

角膜炎に関連した *Acanthamoeba* 分離株の ミトコンドリア DNA 制限酵素切断型による分類

八木田健司

(掲載決定:平成5年11月17日)

要 約

角膜, コンタクトレンズ保存容器および土壌などより分離した28株のアカントアメーバについて制限酵素を用いたミトコンドリア DNA (mtDNA) の切断型による分類を行ない, 分離株間の遺伝的關係, ならびに形態分類との關係を検討した。環状 DNA の抽出に利用されるアルカリ抽出法によりアメーバからは40-52 Kbp の DNA が抽出された。これらはマウスのチトクローム b 遺伝子の一部をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションで陽性反応を示したことから mtDNA と同定された。調べた分離株のうちの70%は40-43 Kbp の mtDNA を有していた。角膜分離の7株 (100%) およびレンズ保存容器分離の6株 (87.5%) はこの大きさの DNA を有していた。これに対し52 Kbp の mtDNA をもつアメーバは土壌からのみ検出された。つぎに mtDNA を6種類の制限酵素を用いて消化し, アガロース電気泳動によりそれらの切断パターン (切断型) を調べた。相同性の比較から28の分離株は複数の分離株を含む5種類の RFLP フェノタイプと, 単一の分離株からなる10種類の RFLP フェノタイプに分けられた。そのうち特に *Acanthamoeba castellanii* の Ma 株に代表される RFLP フェノタイプのアメーバが最も高率に (28.5%) 検出された。制限酵素切断型の相同性から算出された塩基置換率の値は S 7 と S 13 に代表される RFLP フェノタイプ (3.2%) および Castellani と Ma に代表される RFLP フェノタイプ (4.9%) のアメーバが極めて近縁な關係にあることを示した。

一方, 本研究により同一形態種間の遺伝的距離が異種間でのそれと同等か, それよりも大きな値を示すなど, 従来の形態種を遺伝的に単一, あるいはごく近縁な集団とみなすことができなかった。これにより分類上の検索項目として用いられてきた形態的特徴が遺伝的な根拠を欠いていることを示すものと解釈された。本論文ではアカントアメーバにおける分類の新たなとりくみとして, mtDNA の制限酵素切断型を用いた分類法の利点および有用性について論じた。

Key words: *Acanthamoeba*, amoebic keratitis, mitochondrial DNA, restriction fragment length polymorphism (RFLP), RFLP phenotype

緒 言

アカントアメーバ性角膜炎は潰瘍を伴った難治性の眼感染症で, 当初, 米国 (Jones, 1973) と英国 (Nagington *et al.*, 1974) においてほぼ同時に報告された。本症は1984年を境として欧米を中心に多数の患者が報告されることとなっているが, 患者の大半がコンタクトレンズ装用者であることが際だった特徴である (Stehr-Green *et al.*, 1987; Stehr-Green *et al.*, 1989;

Donzis *et al.*, 1989)。欧米諸国に例をひくまでもなく, わが国においてもコンタクトレンズの普及には著しいものがあり, その利用者は人口のおよそ8%に及んでいる。このような背景から1987年に著者ら (石橋ら, 1988) によって本症の第1例が発見されて以来, 僅かな期間に30名以上の患者が見つかっている (太刀川ら, 1993)。

本症に関しては特に治療法の開発が急がれるところであるが (Moore *et al.*, 1985; Jones, 1986; Binder, 1989), その一方で本アメーバの病原性の解明, あるいは予防医学的な側面から病原種の特定が当面の重要課題となっている。これまでに患者角膜からは

Acanthamoeba castellanii をはじめとして数種のアカントアメーバが報告されている (CDC 報告, 1986)。しかしながら, その種の異同や独立性に関しては異論もあり, 必ずしも広く認められているところとはなっていない。近年では形態分類に用いられてきた検索点が果して種を特徴付けるのに足る性質なのか疑問視されるに及び (De Jonckheere, 1983; 遠藤ら, 1991), その根幹である分類方法を含めて再検討を迫られる状況となっている。これを受けて一部ではアイソザイム (De Jonckheere, 1983), あるいは DNA の塩基配列に見られる多型性を分類に利用する試みがなされている (Bogler *et al.*, 1983; Byers *et al.*, 1983; Costas *et al.*, 1983; Kilvington *et al.*, 1991a, 1991b; McLaughlin *et al.*, 1988; Yagita and Endo, 1990)。ミトコンドリア DNA (mtDNA) はそれ自体が独立した分子で高度に遺伝的変異を蓄積していること, また多くは環状 DNA であるため取扱いやすいことから様々な生物種の分類に利用されている。制限酵素切断型による分類は mtDNA のもつ制限酵素切断断片長の多型性 (restriction fragment length polymorphism: RFLP) を利用したもので, 各種の酵素における切断パターンの組み合わせ, いわゆる Digestion Phenotype (以下 RFLP フェノタイプとする。Avise *et al.*, 1979) により個体の遺伝的特徴を表現する方法で, 遺伝的に近縁な生物種の異同を識別するのに有効とされている。原虫類においてはミトコンドリア DNA のコピー数また構造の点で単離および精製が難しい場合があるが (Goddard and cummings, 1975; Borst and Hoesjmakers, 1979), アカントアメーバにおいては回収, 実験操作の面でこのような制約がなく, 容易に mtDNA を利用できることが大きな利点となっている。本研究では mtDNA の多型性の解析を通して, わが国において分離された28株のアカントアメーバの遺伝的近縁関係を検討し, 本法が実際分類, あるいは疫学調査に有用な手段となり得るものか考察した。

材料および方法

1. アカントアメーバ分離株

1987年から1991年までの間に当研究室において分離, または同定を依頼されその後継代保存している28の分離株を研究に供した。その内訳は角膜など臨床材料から分離した7株, コンタクトレンズ保存容器内の保存液から分離した7株, および土壌などより分離した14株である (Table 1)。

2. アメーバの分離および培養

検査材料からのアメーバ分離には細菌を塗布した寒天

Table 1 *Acanthamoeba* isolates

Isolate	Source	Isolate	Source
JAC/E1	Cornea	JAC/S1	Soil
JAC/E2	Cornea	JAC/S2	Soil
JAC/E3	Cornea	JAC/S3	Soil
JAC/E4	Cornea	JAC/S4	Soil
JAC/E5	Cornea	JAC/S6	Soil
JAC/E6	Aqueous humor	JAC/S7	Soil
JAC/E7	Cornea	JAC/S8	Soil
		JAC/S9	Soil
JAC/L1	CLC*	JAC/S11	Soil
JAC/L2	CLC	JAC/S12	Soil
JAC/L3	CLC	JAC/S13	Soil
JAC/L4	CLC	JAC/S14	Soil
JAC/L5	CLC	JAC/S15	Soil
JAC/L6	CLC	JAC/W1	Hot spring
JAC/L7	CLC		

*Contact lens container.

培地を用いた。寒天 (Bactoagar, Difco) を濃度1.5%となるように蒸留水に煮沸溶解し, 直径90mmのプラスチックシャーレを用いて厚さ3~4mmの無栄養寒天培地を作製した。大腸菌 (K12-DH1) は細菌培養用培地 (Antibiotic medium 3, Difco) で2~3日培養し, 100倍希釈時の吸光度 ($\lambda=560\text{nm}$) が約1.0になるように蒸留水に懸濁し, 60°Cで1時間加熱処理をほどこした。ちなみに, このK12-DH1株はプラスミドDNAをもたないので mtDNA の抽出時における細菌由来のプラスミドDNAの混入を考慮する必要はない。この大腸菌懸濁液を適宜希釈 (およそ50~100倍) して上述の無栄養寒天培地にうすく塗布したのち被検材料を接種した。その際, コンタクトレンズ保存容器内の保存液や患部洗浄液は遠心し, 0.5mlほどに濃縮したものを滴下した。また土壌は小指先大の量をそのまま培地上にのせた。培養温度は25~30°Cとした。増殖したアメーバはその十子をマイクロキャピラリー法で1個体ずつ分離培養し, 得られた分離株 (クローン) を便宜的に従来の形態分類に従って同定した。次いで各分離株は十子の状態で0.1Nの塩酸で12時間, 25°Cで無菌化し, その後プロテオースペプトン; 10g/1, イースト抽出粉末; 10g/1, グルコース; 10g/1, NaCl; 5g/1, L-システイン塩酸塩; 0.95g/1, リン酸第1カリウム; 0.68g/1, リン酸第2カリウム; 0.87g/1を含む液体培地 (PYGC 培地) に順化させた。

3. ミトコンドリア DNA の調整

10mlのPYGCの培地を入れた75cm²底面の培養用フ

ラスコにアメーバを接種し、25°Cで3-4日間静置培養を行なった。DNA抽出用の材料としては対数増殖期の栄養型虫体を用いた。mtDNAはアルカリ抽出法(Yagita and Endo, 1990)により抽出した。本法は1.5 ml微量遠心チューブですべての操作ができる簡便な抽出法で、以下にその手順を示した。培養で得た栄養体(5×10⁶程度)をPBSで洗浄しPYGC培地を除いてから100 μlのTEG溶液(50mMトリス塩酸緩衝液/pH8.0, 50 mM グルコース, 10mM EDTA ナトリウム塩)に再浮遊した。これに細胞溶解液として200 μlの水冷した0.15Mの水酸化ナトリウムを含む1% SDS溶液を加え、5-6回チューブを転倒混和した。直ちに氷上に5分間静置し、その後150 μlの水冷した中和用の3 M酢酸カリウム溶液(pH5.6)を加えた。穏やかにチューブを転倒混和し、30分間以上氷上に静置した。その後4°Cで12,000 g, 15分間の遠心操作により上清を得た。上清を新しいチューブに移し、これに等量のフェノール/クロロフォルム(1:1)溶液を加え強く攪拌、直ちに12,000 gで15分間の遠心を行なった。再び上部の水層を新しいチューブに移し、1/10容の3 M酢酸ナトリウム溶液と2.5容の冷エタノールを加え充分混和し、-8°Cで30分間、静置した。その後4°Cで20分間、12,000 gで遠心を行ない沈澱を回収した。500 μlの70%エタノールで洗浄した沈澱は真空乾燥した後、50 μlのTE溶液(10mM トリス塩酸緩衝液/pH8.0, 1 mM EDTA ナトリウム塩)に溶解した。調整したDNA溶液は使用するまで-20°Cで保存した。

4. 制限酵素消化と電気泳動

RNA消化酵素(終濃度10ng/ml)処理により抽出DNAに混在するRNAを消化除去し、0.5%アガロースゲルによる電気泳動でDNAの純度を確認した。その際、抽出DNAの大きさを測定するために10-60 Kbpの既知の大きさをもつサイズマーカーを同時に泳動した。これらのサイズマーカーにはpJK, pBRをベクターとする大腸菌のゲノムの一部をインサートとして含む細菌由来のプラスミドDNA(Watanabe *et al.*, 1990)を用いた。次いで抽出したDNAをBgl II, EcoR I, Hind III, Sca I, Hpa IおよびXba I等の制限酵素により37°Cで12時間消化した。0.7%のアガロースゲル(13cm×13cm)で50 V, 5-6時間電気泳動し、DNA断片の分離を行なった。その際DNA断片のサイズマーカーとしてλ DNA/Sal I消化物(15-32 kbp), λ DNA/Hind III消化物(2-24 kbp)およびφ X174 DNA/Hae III消化物(0.6-1.3 Kbp)を用いた。なお、いずれの電気泳動もTBE溶液(0.089 M トリス・ホウ酸緩衝液, 2 mM EDTA ナトリウム)中

で行なった。電気泳動後、ゲルをエチジウムブロマイドで染色、紫外線により制限酵素切断パターンを観察し、ポラロイドフィルムに記録した。

5. チトクローム b 遺伝子プローブの作製

常法によりマウス肝臓から抽出した全DNAを鋳型として、Polymerase Chain Reaction (PCR)法を用いてmtDNAの特異部分の合成を行なった。目的のDNAとしてはチトクローム b 遺伝子を選んだ。本反応にはマウスチトクローム b 遺伝子の塩基配列(Marten and Clayton, 1979)を参考に、5'-TGAATTCCC AACATCTCAGCATGATGAAA (sense)と5'-TGAATTCTCAGAATGATATTTGTCCTCA (reverse)のプライマーを作製し、これによりチトクローム b 遺伝子内の349bpを増幅した。PCRの反応条件としては94°Cで1分間の変性、58°Cで1分間のアニーリング、72°Cで2分間の合成を1サイクルとして、これを30サイクル繰り返すこととした。なお本反応における温度コントロールにはFA100型温度調節装置(MJリサーチ社)を使用した。得られたPCR産物をアガロースゲルで電気泳動後、目的のフラグメントを含むゲルを回収し、ゲル中のDNAをガラスパウダーで精製した(Gene Clean II: BIO-101社製)。得られた約1 μgの精製DNAをジゴキシゲニンで標識し(DNA Labeling and Detection Kit-Nonradioactive: ベーリンガー・マンハイム社製)、DNAプローブとした。

6. DNAハイブリダイゼーションと免疫学的検出

アルカリ抽出法で得たDNAをアガロース電気泳動後、ゲルごと0.25 N塩酸に20分間、続いて0.5 M水酸化ナトリウムと1.5 M塩化ナトリウムの混合液に40分間、最後に0.5 Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)と1.5 M塩化ナトリウムの混合液に40分間、軽く振とうしながら浸した。ゲル内で変性させたDNAはサザンブロッティング法により10倍濃度のSSC溶液(1.5 M塩化ナトリウムと0.15 Mクエン酸ナトリウム/pH7.0)を用いてニトロセルロース膜に16時間転写し、さらに紫外線処理により膜上に固定した。その後68°Cで16時間、マウス由来のチトクローム b 遺伝子プローブを含むハイブリダイゼーション溶液で反応を行なった。なおハイブリダイゼーション液は市販(DNA Labeling and Detection Kit-Nonradioactive: ベーリンガー・マンハイム社製)のものを用いた。ハイブリダイゼーション後、ニトロセルロース膜を0.1% SDSを含む2倍濃度のSSC溶液中に移し、室温において10分間の洗浄、さらに0.1% SDSを含む1/10の濃度のSSC溶液で20分間の洗浄を行った。その後常法に従い酵素抗体法により目的のDNAを検

出した。

結 果

1. アカントアメーバ分離株

本研究に供したアカントアメーバ分離株を Table 1 にまとめた。臨床材料より分離した 7 株 (JAC/E 1 - E 7) のうち JAC/E 1 - E 5 および JAC/E 7 は患者角膜由来で、患者はいずれもソフトコンタクトレンズ装用者であった。JAC/E 6 はアメーバ性角膜炎の強く疑われた患者の前房水 (Aqueous humor) より分離したもので、患者にコンタクトレンズ装用の前歴はなかった。レンズ保存容器より分離した 7 株 (JAC/L 1 - L 7) のうち JAC/L 1 および JAC/L 3 は、それぞれ JAC/E 1 および JAC/E 2 を分離した患者の

レンズ保存容器より分離したものであった。同様に、JAC/L 2, JAC/L 4 および JAC/L 5 は実際に角膜炎患者の使用していたレンズ保存容器より分離したものであった。JAC/L 6 および JAC/L 7 は健常者のレンズ保存容器より分離したものであった。土壌からは 13 株 (JAC/S 1 - S 15) を分離した。一部、同一地点から複数の分離株を採取しているがそれらはいずれも形態が著しく異なっていた。JAC/S 1, JAC/S 3 および JAC/S 15 は東北地方の山間部の一地点より分離したもので、また JAC/S 2 および JAC/S 11 - S 14 は同一地域の別の地点から分離したものであった。JAC/S 4 は東京都、JAC/S 6, JAC/S 7 および JAC/S 8 は神奈川県の前土壌より分離した。そのうち JAC/S 7 と JAC/S 8 は同一地点からのものであった。

Table 2 RFLP phenotypes, mtDNA genome sizes based on RFLPs and morphological species

RFLP phenotype	Genome* size (Kbp)	Isolates with this phenotype	Remarks
M a	42	JAC/E6	<i>A.castellanii</i> [†]
		JAC/E7	<i>A.castellanii</i>
		JAC/L1	<i>A.polyphaga</i>
		JAC/L2	<i>A.polyphaga</i>
		JAC/L7	<i>A.castellanii</i>
		JAC/S1	- [‡]
		JAC/S2	-
		JAC/W1	-
Castellani	43	JAC/E1	<i>A.castellanii</i>
		JAC/L4	<i>A.castellanii</i>
E2	42	JAC/E2	<i>A.castellanii</i>
		JAC/E3	<i>A.castellanii</i>
		JAC/L3	<i>A.castellanii</i>
S3	52	JAC/S3	-
		JAC/S12	-
		JAC/S15	-
S13	52	JAC/S13	-
		JAC/S14	-
E4	41	JAC/E4	<i>A.castellanii</i>
E5	43	JAC/E5	<i>A.castellanii</i>
L5	46	JAC/L5	<i>A.castellanii</i>
L6	40	JAC/L6	<i>A.polyphaga</i>
S4	42	JAC/S4	-
S6	42	JAC/S6	-
S7	52	JAC/S7	-
S8	47	JAC/S8	-
S9	46	JAC/S9	-
S11	43	JAC/S11	-

*Genome size based on restriction endonuclease fragment sizes corresponded well to that of whole mtDNA molecule.

[†]Morphologically identified.

[‡]Identification was not done.

S9は三重県の土壌より分離した。また JAC/W1は群馬県の温泉の浴槽より分離した。ちなみに、臨床材料およびレンズ保存容器より得た株については、従来の分類基準 (Page, 1967 ; Pussard and Pons, 1977) に従い便宜的に種の同定を行なった (Table 2)。なお実験に供した28株はいずれも Pussard and Pons (1977) のいう第2グループに属するものと考えられた。

2. 分離株からの環状 DNA 抽出

環状 DNA の抽出には大型の培養用フラスコで3-4日間静置培養した栄養型虫体を用いたが、対数増殖期を過ぎたアメーバでは環状 DNA の回収率が低下するため $5 \times 10^6 - 10^7 / 75 \text{cm}^2$ の密度に増殖するように培養条件を調整した。また DNA の精製度の面からはエッペンドルフチューブあたり 5×10^5 個の虫体が良好な結果を得る際の上限と思われた。虫体数が 10^7 個を越えると RNA やタンパク質などの夾雑物が増加し、その後の制限酵素処理等に悪影響を及ぼした。なおエチジウムブロマイド染色でバンドとして確認することのできる DNA の最少量は約10ng と算定され、それにはおよそ 10^5 個の栄養体が必要であった。

抽出した環状 DNA は0.5%アガロースゲル中で電気泳動し、サイズマーカーである細菌由来のプラスミド DNA の移動度から大きさを測定した。その結果、40-52 kbp のものが得られ、そのうちの約70% (19/28) は40-43 Kbp の範囲に収まるもので、特に角膜分離の7株 (100%)、およびレンズ保存容器分離の6株 (87.5%) はこの大きさのものを有していた。同様に、土壌分離株の半数からもこの大きさのものが回収された。他の土壌分離株からは50 Kbp を越える大型の DNA が得られた (Fig. 1)。

3. チトクローム b 遺伝子プローブによるミトコンドリア DNA の同定

得られた環状 DNA が mtDNA であることの確認はチトクローム b 遺伝子をその分子内に検出することにより行なった。Fig. 2 にマウスのチトクローム b 遺伝子をプローブとしてハイブリダイゼーションを行なった結果を示した。アメーバ由来の環状 DNA はプローブとの間に特異反応が認められ (Fig. 2, 矢尻), mtDNA であることが確認された。またしばしばゲルのウェル内に DNA が一部泳動されずに残ることがあったが (Fig. 2, 矢印), この部分でも陽性反応が認められた。これは本来閉環型 (closed circular) の mtDNA が抽出の過程でその一部が開環型 (open circular) に変性したためと考えられた。

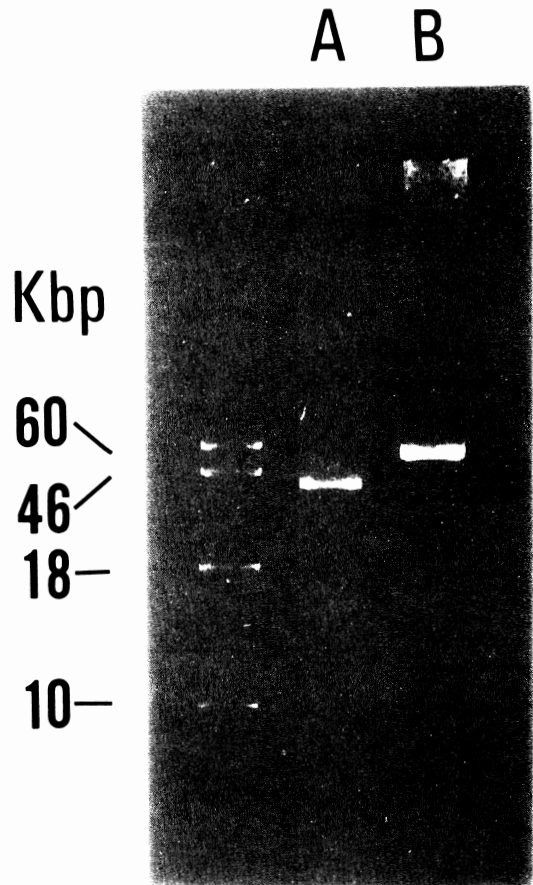


Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of circular DNA from *Acanthamoeba* isolates. The DNAs were extracted from JAC/E1 (A) and JAC/S3 (B) by a modified alkaline lysis method, and were electrophoresed on 0.5% agarose gel in TBE buffer for 30 min, showing 2 bands of 43 and 52Kbp in size, respectively. Bacterial plasmids were used as size markers (left lane).

4. ミトコンドリア DNA の制限酵素切断型の相同性による分類

個々の分離株より得られた mtDNA を6種類の6塩基認識制限酵素 (Bgl II, EcoR I, Hind III, Sca I, Hpa I および Xba I) で消化し、得られた断片を電気泳動することによりそれらの泳動パターン (切断型) の比較を行なった。6塩基認識制限酵素を用いた場合、DNA は約4 Kbp につき1箇所切断される。従って40-52 Kbp の mtDNA では10本前後の断片が生じることが予測される。Table 3 に Bgl II 消化による28分離株

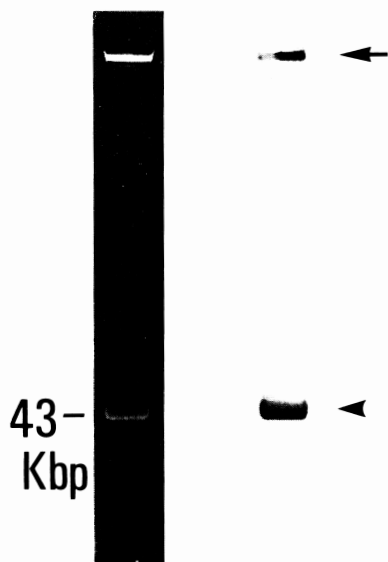


Fig. 2 Southern blot of 43Kbp DNA from JAC/E1 hybridized with mouse cytochrome b gene. The hybridized band was detected by immunological means. Positive reactions were detected at the sites where circular DNA migrated (arrow head), as well as at the starting point (arrow).

の mtDNA 切断型を調べた結果を示した。各分離株の mtDNA は約20Kbp から0.8Kbp の大きさの範囲で3-12本の断片に切断され、切断型の比較からはいくつかの分離株が相同の mtDNA を有していることが明らかとなった。6種類の制限酵素による切断型の相同性から分離株は Table 2 に示す15のグループに分けられた。それぞれのグループ名とそのグループの示す制限酵素切断型の組み合わせ、すなわち Digestion Phenotype (RFLP フェノタイプ) 名は基本的に分離株の名前で代表させたが、文献的な検索によりすでに報告されている Ma と Castellani (Bogler *et al.*, 1983) については混乱を避けるためにそれに従った。このうち Ma グループにおいては JAC/E 6 が Hind III と Scal の切断型がグループ内の他のアメーバとごくわずかな違いを見せた(後述)。

興味あることに分離株のうち Ma フェノタイプを示すものが最も多く、角膜、レンズ保存容器、野外環境のいずれからも検出され、全体の約29% (8/28) を占めた。E 2 フェノタイプの JAC/E 2 と JAC/L 3 は角膜炎患者とその使用していたレンズ保存容器から分離した株で、レンズを汚染したアメーバがレンズを介して角膜に感染したことを証明する結果となった。これに対し

て別の患者より分離した JAC/E 1 とその患者の使用していたレンズの保存容器から分離した JAC/L 1 はそれぞれ Castellani フェノタイプと Ma フェノタイプを示し、両者は異なるという結果を得た。ちなみに、各 RFLP フェノタイプのアメーバがもつ mtDNA の大きさを見ると、15の RFLP フェノタイプのうち60% (9/15) が40-43Kbp の mtDNA を有していた。一方、52Kbp の mtDNA をもつものは全体の20% (3/15) を占めており、その存在は必ずしも例外的ではないものと思われた。

5. ミトコンドリア DNA の RFLP フェノタイプ間での遺伝的近縁関係

さらに得られた15の RFLP フェノタイプの近縁関係を知る目的で Nei and Li (1979) の方法に従って塩基置換率を算定した (Yagita and Endo, 1990)。置換率は6種類の酵素によって得られた mtDNA の切断パターンから相同なバンドの対の数と非同質なバンドの総数の比率より計算した (Table 3)。最も相同性の高かった S 7 と S 13 フェノタイプのアメーバについて見た場合、両者の合計バンド数130本中74本 (37対) が相同で、その時の塩基置換率は3.2%と計算された。Castellani と Ma フェノタイプのアメーバ間でもほぼ同様の低い塩基置換率が示された。逆に最も高い塩基置換率は E 2 と S 3 フェノタイプのアメーバ間の21.2%であった。なお Ma グループにおいて JAC/E 6 がグループ内の他のアメーバと Hind III と Sca I の切断型においてそれぞれ1本ずつバンドが異なっていたが、その塩基置換率はわずか0.3%であったことからこれらは同一の RFLP フェノタイプとして扱えるものと判断した。Fig. 4 には Table 3 の塩基置換率から作成した RFLP フェノタイプの近縁関係を系統樹として表わした。

6. 形態とミトコンドリア DNA の RFLP フェノタイプとの関係

従来形態分類を踏襲して種名を決定した臨床分離株およびレンズ保存容器分離株 (Table 1) について、形態と mtDNA の RFLP フェノタイプとの関係を調べた。形態的に *A. castellanii* の特徴を示す10株は6種類 (Castellani, E 2, E 4, E 5, Ma および L 5) の RFLP フェノタイプに分けられ (Table 2), フェノタイプ相互の塩基置換率は4.9% (Castellani と Ma フェノタイプの間) と比較的近縁な関係にあるものから、15.2% (E 2 と L 5 フェノタイプの間) と離れたものまで多岐にわたった。JAC/E 2 と JAC/L 5 の間に見られたこの置換率は、これらと *A. polyphaga* の特徴を示す JAC/L 6 の間の置換率よりむしろ大きかった。

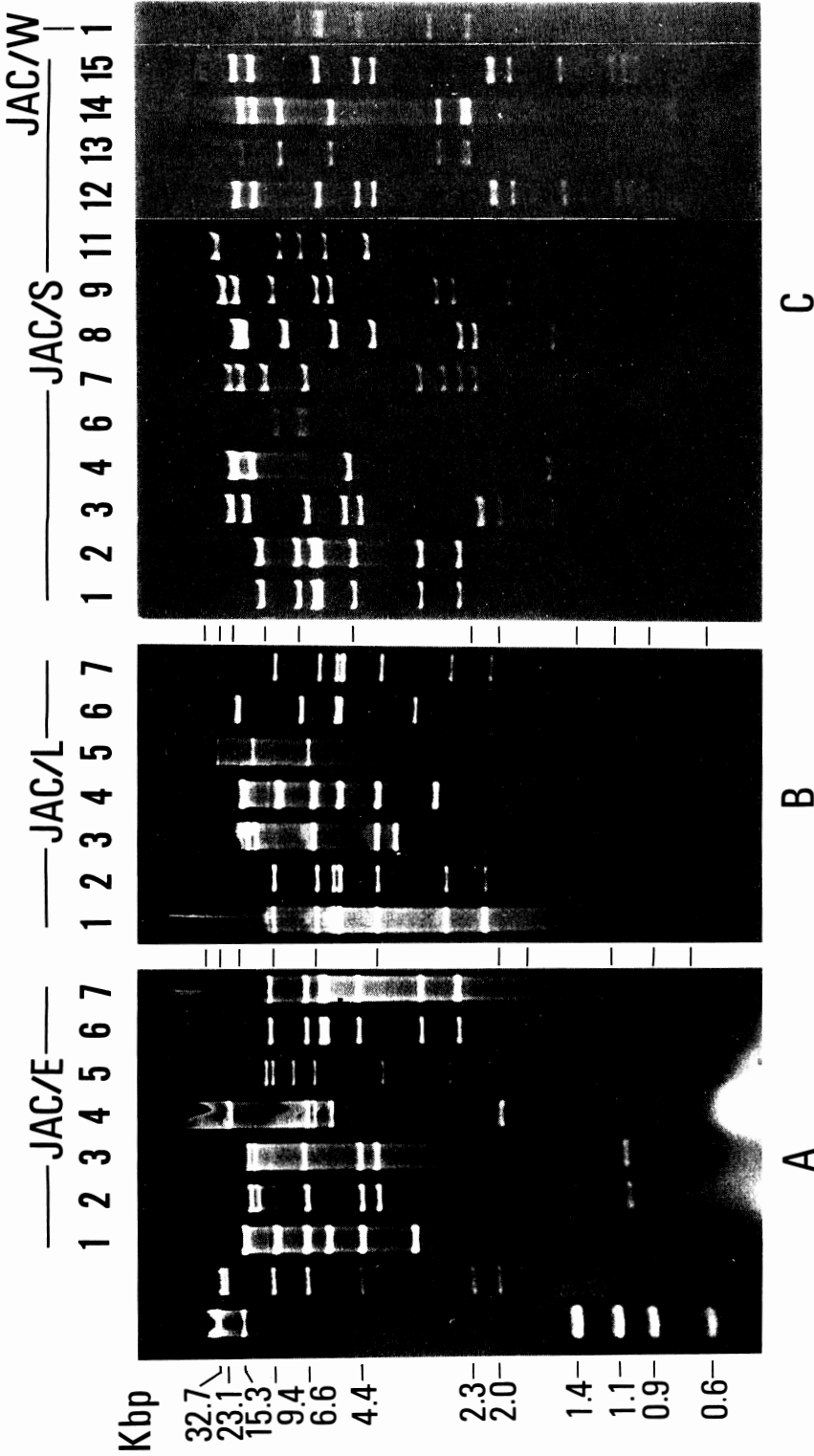


Fig. 3 Comparison of agarose gel electrophoretic patterns of mtDNA for BglII digests. Mitochondrial DNA digests of JAC/E1-E7 (A), JAC/L1-L7 (B) and JAC/S1-S15 or JAC/W1 (C) were loaded on 0.7% agarose gel and run for 6 hours at a constant voltage of 3.8 V/cm. Patterns for JAC/E1, JAC/E2, JAC/E6, JAC/S3 and JAC/S13 are shared by other strains classified in the same digestion phenotype (table 2). Size markers are mixtures of λ DNA/Sal I digests of 32.7 and 15.3 Kbp. ϕ X174DNA/HaeIII digests of 1.4, 1.1, 0.9 and 0.6 Kbp (left lane), and λ DNA/HindIII digests of 23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.3 and 2.0 Kbp (2nd lane from the left).

Table 3 Estimates of genetic divergence in pairwise comparison of RFLP phenotypes

	Cast	E2	E4	E5	Ma	L5	L6	S3	S4	S6	S7	S8	S9	S11	S13
Cast	-	7.0	10.4	11.1	4.9	11.0	12.0	11.0	9.5	13.2	14.3	10.7	10.9	9.7	10.1
E2		-	10.4	9.9	8.3	15.2	13.1	21.2	11.5	11.0	11.7	15.2	10.2	13.0	8.7
E4			-	9.3	8.2	15.0	14.2	10.4	13.3	11.6	12.4	8.6	12.2	11.1	9.6
E5				-	14.1	11.3	12.1	14.3	10.1	10.4	11.1	7.4	9.6	10.4	10.1
Ma					-	9.9	12.5	11.4	11.2	12.8	10.8	14.4	11.2	9.3	10.0
L5						-	13.3	9.1	11.0	11.2	10.6	13.2	11.6	11.4	13.2
L6							-	16.6	11.7	14.8	12.7	15.9	14.6	9.7	11.6
S3								-	11.4	14.7	10.4	13.5	14.5	8.6	13.5
S4									-	10.7	10.7	10.4	13.7	19.5	8.8
S6										-	11.0	12.7	13.6	11.0	11.3
S7											-	11.3	14.6	10.4	3.2
S8												-	13.3	11.5	11.0
S9													-	12.3	14.2
S11														-	16.1
S13															-

The degree of sequence differences of mtDNA between the two isolates of *Acanthamoeba* was established from comparison of the electrophoretic patterns of mtDNA that were digested with restriction enzymes according to the method of Nei and Li (1979).

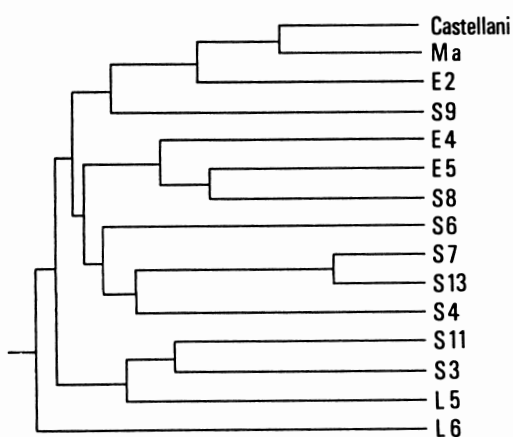


Fig. 4 Phenogram showing relationships between mitochondrial DNA RFLPs of *Acanthamoeba* isolates.

一方、JAC/L1およびJAC/L2の2株は形態的には *A. polyphaga* の特徴を示したにもかかわらず、そのRFLPフェノタイプはMaフェノタイプであった。

考 察

従来、アカントアメーバ属のmtDNAはおおよそ42Kbpの大きさをもつものと報告されていた (Bogler *et al.*, 1983; Yagita and Endo, 1990)。今回調べた28分離株のうち、その約70% (19/28) はこの大きさの

mtDNAを有していたが、同時に46~52Kbpの大型のmtDNAを有するアメーバの存在も明らかとなった。一般に、哺乳動物を含めた後生動物についてみた場合、mtDNAは概ね16~19Kbpの中に収まるものとされている。これに対し原生動物やカビ類では20~100Kbpと平均して大型のmtDNAが報告されており、サイズが大きくなるに従って種間、あるいは種内のばらつきが大きくなる傾向があるとされている (Mahler, 1983)。アカントアメーバもこの例にもれず、最大で12Kbp近くにもおよぶばらつきが認められた。mtDNAの大きさに変化が生ずる生物学的な意味は不明であるが、大型のmtDNAの分離株は主に土壌から得られたことを考えると、あるいは環境への適応性の違いを反映しているのかも知れない。今後さらに分離株を増して確認する必要があるが、大型のmtDNAを有するアメーバが水系の環境に馴染みにくいなどの原因で角膜炎の病原体としての対象から除外することができれば、疫学的に意味のあるところである。

制限酵素切断型の解析から得たRFLPフェノタイプ間の塩基置換率 (Table 3) からは、CastellaniやMaフェノタイプなど一部のアメーバはごく近縁な関係にあることが判明した。一方、全体的には塩基置換率は高値を示す傾向が認められ、本属のアメーバにはかなりの遺伝的変異が蓄積していることが明かとなった。加えて、異なった分子量のmtDNAをもつアメーバが系統樹に示されたように集団内に比較的まんべんなく分布していることなど (Fig. 4)、アカントアメーバの分化は複

雑な変遷を遂げたものと考えられる。一般に、集団内に保存される DNA の変異量を決める因子として、1) 塩基置換率 (突然変異率), 2) 集団の大きさ, 3) 世代の長さが影響を与え, mtDNA ではさらに 4) 細胞当たりのミトコンドリアのコピー数, 5) 雌雄の比などが重要とされている。アメーバは無性生殖で極めて活発に増殖する。従って、これらの因子のうち 2) や 5) は特有な形で変異量に影響するものと考えられ、他の因子による影響が一般の生物とそれほどかけ離れていないものと仮定しても本属のアメーバにおいては大きな変異量が期待される。すなわち、無性生殖を営むアメーバにおいては個体に遺伝的に現れた変異が生命の維持に影響しないものであれば次世代へ制約なしに継承され、従って多源的な分化がほぼ無制限に進行する可能性を持つものと考えられるからである。現に本属のアメーバにおいて多数の RFLP フェノタイプが得られているという事実は、これを表現しているものかも知れない。

一方で疫学的な知見として Castellani あるいは Ma フェノタイプなど北米で見つかった RFLP フェノタイプのアメーバが、わが国にも広く分布しているという事実が明らかにされた。上述の無制限に多源的に分化して行くとする考えと一見矛盾するかに思われるが、これはアカントアメーバの十子が物理・化学的環境に耐性を示すことを考慮すれば、塵埃等と同様に遠距離を運ばれて広く分散したものと解釈できる。むしろこのような特性からアカントアメーバは地理的隔離を受けることなく地球規模で拡散してのものと推測される。

Pussard and Pons (1977) はアカントアメーバを形態学におよそ 20 種類に分類することを提唱している。これに従えば、現在までに *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. rhyodes*, *A. hatchetti* および *A. culbertsoni* の 5 種類が角膜より分離、同定されている (CDC 報告, 1986)。しかしながらアカントアメーバの分類は現在も確定的ではなく、これまで中心的だった形態分類は再検討を迫られている状況にある。その理由として、従来分類上の検索項目として十子の形態が重要視されてきたが、その十子の形態でさえ棲息環境から影響を受けて変異する形質であることが判明したり (遠藤ら, 1991)、あるいはアイソザイムによる同定の試みなどとの結果に著しい隔たりがあることなどから (De Jonckheere, 1983) 形態種の独立性に疑問が持たれるようになっていくことが挙げられる。今回の結果も形態分類と mtDNA による解析結果との間には大きな隔たりが認められた。Fig. 4 の系統図からも明らかのように、従来の形態種である *A. castellanii* と *A. polyphaga* は必ずしも遺伝的に分離した関係にはなく、また Table 2 のごとく、Ma フェノタイプというほぼ均

一な遺伝集団に複数の形態種が含まれ、さらには同一形態種間の遺伝的距離が異種間でのそれよりも大きな値を示すなど (Table 3)、形態種を単一あるいはごく近縁な集団とみなすことができないという結果であった。一方、前述のように本アメーバは無性生殖のみで増殖する生物であるために他の生物種の例を当てはめて種内、あるいは種間の変異の境界を定めることに当面は問題が残るが、mtDNA の RFLP フェノタイプを解析することで個々のアメーバ分離株を近縁な遺伝集団にまとめていく作業は可能であり、本研究により疫学的にも充分意味のあることが示された。今後、本法は新たな分類法の一つとして積極的に活用されるべきと考えられ、さらに発展して病原性などとの関連からも詳細に検討されるべきものと判断される。

謝 辞

本研究を行うにあたり、御指導、御校閲頂きました埼玉医科大学医動物学教室 堀 栄太郎教授、ならびに国立予防衛生研究所寄生虫虫部 小山 力前部長、同寄生動物部 石井 明部長、同寄生動物部 遠藤卓郎室長に深謝致します。

参考文献

- 1) Avise, J. C., Lasman, R. A. and Shade, R. O. (1979): The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial sequence relatedness in natural populations. I. Population structure and evaluation in the genus *Peromyscus*. *Genetics*, 92, 279-295.
- 2) Binder, P. S. (1989): Cryotherapy for medically unresponsive *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea*, 8 (2), 106-114.
- 3) Bogler, S. A., Zarley, C. D., Burianek, L. L., Fuerst, P. A. and Byers, T. J. (1983): Interstrain mitochondrial DNA polymorphism detected in *Acanthamoeba* by restriction endonuclease analysis. *Mol. Biochem. Parasitol*, 8, 145-163
- 4) Borst, P. and Hoeijmakers, J. H. J. (1979): Kinetoplast DNA. *Plasmid*, 2, 20-40.
- 5) Byers, T. J., Bogler, S. A. and Burianek, L. L. (1983): Analysis of Mitochondrial DNA variation as an approach to systematic relationships in the genus *Acanthamoeba*. *J. Protozool.*, 30, 198-203.
- 6) Centers for Disease Control (CDC) (1986): *Acanthamoeba* keratitis associated with contact lenses-United States. *MMWR*, 35, 405-

- 408.
- 7) Costas, M., Edwards, S. W. Lloyd, D., Griffiths, A. J. and Turner, G. (1983): Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA of members of the genus *Acanthamoeba* as an aid of taxonomy. *FEMS, Microbiol.*, 17, 231–234.
 - 8) De Jonckheere, J. F. (1983): Isoenzyme and total protein analysis by agarose isoelectric focusing, and taxonomy of the genus *Acanthamoeba*. *J. Protozool.*, 30 (4), 701–706.
 - 9) Donzis, P. B., Mondino, B. J., Weissman, B. A. and Bruckner, D. A. (1987): Microbial contamination of contact lens care systems. *Am. J. Ophthalmol.*, 104, 325–333.
 - 10) Donzis, P. B., Mondino, B. J., Weissman, B. A. and Bruckner, D. A. (1989): Microbial Analysis of contact lens care systems contaminated with *Acanthamoeba*. *Am. J. Ophthalmol.*, 108, 53–56.
 - 11) 遠藤卓郎・八木田健司 (1991): アカンソアメーバ角膜炎の診断法の開発, 寄生虫疾患の診断法の開発と症例検討, 87頁, 医薬ジャーナル社, 東京
 - 12) Goddard, J. M. and Cummings, D. J. (1975): Structure and replication of mitochondrial DNA from *Paramecium aurelia*. *J. Mol. Biol.*, 97, 593–609.
 - 13) 石橋康久・松本雄二郎・渡辺亮子・本村幸子・安羅岡一男・石井圭一・小山力・遠藤卓郎・八木田健司 (1988): *Acanthamoeba Keratitis* の 1 例, *日眼誌*, 92, 963–972.
 - 14) Jones, D. B. (1973): Paper read at a meeting of the ocular microbiology and immunology group in Dallas, Texas, in October.
 - 15) Jones, D. B. (1986): *Acanthamoeba* - The ultimate opportunist?. *Am. J. Ophthalmol.*, 102, 527–530.
 - 16) Kilvington, S., Larkin, D. F. P., White, D. G. and Beeching, J. R. (1991a): Laboratory investigation of *Acanthamoeba keratitis*. *J. Clin. Microbiol.*, 28, 2722–2725.
 - 17) Kilvington, S., Beeching, J. R. and White, D. G. (1991b): Differentiation of *Acanthamoeba* strains from infected corneas and the environment by using restriction endonuclease digestion of whole-cell DNA. *J. Clin. Microbiol.*, 29, 310–314.
 - 18) Mahler, H. R. (1983): The exon: Intron structure of some mitochondrial genes and its relation to mitochondrial evolution. *International Review of Cytology*, Vol. 82. Bourne, G. H., Danielli, J. F. and Jeon, K. W., ed., Academic Press, London and New York, 1–98.
 - 19) Marten, P. A. and Clayton, D. A. (1979): Mechanism of mitochondrial DNA replication in mouse L-cells: Localization and sequence of the light-strand origin of replication. *J. Mol. Biol.*, 135, 327–351.
 - 20) McLaughlin, G. L., Brandt, F. H. and Visvesvara, G. S. (1988): Restriction fragment length polymorphisms of the DNA selected *Naegleria* and *Acanthamoeba* amoebae. *J. Clin. Microbiol.*, 26, 1655–1658.
 - 21) Moore, M. B., McCulley, J. P., Luckenbach, M., Gelender, H., Newton, C., McDonald, M. B., and Visvesvara, G. S. (1985): *Acanthamoeba keratitis* associated with soft contact lenses. *Am. J. Ophthalmol.*, 100, 396–403.
 - 22) Nei, M. and Li, W. H. (1979): Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 76, 5269–5273.
 - 23) Nagington, J., Watson, P. G., Playfair, T. J., McGill, J., Jones, B. R. and McG. Steer, A. D. (1974): Amoebic infection of the eye. *Lancet*, 28, 1537–1540.
 - 24) Page, F. (1967): Re-definition of genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. *J. Protozool.*, 14, 709–724.
 - 25) Pussard, M. and Pons, R. (1977): Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistol.*, 13, 557–598.
 - 26) Stehr-Green, J. K., Bailey, T. M., Brandt, F. H., Carr, J. H., Bond, W. W. and Visvesvara, G. S. (1987): *Acanthamoeba Keratitis* in soft contact lens wearers. *JAMA*, 258, 57–60.
 - 27) Stehr-Green, J. K., Bailey, T. M. and Visvesvara, G. S. (1989): The epidemiology of *Acanthamoeba keratitis* in the United States. *Am. J. Ophthalmol.*, 107, 331–336.
 - 28) 太刀川貴子・石橋康久・藤沢佐代子・高沢朗子・アウン・キョ・ニュン, 宮沢嘉隆 (1993): 本邦にお

- けるアメーバ性角膜炎の1987年から1993年までの集計, 第47回日本臨床眼科学会講演抄録, pp242
- 29) Yagita, K. and Endo, T. (1990) : Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA of *Acanthamoeba* strains in Japan. *J. Protozool.*, 37, 570–575.
- 30) Watanabe, H., Arakawa, E., Ito, K., Kata, J. and Nakamura, A (1990) : Genetic analysis of invasion region by use of a Tn3 - *Iac* transposon and identification of a second positive regulator gene, *invE*, for cell invasion of *Shigella sonnei* : Significant homology of *invE* with *parB* of plasmid P1. *J. Bacteriol.*, 619–629.

[*Jpn. J. Parasitol.*, Vol. 42, No. 6, 468–478, December, 1993]

Abstract

CHARACTERIZATION OF *ACANTHAMOEBA* ISOLATES FROM
EYE INFECTIONS AND THE ENVIRONMENT BY
RESTRICTION ENDONUCLEASE DIGESTION OF MITOCHONDRIAL DNA

KENJI YAGITA

*Department of Parasitology, National Institute of Health,
Shinjuku-ku, Tokyo 162, Japan*

A total of 28 *Acanthamoeba* isolates from human eye infections, contact lens containers and soil were characterized by restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) of mitochondrial DNA. Circular DNAs ranging from 40 to 52 Kbp were isolated from the amoebae by the alkaline lysis method. The DNAs were confirmed to be mitochondrial by the presence of particular sequence determined by southern hybridization with a synthesized short segment of the mouse cytochrome b gene. Interestingly, most amoebae from the cornea and contact lens containers had approximately 42 to 43 Kbp DNAs. The DNAs were digested with restriction enzymes and analyzed by agarose gel electrophoresis. By comparing the RFLPs, the 28 isolates could be divided into 15 groups, 5 multiple-strain and 10 single-strain groups. The dominant RFLPs group consists of 8 strains and shares a single RFLP phenotype with the Ma strain of *A. castellanii*. Phylogenetic close relationships were demonstrated between RFLP phenotypes with the estimated sequence divergences of 3.2% (between JAC/S7 and JAC/S13), 4.9% (between Castellani and M a). It is noteworthy that the maximum sequence divergence of 15.2% was calculated between morphologically identical strains (between JAC/E2 and JAC/L5). In contrast, the dominant Ma phenotype was a complex of morphologically heterogeneous strains. These results in turn show that morphology alone does not permit a clear demarcation in the identification and classification of closely related amoeba species. We suggest phylogenetic typing by RFLPs in the taxonomy of the genus *Acanthamoeba* will be useful.