

論 文 要 旨

論 文 題 目

Phylogenic Analysis of the Genus *Leishmania* by Cytochrome b Gene Sequencing

(Cytochrome b 遺伝子によるリーシュマニア属の系統樹解析)

氏 名 安里 典



リーシュマニア症はサシチョウバエによって媒介されるキネトプラスト目トリパノソーマ科に属するリーシュマニア原虫によって引き起こされる寄生虫感染症である。

リーシュマニア症は現在、世界88カ国に分布し、約35億人が感染の危機にさらされている。その臨床症状は主に3型に分類され、内臓型、粘膜皮膚型、皮膚型に分けられる。リーシュマニア症の症状の違いは主にリーシュマニア原虫種の相違や宿主の免疫反応に起因すると考えられている。今までリーシュマニア原虫種の分類法としてアイソザイム電気泳動法やモノクローナル抗体を使用した方法など、様々な方法が用いられてきた。最近では分子生物学的な手法も用いられるようになり、より特異的で正確な原虫種の同定が可能になった。

今回、我々はリーシュマニア原虫のシトクロームb遺伝子を解析することにより、新しいリーシュマニア原虫種の系統樹を作成した

。対象と方法は World Health Organization (WHO) リーシユマニア原虫標準株 28 株とエンドトリパナム 2 株を対象として、それぞれの原虫種のシトクローム *b* 遺伝子を 14 対のプライマーにて PCR で増幅した後、シーケンスを行い、その塩基配列を決定した。それらの塩基配列をコンピューターソフト (MEGA v 3.1 と PAUP v 4.0) にて系統樹解析を行い、系統樹を作成した。その結果、1987 年に提案された *L. ainsoni* と *S. haw* による分類と比較すると、いくつかの相違点を認めた。一つ目は *L. Major* は *L. Tropica complex* とは異なる分類であること、二つ目はトカゲに感染する *L. tarantole* が *L. braziliensis* *complex* に近いこと、三つ目は *L. herpetigii* *complex* と *L. equatoriensis* はエンドトリパナム属に近縁であること、四つ目

は *L a i n s o n* と *S h a w* の 分 類 で は *L .*
m e x i c a n a c o m p l e x に 分 類 さ
れ て い る *L . e n r i e t t i* が 系 統 樹 で は
別 の 位 置 に あ る と い う こ と 、 五 つ 目 は *L . t*
u r a n i c a と *L . a r a b i c a* は 人 に
病 原 性 の あ る リ ー シ ュ マ ニ ア 原 虫 種 と は 異 な
っ た 位 置 に あ る と い う こ と が わ か っ た 。 以 上
の 結 果 か ら こ れ ら の シ ト ク ロ ー ム *b* 遺 伝 子 解
析 に よ る 原 虫 種 の 同 定 ・ 分 類 法 は ヒ ト 病 原 性
の 原 虫 種 か ど う か の 判 断 も 可 能 に し 、 ま た 診
断 に も 応 用 で き る と 期 待 さ れ る 。

平成 22 年 11 月 9 日

(別紙様式第 7 号)

論 文 審 査 結 果 の 要 旨

報 告 番 号	課程博 * 第 号 論文博	氏 名	安里 豊
論 文 審 査 委 員	審 査 日	平 成 22 年 11 月 9 日	
	主 査 教 授	藤田 次郎 印	
	副 査 教 授	渡部 久実 印	
	副 査 教 授	山根 誠久 印	
<p>(論 文 題 目)</p> <p>Phylogenic analysis of the genus Leishmania by cytochrome b gene sequencing (シトクローム <i>b</i> 遺伝子によるリーシュマニア属の系統樹解析)</p> <p>(論文審査結果の要旨)</p> <p>上記の論文に関して、研究に至る背景と目的、研究内容、研究成果の意義、学術的水準等につき慎重かつ公正に検討し、以下のような審査結果を得た。</p> <p>1. 研究の背景と目的</p> <p>リーシュマニア症はサシチヨウバエによって媒介されるキネトプラスト目トリパノソーマ科に属するリーシュマニア原虫によって引き起こされる寄生虫感染症である。リーシュマニア症の症状の違いは主にリーシュマニア原虫種の相違や宿主の免疫反応に起因すると考えられている。今までリーシュマニア原虫種の分類法としてアイソザイム電気泳動法やモノクローナル抗体を使用した方法など、様々な方法が用いられてきた。最近では分子生物学的な手法も用いられるようになり、より特異的で正確な原虫種の同定が可能になった。リーシュマニア原虫の cytochrome b (cyt b) 遺伝子を用いて、塩基配列より系統樹を作成し新しい分類を作成している。</p> <p>2. 研究内容</p> <p>方法はリーシュマニア原虫 (解析に用いた原虫種は、培養・継代した WHO 標準株 28 株) とエンドトリパナム 2 株 から DNA を抽出し、cyt b 遺伝子の上流遺伝子 (cytochrome oxidase III) と下流遺伝子(maxicircle unidentified reading frame 4)上に PCR primer を設定し、cyt b 遺伝子を増幅した。増幅された DNA 断片から 10 のプライマーにてダイレクトシーケンスを行った。決定した各々の原虫の cyt b 遺伝子の塩基配列をコンピューターソフト (MEGA v 3. 1 と PAUP v 4. 0) にて系統樹解析を行い、近隣結合法および最尤法により分子系統樹を作成している。</p>			

- 備 考
- 1 用紙の規格は、A 4 とし縦にして左横書きとすること。
 - 2 要旨は800字～1200字以内にまとめること。
 - 3 *印は記入しないこと。

結果は、1987年に提案された Lainson と Shaw による分類と比較すると、いくつかの相違点を認めた。① *L. (L.) major* は *L. (L.) tropica complex* とは異なる分類であること、② *L. (L.) turanica* と *L. (L.) arabica* は人に病原性のあるリーシュマニア原虫種とは異なった位置にあるということ (①と②は *L. (L.) tropica complex* は3つのサブグループから形成するとも考えられる)、③ *L. (L.) hertigi complex* と *L. (L.) equatorensis* はエンドトリパナム属に近縁であること、④ Lainson と Shaw の分類では *L. (L.) mexicana complex* に分類されている *L. (V.) enriettii* が系統樹では別の位置にあるということがわかった。

3. 研究成果の意義と学術的水準

リーシュマニア原虫の *cytb* 遺伝子の塩基配列から新たな分類法が形成できることが明らかになった。本手法も含めた遺伝子検査などによりリーシュマニア原虫の再分類の必要性が提案されてきている。また、この手法は皮膚病変からの原虫の検出・同定に応用され、本邦での臨床診断に貢献しており、治療に役立つことが期待される。よって国際的にも高く評価されるものであると判断される。

以上により、本論文は学位授与に十分に値するものであると判断した。