

2種類のヒト刺咬性ダニ；イエダニ (*Ornithonyssus bacoti* (Hirst)) およびミナミツメダニ (*Chelacaropsis moorei* Baker) を 検出，識別するための DNA マイクロアレイ

加瀬谷泰介, 青木 俊介, 平山 幸一*

DNA Microarray to Detect and Discriminate Two Biting Mites, Rat Mite (*Ornithonyssus bacoti* (Hirst)) and a Cheletid Mite (*Chelacaropsis moorei* Baker)

Taisuke Kasetani, Shunsuke Aoki and Koichi Hirayama*

Our new DNA microarray can detect and discriminate two biting mites, rat mite (*Ornithonyssus bacoti*) and a cheletid mite (*Chelacaropsis moorei*) which bite frequently humans in indoor environment. Both mites live close to humans, rat mite is a parasite of mouse and the cheletid mite is a predator of house dust mites and increases simultaneously with their outbreak.

Probes to detect the mites were selected from specific sequences of their rDNA ITS1 and 2 region, and artificially synthesized as single-strand oligonucleotides, then fixed on Gene-Silicon[®] chip as to be microarray. It also included other former reported probes for two house dust mites (*Dermatophagoides farinae*, *D. pteronyssinus*) and cheese mite (*Tyrophagus putrescentiae*).

All five genome DNAs from these mites were used as templates for fluorescent labeling PCR amplification and the PCR products (amplicons) were applied to the microarray. As a result, the microarray permitted to detect each mite when each amplicon from single genome DNA was applied, and it permitted to detect and discriminate all five mites when the amplicon from mixture of five genome DNAs was applied.

Key words: biting mite, DNA microarray, rDNA ITS, GeneSilicon[®], rapid detection

これまでに室内塵埃から抽出，精製した環境ゲノム DNA¹⁾ を試料として，その中に存在する複数のダニ類と真菌類のみを一括して検出し，同時に識別する DNA マイクロアレイを調製し，報告した^{2, 3, 4)}。ここで対象としたダニは，アレルギー疾患の原因となるコナヒョウヒダニ (*Dermatophagoides farinae* Hughes)，ヤケヒョウヒダニ (*D. pteronyssinus* (Trouessart)) にケナガコナダニ (*Tyrophagus putrescentiae* (Schrank)) を加えた3種であったが，ダニの被害はアレルギー疾患だけではない。

哺乳類や鳥類に寄生するダニはもとより，他のダニを捕食する肉食性のダニが時によってヒトを刺咬して被害をもたらす。前者は伝染病を媒介することもある⁵⁾。マダニ類を初めとする寄生性ダニの中にはヒトから吸血するものも多いが，本来の寄主がネズミ類であるためにヒトと接点が多いイエダニ (*Ornithonyssus bacoti* (Hirst)) の被害は多い⁶⁾。一方，捕食性ダニは餌となる室内塵性ダニなどが大量に発生した場合に同時に増殖し，ヒトと偶発的に接触することで刺咬して被害をもたらす。被害報告の多い代表的な種がミナミツメダニ (*Chelacaropsis moorei* Baker) である⁷⁾。

利便性を向上して用途を拡大するために，アレルギー性ダニに加えて，刺咬性ダニの2種を新たに検出，識別でき

る DNA マイクロアレイを調製したので報告する。

実験方法

1. 材料および装置

1-1 ダニ標品

(財)日本環境衛生センター (神奈川県川崎市川崎区四谷上町 10-6) より，生体のミナミツメダニおよび 100% エタノールに浸漬して殺虫・保存したイエダニ液浸標本を入手した。合わせて，代表的な室内塵性ダニである，コナヒョウヒダニ (日本女子医科大学固定株)，ヤケヒョウヒダニ，ケナガコナダニの生体も入手して，飼育・増殖した。必要量まで増殖した後は，100% エタノールに投入して殺虫し，液浸標本として保存した。

ミナミツメダニの飼育には餌となる別種のダニが必要で，コナヒョウヒダニと混合飼育して増殖を図った。その後，100% エタノールに投入して殺虫してから，実体顕微鏡下でミナミツメダニのみを選別，4℃で冷蔵保存した。長期保存のためには，保存温度を -20℃とした。

* : 東洋鋼鈹(株) 技術研究所

1-2 DNA抽出と精製

DNAの抽出と精製には、自動核酸抽出装置 QuickGene-810 (富士写真フイルム(株))と専用の組織抽出キット (DT-S)を用いた。また、必要に応じてCTAB法も併用した。

1-3 PCR増幅～塩基配列解析

PCR増幅用酵素には TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version (株)タカラバイオ, RR006A) または NovaTaq™ Hot Start DNA Polymerase (No. 241-08890-92)を、Table 1 に示すプライマーと共に用いた。ダニ汎用プライマーセット (Acari-ITS1, Acari-ITS2R)³⁾を主に用い、節足動物汎用の正 (Fw) プライマー (Arthro-ITSF) と昆虫汎用の逆 (Rv) プライマー (Insect-ITSR (私信)) を併用した。また、反応系に PCR増幅反応用試薬 Ampdirect® Plus (島津製作所(株), 241-08800-98) も場合によって使用した。PCR増幅装置は Dice® Gradient (株)タカラバイオ, TP600) を用いた。PCR増幅産物の精製には QIAquick® Gel Extraction Kit (株)キアゲン, Cat No.28704) を用いた。

塩基配列の解析にはキャピラリー型遺伝子解析システム CEQ8000 (ベックマン・コールター(株))を用いた。

1-4 ソフトウェア

解析で得られた波形データからの塩基配列の抽出には、解析装置 CEQ8000 付属の解析ソフトウェア、および BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) を用いた。また、得られた識別対象領域からプライマーとプローブを設計するためには、BioEdit と primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) を用いた。

1-5 DNAマイクロアレイの作成

対象種に特異的な配列を元に合成した一本鎖 DNA を

(北海道システムサイエンス(株) <http://www.hssnet.co.jp/>), ジーンシリコン®チップ (東洋銅板(株) <http://www.toyokohan.co.jp/>) に固定し、DNA マイクロアレイとした。

1-6 DNA マイクロアレイによる検出

個々のダニ由来ゲノム DNA を鋳型として、Cy5-dCTP (GEヘルスケア・ジャパン(株), PA55021) を含む 20 µL の反応系で蛍光標識 PCR 増幅した産物を試料として用いた。GenePix® Personal 4100A と付属のソフトウェア GenePix® Pro 6.1 (モレキュラーデバイス ジャパン(株)) で、プローブと二本鎖を形成 (Hybridize) し、それを介して DNA マクロアレイに固定された試料の発する蛍光の有無と強度を検出した。

2. 実験方法

2-1 ゲノム DNA 抽出

ダニの液浸標本は約 200 匹を実験当日にねじ蓋付きバイアル瓶に分取し、シリカゲル入りデシケータ内で減圧してエタノールを除去した。その後、φ2.0 mm ジルコニアビーズ 2 個、φ1.0 mm 鉄球 2 個を添加し、容器ごと液体窒素で凍結して組織破砕装置ミニビードビータ 3110BX (BioSpec Products 社) で破砕した。以後は DT-S の定法に従い、QuickGene-810 で精製、回収した。

あわせて CTAB 法も用いた。ダニの複数虫体を凍結破砕し、2% (w/v) Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) 液 500 µl 中で 65°C-30 分静置したのち、遠心分離とクロロホルム、イソプロパノールによる精製を経て沈殿 DNA ペレットを回収し、70% エタノール脱塩後に、滅菌水に溶解した。

得られたゲノム DNA 溶液の濃度と純度は、分光光度計 µQuant (BioTek 社) で波長 260 nm / 280 nm で測定し、適正なものを PCR 増幅に供試した。

Table 1 Universal PCR primers to amplify rDNA ITS region of mites

Name	Sequence (5' - 3')	Length	CG cont.	Tm(°C)
Acari-ITS1	CAAGGTTCCGTTAGGTGAAC	20	50.0%	55.0
Arthro-ITSF	TAGAGGAAGTAAAAGTTCG	19	36.8%	47.6
Acari-ITS2 R	GCTTGATCTGAGGTCGA	17	52.9%	51.6
Insect-ITSR	CCTTAGATGGAGTTTACC	18	44.4%	47.1

Table 2 Formula for PCR

Reagents	Amount
10× PCR buffer	2.0 µl
2.5mM dNTP mixture	2.0 µl
Fw primer (10 pmol/µl)	1.0 µl
Rv primer (10 pmol/µl)	1.0 µl
Taq Polymerase	0.1 µl
Template DNA	1.0 µl
Add H ₂ O up to	20.0 µl

Table 3 Thermal setting of PCR

Start of cycle		
94°C	30 sec	
35 cycles	94°C	30 sec
	46 - 50°C	30 sec
	72°C	30 sec
End of cycle		
72°C	60 sec	
4°C	∞	

2-2 PCR 増幅 (配列解析用)

PCR 増幅の反応液組成と条件を Table 2-3 に示す。Fw・Rv プライマーの組合せ, PCR 増幅時にアニーリング工程の温度を複数設定し, 適当な条件を検討した。

2-3 電気泳動と PCR 産物の回収

得られた PCR 産物をサブマリン型電気泳動装置 (Mupid-2plus, (株)アドバンス) で泳動後, ゲル撮影装置 (Mupid Scope WD, (株)アドバンス) の UV 照射下で, 目的のものと考えられるバンドを手動で切り出した。QIAprep® Gel Extraction Kit でゲル片から PCR 産物を抽出し, 同時に精製した。

2-4 塩基配列解析

回収・精製した PCR 増幅産物は, キャピラリー型遺伝子解析システム CEQ8000 を用い, そのメーカーの定法に従って塩基配列を解析した。得られた波形データは, 付属の解析ソフトウェアおよび BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) を用いて処理し, 塩基配列を決定した。また, 配列が非常に長い場合は外部に委託した。

2-5 DNA マイクロアレイ用プローブの設計とアレイの作成

得られたミナミツメダニ, イエダニの配列情報を元に, それらを検出, 識別するプローブを設計した。primer3 を用いて決定した対象種に特異的な配列を元に, 5' 末端にアミノ基を付加した一本鎖 DNA を合成し, これをマイクロアレイに固定するプローブとした。プローブは東洋鋼鉄(株)技術研究所にてジーンシリコン® チップ基板に搭載, 固定し, 刺咬性ダニ検出 DNA マイクロアレイとした。

2-6 DNA マイクロアレイ (プローブ) の評価

対象ダニ種から抽出したゲノム DNA を鋳型として, 島津製作所(株)製の PCR 増幅反応緩衝液 Ampdirect® Plus と推奨酵素 NovaTaq™ Hot Start DNA Polymerase (No. 241-08890-92), Cy5-dCTP を含む 20 µL の反応系で蛍光標識 PCR 増幅した産物を, DNA マイクロアレイ用試料として用いた。条件を Table 4-5 に示す。

Table 4 Formula for fluorescent labeling PCR

Reagents	Amount
5×Ampdirect®	4.0 µl
5×Amp Addition-1	4.0 µl
5×Amp Addition-2	4.0 µl
dNTP mixture (dCTP; 400 µM, others; 500 µM)	2.0 µl
Acari-ITS1 (10 pmol/µl)	1.0 µl
Orni-ITS2R (10 pmol/µl)	1.0 µl
1mM Cy5-dCTP	0.2 µl
NovaTaq™ Hot Start DNA Polymerase	0.2 µl
Template DNA	1.0 µl
Add H ₂ O up to	20 µl

Table 5 Thermal setting of PCR

Start of cycle	
35 cycles	95°C 10 min
	94°C 30 sec
	56°C 30 sec
	72°C 60 sec
End of cycle	
	72°C 7 min
	4°C ∞

得られた蛍光標識 PCR 増幅反応液 1 µl を 0.1% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム), 5×デンハルト溶液, 30 mM リン酸ナトリウムを含む 1×クエン酸-生理食塩水 (SSC) 緩衝液 2 µl に混合し, マイクロアレイに滴下し, 専用のカバーをかけた。さらに, アルミ積層プラスチックパウチに密封して, 45°C の温浴中で 30 rpm-1 時間保持し, 基板上のプローブと試料である蛍光標識 PCR 産物を分子交雑 (Hybridization) させた。反応終了後, 2×SSC 緩衝液で洗浄して遠心乾燥 (2,000 rpm-1 分) して, GenePix® Personal 4100A でプローブの蛍光の有無と強度を測定した。

結果と考察

1. 既存プライマーによる刺咬性ダニの ITS1, 2 領域の増幅

Table 1 に示したプライマーを用いて, 両種の ITS1-5.8S rDNA-ITS2 領域の PCR 増幅を試みた結果, イエダニは Arthro-ITSF と Insect-ITSR で, ミナミツメダニは Acari-ITS1 と Acari-ITS2-R2 の組み合わせのときにのみ増幅産物が得られた。

得られた 3 種の配列 (非掲載) を検索キーとして BLAST (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) で検索したところ, いずれも目的のものではなかった。イエダニ由来配列は細菌類のデータと高い相同性を示し, 虫体の内外に存在する細菌のものとして判断された。また, ミナミツメダニ由来産物のうち 0.9 kbp のものはコナヒョウヒダニ, 1.2 kbp のものはケナガコナダニの当該領域の塩基配列と比べて高い相同性を示し, やはりミナミツメダニではないと判断された。これらは餌として混合飼育しており, ミナミツメダニに捕食されたダニのゲノム DNA が鋳型に混在していることと, 用いたプライマーが目的のミナミツメダニには不適当なことがその理由と考えられる。

室内塵性ダニ (コナヒョウヒダニ, ヤケヒョウヒダニおよびケナガコナダニ) と, イエダニ, ミナミツメダニは各々異なる亜目に属している⁸⁻¹⁰⁾ (Fig. 1)。また, NIAS SRS (<http://srs.dna.affrc.go.jp/srs8/>) を用いて, 各亜目に属するダニの当該領域の塩基配列を収集したところ, 室内塵性ダニが含まれる Astigmata (無気門) 亜目では 900 ~ 1,200 bp, イエダニが含まれる Mesostigmata (中気門) 亜目では 500 ~ 600 bp, ミナミツメダニが含まれる Prostigmata (前気門) 亜目では 1,200 ~ 1,300 bp であり,

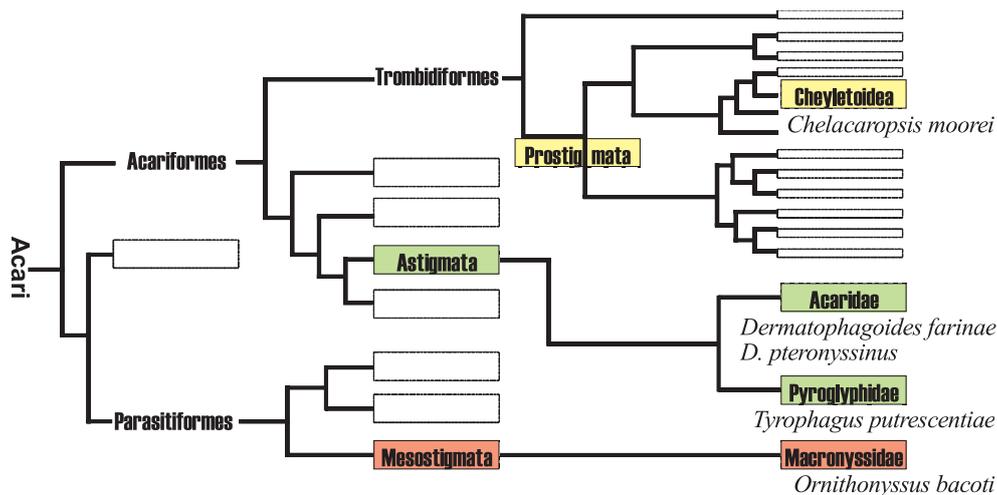


Fig. 1 Upper phylogeny of acari (partial) ; from order to families

亜目間で大きく相違していた。従って、プライマー配列が存在する 18S rDNA および 28S rDNA 領域も異なることが推測されたので、プライマー配列を改良し、引き続き目的領域の配列を得ることとした。

2. イエダニ用プローブの設計

2-1 イエダニ用プライマーの設計

イエダニを含む Mesostigmata に属するダニの当該領域の塩基配列を NIAS SRS によって収集し、類縁関係などから妥当と考えられる 6 種のダニを選択した (Table 6)。

次いで、正 (Fw) プライマーの設計に用いる 18S rDNA 領域と、逆 (Rv) プライマーの設計に用いる 23S / 28S rDNA 領域それぞれについて、上記 6 種間で共通する配列を ClustalW (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) を用いて比較、検討し、Tm 値、GC 含量 (%), 塩基数を考慮してプライマーに用いる塩基配列を決定した (Table 7)。

Table 7 のプライマーセット (Orni-ITS1, Orni-ITS2R) を用いて、Table 2 ~ 3 の条件 (アニーリング温度は 50°C) で PCR 増幅を試みたところ、イエダニで約 550 bp の位置に明瞭なバンドを確認した (Fig. 2)。イエダニと同じ Mesostigmata 亜目のダニ 6 種の当該領域の塩基長も同様であるため (Table 6), 目的領域の増幅に成功したと推測した。

同時に用いたコナヒョウヒダニ、ヤケヒョウヒダニでも約 900 bp の増幅産物が確認できたが、ケナガコナダニでは増幅産物が得られず、ミナミツメダニでは上記と同様に 500 ~ 1,600 bp の複数産物が得られた。

対照として、ダニ汎用プライマー (Acari-ITS1, Acari-ITS2R) を用いたが、イエダニは全く増幅できず、ミナミツメダニについては、やはりヒョウヒダニ類と同じ位置のみにバンドがあり、非特異的増幅と考えられた。

Table 6 Target region (ITS1, 2) of six mites belonging to Mesostigmata

Name	Accession #	Length	Remarks
<i>Euseius finlandicus</i>	AF202993	635 bp	Amblyseiinae, predator of spider mites
<i>Macrocheles glaber</i>	DQ986378	546 bp	Macrochelidae, predator of maggot
<i>Rhinonyssus tringae</i>	AJ421838	533 bp	Rhinonyssidae, parasite in the nasal passages of birds
<i>Sternostoma boydi</i>	AJ421834	584 bp	Rhinonyssidae, parasite in the nasal passages of birds
<i>Tinaminysus bubulci</i>	AJ421828	571 bp	Rhinonyssidae, parasite in the nasal passages of birds
<i>Tropilaelaps clareae</i>	AF544013	519 bp	Laelapidae, parasite in the air way of honey bee

Table 7 PCR primer set for Mesostigmatal mites including *Ornithonyssus bacoti*

Name	Sequence (5' - 3')	Feature of primers
18S rDNA common sequence of the six mites shown in Table 6	TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCTACTGATTAATAATCCATT	
23S / 18S rDNA common sequence of the six mites shown in Table 6	GACGTGTATCTGAAATCAAGTAGTGCGACCCGCTGAACTTAAGCAT ATCAATAAGCGGAGGA	
Orni-ITS1 (18 mer)	TGAACCTGCGGAAGGATC	Tm: 55.5 °C, GC: 55.5%
Orni-ITS2R (18 mer)	ATGCTTAAGTTCAGCGGG	Tm: 53.7 °C, GC: 50.0%

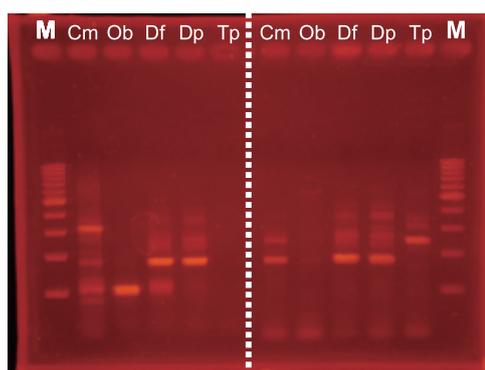


Fig. 2 Result of PCR amplification with the primer set for Mesostigmatal mites

Left side: primer set (Orni-ITS1, Orni-ITS2R) for Mesostigmatal mites
Right side: primer set (Acari-ITS1, Acari-ITS2R) for Astigmatal, house dust mites²⁾

Cm: *C. moorei*

Ob: *O. bacot*

Df: *D. farinae*

Dp: *D. pteronyssinus*

Tp: *T. putrescentiae*

2-2 イエダニの ITS1, 2 領域の配列解析

得られたイエダニ増幅産物をゲルから切り出し、精製後、キャピラリー型遺伝子解析システム CEQ8000 に供試し、531 bp の塩基配列を得た (Fig. 3)。この配列をキーとして BLAST 検索したところ、Mesostigmata 亜目のダニの当該領域が多数得られたことから、イエダニの配列であると推定した。その後の 2009 年に、AM903318 としてイエダニの配列がフランスより登録されたが、その配列とは 2 塩基のみの相違であり、99% 以上の一致となることから、Fig. 3 に示した配列をイエダニの ITS1, ITS2 領域のものと改めて断定した。

3. ミナミツメダニの ITS1, 2 領域の増幅

3-1 ミナミツメダニ用プライマー

ミナミツメダニと類縁関係の近い種の配列情報は、ほとんど公共データベースに登録されていないことから、Prostigmata 亜目に属する重要な農業害虫である *Tetranychus* (ハダニ) 属について文献等を調査したところ、Mh. Osakabe et al. がハダニに用いている rD02 forward¹²⁾ と Table 1 に記載の室内塵性ダニ汎用プライマー Acari ITS1 の塩基配列が酷似していることが判明したので、正プライマーとして Acari ITS1 がミナミツメダニに採用できると考えた。同様に HC2 reverse¹³⁾ がイエダニ用に決

定した逆プライマー Orni-ITS2R (Table 6) とほぼ同一であることから、Orni-ITS2R が採用できると判断した (Table 7)。

Table 8 のプライマーセット (Acari-ITS1, Orni-ITS2R) を用いて、Table 2 ~ 3 の条件 (アニーリング温度は 50°C) で PCR 増幅を試みたところ、ミナミツメダニについて約 1,600 bp の増幅産物が確認できた (Fig. 4: 第 2 レーン)。

また、その他のダニ (イエダニ, コナヒョウヒダニ, ヤケヒョウヒダニ, ケナガコナダニ) についても、固有の塩基長をもつ増幅産物が得られた (Fig. 4: 第 3 ~ 6 レーン)。HC2 / Orni-ITS2R プライマーと一致する配列が室内塵性ダニに存在することは、公共データベース中の配列データで確認できた。一方、Acari ITS1 / Acari ITS2 R では、ミナミツメダニおよびイエダニで得られる PCR 増幅産物は、既述のとおり、目的領域でないことが明らかである (Fig. 4: 第 7 ~ 8 レーン)。

以上の結果から、Acari-ITS1 / Orni-ITS2R の組み合わせは、広く Acari (ダニ) 目種全般に使用できるとみられ、わずかな塩基の変更で、Astigmata (無気門) 亜目特異的または Acari 目汎用プライマーとして使い分けられる可能性があると考えられた。ただし、非特異的増幅も観察されていることから、PCR 条件を検討した。

```
TGAACCTGCG GAAGGATCAT TATTGATTCA AAATCCATTC ACTCACTCTT 50
GGGCGAATGG TGTCGGGATG ATGACCTAAC CCGCTCCGG GAGAGGCATA 100
TATCATTATA ACTTTGTATT GCATATACGT ATCGCGATCT CACTTTAGCA 150
CTAAAGTTAG GCGCGCGTCG CCGTGACGAC TTTGTCGTGC GGCTCGACAC 200
ACTTTTCCCT TAATTCGTGC TATTGAGAAT GAAATAAAAC AAGACTCAAT 250
ATGGGGGATC ACTTAGTCCT TAAATCGATG AAAAAACATAG TAATTTGTGG 300
AAATTGATGT GAGTTGTGAA ATTTTGTGAG CATTGTGTTT TTGAATGAAA 350
ATTTTCAGCAT GGATGCAATC GTATCGATGC TACATTTGTT TCAGTATATA 400
AACCGTACAA TACGTAATTA CCATTGCTTG TACGCAATGG TATAAAAATT 450
ACTTGATCAC GAGAGTGATG ATGTTTCGAG CTGACGACGT GTATCTGAAA 500
TCAAGTGTGA CGACCCGCTG AACTTAAGCA T
```

Fig. 3 Sequence of rDNA ITS1, 2 region of rat mite, *Ornithonyssus bacoti* 18S (partial) -ITS1-5.8S-ITS2-28S rDNA (partial); 531 bp

Table 8 PCR primer set for a Prostigmatal mite, *Chelacaropsis moorei*

Name	Sequence (5' - 3')	Feature of primers	
Acari-ITS1 ³⁾	CAAGGTTTCCGTAGGTGAAC	GC: 50.0%	Tm: 56.3 °C
rD02 Fw ¹²⁾	GTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG	GC: 50.0%	Tm: 58.6 °C
HC2 Rv ¹³⁾	ATATGCTTAAGTTCAGCGGG	GC: 45.0%	Tm: 54.3 °C
Orni-ITS2R	ATGCTTAAGTTCAGCGGG	GC: 50.0%	Tm: 53.7 °C

Table 9 Target region (ITS1, 2) of four mites belonging to Prostigmata

Name	Accession #	Length	Remarks
<i>Amphitetranychus viennensis</i>	AB257732	1,079 bp	Tetranychidae, parasite
<i>Tetranychus kanzawai</i>	AB076370	1,203 bp	Tetranychidae, parasite of wide range hostplants
<i>Cecidophyopsis spicata</i>	AJ297571	1,395 bp	Eriophyidae, gall forming parasite of plants
<i>Phyllocoptes gracilis</i>	AJ297573	1,617 bp	Eriophyidae, gall forming parasite of plants

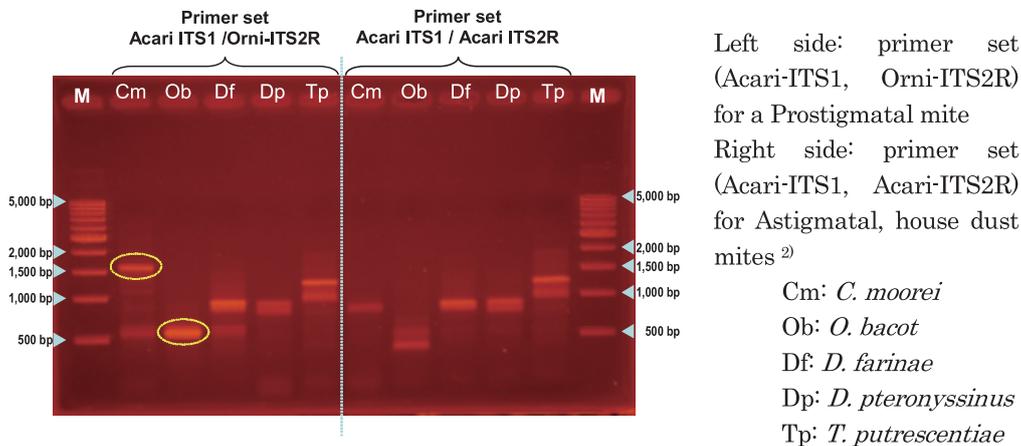


Fig. 4 Result of PCR amplification with the primer set for a Prostigmatal mite

前述のとおり, Prostigmata 亜門ダニの当該領域の塩基配列長は 1,000 ~ 1,600 bp 程度であり (Table 9), 同亜目内で塩基長に相違があるものの, 得られたミナミツメダニの産物長 (Fig. 4: 第 2 レーン) が類似することから, 増幅に成功したと推測した。

3-2 ミナミツメダニの ITS1, 2 領域の配列解析

配列が長いことから, 得られたミナミツメダニ増幅産物を前処理した上で, 外部に解析を依頼し, ミナミツメダニの当該領域 1,623 bp の塩基配列を得た (Fig. 5)。

決定した 1,623 bp のミナミツメダニ塩基配列のうち, 途中の 5.8S rDNA は保存性が高いことから, これをキーに BLAST 検索した。結果, 極めて高い相同性 (E-value < 0.01) をもつ配列が同亜門のハダニ属 (26 件) と *Amphitetranychus viennensis* (ハダニ科, 2 件) の同じ領域のみであったことから (データ略), この塩基配列はミナミツメダニの目的領域であると判断した。

4. DNA マイクロアレイの作成と動作検証

4-1 プローブの設計

得られたミナミツメダニ, イエダニの配列情報を元に, それらを検出, 識別するプローブを設計した。primer3 による候補配列の特異性を BLAST 検索で確認し, 一致度の高い配列が検出される場合は候補から除外し, 対象ダニへの特異性が確認されたものを選抜した。この配列をプローブとした (Table 10-11)。これらと, 室内塵性ダニ 3 種のプローブ³⁾ をジーンシリコン® チップ基板に搭載し, 刺咬性ダニ検出 DNA マイクロアレイとした。

基本的に ITS1 と ITS2 領域のそれぞれから 2 ヶ所ずつ, 計 4 種のプローブ配列を選抜した。ただし, イエダニについては ITS1 内に適切な配列が少なく, プローブ obh-1 と obh-2 は 1 塩基ずらした同じものである。

4-2 PCR 条件の改変

プライマーセット Acari-ITS1 / Orni-ITS2R によって刺咬性ダニ 2 種を含む全 5 種の検出対象ダニのすべてにつ

```

CAAGGTTTCC GTAGGTGAAC CTGCGGAAGG ATCATTACCG ATAGTGAGGT 50
GCACACTACT CGGTTGCCAG GCTGGCTAGC TGGGGCCAGC CTGGCAAGCA 100
GTTACTTTTCG AAGCCCCGGT GTGAGAGAGC ACACCGGGGT AGAGACTGCC 150
GGTCAACGGG AGTTGGCCAA GCTGAAACTT AACAAACTGA AACTTACCCT 200
ACCCGGGCTC TCATTCGAGT GTCTGGTGCA TGTGCCTCGG TCGGTCCGTG 250
AGGAGTCCGG GGGCATGCAT ACGGTAGCCA GAATGCTGT GTTCTCCAT 300
GATCTTCGGT CGGTCCACCT AGTGTGGTAG CGCGGGGTGA TTGGAGGATG 350
CCAGCGTCTG CAAGTCGGAG CTCTAAGCGG TCCAATGGGC CGTGTAAAG 400
CGAAGCACCC GTGCATACGG CATGTACTAG GCATGAGAGG AGAGACTGGG 450
CAAGCTGAAA CTTAACCAAA GACAGGTTTA TTCGAATGTC TGATGCATGT 500
GTCTCGGTCG GTCCGTGAGG AGTCGCGGGG CATGCACACG GTAGCCAGAA 550
TTGCTGCGGT TCTCCATGAT CTTCGGTCCG TCCACCTAGT GTGGTAGCGC 600
GGGGTGATTG GAGGATGCCA GCGTCTGCAA GTCCGGAGTC TAAGCGGTCC 650
AATGGGCCGT GTTAAGGCAA AGCACCCGTG CATAACAGC GTATTAGGCA 700
GGAGAGTATA ACCAGTCAGC CCGTATTGAA TGCAGACAAG CTCATTTCGAG 750
TGTCTGATGC ATGTGTCTCG GTCCGGTCCG GAGGAGTCGC GGGGCATGCA 800
CACGGTAGCC AGAATGCTG CGGTCTCCA TGATCTTCGG TCGGTCCACC 850
TAGTGTGGTA GCGCGGGGTG AGTGGAGGAT GCCAGCGTCT GCAAGTCGGA 900
GCTCTAAGCG GTCCAGTGGG CCGTGTAAAG GCAAAGCACC CGTGCATACA 950
GCATGTATTA GGCAGGAGAG TGTGGTGAGT CGACCCGTAA TGTACACGTA 1000
AACTAGAATT ACTAAGCAAT TGAATATGCA ACACAATTGC ATCCGGTGGG 1050
TCACTCGGAT CATCAGACGA TGAGGAACGT AGCAAGCTGC GTTACTCGGT 1100
GCGAAGTGC A GAGCACGTTG AGCGCTAGAT TTTCTAACTC ATATTGATGC 1150
TTTGGGTTTT CTTCTCATGG CAATATCTGT CTGAGTGTCT GATAAATACA 1200
GTAGAAGTTT GACGGCTTTT CTACGAGGTA TACATTGTAC ACCGCATTAA 1250
CTGGGCTACC TTGCCAGTT GTACGGTATA AGCTGAGACT AGGAGACGTA 1300
AAACATAATA GTGGCCATCC ACATAGCTCA ACACCCGCAT CCGGGTGTGT 1350
GCGATGGTAT CCACTATGTT GGGGTTGTCT ACCTAGCGGT CTAGCACATT 1400
GGCTCTTG TG TATGGATGCG AAATGCAACC GGTATACGCA GTAGGCCTCT 1450
CCATGTGCAT GCAGACTGAC CAACTGACGG AGATGGAGTT GAAAAGGCC 1500
GGCCGGACAG GAAAGCACGC TCGAGTACTG TTCTAATATG TGTGAATTAG 1550
AGATATGCAT GCAAGAACAG CTTACCATCA TTGGACCTCA GATCAGATAA 1600
GGCTACCCGC TGAACCTAAG CAT
    
```

Fig. 5 Sequence of rDNA ITS1, 2 region of the cheletid mite, *Chelacaropsis moorei*
18S (partial) -ITS1-5.8S-ITS2-28S rDNA (partial) ; 1623 bp

Table 10 Probes for *Ornithonyssus bacoti*

Region	code	sequence (5' - 3')	Tm (°C)
ITS1	obh-1	ATACGTATCGCGATCTCACT	54.25
	obh-1c	AGTGAGATCGCGATACGTAT	
ITS1	obh-2	TACGTATCGCGATCTCACTT	54.25
	obh-2c	AAGTGAGATCGCGATACGTA	
ITS2	obh-3	CTGACGACGTGTATCTGAAA	54.25
	obh-3c	TTTCAGATACACGTCGTCAG	
ITS2	obh-4	ATCACGAGAGTGATGATGGT	54.25
	obh-4c	ACCATCATCACTCTCGTGAT	

Table 11 Probes for *Chelacaropsis moorei*

Region	code	sequence (5' - 3')	Tm (°C)
ITS1	cmb-1	ATAGTGAGGTGCACACTACT	54.25
	cmb-1c	AGTAGTGTGCACCTCACTAT	
ITS1	cmb-2	GCATGTATTAGGCAGGAGAG	56.30
	cmb-2c	CTCTCCTGCCTAATACATGC	
ITS2	cmb-3	ATGCAAGAACAGCTTACCAT	52.20
	cmb-3c	ATGGTAAGCTGTCTTGCAT	
ITS2	cmb-4	AATAGTGGCCATCCACATAG	54.25
	cmb-4c	CTATGTGGATGGCCACTATT	

いて、目的とする増幅産物を得たが、Fig. 4 に示すとおり、非特異的産物もまた増幅されていた。DNA を CTAB 法で抽出し、PCR 系に(株)島津製作所の Ampdirect とその推奨酵素 NovaTaq を用いたところ、Fig. 6 に示すとおり、非特異的増幅産物を抑制できた。

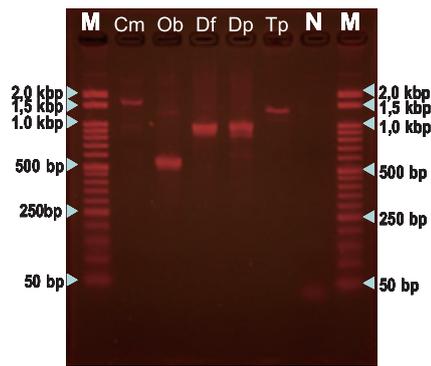
4-3 DNA マイクロアレイの動作確認

各ダニから抽出したゲノム DNA を単独で鋳型とし、Table 4, 5 の条件で蛍光標識 PCR 増幅を行い、その産物を試料として DNA マイクロアレイに適用したところ、Fig. 7 に示すとおり、ミナミツメダニ、イエダニをそれぞれ検出、識別できた。室内塵性ダニ 3 種も同様にそれぞれ

の試料に該当するプローブのみが発光し、全 5 種を単独で適用した場合には、検出と識別を同時に可能であった。また 5 種のゲノム DNA を混合して蛍光標識 PCR 増幅した試料についても、混在全種を検出、識別できた。

一方でプローブ間にはそれぞれ発光強度に差異があり、ミナミツメダニ、イエダニ用に限らず、搭載したプローブ全てが強く反応するわけではなく、反応が乏しいプローブも見られた。また、単独試料と 5 種混合試料を比較した場合、単独試料で発光強度が強くなる傾向が見られた。

いずれのプローブ群でも主鎖配列と相補鎖配列の間で反応性が大きく異なった。即ち、ITS1 領域プローブでは相補鎖配列が、ITS2 領域プローブでは主鎖配列が良く反応



The primer set, Acari-ITS1, Orni-ITS2R

Cm: *C. moorei*

Ob: *O. bacoti*

Df: *D. farinae*

Dp: *D. pteronyssinus*

Tp: *T. putrescentiae*

N: Negative control

Fig. 6 Result of PCR amplification by Ampdirect® and the primer set (Acari-ITS1, Orni-ITS2R)

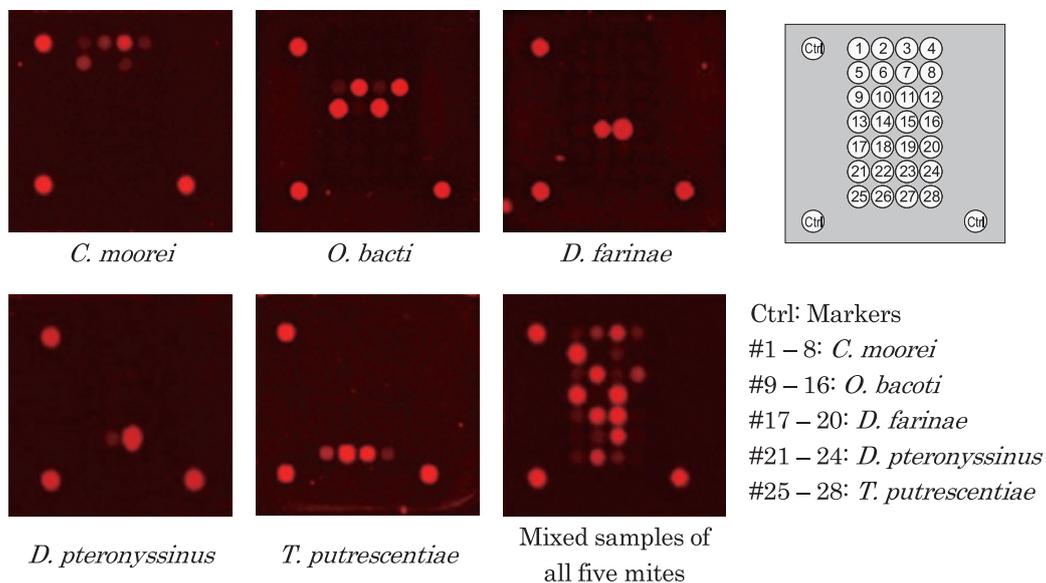


Fig. 7 Detection and discrimination of five mites by DNA microarray

し、その反対側の配列によるプローブの反応は低いものに留まった。他のダニのプローブでも同様の傾向が見られる。これらのプローブは一对のもので T_m 値や GC 含量などは完全に一致すること、プローブ配列の近傍に立体構造を形成しやすい GC 塩基に富む領域はないことから、反応の強弱は、プローブ配列が PCR 増幅産物 (約 500 bp ~ 1,600 bp) のどの部分と対合して部分的二本鎖構造を形成してチップに固定するののかといった、DNA 分子の物理的な構造に影響されるものと考えられる。また、反応したイエダニ用プローブは発光強度が揃っていた一方で、ミナミツメダニではばらついていて、後者ではプローブの T_m 値に差がなく、試料に対する反応性に差異が少ないのではないかと考えられる。混合試料で発光強度が低下したのは、個々の鋳型 DNA 量が少なくなることで、PCR 増幅の際にプライマーや Cy5-dCTP が個々のダニゲノム DNA に分配され、各々の増幅産物が単独試料の場合より減少するためであるとされる。

以上、本 DNA マイクロアレイを用いることで、PCR 増幅が可能な DNA 試料が得られれば、その由来によらず 2 種の刺咬性ダニを含めた全 5 種のダニの検出と識別が同時にできることが示された。

まとめ

室内塵埃中の環境ゲノム DNA¹⁾ を試料に、コナヒョウヒダニ、ヤケヒョウヒダニ、ケナガコナダニと複数真菌類を一括して検出し、同時に識別する DNA マイクロアレイを報告した²⁻⁴⁾。一方、イエダニは寄主であるネズミ類を介してヒトと接点を持つため被害は多く、また餌となる室内塵性ダニなどが大量発生した場合には、ミナミツメダニを代表とする捕食性ダニも同時に増殖するため偶発的接触でヒトに刺咬被害をもたらす。先の DNA マイクロアレイの用途を拡大するために、刺咬性ダニ 2 種を新たに検出、識別できるようにした。

両ダニ種の ITS1-5.8S rDNA-ITS2 領域の PCR 増幅を試みた結果, これまでのプライマーは不適切であった。それぞれの近縁種の配列を検討した結果, 正プライマーはこれまでどおり Acari-ITS1 を用い, 逆プライマーは Acari-ITS2R に替えて新しく Orni-ITS2R を作成して用いた。その結果, 室内塵性ダニ 3 種に加えて, イエダニとミナミツメダニも増幅できた。

増幅産物を解析して得られた塩基配列長が近縁種と類似すること, 同配列をキーとした BLAST 検索で同種または近縁ダニ種が配列の一致度で上位を独占することから, 正しくイエダニとミナミツメダニの当該配列を解読できたと判断した。

この配列中から種特異的とみなされ, かつプローブとして適当な配列を選定し, 一本鎖オリゴヌクレオチドを合成, ジーンシリコン基板に固定して, DNA マイクロアレイとした。

各ダニから抽出したゲノム DNA を単独で鋳型とし, 蛍光標識 PCR 増幅を行い, その産物を試料として DNA マイクロアレイに適用した。全 5 種を単独で適用した場合には, ミナミツメダニ, イエダニ, 室内塵性ダニ 3 種をそれぞれ検出, 識別が可能であった。また 5 種のゲノム DNA を混合して蛍光標識 PCR 増幅した試料についても, 混在全種を検出, 識別でき, 検出できなかったものはなかった。

参考文献

- 1) 青木 俊介, 加瀬谷 泰介: 東洋食品工業短期大学・東洋食品研究所 研究報告書, **27**, 1-8 (2009)
- 2) 加瀬谷 泰介, 青木 俊介, 平山 幸一, 近藤 隆一郎, 堤 祐司, 須原 弘登: 日本ペストロロジー学会誌, **23** (1), 27-30 (2008).
- 3) 平山 幸一, 加瀬谷 泰介, 近藤 隆一郎, 堤 祐司, 須原 弘登: 公開特許 特開 2008-35773.
- 4) 加瀬谷 泰介, 青木 俊介, 平山 幸一: 東洋食品研究所 研究報告書, **28**, 11-16 (2010)
- 5) 江原 昭三: 化学と生物, **6** (6), pp. 331-339 (1968)
- 6) 東京都福祉保険局: 東京都ねずみ防除指針 第一部
3) 被害の実態, <http://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/kankyo/eisei/yomimono/nezukon/nezumi/boujyoshishin/files/higai.pdf>, 東京都, pp.17-18 (2005)
- 7) 東京都福祉保険局: 東京都におけるねずみ・衛生害虫等相談状況調査結果 類別・年度別集計 (平成7年度から平成21年度まで) 3 ダニ類, <http://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/kankyo/eisei/nezukon/files/3dani.pdf>, 東京都, (2010)
- 8) 江原 昭三編: 日本ダニ類図鑑, (株)全国農村教育協会, 東京, pp. 505-509 (1990)
- 9) Walter, D. E., Krantz, G., and Lindquist, E. (Tree of Life web project) : <http://tolweb.org/Acari/2554>, hosted by The University of Arizona College of Agriculture and Life Sciences and The University of Arizona Library, (1996)
- 10) Cracraft, Joel and Donoghue, Michael J. : *Assembling of the tree of life*, Oxford University Press, London, pp. 299-301 (2004)
- 11) Osakabe, Mh., Hirose, T. and Sato, M. : *Appl. Entomol. zool.*, **37**, 399-407 (2002)
- 12) Hinomoto, N. and Takafuji, A. : *Exp. Appl. Acarol.*, **25**, 355-370 (2001)
- 13) Navajas, M., Gutierrez, J., Bonato, O., Bolland, H. R. and Mapangou-Divassa, S. : *Exp. Appl. Acarol.*, **18**, 351-360 (1994)