

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：82610

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670205

研究課題名(和文) マラリア原虫ゲノムに対する抗マラリア薬の変異原性リスク評価と突然変異導入機序

研究課題名(英文) Mutagenic risk assesment of Anti-Malarial Drugs to Plasmodium Genome and Mechanisms to induce Mutations

研究代表者

狩野 俊吾 (KANO, Shungo)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：50648409

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：熱帯熱マラリア原虫が薬剤耐性を獲得する機序として抗マラリア薬投与による変異誘起の可能性を仮定し、マラリア原虫生体内の突然変異を大腸菌の系で選別するシャトルベクター系を開発した。この系を用いて、化学的突然変異誘起剤ENUならびに抗マラリア薬クロロキン(CQ)存在下で誘起される突然変異スペクトルの違いを見出したが、一方で、大腸菌生体内で不確定的に生じる突然変異と原虫のそれとの区別が煩雑であることが判明した。これを補うべく、コメットアッセイを用いて、CQ存在下でのマラリア原虫のDNA損傷を検出し、突然変異の前駆段階となるDNA損傷が起こりうる条件の選抜に有効であることを確かめた。

研究成果の概要(英文)：To prove the working hypothesis that antimalarial drugs could be mutagenic to the parasite *Plasmodium falciparum*, a shuttle vector system was established, by which neutral mutations in the parasites in vivo that carry the shuttle vector containing the mutation reporter gene *rpsL* are screened using the conventional bacterial system in the presence of streptomycin. This system indeed detected different mutation spectra between control groups and ones exposed either to the chemical mutagen ENU or to the anti-malarial drug chloroquine (CQ). However, it emerged that this system alone was inconvenient for accurately estimating the true mutation frequencies since it was difficult to distinguish mutations occurring in the parasites from those in the bacteria, in which unclear mutations are randomly induced. To compensate for this low reliability, a comet assay was also applied, which was helpful in narrowing down the range of concentrations of CQ to be investigated.

研究分野：進化発生学

キーワード：突然変異 抗マラリア薬

1. 研究開始当初の背景

(1) 熱帯熱マラリアは年間 58 万人の死者を出す感染症疾患であり、実用ワクチンが開発途上である現況では抗マラリア薬の投与が主たる治療法となる。しかし度重なる薬剤耐性原虫の出現によりその有効性が脅かされており、また薬剤耐性が報告されていなかったアルテミシニン系薬剤に対しても、抵抗性を示す原虫の出現が確認されていることから、熱帯熱マラリア原虫の薬剤耐性の獲得機序の解明は急務である。

(2) 幾つかの抗マラリア薬に関してはサルモネラ菌等を用いた変異原性試験で変異原性が弱いながらも見出されており、マラリア原虫への変異原性も考えられる。つまり、抗マラリア薬の投与自体が、条件次第では薬剤耐性獲得に寄与してしまうというリスクへの懸念が生じていた。

2. 研究の目的

以上のような背景のもと、マラリア原虫における突然変異生成機序の解明が薬剤耐性原虫の出現抑制の糸口へと繋がると考え、抗マラリア薬がマラリア原虫ゲノムに対しての変異原性を実際に有するかを検証し、またその変異が生じるカスケードの解明を目的とした。

3. 研究の方法

熱帯熱マラリア原虫が抗マラリア薬を暴露された際の突然変異頻度の変化を測定する系としてシャトルベクター・システムを構築した。

シャトルベクターとしては、熱帯熱マラリア原虫生体内で人工染色体として機能する pFCEN/pFCENv2 ベクター (Iwanaga *et al.* 2012) を採用し、元々大腸菌でのスクリーニング用に組み込まれていたカナマイシン耐性遺伝子に加えて、大腸菌由来の *rpsL* 遺伝子を突然変異レポーターとして組み込んだ (*rpsL* 遺伝子は大腸菌にストレプトマイシン感受性を付与するが原虫の生存には中立である)。このシャトルベクターを熱帯熱マラリア原虫実験株 FCR3 にエレクトロポレーション方で遺伝子導入した。

この遺伝子改変原虫を化学的変異誘起剤 ENU もしくは抗マラリア薬クロロキンに曝露した後、シャトルベクターを回収し大腸菌 (野生型 *rpsL* 欠損株 TOP10) に再び遺伝子導入、ストレプトマイシンの存在 / 非存在下で生じた培養プレート上のコロニー数の比を突然変異頻度として測定した。

また抗マラリア薬が、突然変異生成の前駆段階において観察される DNA 損傷を引き起こすかをコメントアッセイで検証した。

4. 研究成果

遺伝子改変原虫株作製に関しては、人工染色体 pFCEN をシャトルベクターとして採用することで、シャトルベクター保持原虫の選別

用の抗マラリア薬ピリメサミンが不要となることが期待されていた。しかし、選択薬剤無しではシャトルベクターが脱落することが判明し、単一薬剤の長期的暴露による影響を測定するには不向きであるため、暴露実験は比較的短時間 (4 時間 ~ 48 時間) で行うこととし、化学的突然変異誘起剤と知られる ENU ならびに抗マラリア薬クロロキンの変異原性の有無を調べた。

(1) ENU 処理における突然変異頻度及び変異スペクトル

ENU 処理群 (200 µg/ml, 4 時間) は全体の突然変異頻度は対照群と有意差はなかったが、個々の変異スペクトルでは塩基レベルの欠失や 245T>G 変異の上昇がみられた (図 1)。

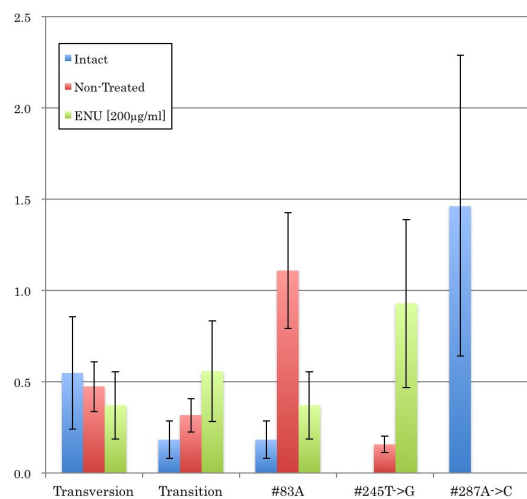


図 1. ENU 処理群における *rpsL* 遺伝子上の変異スペクトル。

縦軸は突然変異頻度を示す (x10⁻⁷)。トランスポージョン/トランジション変異など総体的には有意差がないが (左から 1、2 番目の比較)、個々の変異をみると、原虫生体を介さないベクター (intact)、非 ENU 処理群 (Non-Treated) ではほとんど見られない 245T>G 変異が ENU 処理群 (200 µg/ml) において見出された (左から 4 番目の比較)。

(2) クロロキン (CQ) 処理における突然変異頻度および変異スペクトル

CQ 処理群 (30 nM, 48 時間) に関しては、対照群の突然変異頻度 $6.1 \pm 1.8 \times 10^{-7}$ に対し、 $46.0 \pm 15.6 \times 10^{-7}$ と約 7.5 倍の上昇が確認された (図 2)。

変異レポーター *rpsL* 上の突然変異に関して塩基配列を調べたところ、CQ 30 nM 処理群では一塩基置換変異 217A>C ならびに 167bp の欠損変異が顕著であり、対照群と比べそれぞれが有意に上昇していることが判明した。同様の変異スペクトルは対照群では検出されなかったことから、上述の変異はクロロキンにより誘発される突然変異だと思われる。

しかし、再現実験では突然変異頻度の上昇は試行毎に異なり、時として対照群の方がよ

り高い突然変異頻度を呈する場合もあった。*rpsL* 遺伝子座における PCR 長や塩基配列を調べたところ、トランスポゾンの挿入頻度が一定ではなく、単一コロニーが偏って増殖したと考えられる場合等も見出せた。大腸菌によるクローニングで得られた(原虫を介さない)シャトルベクターを用いて大腸菌の突然変異スペクトルを調べたところ、特にトランスポゾンが関与すると思われる変異が変異全体の 0-20%と試行毎にばらつきがあることが判明した。

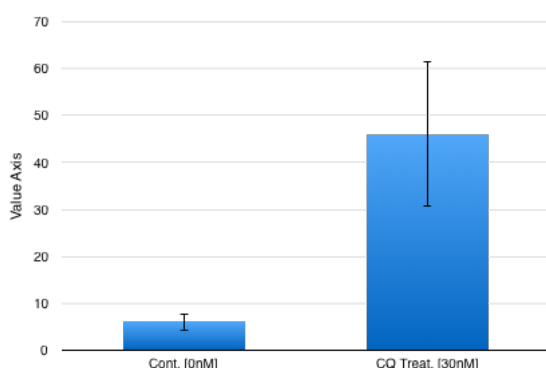


図2. CQ処理群における突然変異頻度
縦軸は突然変異頻度を示す (x 10⁻⁷)。)

(3) コメットアッセイ法によるクロロキン暴露下における DNA 損傷の検出。

突然変異頻度は偶発的要因の影響を受けるため、2つの *in vivo* の系を介した検出系では偶発的要因による測定誤差が大きくなりスクリーニングには向かないと考え、抗マラリア薬への暴露によりマラリア原虫ゲノムに DNA 損傷が生じるか否かをコメットアッセイによりスクリーニングできるか検討を行った。

熱帯熱マラリア株 FCR3 トロフォゾイト期に対して CQ 濃度 0, 30, 300, 3,000nM, 4 時間の処理を行い、洗浄後直ちにコメットアッセイを行ったところ、300nM, 3,000nM 処理群において明瞭な DNA 損傷がコメット像として確認された。また DNA 損傷の程度をスコア化した際にも対照群に対して有意な差が認められたが、30nM 処理群では有意な差認められなかった(図3)。

4 時間のクロロキンへの暴露に関しては、100nM 程度までの濃度では細胞毒性をほとんど示さないが 300-500nM に至ると約 30%の成長阻害率を示すことが知られており (Yanou et al. 1983; Ch'ng et al. 2010; 2011; 2014) また修復酵素 hOGG1 とコメットアッセイを組み合わせた実験で酸化損傷が CQ30nM の暴露で引き起こされてうること予備的にわかっているため、CQ 暴露による DNA 損傷と突然変異頻度の相関を調べるためには CQ30-300nM の範囲を精査していけば良いことがわかった。

これまでにマラリア原虫生体に対する CQ の変異原性に関する報告はなかったが、本研究では CQ が熱帯熱マラリア原虫生体内で DNA

損傷を誘引しうることが明らかになった。一方で、実際に突然変異と結びつくにはコメットアッセイで明瞭に検出できない程の微小な DNA 損傷で十分である可能性が示唆され、またそのカスケードとして酸化損傷は一つの要因として考慮するに値すると思われる。

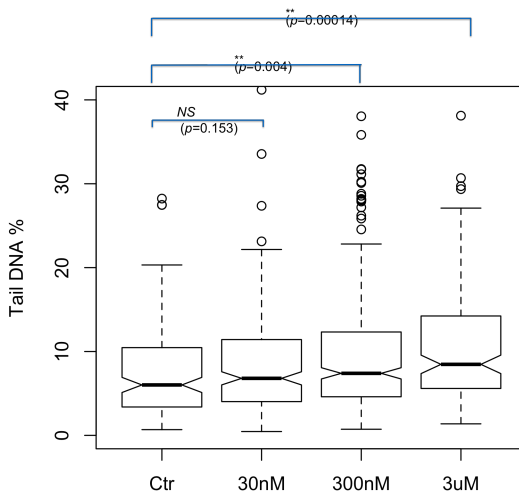


図3. CQ 処理 4 時間後の DNA 損傷の検出。

コメットアッセイによって得られたコメット画像より DNA 損傷に由来すると考えられるコメットテイルの割合をスコア化した。有意差検定には Wilcoxon Test (Mann-Whitney Test) を用いた。

(4) 今後の課題。

本研究で構築されたシャトルベクター系で測定される、コロニー数の出現数に基づく突然変異頻度に関してはランダムに生じるノイズが無視できないほど大きく、微小な突然変異を捉えるのは困難であることが判明した。この要因としては 1) 検証した外部要因(薬剤濃度・処理時間)が明確な差異を生じさせるためには不十分であった可能性、2) 実験系のデザインが原虫での突然変異を拾うために不十分であった可能性が考えられる。

前者に関しては、前出の人工染色体 pFCEN の維持が期待していたことではなかったため技術的制約も受けているが、コメットアッセイ法などを組み合わせることである程度補えると期待できる。

気をつけるべき事項として、原虫生体内で生じたレポーター遺伝子上の DNA 損傷が突然変異として固定されずとも、大腸菌内に遺伝子導入した際に大腸菌生体内で固定され、結果として遺伝子頻度として測定されてしまう場合を挙げており (Burkhart 2000, Nature Biotech vol18. pp21-22) 本研究において原虫から DNA を調整する過程における回復期に関する条件検討をより詳細に行うべきだったであろう。

これらの技術的課題に関してはレポーター遺伝子配列を決定した上で突然変異スペクトルとして検出することである程度解消

はできる（生じたスペクトルの違いを確認する）と予想したが、いずれの場合も実際の処理量が増すことになり、「簡便にスクリーニング」という目的には達していない。

実験系のデザイン上の懸念に関しては、エピソーマルなシャトルベクターではなく、ゲノムにインテグレートした変異レポーターの回収により解消できた可能性がある。出芽酵母では、DNA複製のタイミングと突然変異率の相関、すなわち、染色体上の端部におけるDNA損傷に関して突然変異率が上がる（Lang and Murray, 2011）。このことはBopp et al. (2013)が観察したマラリア原虫における新規突然変異の導入率に関して説明できうる。つまり、本研究において用いたエピソーマルに維持されるシャトルベクターでは、通常の修復機構が働いてしまい、それより以前に入ったDNA損傷の度合いをマスクしてしまっている可能性がある。

シャトルベクター回収効率が落ちるものの、変異レポーターへのゲノム上へのインテグレートにより前述の選抜薬剤の添加が不要となるため、目標薬剤の潜在的変異原性の長期的暴露の実験も可能となることが期待できる。

薬剤耐性原虫の出現は、複合的な要因により起こりうる進化の結果であり、1つの要因で全てを説明付けるのはそもそも難しい。ここ1,2年の集団遺伝学的見地から、突然変異頻度の程度は必ずしも薬剤耐性の獲得と相関を示さず、むしろフィールドにおける東南アジアの状況が遺伝的浮動（Genetic Drift）を起こしうる条件に適合して薬剤耐性原虫の頻出に結びついているというのが、最近の論調である（Bopp et al. 2013; Brown et al. 2015）。そのため、遠回りのようだが、少なくとも想定される変異導入過程はある程度絞っておき、モニターできるポイントを増やしておいた上で変異導入機序の一端を捉えてから、実験規模を拡大し選択圧の効果の検証に入ることが、マラリア薬剤耐性原虫の問題への真の取り組みになると思われる。

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）

〔学会発表〕（計1件）

Shungo Kano, Shigeyuki Kano, Kanako Komaki-Yasuda, "A New Shuttle Vector System To Evaluate Potential Mutagenic Risks Of Anti-Malarial Drugs", 25th Annual Molecular Parasitology Vector Biology Symposium, 28 April 2015, Athens, Georgia, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

狩野 俊吾 (KANO, Shungo)

国立国際医療研究センター研究所・研究員

研究者番号：50648409

(2) 研究分担者

駒木 - 安田 加奈子 (KOMAKI-YASUDA, Kanako)

国立国際医療研究センター研究所・室長

研究者番号：50415551