

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590436
 研究課題名 (和文) トリパノソーマのゲノム多様性の分子遺伝学的解析
 研究課題名 (英文) Phylogenetic analyses of the nucleotide sequence diversity in the genome of *Trypanosoma cruzi*
 研究代表者
 奈良 武司 (NARA TAKESHI)
 順天堂大学医学部・准教授
 研究者番号：40276473

研究成果の概要：

シャーガス病の病原体 *Trypanosoma cruzi* は無性分裂を行なう 2 倍性の寄生原虫で、遺伝学的に 6 系統に分類される。*T. cruzi* における遺伝的多様性創出機構を解明することを目的として、*T. cruzi* の dihydroorotate dehydrogenase (DHOD) 遺伝子のコピー数および 1 塩基置換を *T. cruzi* 分離株間で比較した。DHOD 遺伝子は調べた分離株全てで 4 コピー存在し、系統 IIb では DHOD 遺伝子の多型度は分離株間よりも同一個体内に存在する遺伝子コピー間での遺伝的多型度が大きかった。従来 *T. cruzi* では、有性生物に見られるように個体内での遺伝的多様度が極めて小さいと報告されていたが、本研究で初めて無性生物に特有の進化的特徴を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：トリパノソーマ、遺伝的多様性、1 塩基置換 (SNPs)、遺伝子重複、ピリミジン合成酵素

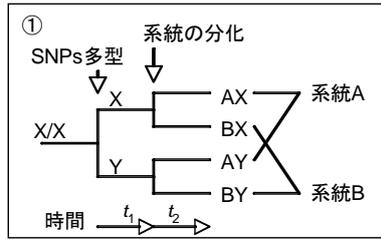
1. 研究開始当初の背景

中南米に広く分布する風土病、シャーガス病は、多様な病態を示す疾患である。急性期では心筋炎が致命的になるほか、急性期を経ずに感染後 10 数年経って心筋炎や巨大結腸を発症する場合 (慢性期シャーガス病) や、

一生無症候のまま経過する場合もある。このような病態の多様性は、宿主であるヒトおよび病原体である寄生原虫 *Trypanosoma cruzi* 双方の遺伝的多様性とその成因として考えられているが、これらの関連を示す明確な証拠は挙っていない。

一般に、無性生物では性を介した遺伝子組

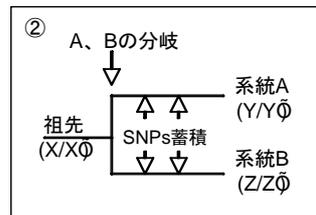
換えが起こらないため、一旦生じた変異は世代を超えて保存されることになる。



したがって、理論的には「個体内では遺伝子コピー間の塩基多型度は大きくなる」ことが予想される (図①)。

一方、*T. cruzi* は2倍性の無性生物であり、単一遺伝子の多くは個体内で2コピー存在する。また、*T. cruzi* は遺伝的に6系統 (I、IIa~IIe) に分類される。その特徴として、

(1) 系統間で塩基多型度が大きい一方、(2) 個体内では単一遺伝子のコピー間の塩基配列は全く同一か、塩基置換はあっても著しく少ないことが報告され



ている。(2) の特徴は、アレル間で頻繁に組換えが起きている可能性を示し、性を持つ2倍性生物に見られる典型的な遺伝子パターンに一致する (図②)。

したがって、*T. cruzi* は無性生物でありながら、遺伝学的には有性生物の特徴を示すという、矛盾した特徴を示す。これは (1) *T. cruzi* において有性生殖あるいは減数分裂を伴わない遺伝子組換えが頻繁に起きているか、(2) これまでの解析が不十分で、実際には図①に示すような塩基置換の蓄積が起きていることを見逃している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

病原体における遺伝的多様性の創出機構の解明は、薬剤耐性の出現機構や多様な病態の成因を考える上で非常に重要である。上記の背景を踏まえ、本研究では *T. cruzi* における遺伝子の多型解析および分子進化学的解析を行ない、遺伝的多様度を明らかにすることを目的とする。最終的に、*T. cruzi* の遺伝的多様性を生成する遺伝機構のモデルを確立し、集団遺伝学的意義付けと治療薬開発への応用について考察する。

3. 研究の方法

ピリミジンヌクレオチド合成経路の第4酵素 dihydroorotate dehydrogenase (DHOD) 遺伝子をモデル遺伝子として、*T. cruzi* 分離

株より DHOD 遺伝子の単離・同定を行なった。用いた *T. cruzi* 株は、SylvioX10 CL4 (系統 I)、CANIII CL2 株 (系統 IIa)、Esmeraldo CL3 および Y CL2 (系統 IIb)、Tulahuen および CL Brener (ともに系統 IIe) である。このうち系統 IIe は、IIb と IIc のハイブリッドと考えられている。各 *T. cruzi* 株より DNA を抽出し、ゲノム DNA ライブラリーを作製した。得られたゲノム DNA ライブラリーについて、DHOD 遺伝子をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行ない、陽性 DNA クローンを複数得た。各 *T. cruzi* 株について DHOD 遺伝子の制限酵素地図を作製し、タイピングを行ない、それぞれのタイプについて DHOD 遺伝子の塩基配列を決定した。なお、Tulahuen 株では DHOD 遺伝子は3コピー存在し、コピー間で複数の塩基置換があることをすでに報告している (*Parasitol Int*, 55:11-16, 2006)。また、CL Brener 株は *T. cruzi* ゲノムプロジェクトの標準株であり、同ゲノムデータベースに存在する DHOD 遺伝子の配列を検索したが、一部に塩基の重複に伴うフレームシフトと考えられる箇所があり、訂正して用いた

(<http://tcruzidb.org/tcruzidb/>)。

4. 研究成果

ピリミジン合成経路は6段階の酵素反応によってUMPを生成する代謝経路であり、全ての生物にとって不可欠なDNA、RNAの前駆体を供給する。DHODは本経路の第4酵素であり、DHOD遺伝子欠損*T. cruzi*を用いた解析から*T. cruzi*の生存に必須であることを明らかにしている (*J Mol Evol*, 60:113-127, 2005)。本研究ではすでにDHOD遺伝子の塩基配列およびコピー数が明らかとなっているTulahuen、CL Brener株に加え、新たに*T. cruzi*4株を含めてDHOD遺伝子のクローニング、制限酵素地図作成、塩基配列決定、および分子系統学的解析を行なった。

今回用いた*T. cruzi*6株のうち、TulahuenにはDHOD遺伝子が3コピー、それ以外の5株ではそれぞれ4コピー存在することが明らかとなり、塩基配列を決定した計23遺伝子コピー(4コピー×5株+3コピー×1株)の比較からDHODのコード領域942塩基中61箇所の塩基置換が認められた。系統IIbに属するEsmeraldo CL3およびY CL2の間では、同じ塩基配列を持つ遺伝子コピーの存在も明らかとなった。また、系統IIeに属するTulahuenの3遺伝子コピーの塩基配列は、CL Brenerの4コピーのうち3コピーのそれと完全に一致し、TulahuenとCL Brenerが非常に

近縁であることが明らかとなった。

遺伝子多型の背景としては、その遺伝子が進化上淘汰圧を受けているかどうかことが重要である。免疫系の標的となる病原体の表面抗原のようなタンパクでは遺伝子の進化速度が速くなる（正の淘汰圧がかかる）一方で、DHOD のように生存に必須な代謝酵素をコードする遺伝子には進化上強い負の淘汰圧がかかる。その結果、前者ではアミノ酸置換が生じやすく、後者では酵素機能に影響を与えるアミノ酸置換は生じにくいと考えられる。淘汰圧を受けているかどうかは、塩基置換が起きた座位でアミノ酸置換を伴わない置換（非同義置換）と伴う置換（同義置換）との比 (d_n/d_s 比) を求めて検定する。そこで、*T. cruzi* の DHOD 遺伝子にどのような淘汰圧が働いているかを調べるために塩基置換の d_n/d_s 比を求めたところ、

$$d_n/d_s = 0.149 (< 1)$$

となり、DHOD 遺伝子は負の淘汰（機能制約）を受けていることが明らかとなった。

次に、DHOD 遺伝子の塩基配列について近隣結合法を用いた無根系統樹を作成した。その結果、系統 I および系統 IIa の配列はそれぞれ単系統を形成し、系統 I の clade には系統 IIe の配列の一部が含まれた。系統 IIb の配列は系統 IIe の残りの配列とともに単系統群を形成したが、株ごとの単系統性は支持されず、系統 IIb ではむしろ株内の遺伝子コピー間で塩基多型度が大きいことが明らかとなった。また、Esmeraldo CL3 と Y CL2（ともに系統 IIb）の間で同一の配列を持つ遺伝子コピーについては両株の分岐以前にオルソログスであると考えられたが、残りの 3 コピーについてオルソログスなのかパラログスなのかを示すデータは得られなかった。

以上の結果から、*T. cruzi* の個体内（株内）では単一遺伝子のコピー間の塩基配列は全く同一か、塩基置換はあっても著しく少ないとする従来の知見と矛盾し、DHOD 遺伝子に関しては図①に示すような、無性生物に特徴的な塩基多型の創出が起きていることが強く示唆された。

一般に無性増殖を行なう生物では、厳密な意味で相同染色体やアレルといった遺伝学的概念が成立しない。また、*T. cruzi* が 2 倍性の生物であるとする根拠は実は曖昧で、いくつかの単一遺伝子が個体内に 1 対（2 コピー）存在することから提唱されているにすぎず、多くの場合単一遺伝子は「サイズの異なる 2 本の染色体 DNA」上に局在している。したがって、塩基多型の成因として相同組換

えを想定した場合それがどのような機構によって起こるのか全く不明である。一方、本研究で用いた DHOD 遺伝子は個体内（株内）に 4 コピー存在し、それぞれのコピーは異なる染色体 DNA 上に位置することから、単一遺伝子というよりもむしろ *T. cruzi* ゲノムに 2 コピー（2 対）存在する遺伝子と捉えることができる。そのために従来の方法では検出できなかった遺伝子コピー間の塩基置換を検出することができた可能性がある。また、この特徴は解析した *T. cruzi* 全ての系統で保持されていることから、DHOD 遺伝子のコピー数の変動は起こりにくいと予想される。したがって、DHOD を標的とした薬剤開発を進める際に遺伝子重複による薬剤耐性株の出現は低いものと考えられる。

本研究では、DHOD 遺伝子の全てのコピーが系統を超えてオルソログスである証拠は得られず、個体内で遺伝子組み換えが起きている可能性は否定できない。*T. cruzi* の遺伝学的特徴を明らかにするためには今後系統とその株数を増やし、より詳細な解析を行っていく必要がある。

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 7 件）

1. Abdel-Hafeez EH, Kikuchi M, Watanabe K, Ito T, Yu C, Chen H, Nara T, Arakawa T, Aoki Y, Hirayama K. Proteome approach for identification of schistosomiasis japonica vaccine candidate antigen. *Parasitol Int*, 58(1): 36-44, 2009 (査読有)
2. Inaoka DK, Sakamoto K, Shimizu H, Shiba T, Kurisu G, Nara T, Aoki T, Kita K, Harada S. Structures of *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase complexed with substrates and products: Atomic resolution insights into mechanisms of dihydroorotate oxidation and fumarate reduction. *Biochemistry*, 47 (41): 10881-10891, 2008 (査読有)
3. Makiuchi T, Annoura T, Hashimoto T, Murata E, Aoki T, Nara T. Evolutionary analysis of synteny and gene fusion for pyrimidine biosynthetic enzymes in Euglenozoa: An extraordinary gap between kinetoplastids and

diplonemids. *Protist*, 159(3): 459-470, 2008 (査読有)

4. Yamazaki M, Ohwada A, Miyaji A, Yamazaki H, Nara T, Hirai S, Fujii H, Uekusa T, Suzuki M, Iwase A, Takahashi K. Pulmonary paragonimiasis with coincidental malignant mesothelioma. *Intern Med*, 47(11): 1027-1031, 2008 (査読有)
5. Annoura T, Sariego I, Nara T, Makiuchi T, Fujimura T, Taka H, Mineki R, Murayama K, Aoki T. Dihydroorotate dehydrogenase arises from novel fused gene product with aspartate carbamoyltransferase in *Bodo saliens*. *Biochem Biophys Res Commun*, 358(1): 253-258, 2007 (査読有)
6. Makiuchi T, Nara T, Annoura T, Hashimoto T, and Aoki T. Occurrence of multiple, independent gene fusion events for the fifth and sixth enzymes of pyrimidine biosynthesis in different eukaryotic groups. *Gene*, 394:78-86, 2007 (査読有)
7. Nara T, Iizumi K, Ohmae H, Sy O, Tsubota S, Inaba Y, Tsubouchi A, Tanabe M, Kojima S, Aoki T. Antibody isotype responses to paramyosin, a vaccine candidate for schistosomiasis, and their correlations with resistance and fibrosis in patients infected with *Schistosoma japonicum* in Leyte, the Philippines. *Am J Trop Med Hyg*, 76(2): 384-391, 2007 (査読有)

[学会発表] (計 11 件)

1. 稲岡ダニエル健ら、他 15 名 (9 番目). トリパノソーマクルージのジヒドロオロト酸脱水素酵素: 立体構造に基づいて設計された新規阻害剤との複合体構造. 第 78 回日本寄生虫学会大会、東京、2009 年 3 月
2. 牧内貴志、案浦健、橋本宗明、奈良武司、青木孝. トリパノソーマの固有オルガネラ“グリコソーム”の成立起原: 近縁種ディプロネマ類におけるグリコソーム様オルガネラの探索. 第 77 回日本寄生虫学会大会、長崎、2008 年 4 月
3. 稲岡ダニエル健ら、他 10 名 (7 番目). *Trypanosoma cruzi* ジヒドロオロト酸脱

水素酵素の結晶構造に基づいた薬剤設計: 5-ハロゲン及び 5-アルキル誘導体シリーズとの複合体構造. 第 77 回日本寄生虫学会大会、長崎、2008 年 4 月

4. 原國哲也、菊地美穂子、奈良武司、宮田健、平山謙二、新川武. 日本住血吸虫パラミオシン抗原を用いた粘膜ワクチンに関する研究. 第 77 回日本寄生虫学会大会、長崎、2008 年 4 月
5. Nara T. Lateral gene transfer plays a key role in establishing gene fusion in protists. International Symposium on Protist Biology, Tsukuba, 2008 年 3 月
6. Nara T, Annoura T, Sariego I, Inaoka DK, Kita K, Aoki T. Dihydroorotate dehydrogenase of *Trypanosoma cruzi*: A new chemotherapeutic target against Chagas' disease. 第 8 回中米カリブ寄生虫学熱帯医学会議/第 7 回キューバ微生物学寄生虫学会議合同会議、キューバ、ハバナ、2007 年 12 月
7. Annoura T, Sariego I, Nara T, Makiuchi T, Fujimura T, Taka H, Mineki R, Murayama K, Aoki T. Dihydroorotate dehydrogenase arises from novel fused gene product with aspartate carbamoyltransferase in *Bodo saliens*. 第 8 回中米カリブ寄生虫学熱帯医学会議/第 7 回キューバ微生物学寄生虫学会議合同会議、キューバ、ハバナ、2007 年 12 月
8. 奈良武司、飯泉恭一、大前比呂思、Orlando S. Sy、坪田聡一、稲葉裕、坪内暁子、田邊将信、小島莊明、青木孝. フィリピン日本住血吸虫症患者におけるパラミオシンに対する抗体応答と病態との相関. 第 67 回日本寄生虫学会東日本支部会、東京、2007 年 10 月
9. 奈良武司、飯泉恭一、大前比呂思、Orlando S. Sy、坪田聡一、稲葉裕、坪内暁子、田邊将信、小島莊明、青木孝. フィリピン日本住血吸虫症患者におけるパラミオシンに対する抗体応答と病態との相関. 第 48 回日本熱帯医学会、大分、2007 年 10 月
10. 牧内貴志、案浦健、橋本宗明、奈良武司、青木孝. トリパノソーマ科原虫の固有オルガネラ“グリコソーム”の成立起原の解明. 第 6 回分子寄生虫・マラリアフォーラム、松山、2007 年 10 月

11. 奈良武司. トリパノソーマにおける遺伝子水平転移と寄生適応. 日本進化学会第9回京都大会ワークショップ、京都、2007年7月

〔図書〕(計14件)

1. 奈良武司訳. アメーバ症および自由生活性アメーバ感染症. ハリソン内科学 原著第17版、202章. メディカル・サイエンス・インターナショナル (印刷中)
2. 奈良武司訳. マラリア. ハリソン内科学 原著第17版、203章. メディカル・サイエンス・インターナショナル (印刷中)
3. 奈良武司訳. バベシア症. ハリソン内科学 原著第17版、204章. メディカル・サイエンス・インターナショナル (印刷中)
4. 奈良武司訳. リーシュマニア症. ハリソン内科学 原著第17版、205章. メディカル・サイエンス・インターナショナル (印刷中)
5. 奈良武司訳. トリパノソーマ症. ハリソン内科学 原著第17版、206章. メディカル・サイエンス・インターナショナル (印刷中)
6. 奈良武司訳. *Toxoplasma* 感染症. ハリソン内科学 原著第17版、207章. メディカル・サイエンス・インターナショナル (印刷中)
7. 奈良武司訳. 消化管内原虫感染症とトリコモナス症. ハリソン内科学 原著第17版、208章. メディカル・サイエンス・インターナショナル (印刷中)
8. 奈良武司訳. 住血吸虫症とその他の吸虫感染症. ハリソン内科学 原著第17版、212章. メディカル・サイエンス・インターナショナル (印刷中)
9. 奈良武司訳. 条虫類. ハリソン内科学 原著第17版、213章. メディカル・サイエンス・インターナショナル (印刷中)
10. 奈良武司訳. マラリアおよびバベシア症の血液塗抹アトラス. ハリソン内科学 原著第17版、e18章. メディカル・サイエンス・インターナショナル (印刷中)
11. 奈良武司訳. シャーガス病 Chagas' Disease : 診断と管理の進歩. ハリソン内科学 原著第17版、e37章. メディカル・サイエンス・インターナショナル (印刷中)
12. 奈良武司. トリパノソーマ. バイオセー

フティの事典 第8章: 病原微生物の特性と対策. みみずく舎/医学評論社、pp143-145、2008

13. 奈良武司. 赤痢アメーバ. 感染症診断の迅速化を目指して—感染症検査の POCT を中心に—. 臨床と微生物 34 (増):612-615、近代出版、2007
14. 奈良武司. マラリア. 感染症診断の迅速化を目指して—感染症検査の POCT を中心に—. 臨床と微生物 34 (増):616-618、近代出版、2007

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奈良 武司 (NARA TAKESHI)
順天堂大学医学部・准教授
研究者番号: 40276473

(2) 研究協力者

鈴木 重雄 (SUZUKI SHIGEO)
順天堂大学医学部・技術員