

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月1日現在

機関番号：14401
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21570238
 研究課題名（和文）マラリア原虫 SERA 遺伝子ファミリーの多様化による寄生適応と宿主域

研究課題名（英文）The diversity of *Plasmodium* SERA gene family:
 Adaptation of parasitism and host range

研究代表者
 有末 伸子 (ARISUE NOBUKO)
 大阪大学・微生物病研究所・助教
 研究者番号：00242339

研究成果の概要（和文）：宿主の異なる様々なマラリア原虫を用いて SERA の発現解析と遺伝子多型の解析を行った。その結果、赤血球期原虫で発現量が多く、増殖に必須である SERA のレパートリーが霊長類を宿主とする原虫では Group IV に属する SERA 分子であるのに対して、げっ歯類を宿主とする原虫では、Group III に属する SERA 分子と異なっていた。更に霊長類を宿主とするマラリア原虫のいくつかの SERA において、Group IV の SERA 遺伝子の数が多様化していると共に、正の選択を受けている領域が見つかった。SERA は宿主の多様化と共に数を増やし、機能も多様化したことがわかった。

研究成果の概要（英文）：Transcriptional profiles and sequence diversities were analyzed using SERA genes of malaria parasites from a variety of different vertebrate hosts. As a result, we found that the repertoires of SERA genes showing abundant expression and essential for parasite survival were different between primate and rodent parasites. In addition, primate parasites when compared to rodent parasites have larger number of SERA genes and positive selections were detected in the several SERA genes in primate parasites. These findings suggest that SERA genes have acquired multiple functions relevant to the parasite extension of host range.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：マラリア原虫、遺伝子ファミリー、遺伝子多型、SERA、宿主

1. 研究開始当初の背景

Serine repeat antigen (SERA) は熱帯熱マラリア原虫のワクチン候補抗原として知られており、*P. falciparum* の SERA5 を中心に研究が進められてきた。全てのマラリア原虫に SERA は遺伝子ファミリーとして存在し、ファミリーを構成する遺伝子の数が種毎に異

なっていることが知られている。抗原分子の遺伝子ファミリーは宿主免疫応答を回避するためのメカニズムである「抗原変異」を示すことが知られているが、SERA 遺伝子ファミリーは常に同じレパートリーが転写・翻訳され、抗原変異を示さない。また、SERA はシステインプロテアーゼのモチーフを配列

中に有し、それぞれ別のレパートリーが脊椎動物宿主の赤血球からのパラサイトの脱出、媒介蚊の中腸内のオーシストからのスポゾイトの脱出という、増殖に必須な過程で機能していることが解析されている。また霊長類を宿主とするマラリア原虫はげっ歯類や鳥類を宿主とするマラリア原虫よりも多数の SERA 遺伝子を有しており、遺伝子の多様化が宿主域の拡大に影響したことが考えられるが、これまでに研究されていない。

2. 研究の目的

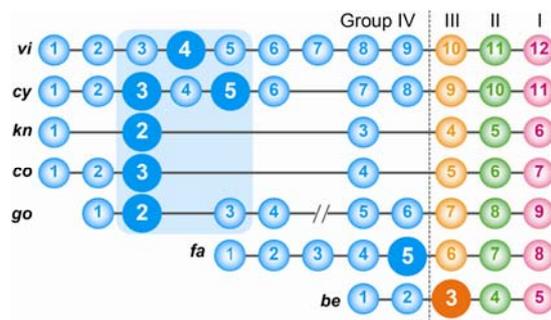
SERA 遺伝子が遺伝子ファミリーとして存在しマラリア原虫の進化に伴い多様化していった要因が、宿主域を広げるためや、宿主からの免疫応答を回避するためのメカニズムを獲得するためであったことを明らかにし、マラリア原虫の宿主適応の分子基盤に対する理解を深めることである。

3. 研究の方法

①マラリア感染血液（後期トロフォゾイトからシゾン期原虫）から mRNA を抽出し、RT-PCR で各 SERA 遺伝子の発現量を比較した。②霊長類とげっ歯類のマラリア原虫数種各 10~13 株について、SERA 遺伝子の塩基配列を決定し、多型解析を行った。③マラリア原虫 8 種のアピコプラストゲノム配列を新たに決定し、進化系統樹推定から、霊長類マラリア原虫の起源を解析した。

4. 研究成果

(1) 発現解析：SERA 遺伝子の発現解析の結果を図 1 に示した。*P. cynomolgi*, *P. knowlesi*, *P. coatneyi*, *P. gonderi*, *P. berghei* について、本研究課題で新たに行った（発表論文③）。図中、*P. berghei* はげっ歯類をそれ以外は霊長類を



宿主とするマラリア原虫である。

図 1 SERA 遺伝子の全レパートリー中に赤血球期に多量に発現する SERA を大きな丸で示した。水色の背景に含まれる遺伝子は単系統群を形成する。vi: *Plasmodium vivax*, cy: *P. cynomolgi*, kn: *P. knowlesi*, co: *P. coatneyi*, go: *P. gonderi*, fa: *P. falciparum*, be: *P. berghei*.

SERA 遺伝子は遺伝的背景から 4 つのグループ(Group I~IV)に分類される。種毎にレパー

トリーの数が異なり霊長類では Group IV SERA 遺伝子の数が多いという特徴がある。Group II~IV SERA 遺伝子は赤血球期に同時に発現が認められるが、発現解析の結果、多量に発現し、機能分子として必要な役割（宿主赤血球からの原虫の脱出）を担っている SERA のレパートリー（図中大きな丸で示した）が霊長類では Group IV の SERA、げっ歯類では Group III の SERA と異なっていた。我々及び他の研究グループが行った遺伝子欠損の実験から、げっ歯類マラリア原虫の *P. berghei* では Group III SERA のみがノックアウト出来ないのに対し、霊長類マラリア原虫の *P. falciparum* では、Group IIIに加えて Group IV SERA である SERA5 もノックアウト出来ないことが解析されており、Group IV SERA が霊長類マラリア原虫において、新たな機能を獲得したと考えられた。

(2) 多型解析： *P. falciparum* 13 株、 *P. vivax* 10 株、 *P. cynomolgi* 10 株、 *P. inui* 13 株、 *P. chabaudi* 12 株から全 SERA 遺伝子配列を決定し、多型解析を行った。塩基多様度 π 、同義置換率 dS、非同義置換率 dN を図 2 に示した。

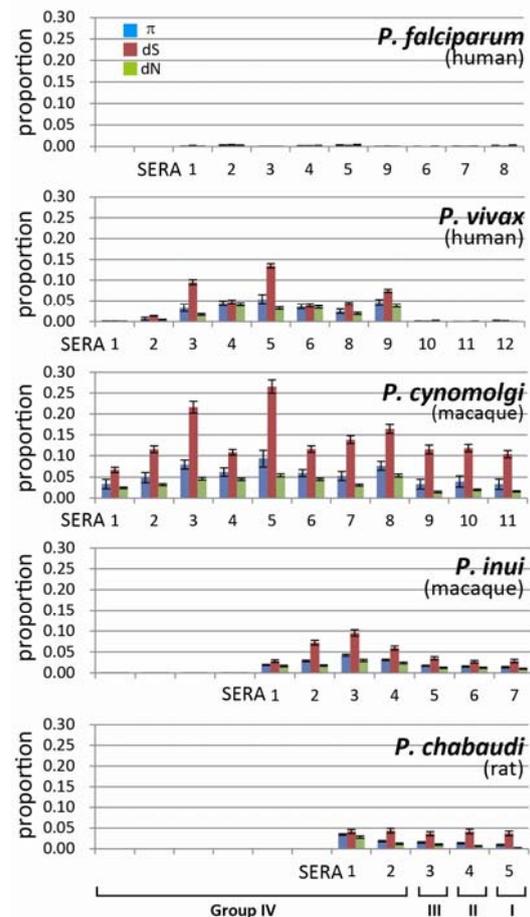


図 2 SERA 遺伝子の多型解析。各値は MEGA5 により算出した。

P. falciparum を除く霊長類マラリア原虫について、Group IV SERA で多型を示すパラメー

タの各値が比較的高いことが解析された。しかし、いずれの SERA についても、 $dS > dN$ であり、特に宿主からの免疫圧を受けている痕跡はなかった。図 3 に SERA のドメイン構造を示す。

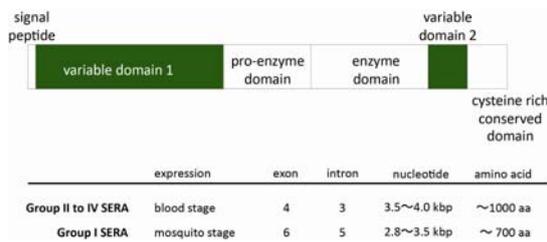


図 3 SERA のドメイン構造

SERA は N 末にシグナルペプチド、中央部システインプロテアーゼドメインがあり、その両側に種内、種間で配列の相同性が低いバリエーション領域がある。C 末にはシステインを多く含む種内、種間で配列が良く保存されているドメインがある。この構造は全ての SERA で共通であるが、蚊を宿主とするステージで発現する Group I SERA では、シグナルペプチドに続くバリエーションドメイン 1 が Group II~IV SERA に比べて短いという特徴がある。スライディングウィンドウの手法を用いて遺伝子の細かい領域毎の塩基多様度 π の値を求め、値の変化を観察した。

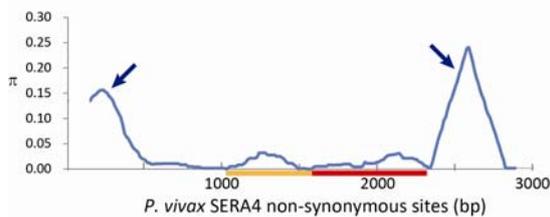


図 4 *P. vivax* SERA4 のスライディングウィンドウ解析。ウィンドウサイズ 200 bp、ステップサイズ 10 bp、非同義置換 (dN) サイトのみを使用。DnaSP ver5 により解析した。

その結果、図 4 のように、バリエーションドメイン領域において、塩基多様度 π の値が高いピークがあることが判明し、このような領域では dN の値が dS より統計的に有意に高かった ($dN > dS$)。このようなピークは図 4 に示した *P. vivax* SERA4 以外にも、*P. vivax* SERA3, 5, 6, 9, *P. cynomolgi* SERA 3, 4, 5, 6, 8, *P. inui* SERA2, 3, 4 においても観察された。これらはいずれも霊長類マラリア原虫の Group IV SERA 遺伝子である。これらの領域は宿主からの免疫圧を受けていることが考えられ、霊長類マラリア原虫の SERA は同じ分子中に多型が高い抗原ドメインと多型が低い機能ドメインが混在していることが判明した。同じ霊長類マラリア原虫でも *P. falciparum* の SERA 遺伝子では、多型を示すサイトは非常

に少なく、他の霊長類マラリア原虫とは異なる挙動が示された。*P. falciparum* の他の抗原、例えば *msp1* (発表文献②) や *ama1* などは抗原多型が非常に高いことが知られており、SERA の低い多型は希少な例外である。*P. falciparum* の SERA5 は我々のグループを中心にマラリアワクチンとして開発が進められている (発表文献④)。SERA5 抗体価は感染防御と密接に関係することが解析されているが、感染を繰り返しても SERA 抗体の陽転率は決して高くない。(40 歳以上の流行地居住者で 50% 程度) SERA5 は感染時に大量に血流に放出される抗原であるにも関わらず、宿主免疫システムが反応しないことを意味しており、SERA は宿主免疫反応を回避する何らかのメカニズムを持っていることが示唆され、それを調べることは今後の課題である。(3) 霊長類マラリア原虫の系統位置：新規に 16 種のマラリア原虫からアピコプラストゲノム (~35 kbp) を解読し、霊長類マラリア原虫の系統位置を再解析した。

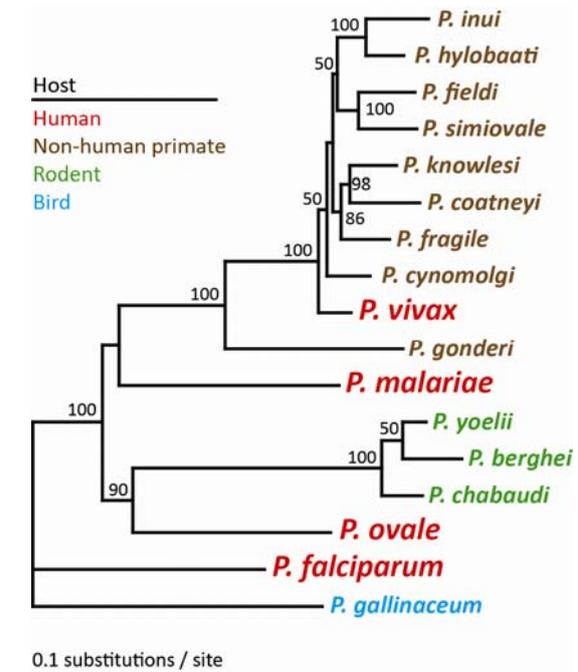


図 5 マラリア原虫の進化系統樹。アピコプラストゲノムにコードされている 30 タンパク遺伝子により推定。RaxML ver. 7.2.6 使用。

この解析により、これまで系統位置が明確にされていなかった卵形マラリア原虫がげっ歯類マラリア原虫と共通祖先を持つことを示せたことは大きな成果である (発表論文⑦)。図 5 の系統樹に示したように、霊長類マラリア原虫は単系統にはならずその起源が一つではないことがわかる。しかしながらどの霊長類マラリア原虫でも Group IV SERA 遺伝子の数はげっ歯類や鳥類を宿主とする

マラリア原虫よりも多く、機能も多様化しており、SERA の多様化に宿主域の拡大が関係していたことが示された。

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 8 件)

- ① Hyakawa, Shin-Ichiro Tachibana, Kenji Hikosaka, Nobuko Arisue, Atsushi Matsui, Toshihiro Horii, Kazuyuki Tanabe, Age of the last common ancestor of extant *Plasmodium* parasite lineages. *Gene* (査読有) 502:36-39, 2012
- ② Nobuko Arisue, Tetsuo Hashimoto, Hideya Mitsui, Nirianne M. Q. Palacpac, Akira Kaneko, Satoru Kawai, Masami Hasegawa, Kazuyuki Tanabe, Toshihiro Horii, The *Plasmodium* apicoplast genome: conserved structure and close relationship of *P. ovale* to rodent malaria parasites. *Mol. Biol. Evol.* (査読有), in press, Epub ahead of print, Mar. 27, 2012
- ③ Kazuyuki Tanabe, Nobuko Arisue, Nirianne M.Q. Palacpac, Masanori Yagi, Takahiro Tougan, Hajime Honma, Marcelo U. Ferreira, Anna Färnert, Anders Björkman, Akira Kaneko, Masatoshi Nakamura, Kenji Hirayama, Toshihiro Mita, Toshihiro Horii, Geographic differentiation of polymorphism in the *Plasmodium falciparum* malaria vaccine candidate gene SERA5. *Vaccine* (査読有) 30:1583-1593, 2012
- ④ Fadile Yildiz Zeyrek, Nirianne Palacpac, Fehmi Yuksel, Masanori Yagi, Kaori Honjo, Yukiko Fujita, Nobuko Arisue, Satoru Takeo, Kazuyuki Tanabe, Toshihiro Horii, Takafumi Tsuboi, Ken J. Ishii, Cevayir Coban, Serologic markers in relation to parasite exposure history help to estimate transmission dynamics of *Plasmodium vivax*. *PLoS One* (査読有) 6:e28126, 2011
- ⑤ Nirianne Marie Q. Palacpac, Nobuko Arisue Takahiro Tougan, Ken J. Ishii, Toshihiro Horii, *Plasmodium falciparum* serine repeat antigen 5 (SE36) as a malaria vaccine candidate. *Vaccine* (査読有) 29:5837-5845, 2011
- ⑥ Nobuko Arisue, Satoru Kawai, Makoto Hirai, Nirianne M. Q. Palacpac, Mozhi Jia, Akira Kaneko, Kazuyuki Tanabe, Toshihiro Horii, Clues to Evolution of the SERA Multigene Family in 18 *Plasmodium* Species. *PLoS One* (査読有) 6:e17775, 2011
- ⑦ Hiromi Sawai, Hiroto Otani, Nobuko Arisue, Nirianne Palacpac, Leonardo de Oliveira

Martins, Sisira Pathirana, Shiroma Handunnetti, Satoru Kawai, Hirohisa Kishino, Toshihiro Horii, Kazuyuki Tanabe, Lineage-specific positive selection at the merozoite surface protein 1 (msp1) locus of *Plasmodium vivax* and related simian malaria parasites. *BMC Evol. Biol.* (査読有) 10:52, 2010

- ⑧ Hideya Mitsui, Nobuko Arisue, Naoko Sakihama, Yuji Inagaki, Toshihiro Horii, Masami Hasegawa, Kazuyuki Tanabe, Tetsuo Hashimoto, Phylogeny of Asian primate malaria parasites inferred from apicoplast genome-encoded genes with special emphasis on the positions of *Plasmodium vivax* and *P. fragile*. *Gene* (査読有) 450: 32-38, 2011

[学会発表] (計 13 件)

- ① Nobuko Arisue, Kazuyuki Tanabe, Nirianne M. Q. Palacpac, Toshihiro Horii, Lineage specific evolutionary history of *Plasmodium* SERA gene families. 17th Japanese-German Cooperative Symposium on Protozoan Diseases & Workshop of Gastrointestinal Protozoan Diseases, 2011 年 9 月 13 日、奈良
- ② Nobuko Arisue, Lineage-specific evolutionary history of *Plasmodium* SERA gene families. PAR6-Evolution of Parasitism: The Origin and Diversification. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011 年 9 月 10 日、札幌
- ③ Nobuko Arisue, Tetsuo Hashimoto, Hideya Mitsui, Akira Kaneko, Nirianne M.Q. Palacpac, Masami Hasegawa, Kazuyuki Tanabe, Toshihiro Horii, Phylogenetic analysis of apicoplast genome-encoded genes reveals close affinity of the human malaria parasite, *Plasmodium ovale* with rodent parasites. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011, 2011 年 9 月 9 日、札幌
- ④ 有末伸子、田邊和裕、Palacpac M. Q. Nirianne、堀井俊宏、霊長類マラリア原虫 sera 遺伝子の多型解析. 第 80 回日本寄生虫学会大会、2011 年 7 月 17 日、東京
- ⑤ 有末伸子、Nirianne M. Q. Palacpac、川合 覚、平井 誠、田邊和裕、堀井俊宏、マラリア原虫 SERA 遺伝子ファミリーの系統特異的な進化. 第 9 回 分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、2010 年 10 月 9 日、長崎
- ⑥ Nobuko Arisue, Nirianne M. Q. Palacpac, Satoru Kawai, Makoto Hirai, Kazuyuki Tanabe, Toshihiro Horii, The SERA gene

family from several *Plasmodium* species: Picking important clues for the evolutionary puzzle of this gene family. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2010年9月9日 淡路島

- ⑦ Nobuko Arisue, Tetsuo Hashimoto, Hideya Mitsui, Akir. Kaneko, Masami Hasegawa, Kazuyuki Tanabe Toshihiro Horii, Comparative analyses of the apicoplast genomes from nine *Plasmodium* species. 18th Meeting of the International Society for Evolutionary Protistology, 2010年7月6日、金沢
- ⑧ 有末伸子、Nirianne M. Q. Palacpac、田邊和桁、堀井俊宏、マラリア原虫 sera 遺伝子ファミリーの多型解析. 第79回日本寄生虫学会大会、2010年5月20日 旭川
- ⑨ 有末伸子、橋本哲男、三井英也、ニリアンバラックバック、青枝大貴、長谷川政美、田邊和桁、堀井俊宏、Are the components of apicoplast genomes equal among all *Plasmodium* species? 第32回日本分子生物学会年会、2009年12月9日、横浜
- ⑩ Nobuko Arisue, Nirianne M. Q. Palacpac, Satoru Kawai, Makoto Hirai, Kazuyuki Tanabe, Toshihiro Horii, The SERA gene family: Important clues from several *Plasmodium* species, International Joint Forum on Infectious Disease 2009, 2009年9月16日 Bangkok
- ⑪ Nirianne M. Q. Palacpac, Nobuko Arisue, Kazuyuki Tanabe, Hiromi Sawai, Richard Culleton, Rachanee Udomsangpetch, Jetsumon Sattabongkot, Fadile Zeyrek, Cevayir Coban, Toshihiro Horii, Comparative analysis of human vivax malaria infections in different endemic area. International Joint Forum on Infectious Disease 2009, 2009年9月16日 Bangkok
- ⑫ Nirianne M. Q. Palacpac, Nobuko Arisue, Kazuyuki Tanabe, Hiromi Sawai, Richard Culleton, Rachanee Udomsangpetch, Jetsumon Sattabongkot, Fadile Zeyrek, Cevayir Coban, Toshihiro Horii, Comparative analysis of human vivax malaria infections in different endemic area. The 9th AWAJI International Forum on Infection and Immunity, 2009年9月10日 淡路島
- ⑬ Nobuko Arisue, Nirianne M. Q. Palacpac, Satoru Kawai, Makoto Hirai, Kazuyuki Tanabe, Toshihiro Horii, The SERA gene family: Important clues from several *Plasmodium* species. The 9th AWAJI International Forum on Infection and Immunity, 2009年9月10日 淡路島

〔図書〕(計1件)

- ① Nobuko Arisue, Nirianne M.Q. Palacpac, Kazuyuki Tanabe, Toshihiro Horii, In-Tech open access publisher, Clues to evolution of the SERA multigene family in the genus *Plasmodium*. (2011) page 315-322, In: Gene Duplication / Book 2, edited by: Felix Friedberg, ISBN 978-953-308-57-8,

〔産業財産権〕(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

有末 伸子 (ARISUE NOBUKO)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号：00242339

(2)研究分担者

東岸 任弘 (TOUGAN TAKAHIRO)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号：20379093

堀井 俊宏 (HORII TOSHIHIRO)
大阪大学・微生物病研究所・教授
研究者番号：80142305
(H22 まで研究分担者として参画)

八木 正典 (YAGI MASANORI)
大阪大学・微生物病研究所・特任研究員
研究者番号：60452463
(H22 まで研究分担者として参画)

青枝 大貴 (AOSHI TAIKI)
大阪大学・微生物病研究所・特任助教
研究者番号：10324344
(H21 のみ研究分担者として参画)

(3)連携研究者

田邊 和桁 (TANABE KAZUYUKI)
大阪大学・微生物病研究所・招聘教授
研究者番号：40047410