

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860308

研究課題名(和文) マラリア原虫の宿主域を規定する分子生物学的基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular basis on the host range in the human malaria parasite Plasmodium vivax

研究代表者

橘 真一郎 (TACHIBANA, SHINICHIRO)

大阪市立大学・大学院理学研究科・特任助教

研究者番号：90414630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトに感染する三日熱マラリア原虫は、旧世界サル類を宿主とするサルマラリア原虫類から派生したと考えられているが、ヒトにしか感染せず、旧世界サル類には感染しない。本研究では、この宿主特異性の分子基盤を明らかにするために、感染に重要な役割を持つ宿主赤血球表面上の受容体(Duffy抗原)と、それに結合する原虫タンパク質(DBP)の特性を調べ、宿主特異性に関与すると考えられる分子変化を同定した。

研究成果の概要(英文)：Plasmodium vivax, the human malaria parasite, is believed to become a parasite of man by host switch from a monkey malaria parasite that infects Asian Old World monkeys. It remains totally unknown why P. vivax infects only human and has lost their infectivity to monkeys. To elucidate the molecular basis of the host specificity, we investigated properties of the Duffy antigen that is a surface receptor on red blood cells in hosts and the Duffy-binding protein (DBP) that is a ligand for the Duffy antigen in the parasite, and identified putative amino acid changes related to the host specificity.

研究分野：寄生虫学

キーワード：三日熱マラリア原虫 サルマラリア原虫 感染能 宿主特異性 DBP Duffy抗原

1. 研究開始当初の背景

マラリアは年間約2億人が感染し、60万人以上が命を落としている人類最大の原虫感染症である。ヒトにおけるマラリアの原因種である4種マラリア原虫(熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、四日熱マラリア原虫、卵形マラリア原虫)のうち、三日熱マラリア原虫は毎年約1億人の感染者をだし、温帯地域におよぶ広範な分布によって、アフリカ以外の地域におけるマラリアの主要原因種となっている。三日熱マラリア原虫は肝臓での休眠期をもつため数カ月から数年後に再発することや、近年出現している薬剤耐性株などの諸問題から重要視されている。にもかかわらず、三日熱マラリア原虫は血液中の赤血球のうち、数%しかない網状赤血球(未熟な赤血球)に寄生するため培養が非常に困難であること、そして感染実験動物(サル)が限定されていることから、別の重要種として知られる熱帯熱マラリア原虫と比べ研究が進んでおらず、効果的な予防法や治療法の発案に繋がる基礎的知見が不足している。

2008年、三日熱マラリア原虫のゲノム塩基配列とともに、同じサルマラリア原虫族に属する人獣共通感染性サルマラリア原虫 *P. knowlesi* のゲノム塩基配列が解読された。しかし、三日熱マラリア原虫と *P. knowlesi* は系統進化的に比較的遠い関係にあり、表現型およびゲノム構造もかなり異なっていたことから、両種間のゲノム比較解析を通して、新たな対策法の開発に結びつくような発見は得られていない。その後申請者らは、系統進化的に最も近縁で、三日熱マラリア原虫の重要なモデル種と位置づけられているサルマラリア原虫 *P. cynomolgi* のゲノム塩基配列を解読し、三日熱マラリア原虫および *P. knowlesi* のゲノム塩基配列との比較解析を行った。その結果、宿主赤血球への結合に関与するタンパク質“DBP(Duffy binding protein)”をコードする *dbp* 遺伝子のコピー数が宿主域

に関係している可能性が示唆された。

系統進化的研究から、三日熱マラリア原虫は他のヒトマラリア原虫と直接の祖先を共有せず、アカゲザル等のマカクサル類を宿主とするサルマラリア原虫の宿主転換により生じたと考えられている。しかしながら三日熱マラリア原虫はマカクサルへの感染能を失っていると考えられている。三日熱マラリア原虫がヒトにしか感染しない原因は明らかになっていないが、申請者らが明らかにしたマラリア原虫のゲノム中の *dbp* 遺伝子の重複(あるいは消失)と宿主域との関係を調べることにより、この原因を解明し、新たな予防法や治療法に繋がる知見を得ることが可能と考えられる。

2. 研究の目的

本研究ではサルマラリア原虫族の宿主赤血球との結合特性および感染性を調べるとともに、関係するマラリア原虫と宿主のタンパク質の特徴を明らかにすることで、宿主域を決めている分子基盤の理解を目指す。そのために以下の課題を実施する。

マラリア原虫感染能の検証

過去に実施例のない *P. vivax* および *P. cynomolgi* のニホンザルおよびカニクイザルへの接種試験を実施し、これらマラリア原虫の宿主域に関する新知見を得る。

宿主赤血球の特性の検証

サルマラリア原虫族の宿主赤血球への結合の標的分子として知られる Duffy 抗原の分子生物学的・生化学的特徴を得る。

宿主特異性に関与する Duffy 抗原と DBP 中の要因の同定

宿主 Duffy 抗原-マラリア原虫 DBP 間の結合特性の変異点を同定する。

3. 研究の方法

マラリア原虫感染能の検証

ニホンザルおよびカニクイザルに *P. vivax*

および *P. cynomolgi* の感染血液を接種し、2 ヶ月間の定期的な血液サンプリングと PCR による原虫陽性率の確認、および経過観察を行い、感染成立の成否を調べる。

宿主赤血球の特性の検証

P. vivax に感染しないと考えられているニホンザルとカニクイザル、および感染することが知られているヨザルおよびリスザルの血液をそれぞれ得、ヒト抗 Duffy 抗体と反応させることでこれらサル類の Duffy 抗原の生化学的特徴を得る。さらに、サル類の Duffy 抗原 DNA 塩基配列情報を公共データベース検索および DNA シーケンシングによって得る。

宿主特異性に関する Duffy 抗原と DBP 中の要因の同定

上述の検証試験によって得られた宿主 Duffy 抗原の生化学的特徴およびアミノ酸配列の比較により、宿主特異性に関する宿主側要因を同定する。さらに、*P. vivax*, *P. knowlesi* および *P. cynomolgi* の宿主域および DBP のアミノ酸配列情報から、宿主特異性に関するマラリア原虫側の要因を同定する。

4. 研究成果

マラリア原虫感染能

ニホンザルおよびカニクイザルへの *P. vivax* の接種による感染は、いずれのサル種においても成立しなかった。一方、*P. cynomolgi* の接種により、両サル種ともに感染が成立したが、寄生赤血球率および症状に違いが見られ、ニホンザルは高感受性を示すことが明らかとなった(下図)。

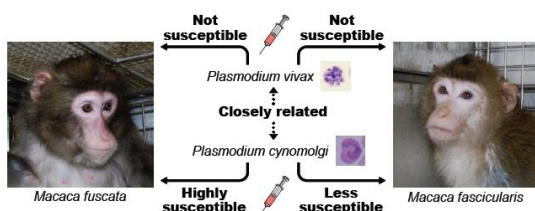


図: *P. vivax* および *P. cynomolgi* の接種に対するニホンザルおよびカニクイザルの感受性(Tachibana et al. 2015. Parasitol. Int., graphical abstract より)

宿主赤血球の特性

Duffy 抗原のタイピングにより、*P. vivax* の感染が成立しないマカクサル類は、Duffy 抗原の N 末 19-26 番目のアミノ酸を認識する Fy6 抗体に対して反応を示さないことが明らかとなった。また、Duffy 抗原のアミノ酸配列比較により、Fy6 抗体の認識部位中の 22 番目のアミノ酸残基が非同義置換を起こしていることが明らかとなり、このことが Fy6 抗体に陰性となる原因と考えられた。

宿主特異性に関する Duffy 抗原と DBP 中の要因の同定

比較解析により、Fy6 抗体の認識部位とサルマラリア原虫類の DBP の結合部位が重複していることが明らかとなった。このことから、上項 のマカクサル類特異的なアミノ酸非同義置換が *P. vivax* の感染防御に関与している可能性が強く示唆された。

また、サルマラリア原虫類の DBP のアミノ酸配列を比較し、*P. knowlesi* および *P. cynomolgi* が Duffy 抗原以外の宿主受容体に結合するタイプの DBP を持っていることが強く示唆された。一方、*P. vivax* には Duffy 抗原結合タイプの DBP しかなく、このことがマカクサル類への感染非成立に関与し、宿主域を規定する要因となっていると考えられる。

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4件)

Chan CW, Sakihama N, Tachibana S-I, Idris ZM, Lum JK, Tanabe K, Kaneko A (2015)

Plasmodium vivax and *Plasmodium falciparum* at the crossroads of exchange among islands in Vanuatu: implications for malaria elimination strategies" PLoS One, 10, e0119475. 査読有

Tachibana S-I, Kawai S, Katakai Y, Takahashi H, Nakade T, Yasutomi Y, Horii T, Tanabe K

(2015) Contrasting infection susceptibility of the Japanese macaques and cynomolgus macaques to closely related malaria parasites, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium cynomolgi*. *Parasitology International*, 64, 274-281. 査読有

Kaneko A, Chaves LF, Taleo G, Kalkoa M, Isozumi R, Wickremasinghe R, Perlmann H, Takeo S, Tsuboi T, Tachibana S-I, Kimura M, Björkman A, Troye-Blomberg M, Tanabe K, Drakeley C (2014) Characteristic age distribution of *Plasmodium vivax* infections after malaria elimination on Aneityum island. *Infection and Immunity*, 82, 243-252. 査読有

Tanabe K, Jombart T, Horibe S, Palacpac NMQ, Honma H, Tachibana S-I, Nakamura M, Horii T, Kishino H, Mita T (2013) *Plasmodium falciparum* mitochondrial genetic diversity exhibits isolation-by-distance patterns supporting a sub-Saharan African origin. *Mitochondrion*, 13, 630-636. 査読有

[学会発表](計4件)

橘真一郎, 川合覚, 片貝祐子, 高橋英夫, 中出亮, 保富康宏, 堀井俊宏, 田邊和裕 『アジア旧世界サルが三日熱マラリア原虫の感染を回避する仕組みについて』第84回日本寄生虫学会大会, 杏林大学(東京都三鷹市), 2015年3月

橘真一郎, 川合覚, 塩田正之, 田中昌子, 東岸任弘, 田邊和裕 『三日熱マラリア原虫のヒト特異的な感染の理解に向けた生化学的アプローチ』第11回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム, 長崎大学(長崎県長崎市), 2013年10月

Tachibana S-I, Tanabe K " *Plasmodium cynomolgi* genome sequence provides clues to the host specificity of *Plasmodium vivax* and related monkey malaria parasites" 第86回日

本生化学会大会 International session -Biochemistry toward malaria control-, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2013年9月

橘真一郎, 田邊和裕 『サルマラリア原虫のゲノム解読によって明らかになった三日熱マラリア原虫の宿主特異性の分子基盤に関する手がかり』2013年日本動物学会近畿支部研究発表会, 大阪市立大学梅田サテライト(大阪府大阪市), 2013年5月

6. 研究組織

(1)研究代表者

橘 真一郎 (Tachibana Shin-Ichiro)

大阪市立大学・大学院理学研究科・特任助教

研究者番号: 90414630