	25	15	30	30

* : diploids

† : triploid

Table 2 Electrode and gel buffers used in the present study

System	Electrode buffer	Gel buffer
TC	0.25 M Tris	Dilute 100 ml of electrode buffer to 1 liter
	0.25 M Citrate	
AC	0.04 M Citrate	0.005 M Citrate
	0.006 M N(3-aminopropyl)-morpholine	0.008 M N(3-aminopropyl)-morpholine

Table 3 Electroohoretic conditions for each enzyme examined

System	Enzymes	Conditions
SI	AK, GPT, HK	30 mA current const. 5 h
S13	PGM	30 mA current const. 5 h
S18	GPI	55 mA current const. 16 h
Poulik	GOT, DIA, EST, LAP	200 V voltage const. 6 h
TC	GDH, MDH, 6PGD, TO	50 mA current const. 5 h
AC	G6PD, ME	30 mA current const. 6 h

素の発色法は, Shaw and Prasad (1970) 及び Agatsuma and Habe (1985) に従った。

成 績

a. 台湾産 2 倍体集団の遺伝的構造

調査した14酵素-16遺伝子座 (TOおよびMDHが2つの遺伝子座に支配されている) のうち, 4つの酵素遺伝子座, GOT, GPI, HK, PGM が多型を示した。残りの12遺伝子座のうち TO-II を除いた 11 遺伝子座は全て monomorphic で日本産のものと同じの対立遺伝子に固定していた。また, TO-II の遺伝子座のみ日本産とは異なった対立遺伝子に固定していた。多型を示した4つの

酵素の泳動パターンは次の通りである。

GOT: 5つの遺伝子型が見出され, 3つの対立遺伝子 (*Got-a*, *Got-b*, *Got-c*) が確認された (Fig. 1)。最も高い頻度をもった遺伝子型は *Got-a/Got-a* であった (Table 4)。各対立遺伝子頻度は Table 5 に示されている。本酵素はヘテロが3本のバンドを示すことからダイマーと考えられた。

GPI: 3つの遺伝子型, 2つの対立遺伝子 (*Gpi-a*, *Gpi-b*) が確認され, 遺伝子頻度はそれぞれ0.671, 0.329 であった (Table 4 及び5)。泳動パターンから GOT 同様ダイマーと推定された (Fig. 2)。

HK: 3つの遺伝子型, 2つの対立遺伝子 (*Hk-a*, *Hk-b*) が見出され, それらの頻度はそれぞれ0.740, 0.260 であった (Fig. 1)。

PGM: 極めて高度の多型現象を示し, 少なくとも10種類の遺伝子型, 5つの対立遺伝子がみとめられた (Fig. 3)。最頻度遺伝子型は *Pgm-b/Pgm-e* であり, 最頻度遺伝子は対立遺伝子 "*Pgm-e*" であった (Table 4 及び5)。

これら4つの多型的遺伝子座における遺伝子型頻度が Hardy-Weinberg 平衡の法則に従うかどうかを X^2 test を用いて検定した結果, 各遺伝子座ともこの法則に従うことがわかり, ランダムな交配が行われていることが示された。

b. 日本産 2 倍体集団の遺伝的構造

秋田産の集団は, 調査個体数は少なかったが, すべての遺伝子座で monomorphic であった。千葉産では, GPI のみ多型を示し, 台湾産と同じの対立遺伝子 *Gpi-a*, *Gpi-b* を保有していた。三重産及び大分産の集団についてはすでに発表しているが (Agatsuma & Habe, 1985), 今回, 再調査を試みたところ, 既報と同様の結果が得られた。すなわち三重産では GPI と PGM の両遺伝子座で多型が見出され遺伝子頻度も既報とほぼ一致した (Table 4 及び5, Fig. 4)。また大分産も既報と同様, すべての遺伝子座で monomorphic であった。今回新しく調査した3酵素 glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), glutamic-pyruvate transaminase (GPT), 6-phosphogluc-

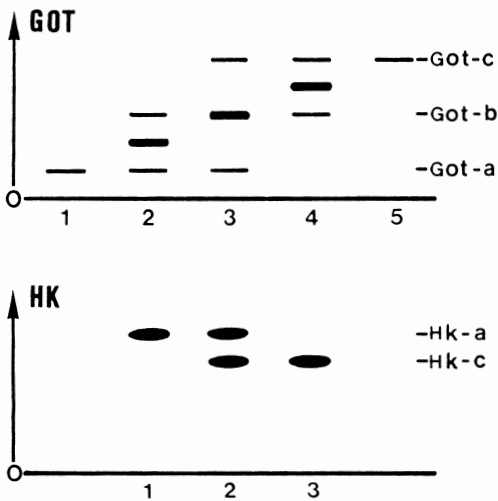


Fig. 1 Electrophoretic patterns of the GOT and HK isozymes in the Taiwan population of *Paragonimus westermani*. The number shows presumptive genotypes for individual isozyme patterns; for GOT, 1: *Got-a/Got-a*, 2: *Got-a/Got-b*, 3: *Got-a/Got-c*, 4: *Got-b/Got-c*, 5: *Got-c/Got-c*, and for HK, 1: *Hk-a/Hk-a*, 2: *Hk-a/Hk-c*, 3: *Hk-c/Hk-c*. O: origin. The arrow shows electrophoretic direction.

Table 4 Genotype frequencies of 4 enzyme loci in 6 different populations of diploid and triploid *P. westermani* from Japan and Taiwan

Populations Genotypes	Japan					Taiwan
	A T	C B	ME	O T	T M	T P
GOT						
a/a	7	42	20	15		27
a/b						13
a/c						1
b/c						1
b/b						3
a/a/b*					30	
GPI						
a/a	7	6	18	15		19
a/b		14	1			21
b/b		3				4
a/a/a*					30	
HK						
a/a	7	42	20	15		13
a/c						11
c/c						1
a/a/b*					30	
PGM						
a/a	7	42	9	15		2
a/b			5			1
b/b			5			1
b/c			2			
b/e						10
e/f						6
a/e						9
a/d						2
a/f						4
e/e						9
f/f						1
a/b/b*					30	

* See Agatsuma and Habe (1985)

onate dehydrogenase (6PGD) は、三重産においても大分産においても、すべて monomorphic であった。

c. 日本産 3 倍体集団の遺伝的構造

日本産 3 倍体集団の遺伝的構造については既に報告したが (Agatsuma & Habe, 1985), 本研究では再調査を試みたところ、前報と同じ結果を得た。すなわち調査した

すべての個体 (対馬産) は、3 酵素遺伝子座, *HK*, *PGM*, *GOT* において、日本産の 2 倍体のバンドと同一の移動度をもつバンドに加えて、付加的に出現する 1~2 本のバンドを必ず持っていた (Fig. 5)。これは、すでに報告したように、これらの遺伝子座でヘテロになっていることを示すものである。(ただし、今回の調査では

Table 5 Allele frequencies at 4 enzyme loci 5 diploid populations of *P. westermanni* from Japan and Taiwan

Alleles \ Populations	Japan				Taiwan
	A T	C B	M E	O T	T P
GOT					
a	1.000	1.000	1.000	1.000	0.756
b					0.222
c					0.022
H	0.000	0.000	0.000	0.000	0.379
GPI					
a	1.000	0.565	0.974	1.000	0.671
b		0.435	0.026		0.329
H	0.000	0.492	0.051	0.000	0.442
HK					
a	1.000	1.000	1.000	1.000	0.740
c					0.260
H	0.000	0.000	0.000	0.000	0.384
PGM					
a	1.000	1.000	0.548	1.000	0.195
b			0.405		0.159
c			0.047		
d					0.024
e					0.524
f					0.098
H	0.000	0.000	0.533	0.000	0.651
\bar{H}^*	0.000	0.031	0.037	0.000	0.116

* : Averages of 16 loci.

LGGとDIAは省略した。)また前報で未調査の3つの酵素遺伝子座, *G6PD*, *GPT*, *6-PGD*では, すべての個体が2倍体と同一のパターンを示し, monomorphicであることがわかった。

考 察

今回, 調査した日本産の二つの2倍体集団(秋田及び千葉)は, とともに変異性に乏しく平均のheterozygosity $\bar{H} (= 1 - \sum X_i^2; X_i: i$ 番目の対立遺伝子の頻度)は, それぞれ0.000, 0.031であった。これは既に調査した大分及び三重の集団の値とほぼ一致しており興味深い(Agatsuma and Habe, 1985)。一方, 台湾産の2倍体集団は極めて変異性が高く, 多型的遺伝子座の割合(P)は25%であり, \bar{H} も0.116であった。このことから台湾産の集団は日本産の諸集団と比較して, 集団の有効サイ

ズが大きく, より古い歴史をもっているものと考えられた。

台湾産と日本産の集団間の遺伝的類縁関係を調べるために, 既報の大分及び三重の両集団も含め, Nei (1972)の遺伝的距離を求めた(Table 6)。その結果, 日本産集団間ではあまり大きな値は得られなかったが, 台湾産集団は, 日本産のどの集団に対しても, 0.1以上の値を示した。これらの値は, 従来より報告されている亜種間の値の範囲に入るもので, 両者間における遺伝的分化がかなり進んでいることを示している(Avise, 1975)。Fig. 6は, 集団間の遺伝距離を用いて作成したデンドログラムである。

本研究の目的は5つの遺伝子座, *DIA*, *GOT*, *HK*, *LGG*, *PGM*における日本産3倍体特有のアイソザイム遺伝子を追及することにより, 3倍体の起源となった祖

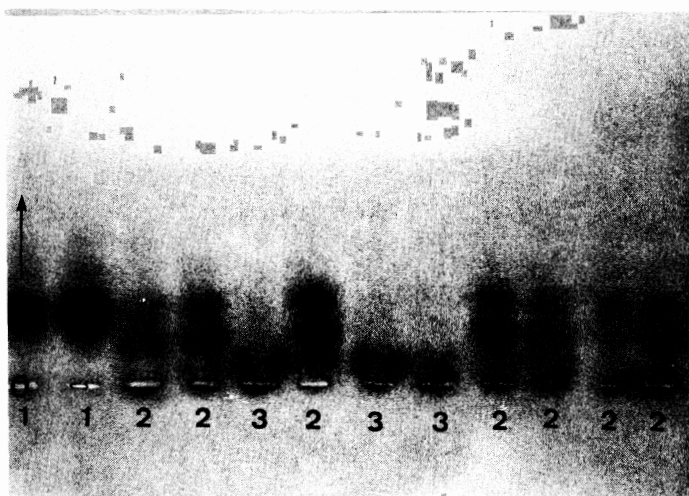


Fig. 2 A photograph of the GPI isozyme patterns in *P. westermanni* from Taiwan. The number shows presumptive genotypes for isozyme patterns. 1: *Gpi-a/Gpi-a*, 2: *Gpi-a/Gpi-b*, 3: *Gpi-b/Gpi-b*. O: origin. The arrow shows electrophoretic direction.

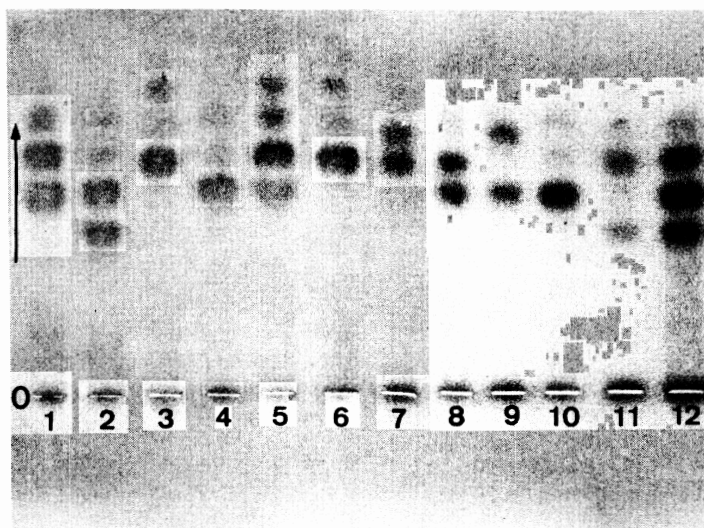


Fig. 3 A photograph of the GPI isozyme patterns in *P. westermanni* from Taiwan. The number shows presumptive genotypes for each individual sample. 1: a diploid individual from Japan (Ohita population) as a reference, 2: *Pgm-a/Pgm-b*, 3: *Pgm-e/Pgm-e*, 4: *Pgm-a/Pgm-a*, 5: *Pgm-a/Pgm-e*, 6: *Pgm-e/Pgm-e*, 7: *Pgm-e/Pgm-f*, 8: *Pgm-a/Pgm-e*, 9: *Pgm-a/Pgm-f*, 10: *Pgm-a/Pgm-a*, 11: *Pgm-b/Pgm-e*, 12: a triploid individual from Japan (Tsushima population) as a reference. O: origin. The arrow shows electrophoretic direction.

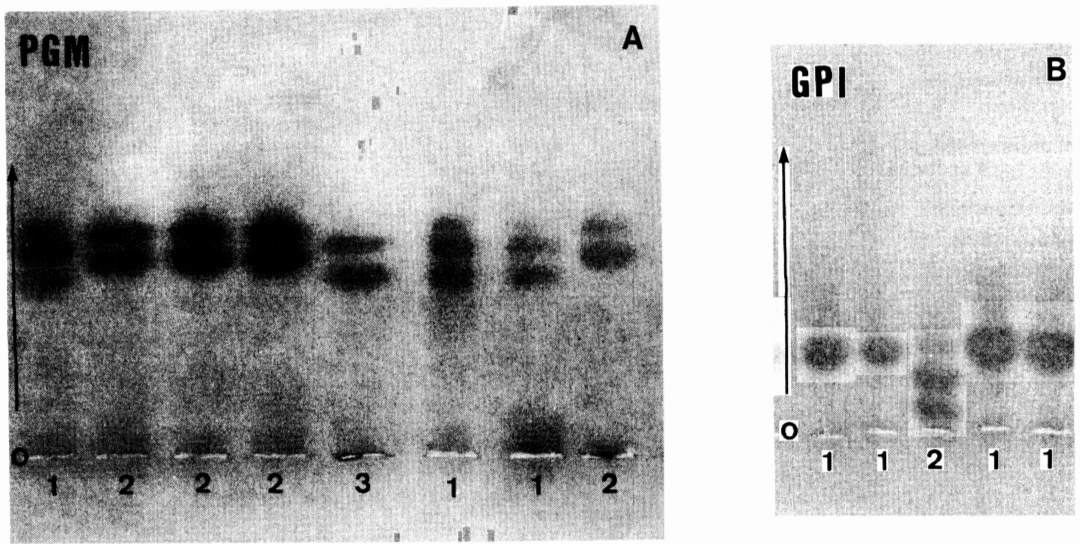


Fig. 4 Photographs of the GPI and PGM isozyme patterns in *P. westermani* from Japan (Mie population). The number shows different genotypes for each isozyme. For PGM(A), 1: *Pgm-a/Pgm-b*, 2: *Pgm-a/Pgm-a*, 3: *Pgm-b/Pgm-b*, and for GPI(B), 1:*Gpi-a/Gpi-a*, 2: *Gpi-a/Gpi-b*. O: origin. The arrows show electrophoretic direction.

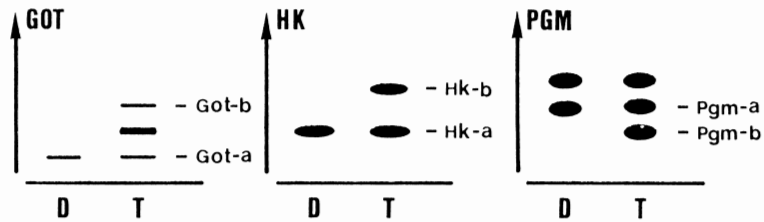


Fig. 5 Electrophoretic representation of isozyme differences in three enzymes (GOT, HK, and PGM) between the diploid and triploid *Paragonimus westermani* from Japan. D: a diploid type (from Ohita) T: a triploid type (from Tsushima). See Agatsuma and Habe (1985) for details. O: origin. The arrows show electrophoretic direction.

Table 6 Matrices of genetic distances (D) (above the diagonal) and normalized identity of genes (I) (below the diagonal) between each pair of 5 populations of *P. westermani* from Japan and Taiwan

D \ I	Japan				Taiwan
	A T	C B	M E	O T	T P
A T		0.01196	0.01174	0.00000	0.11849
C B	0.98811		0.02306	0.01196	0.11409
M E	0.98833	0.97720		0.01174	0.10234
O T	1.00000	0.98811	0.98833		0.11849
T P	0.88826	0.89218	0.90272	0.88826	

謝 辞

稿を終えるにあたり、カニの採集で御協力をいただいた国立台湾大学医学院寄生虫学教室の蘇霽靄教授並びに教室員の皆様、さらに秋田大学医学部石田和人博士、千葉大学医学部金沢保博士、大阪府立大学農学部富村保教授および杉山広氏に深謝いたします。また、有益な御助言をいただいた高知医科大学寄生虫学教室、鈴木了司教授、橋口義久助教授、さらに電気泳動など技術援助いただいた山本佐千代氏、並びに今村京子氏に御礼申し上げます。

文 献

- 1) Agatsuma, T. and Habe, S. (1985): Electrophoretic studies on enzymes of diploid and triploid *Paragonimus westermani*. *Parasitology*, 91, 489-497.
- 2) Avise, J. C. (1975): Systematic value of electrophoretic data. *Syst. Zool.*, 23, 465-481.
- 3) 波部重久・宮崎一郎 (1982) : 大分県北部のサワガニから見出されたウェステルマン肺吸虫の有性生殖型. *寄生虫誌*, 31, 275-280.
- 4) Hirai, H., Sakaguchi, Y., Habe, S. and Imai, H. T. (1985): C-banding analysis of six species of lung flukes, *Paragonimus* spp. (Trematoda: Platyhelminthes), from Japan and Korea. *Z. Parasitenkd.*, 71, 617-629.
- 5) Kanazawa, T., H., Kanzaki, T., Niimura, M., Kojima, S. and Yokogawa, M. (1986): *Paragonimus westermani*, diploid type, from Otaki-machi in Chiba Prefecture, Japan. *Jpn. J. Parasitol.*, 35, 527-5330
- 6) Nei, M. (1972): Genetic distance between population. *Am. Naturalist*, 106, 283-292.
- 7) Shaw, C. R. and Prasad, R. (1970): Starch gel electrophoresis of enzymes-A compilation of recipes. *Biochem. Genet.* 4, 297-320.
- 8) 杉山 広・奥田 稔・園田二郎・富村 保(1983) : 三重県伊賀地方産サワガニにおけるウェステルマン肺吸虫(基本型)メタセルカリアの寄生状況について. *寄生虫誌*, 32(補), 43.
- 9) Terasaki, H. (1977): Studies on the lung flukes in Japan. *Jpn. J. Parasitol.*, 26, 222-229.
- 10) Terasaki, K. (1980): Comparative studies on the karyotype of *Paragonimus westermani* (S. Str) and *P. pulmonalis*. *Jpn. J. Parasitol.*, 29, 239-243.

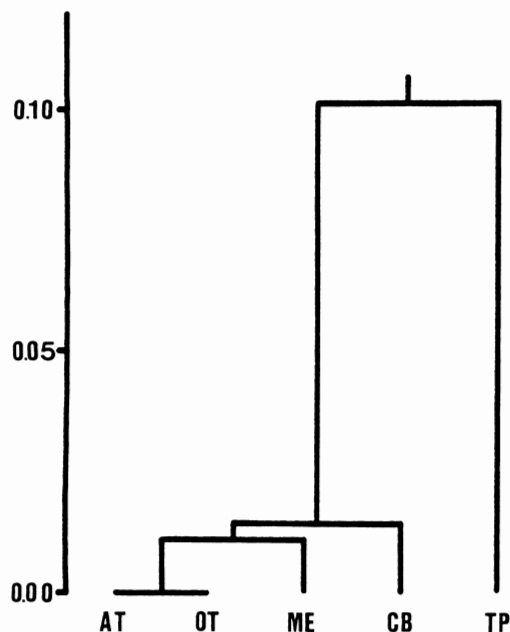


Fig. 6 Dendrogram drawn from Nei's genetic distances (D) (Table 6) among 5 populations of *Paragonimus westermani* using unweighted pair group method.

先種を探り出すことであった。まず、今回調査した GOT, HK, PGM の 3 酵素遺伝子座における対立遺伝子について台湾産と日本産の集団を比較してみると、GOT では、日本産 2 倍体ではどの集団にも変異がみられないのに対し、台湾産は多型的で、日本産では 3 倍体のみ存在する *Got-b* 遺伝子が 22% 以上も存在していることがわかった。また、PGM 遺伝子座についても結果に示したように、台湾産では、5 つの対立遺伝子が見出され高度に多型的であったが、このうち、日本産 3 倍体特有遺伝子 *Pgm-b* は約 16% であった。一方、HK 遺伝子座にも変異がみられたが、その遺伝子は求めている *Hk-b* 遺伝子ではなく、別の対立遺伝子 *Hk-c* であった。これらの結果から、台湾産のウェステルマン肺吸虫が日本産 3 倍体の祖先種と極めて近い関係にあることが示唆されたが、*TO-II* 遺伝子座が全く別の遺伝子で置換されていることや、HK 遺伝子座には 3 倍体と共通の遺伝子がないことから 3 倍体の直接の祖先種であることは否定された。今後更に調査地域を広げ、例えば 3 倍体の地理的分布から類推される韓国や中国大陸において、ウェステルマン肺吸虫 3 倍体の起源となった未知の種を検索していきたい。

Abstract

Population genetic studies on isozymes of *Paragonimus westermani*
from Taiwan and Japan.
– With special reference to the origin of the triploid *P. westermani* –

TAKESHI AGATSUMA¹⁾, SHIGEHISA HABE²⁾ AND MUNEO YOKOGAWA³⁾

¹⁾ Department of Parasitology, Kochi Medical School, Nankoku 781-51; ²⁾ Department of Parasitology, School of Medicine, Fukuoka University, Fukuoka 814-01; ³⁾ Department of Parasitology, School of Medicine, Chiba University, Chiba 280

Isozyme studies were performed on diploid populations of *Paragonimus westermani* from Taiwan and Japan, including the triploid from Japan from a viewpoint of population genetics. Out of 14 enzymes examined, three enzymes, GOT, HK, and PGM, showed polymorphism in a Taiwan population. In comparison with the Taiwan population, two Japanese populations, Akita and Chiba, showed an extremely low level of average heterogeneity (\bar{H}), being 0.000 and 0.031, respectively. No deviation between observed and expected genotype frequencies based on Hardy-Weinberg equilibrium law were found at the above three loci. The Nei's genetic distance (\bar{D}) between Taiwan and Japanese populations was 0.1134 on the average. When the Japanese triploid type was compared with the Taiwan population, it was found that both loci of *GOT* and *PGM* shared common alleles which have never been found in the diploid type of Japan. It was, thus, suggested that the Taiwan strain is closely related to the unknown species which might have been an ancestral species of the Japanese triploid.