

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790405

研究課題名（和文） マラリア原虫の抗原多型と遺伝子重複による寄生適応機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the mechanisms that malaria parasites evade from the host's immune system by polymorphism and duplication of immune target genes in malaria species

研究代表者

澤井 裕美 (SAWAI HIROMI)

東京大学・大学院医学系研究科・特任研究員

研究者番号：60377124

研究成果の概要（和文）：本研究は、三日熱マラリア原虫とその近縁サルマラリア原虫における表面抗原分子（MSP-1, CSP）と赤血球侵入に関与する分子（AMA-1）の進化的特徴を明らかにし、マラリア原虫における宿主適応戦略を知る手がかりを得る事を目的とした。MSP-1 は、宿主であるアジアマカク類の適応放散（約 300–600 万年前）と共に多様化が起こった事が示唆された。また、置換するアミノ酸領域やサイトは種間で共通であるが、選択されたアミノ酸は種によって異なり、多様化選択が働く事が示唆された。AMA-1 では、MSP-1 と同様の傾向が見られたが、CSP では繰り返し配列によって多様な宿主からの免疫を回避する機構が発達した可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to elucidate the evolutionary trait of three molecules (MSP-1: merozoite surface protein 1, CSP: circumsporozoite protein, and AMA-1: apical membrane antigen 1) and to obtain clues to understand the adaptation strategy of malaria parasites against their hosts. This study presented evidence of a signature for ancestral positive selection on *mSP1* of malaria parasites. Estimated time frame of these ancestral lineages was between 3.0 and 6.3 million years ago, which coincide well with the period of radiation events of Asian macaques. It is plausible that Asian macaque malaria parasites radiated along with radiation events of host monkey species. I also obtained a signature for diversifying selection at specific amino acid sites in these parasite species. However, amino acid substitutions in these sites/regions greatly differed among the parasite species. Although *ama1* seemed to be similar evolutionary history to *mSP1*, it was suggested that *csp* received the mechanism to evade from the various host's immune system by amino acid repeats.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：原虫・進化

1. 研究開始当初の背景

マラリアはその制圧が求められている重要な感染症で、年間3-5億人が感染し、100万人以上が死亡している。マラリア感染の大きな特徴として防御免疫が容易に成立しない点が挙げられ、この現象にはマラリア原虫の抗原多型が深く関係している。そのため抗原多型の研究は、マラリア原虫の寄生適応機構の解明やワクチン開発、ひいてはマラリア制圧に繋がる。

マラリア原虫の生活環は非常に複雑で、その時期に応じて様々な形態をとり、各ステージで宿主からの免疫回避機構が発達したと考えられる。マラリア原虫はハマダラカの体内では有性生殖を行い（2倍体）、それに続く孢子形成によってスポロゾイト（半数体）と呼ばれる種虫を多数産生する。ハマダラカによってヒト体内に注入されたスポロゾイトは、血流によって肝臓に運ばれ、数分以内に肝細胞に侵入する。マラリア原虫は肝細胞内で増殖を行い、その形態を変えてメロゾイトとなる。肝細胞を破壊して血中に放出されたメロゾイトは赤血球に侵入する。赤血球に侵入したメロゾイトは、輪状態（リング）を経て栄養体（トロフォゾイト）に成長する。ついで分裂体（シゾン）となり複数のメロゾイトが形成される。分裂体の内部で形成されたメロゾイトは赤血球を破壊し、きわめて短時間のうちに新たな赤血球に侵入する。赤血球期のマラリア原虫の一部は性分化を行い、雌雄の生殖母体となる。ヒトの血液と共にハマダラカに吸い込まれた生殖母体は、雌雄の生殖体となって受精し接合体となる（有性生殖）。接合体は蚊の体内で発育を続け、多数のスポロゾイトを産生する。スポロゾイトは唾液腺に集まり、再び吸血時にヒト体内に注入される。

2. 研究の目的

本研究では、マラリア原虫メロゾイトの表面抗原分子であるMSP-1 (merozoite surface protein 1) とスポロゾイトの表面抗原分子であるCSP (circumsporozoite protein)、そしてマラリア原虫の赤血球侵入に関与するAMA-1 (apical membrane antigen 1) の進化的特徴を明らかにすることで、マラリア原虫における宿主適応戦略を知る手がかりを得る事を目的とした。またCSPに関しては、アミノ酸配列が比較的保存された領域と、保存領域に挟まれた繰り返し配列から構成されており、特定のアミノ酸モチーフの繰り返し

配列がマラリア原虫の免疫回避機構に関与すると予想される。CSPの繰り返し配列についても解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 三日熱マラリア原虫 (*P. vivax*) と近縁サルマラリア原虫の *msp1*, *amal*, *csp* 塩基配列決定

マラリア原虫の宿主適応に関連すると考えられる3遺伝子 (*msp1*, *amal*, *csp*) では、これまでに数多くの研究が行われており、*P. vivax* についてはデータベースに塩基配列が複数登録されている。しかし多くのサルマラリア原虫種について、現在の登録数は多くない。また、種分化後に起きた突然変異や繰り返し配列の変化を調べるには、種間だけでなく種内での塩基配列を比較する必要がある。複数個体の *P. vivax* および近縁サルマラリア原虫DNAサンプルを用いて、*msp1*, *amal*, *csp* の塩基配列決定を行った。PCR法によってDNA断片を増幅した後、ダイレクトシーケンシング法およびクローニング法を併用して塩基配列決定を行った。

(2) 系統解析による正の選択が働く時期の推定

P. vivax とその近縁サルマラリア原虫の *msp1*, *amal*, *csp* における進化過程で、特定の時期に正の選択が働いたかを調べる事を目的とし、系統解析を行った。ミトコンドリアゲノムと各遺伝子の同義置換サイトを利

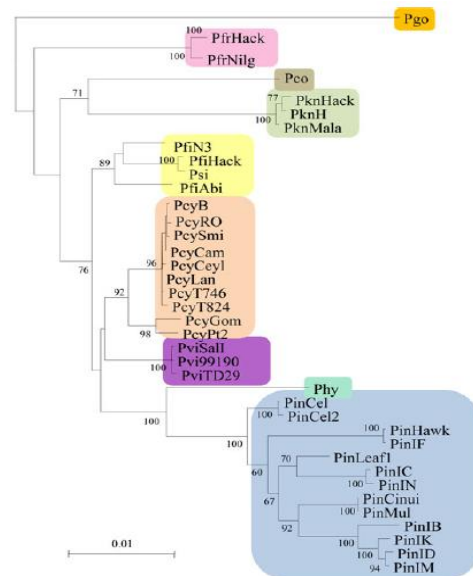


図1 ミトコンドリアゲノムで推定した最尤系統樹

用して系統樹を推定し、種の系統樹の代わりとした(図1)。推定した樹形に対して *mssl*, *amal*, *csp* の塩基配列を用い、各枝での非同義置換率(d_N)と同義置換率(d_S)を推定した。 d_N/d_S 比が有意に1を超えた場合は、その枝で正の選択が働いた可能性を示唆する。また、ミトコンドリアゲノムの系統樹を用いて各枝の時期を推定した。

(3) 多型解析による正の選択が働くサイトの推定

mssl, *amal*, *csp* において正の選択が働くサイトを調べる為、各種について複数の塩基配列を用い、サイト毎に生じた d_N と d_S を推定した。その比(d_N/d_S)が有意に1を超えた場合は、そのサイトで正の選択が働いた可能性を示唆する。*csp* に対しては保存領域でのみ d_N/d_S 比を調べた。

(4) 繰り返し配列の種内・種間比較

点突然変異とは異なり、繰り返し配列は滑りモデルに従って反復単位が重複したり欠失したりして生じる変化だと考えられており、それらは著しい多型を示すことが多い。その為、種内においても数多くのバリエーションが存在する事が予想される。CSP に対して種内における繰り返しモチーフの種類を調べると共に、繰り返し配列における塩基置換の有無を調べた。また種間比較により、*P. vivax* と近縁サルマラリア原虫における CSP 繰り返し配列の系譜を明らかにし、いつどのような選択が働いたかを考察した。

4. 研究成果

P. vivax とその近縁サルマラリア原虫の系統解析から、*mssl* に正の選択が強く働いた時期は、宿主であるアジアマカク類の適応放散の時期(約 300–600 万年前)と概ね一致する事が示された。また、多型解析からは、正の選択が働く領域やサイトは種で共通であるが(図2)、選ばれるアミノ酸は種によって異なり、多様化選択が働く事が示唆された。

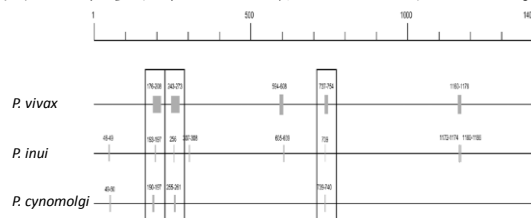


図2 *P. vivax* と近縁サルマラリア原虫 *mssl* における正の選択が働くサイトの比較

amal と *csp* でも *mssl* と同様の解析を行った結果、*amal* では、*mssl* と同様に宿主の適応放散の時期に比較的強く正の選択が働く傾向が見られたが、*csp* では同じ傾向は見られず、*mssl*, *amal* と *csp* では異なるタイプの

選択圧が働く可能性が示唆された。

csp の繰り返し配列に関して、重篤な症状を引き起こす熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*) では繰り返し配列が種内ではほぼ一致しているのに対し、比較的マイルドな症状を示す *P. vivax* とその近縁サルマラリア原虫では、複数のアミノ酸モチーフの組み合わせで繰り返し配列が形成されていた。更に近縁サルマラリア原虫の中でも比較的宿主域の広い *P. cynomolgi* と *P. knowlesi* では、種内でのアミノ酸モチーフの数・モチーフ内での塩基置換が共に数多く見られ、*P. vivax* とその近縁サルマラリア原虫で、繰り返し配列によって多様な宿主からの免疫を回避する機構が発達した可能性が示唆された。

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5件)

- (1) Kazuyuki Tanabe, Toshihiro Mita, Thibaut Jombart, Anders Eriksson, Shun Horibe, Nirianne Palacpac, Lisa Ranford-Cartwright, Hiroimi Sawai, Naoko Sakihama, Hiroshi Ohmae, Masatoshi Nakamura, Marcelo U. Ferreira, Ananias A. Escalante, Franck Prugnolle, Anders Bjorkman, Anna Farnert, Akira Kaneko, Toshihiro Horii, Andrea Manica, Hirohisa Kishino and Francois Balloux. *Plasmodium falciparum* accompanied the human expansion out of Africa. Current Biology (2010) 20: 1283-1289. 査読有
- (2) Hiroimi Sawai, Hiroto Otani, Nobuko Arisue, Nirianne Palacpac, Leonardo de Oliveira Martins, Sisira Pathirana, Shiroma Handunnetti, Satoru Kawai, Hirohisa Kishino, Toshihiro Horii and Kazuyuki Tanabe. Lineage-specific positive selection at the merozoite surface protein 1 (*mssl*) locus of *Plasmodium vivax* and related simian malaria parasites. BMC Evolutionary Biology (2010) 10:52. 査読有
- (3) Hiroimi Sawai, Hie Lim Kim, Kaori Kuno, Sayaka Suzuki, Hideo Gotoh, Masaru Takada, Naoyuki Takahata, Yoko Satta and Fumihito Akishinomiya. The origin and genetic variation of domestic chickens with special reference to junglefowls *Gallus g. gallus* and *G. varius*. PLoS ONE (2010)

- 5(5): e10639. 査読有
- (4) Kenji Hikosaka, Yoh-ichi Watanabe, Naotoshi Tsuji, Kiyoshi Kita, Hiroe Kishine, Nobuko Arisue, Nirianne Marie Q. Palacpac, Shin-ichiro Kawazu, Hiromi Sawai, Toshihiro Horii, Ikuo Igarashi and Kazuyuki Tanabe. Divergence of mitochondrial genome structure in the apicomplexan parasites, *Babesia* and *Theileria*. *Molecular Biology and Evolution* (2010) 27: 1107-1116. 査読有
- (5) Sandra Cheesman, Kazuyuki Tanabe, Hiromi Sawai, Elaine O' Mahony and Richard Carter. Strain-specific immunity may drive adaptive polymorphism in the Merozoite Surface Protein 1 of the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi*. *Infection, Genetics and Evolution* (2009) 9: 248-255. 査読有

[学会発表] (計9件)

- (1) 澤井裕美、ゲノムワイド関連解析による B 型慢性肝炎関連遺伝子の特定、日本人類遺伝学会第 55 回大会 大宮ソニックシティ (埼玉県) 2010 年 10 月 28 日
- (2) 澤井裕美、B 型慢性肝炎と HLA-DP との関連、第 19 回日本組織適合性学会大会 東京大学鉄門記念講堂 (東京都) 2010 年 9 月 18 日
- (3) Hiromi Sawai, 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 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県) 2009 年 9 月 10 日
- (4) 澤井裕美、三日熱マラリア原虫および近縁サルマラリア原虫における MSP-1 遺伝子 (*mSP1*) の種特異的な進化、日本寄生虫学会第 78 回大会 法政大学 市ヶ谷キャンパス (東京都) 2009 年 3 月 28 日

[その他]

ホームページ等

<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/annual.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤井 裕美 (SAWAI HIROMI)
東京大学・大学院医学系研究科・特任研究員
研究者番号: 60377124

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし