

機関番号：14401
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20390120
 研究課題名（和文）超高速シーケンシング法による三日熱マラリア原虫近縁サルマラリア原虫のゲノム解読
 研究課題名（英文）Genome sequencing of the *Plasmodium vivax*-related monkey malaria parasite, *P. cynomolgi*, by the massive sequencing system
 研究代表者
 田辺 和祐（TANABE KAZUYUKI）
 大阪大学・微生物病研究所・招へい教授
 研究者番号：40047410

研究成果の概要（和文）：三日熱マラリア原虫は系統的には旧世界サルマラリア原虫に近縁であるが、ヒトにのみ寄生する。この原虫の宿主転換・ヒト寄生化に関わる遺伝的基盤の解明のため、サルマラリア原虫 *Plasmodium cynomolgi* のゲノムを解読し、比較ゲノム解析を行った。その結果、約1割の遺伝子が種特異的で、それらは多重遺伝子族に属していた。興味あることに、原虫の宿主赤血球への侵入に関与する分子である DBP 及び RBP の遺伝子の数が種間で異なっていた。

研究成果の概要（英文）：*Plasmodium vivax* infects only humans, although it is closely related to Old World monkey malaria parasites. In order to reveal genetic backgrounds of host switch and human infection of *P. vivax*, genome sequencing of *P. cynomolgi* and comparative genomic analyses were performed. Results revealed that about 10% of genes of the genomes are species-specific and belong to multigene families. Intriguingly, the number of genes in the DBP and RBP families, which encode parasite's ligands for the recognition of host erythrocytes, differed between *P. vivax* and related monkey malaria parasites.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	10,800,000	3,240,000	14,040,000
2009年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総計	15,600,000	4,680,000	20,280,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：マラリア、三日熱マラリア原虫、サルマラリア原虫、ゲノム、進化、寄生

1. 研究開始当初の背景

マラリアは毎年3億人の患者と百万人以上の命を奪っている最大の原虫感染症である。人マラリアのうち、熱帯熱マラリアが患者数と重症度から最も重要視されているが、三日熱マラリアは熱帯から温帯にわたる分

布域の広さ、症状の重さ、再発を伴う点から重要である。最近では薬剤耐性の三日熱マラリアが広がりつつあり、状況は悪化している。そのため、三日熱マラリアの制圧に向けた新規薬剤とワクチンの開発が必要とされている。2002年10月、熱帯熱マラリア原虫

(*Plasmodium falciparum*) のゲノムが発表された。その後、そのゲノム情報に基づき薬剤標的や免疫標的タンパクの遺伝子の同定が格段に容易になっている。一方、三日熱マラリア原虫 (*P. vivax*) のゲノム解読も米国を中心として進められ、その発表が待たれている。

ゲノムはその生物の進化における出来事と歴史を刻み込んだ情報である。ヒトのマラリア原虫と系統進化的に近縁なサルマラリア原虫のゲノムとを比較することによって、ヒトマラリア原虫のゲノムの特徴が浮かび上がる。近縁なマラリア原虫とのゲノムの違いはどの程度なのか、ヒト寄生を成功させるためにどのような遺伝子群を獲得し、消失させたのか、といった重要な情報が種間の比較ゲノム解析によって明らかになる。

P. vivax は近年の進化学的研究から、類人猿のマラリア原虫とは祖先を共有せず、マカク類サルマラリア原虫の宿主転換により、比較的最近 (約 20-40 万年前)、ヒトに寄生適応したことが示唆されている。申請者は、複数の遺伝子座の系統解析から、*P. vivax* に最も近縁なサルマラリア原虫は *P. cynomolgi* であることを明らかにした。現在、マカク類サルマラリア原虫の一種の *P. knowlesi* のゲノム解読が英国のサンガー研究所で進められているが、申請者らの研究結果は *P. knowlesi* は *P. vivax* とは系統進化的にかなり離れており、*P. vivax* のゲノム比較種として *P. cynomolgi* が最も相応しいことを意味する。しかし、*P. cynomolgi* のゲノム解読は欧米ではまだ予定されていない。*P. vivax* の研究は、原虫の培養法及び遺伝子改変技術が確立されていないことから、*P. falciparum* に較べて非常に遅れている。従って、*P. vivax* のゲノム情報の解明と近縁種サルマラリア原虫のゲノム比較に大きな期待が寄せられ

ている。

一方、今日、DNAシーケンシング技術の革新はめざましく、超高速シーケンシング法を用いれば真核生物のゲノムでも、その解読が容易になり、研究室規模で、短期に可能になった。この革新的技術をいち早く取り入れれば、*P. vivax* に最も近縁なサルマラリア原虫の *P. cynomolgi* のゲノム解読を行うことが可能となる。さらに、*P. vivax* とのゲノム比較進化学的解析を行い、*P. vivax* ゲノムに独自な特徴、及び、ヒト寄生化の遺伝的基盤を解明することが求められている。

2. 研究の目的

本研究では *P. vivax* に系統的に最も近縁なマカクサルマラリア原虫 *P. cynomolgi* のゲノムを超高速次世代シーケンシング法により解読し、比較ゲノム解析から、*P. vivax* のヒト寄生化に関わるゲノム変化を解明することを目指す。そのために以下の具体的な研究課題を実施する。

- (1) ドラフトゲノムの解読：2種類の超高速DNAシーケンシング法 (イルミナ FLX、及び、ソレクサ GAII) を用い、*P. cynomolgi* のゲノム (約 25 Mb) の配列を得る。バイオインフォマテックス及び実験的方法により *P. cynomolgi* のドラフトゲノムを構築し、遺伝子のアノテーション、染色体上の遺伝子配置を決定する。
- (2) 比較ゲノム解析：*P. cynomolgi* のドラフトゲノムを *P. vivax* 及び *P. knowlesi* のゲノムと比較し、*P. vivax* に独自なゲノム領域、遺伝子群を同定する。
- (3) 種内多型の進化集団遺伝学的解析：*P. vivax* 及び *P. cynomolgi* の種内における多型を複数の原虫株を用いて解析する。この解析により、*P. vivax* に独自な加速進化や正の選択の有無を推測する。
- (4) マカク類サルの *P. vivax* 感染感受性：*P.*

vivax が本当にマカクサルに感染しないかどうかを、各種サルマラリアに高い感染感受性を示すニホンザル(*Macaca fuscata*)を用いて調べる。

3. 研究の方法

(1)サルへのマラリア感染実験

P. cynomolgi B 株のニホンザル (*Macaca fuscata*) 感染を筑波霊長類研究センターにおいて行った。凍結感染血液を尾静脈接種後、原虫の赤血球感染率が 3-10%に達した時点で、ケタミン麻酔下、採血した。白血球除去フィルターにより白血球を除去し、サポニン溶血後、原虫ペレットを凍結保存した。

(2)*P. cynomolgi* ゲノム DNA の採取

凍結 *P. cynomolgi* ペレットから原虫ゲノム DNA を QiagenDNA 抽出法にて抽出した。ペレットの一部は RNALater で処理、RNA を調製した。

(3)超高速次世代DNAシーケンシング

2つの超高速シーケンシング法、すなわちロシュ FLX、及び、イルミナ GAII を使用してゲノムシーケンスを行い、シーケンスリード群を得た。

(4)コンティグの作成、アセンブリング、アノテーション

大阪大学微生物病研究所ゲノム情報解析センターの並列ワークステーション群を使用してリード群からコンティグ群を作成した。コンティグ群のアセンブリングは *P. vivax* のゲノム情報、及び、フォスミドライブラリー作成によるペアエンド配列の連結結果から推定した。コンティグ間のギャップ部分の連結は、PCR 増幅と直接シーケンシングより得た。最終的にマラリア原虫の 14本の染色体に相当する 14本のスーパーコンティグを得、予想ゲノムの約 80%を構築した。スーパーコンティグに対して、PlasmODB、その他生物種の GeneDB に対して BLAST サーチをかけ、遺伝子のアノテーション、並びに、

オーソログ・パラログ遺伝子群の同定を行った。

(5)比較ゲノム解析

作成した *P. cynomolgi* ドラフトゲノムをもとに他種マラリア原虫ゲノムとの比較解析を行った。解析項目は以下である。①ゲノム構成の種間比較：ゲノムサイズ、GC コンテント、遺伝子数等のゲノム構成において *P. vivax* に顕著な変化があるのかどうかを見た。② *P. vivax* における遺伝子の獲得と消失：遺伝子のシンテニーを 3種のマラリア原虫種間で調べ、*P. vivax* に独自の遺伝子の重複(獲得)や消失、逆位があるのかどうか、どんな遺伝子にそれが起こっているのかどうかを調べた。

(6)遺伝子多型の種間比較

P. vivax 集団(n=32)、*P. cynomolgi* 集団(n=12)において免疫標的抗原であるメロゾイト表面タンパク質遺伝子 (*mssl1*) に働く正の選択が認められかどうかを集団遺伝学的に検討し、*P. vivax* に特異的な正の選択があるのか、また、遺伝子内のどの領域にそれが作用しているのかを同定した。

4. 研究成果

(1) *P. vivax* のマカク類感染性

P. vivax ゲノム解読に使用された Sal-I 株を含めた *P. vivax* 7株の凍結原虫を脾摘ニホンザル(*Macaca fuscata*)、カニクイザル(*M. fasciculata*)に静注し、感染の成立をPCR診断で見た。接種後の2ヶ月間、感染は認められなかった。一方、ニホンザルの赤血球 Duffy 抗原の cDNA 遺伝子を調べたところ、低感受性のマカク類のそれと酷似していた。

(2) *P. cynomolgi* ドラフトゲノムの構築

ニホンザル (*M. fuscata*) に *P. cynomolgi* B株を感染させることに成功し、感染サルから原虫を得、原虫ゲノムDNAを調製した。超高速次世代シーケンシングシステム (GS FLX法) によって平均リード長300 bp、総塩基621 Mb

のリード群を得、コンティグ群を作成した。同時にフォスミドライブラリーの作成、及び、PCRによってコンティグ群を結合し、原虫の染色体に相当する14本のスーパーコンティグの作成に成功し、予想ゲノムの約80%以上を占めるドラフトゲノムの構築に成功した。さらに、イルミナGAIIによっても平均リード長75 bp、3732 Mbのリードを得、それを用い、FLXによるシーケンスエラーの修正をかけた。

(3) 比較ゲノム解析

2008年10月に発表されている*P. vivax*および*P. knowlesi*のゲノムとの3種間比較解析を行い、3種のマラリア原虫に共通する遺伝子、種固有な遺伝子を分類した。その結果、約9割のタンパク質コード遺伝子が3種間で共通しており、残り1割の非共通遺伝子が各原虫種に固有であった(下図)。

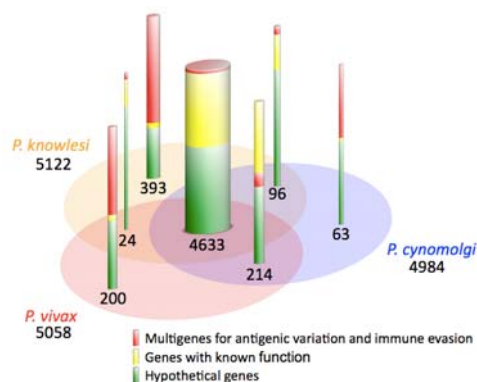


図: *P. cynomolgi*, *P. vivax*, *P. knowlesi* のゲノム比較

非共通遺伝子の多くは、ゲノム中に複数のホモログを持つ多重遺伝子族に属していた。特筆すべきは、3種の原虫の宿主赤血球への侵入に関与する分子である Duffy binding protein (DBP) 及び Reticulocyte binding protein (RBP) の遺伝子の数が、3種間で異なっていた点である。これは、今後 *P. vivax* とサルマラリア原虫種の宿主域を規定する分子基盤を解明する上で重要な発見と考えられる。さらに、比較ゲノム解析から、*vir*, *kir*, *SICAvar*

遺伝子群の共通祖先の同定や肝臓休眠期原虫ヒプノゾイト形成に関わる候補遺伝子の推定、なども行うことができた。

(4) 免疫標的抗原における *P. vivax* に特異的な正の選択

mssl における多型の起源、及び、*mssl* に働く選択を *P. vivax* 及び近縁サルマラリア原虫を対象に進化集団遺伝学的に解析した。その結果、種間で共有される多型は限られ、多型の多くは種分岐後に誕生したこと、及び、種によって正の選択の働く領域とその強度が異なることが明らかになり、*mssl* は種ごとに独自の適応進化を遂げてきたことを示唆した。特に、*P. vivax* では正の選択を受けるアミノ酸サイトが多いことが認められた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

- ①. F. Y. Zeyrek, S. Tachibana, F. Yuksel, N. Doni, N. Palacpac, N. Arisue, T. Horii, C. Coban, K. Tanabe. (2010) Limited polymorphism of the *Plasmodium vivax* *mssl* gene (*pvmsp1*) in isolates from Turkey. Am. J. Trop. Med. Hyg., 83: 1230-1237. 査読有
- ②. K. Tanabe, T. Mita, T. Jombart, A. Eriksson, S. Horibe, N. Palacpac, L. Ranford-Cartwright, H. Sawai, N. Sakihama, H. Ohmae, M. Nakamura, M. U. Ferreira, A. A. Escalante, F. Prugnolle, A. Björkman, A. Färnert, A. Kaneko, T. Horii, A. Manica, H. Kishino, F. Balloux. (2010) *Plasmodium falciparum* accompanied the human expansion out of Africa. Curr. Biol. 70: 1-7. 査読有
- ③. H. Sawai, H. Otani, N. Arisue, N. Palacpac, L. de Oliveira Martins, S. Pathirana, S. Handunnetti, S. Kawai, H. Kishino, T.

- Horii, K. Tanabe. (2010) Lineage-specific positive selection at the merozoite surface protein 1 (*msp1*) locus of *Plasmodium vivax* and related simian malaria parasites. BMC Evol. Biol. 10: 52. 査読有
- ④. R. Culleton, M. Ndounga, F. Y. Zeyrek, C. Coban, P. N. Casimiro, S. Takeo, T. Tsuboi, A. Yadava, R. Carter, K. Tanabe. (2009) Evidence for the transmission of *Plasmodium vivax* in the Republic of Congo, West Central Africa. J. Infect. Dis. 200 (9): 1465-1469. 査読有
- ⑤. S. Kawai, M. Hirai, K. Haruki, K. Tanabe, Y. Chigusa. (2009) Cross-reactivity in rapid diagnostic tests between human malaria and zoonotic simian malaria parasite *Plasmodium knowlesi* infections. Parasitol. Int. 58: 300-302. 査読有
- ⑥. R. Culleton, T. Mita, M. Ndounga, H. Unger, P. Cravo, G. Paganotti, N. Takahashi, A. Kaneko, H. Eto, H. Tinto, C. Karema, U. D'Alessandro, V. do Rosário, T. Kobayakawa, F. Ntoumi, R. Carter, and K. Tanabe. (2008) Failure to detect *Plasmodium vivax* in West and Central Africa by PCR species typing. Malaria J. 7:174 査読有
- ⑦. T. Hayakawa, R. Culleton, H. Otani, T. Horii, K. Tanabe (2008) Big bang in the evolution of extant malaria parasites. Mol. Biol. Evol. 25 (10): 2233-2239. 査読有
- ⑧. Y. Nishimoto, N. Arisue, S. Kawai, A.A. Escalante, T. Horii, K. Tanabe, T. Hashimoto. (2008) Evolution and phylogeny of the heterogeneous cytosolic SSU rRNA genes in the genus *Plasmodium*. Mol. Phylogenet. Evol. 47 (1): 45-53. 査読有
- [学会発表] (計 23 件)
- ①. S. Tachibana, S. Kawai, N. Goto, S. Nakamura, N. Arisue, Y. Katakai, H. Honma, N. Palacpac, H. Sawai, T. Tougan, K. Kita, Y. Yasutomi, T. Horii, T. Yasunaga, K. Tanabe. Genome sequencing of the *P. vivax*-related monkey malaria parasite, *P. cynomolgi* and the comparative genomic analysis. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Hyogo, Japan, 2010.9.9.
- ②. 川合 寛, 片貝 祐子, 保富 康宏, 田邊 和裕, マカク属サル種間にみられるサル・マラリア感染感受性の比較、第 7 9 回日本寄生虫学会大会、北海道、2010.5.21.
- ③. 橘真一郎, 川合寛, 後藤直久, 中村昇太, 片貝祐子, 澤井裕美, 東岸任弘, 北潔, 保富康宏, 堀井俊宏, 安永照雄, 田邊和裕、次世代シーケンサーによる三日熱マラリア原虫近縁サルマラリア原虫 *P. cynomolgi* のゲノム解読、第 7 9 回日本寄生虫学会大会、北海道、2010.5.20.
- ④. R. Culleton, M. Ndounga, A. Yadava, F. Zeyrek, R. Carter, K. Tanabe. Evidence for the transmission of *Plasmodium vivax* in the Republic of Congo, West Africa. XIVth Int. Congress for Tropical Medicine and Malaria. (Jeju, Korea) 2008.9.30.
- ⑤. H. Sawai, H. Otani, T. Horii, K. Tanabe. Evolution of the merozoite surface protein 1 gene (*msp1*) in *Plasmodium vivax* and related simian malaria parasites. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Hyogo, Japan, 2009.9.9.
- ⑥. T. Hayakawa, R. Culleton, H. Otani, T. Horii, K. Tanabe. Incipient rapid diversification in the evolution of extant malaria parasites. Int. Symp. Protistology, Evolution and Diversity, Tsukuba, Japan, 2008.11.8.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

なし

○取得状況 (計0件)

なし

[その他]

ホームページ等

http://www.biken.osaka-u.ac.jp/act/act_tanabe.php

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田辺 和祐 (TANABE KAZUYUKI)

大阪大学・微生物病研究所・招へい教授

研究者番号：40047410

(2) 研究分担者

安永 照雄 (YASUNAGA TERUO)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：20260630

川合 覚 (KAWAI SATORU)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70275733

早川 敏之 (HAYAKAWA TOSHIYUKI)

京都大学・霊長類研究所・特任助教

研究者番号：80418681

(H21 まで分担者として参画)

澤井 裕美 (SAWAI HIROMI)

東京大学・大学院医学研究科・特任研究員

研究者番号：60377124

(H21 まで分担者として参画)

遠山 知子 (TOYAMA TOMOKO)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員

研究者番号：40456934

(H20 まで分担者として参画)

(3) 研究協力者

橘 真一郎 (TACHIBANA SHIN-ICHIRO)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員

研究者番号：90414630

中村 翔太 (NAKAMURA SHOTA)

大阪大学・微生物病研究所・特任助教

研究者番号：90432434

後藤 直久 (GOTO NAOHISA)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：60448157