

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K07095

研究課題名（和文）加速進化したマラリア原虫を駆使した寄生体適応原理の解明

研究課題名（英文）Clarification of host adaptation mechanisms by using mutator malaria parasite

研究代表者

平井 誠（Hirai, Makoto）

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：50326849

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：脊椎動物（マウス）での適応度を規定する遺伝的因子、特に薬剤選択圧下での適応度を規定する遺伝的因子の特定を試みた。その結果、新規薬剤耐性付与突然変異遺伝子変異を同定し、さらに興味深いことに、耐性の安定化にかかわる新規遺伝子変異（耐性安定化遺伝子変異）の特定に成功した。野生型原虫に薬剤耐性付与遺伝子変異を挿入すると弱い耐性を示すが、さらに耐性安定化遺伝子変異を導入することで、耐性度が上昇した。一方、野生型に耐性安定化遺伝子変異のみを導入した場合は、耐性は見られなかった。以上のことから、耐性安定化遺伝子変異が耐性付与遺伝子変異に作用することで、耐性の上昇と安定化にかかわるものと結論した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、マラリア原虫に薬剤耐性を付与する突然変異遺伝子変異を同定し、さらに耐性の安定化にかかわる新規遺伝子変異（耐性安定化遺伝子変異）の特定に成功した。本研究成果は、耐性安定化遺伝子変異が耐性付与遺伝子変異に作用することで、耐性の上昇と安定化にかかわるものと結論した。これらの結果は、現在問題となるマラリア薬剤耐性を解決するための重要な基礎データであり、耐性原虫の撲滅に寄与する大変重要な知見である。

研究成果の概要（英文）：This study addressed this issue by utilizing a mutator strain of rodent malaria parasite. Initially, we attempted to identify the genetic factors that determine fitness in vertebrates (mice), particularly those under drug selection pressure. As a result, we identified novel mutations in drug resistance-conferring genes, and notably, successfully identified novel mutations in genes associated with resistance stabilization (resistance stabilization gene mutations). When drug resistance-conferring gene mutations were introduced into wild-type parasites, they exhibited weak resistance. However, upon further introduction of resistance stabilization gene mutations, resistance levels increased. Conversely, when only resistance stabilization gene mutations were introduced into wild-type parasites, no resistance was observed.

研究分野：マラリア学

キーワード：マラリア

## 1. 研究開始当初の背景

マラリアの撲滅において、薬剤耐性マラリア原虫の出現と拡散が大きな問題となっている。薬剤耐性原虫の拡散する要因は、薬剤の不適切な使用と薬剤耐性原虫の宿主への適応度にある。

## 2. 研究の目的

一般に、マラリア原虫を含む病原体は、宿主内での適応度(生存率)を犠牲にして薬剤耐性を獲得するものと考えられている。しかし、実際のマラリア流行地では、薬剤耐性原虫は蔓延しており、この事実は、薬剤耐性原虫の適応度を回復させる遺伝的要因の存在を示唆する。本研究は、実験室内進化実験により薬剤耐性マラリア原虫を作成し、原因遺伝子変異を特定するとともに適応度を規定する遺伝的要因を明らかにすることを目的とする。この研究により得られる成果は、宿主・寄生体関係の破綻を狙ったマラリア伝搬阻止法開発へ発展することが期待できる。

## 3. 研究の方法

本研究では、高頻度突然変異ネズミマラリア原虫(ミューテーター)を用いる。ミューテーターは、通常80倍以上の変異率を持ち、マラリア原虫が宿主細胞内で分裂・増殖する過程で様々な遺伝子変異を有する変異体が生まれる。このミューテーター変異体ライブラリーをマウスに接種し、さらに抗マラリア薬を投与することで耐性原虫をスクリーニングする。薬剤耐性原虫集団からクローンを数個単離し、薬剤耐性を持つことが確認できたすべてのクローンについて全ゲノム変異解析を行う。すべてのクローンで共通する非同義置換を抽出し、これを耐性または適応度に関連する候補遺伝子変異とする。野生型原虫に候補遺伝子変異を導入した組み換え原虫を作成し、クローンが薬剤耐性を獲得していることを確認し、薬剤耐性の原因となる遺伝子変異を特定する。さらに、薬剤耐性遺伝子変異を導入した原虫の適応度(マウス体内での増殖率)が低下した場合には、当該原虫にさらに別の候補遺伝子変異を導入し、その適応度を検討する。以上の実験により、薬剤耐性原虫蔓延の原因となる適応度関連遺伝子変異を特定する。

## 4. 研究成果

薬剤として抗マラリア薬ピペラキンを使用し、これをミューテーター感染マウスに連続投与することで、耐性原虫集団を樹立し、6つのクローンを得た。すべてのクローンがピペラキン耐性を示すことを確認した後、全ゲノム変異解析を行い、すべてのクローンで共通した8つの非同義置換を特定し、これを耐性または適応度関連候補遺伝子変異とした(Table 1)。その中に一つ、PbCRT(N3311)を野生型原虫に導入したところ、ピペラキンに対して耐性を示した(Fig.1)。さらに、PbCRT(N3311)変異体は野生型に比べてマウス体内での増殖率が著しく低下した。そこで、この原虫に対して別の候補遺伝子変異A(論文投稿中)を導入したところ、耐性度と増殖率が上昇

した (Fig.1)。興味深いことに、候補遺伝子変異 A のみを野生型に導入した組み換え原虫は、ピペラキン耐性を示さなかった。以上のことは、遺伝子変異 A は PbCRT(N331I) と相互作用することで耐性と適応度上昇に関与することが明らかになった。

Table 1. Eight non-synonymous SNPs conserved in 4 clones of PbMutPPQ-R-P9

SNP site	Chr.	Position	Gene ID	Gene description	Amino acid change	Expression	KO
SNP1	4	552412	PBANKA_041530	exoribonuclease II, putative	K91N	A>S	x
SNP2	7	197615	PBANKA_070480	conserved Plasmodium protein	K349Q	A<S	?
SNP3	8	1048775	PBANKA_082730	tetratricopeptide repeat protein	K864N	A<S	?
SNP4	10	1225025	PBANKA_103130	rhomboid protease ROM8	P435S	A/S	x
SNP5	11	611718	PBANKA_111670	AP-2 complex subunit alpha, putative	L1128I	A/S	?
SNP6	12	722508	PBANKA_121950	chloroquine resistance transporter	N331I	A>S	x
SNP7	13	1765633	PBANKA_134480	conserved Plasmodium protein	R54K	A>S	?
SNP8	14	631065	PBANKA_141720	protein AAP4, putative	I773L	A<S	?

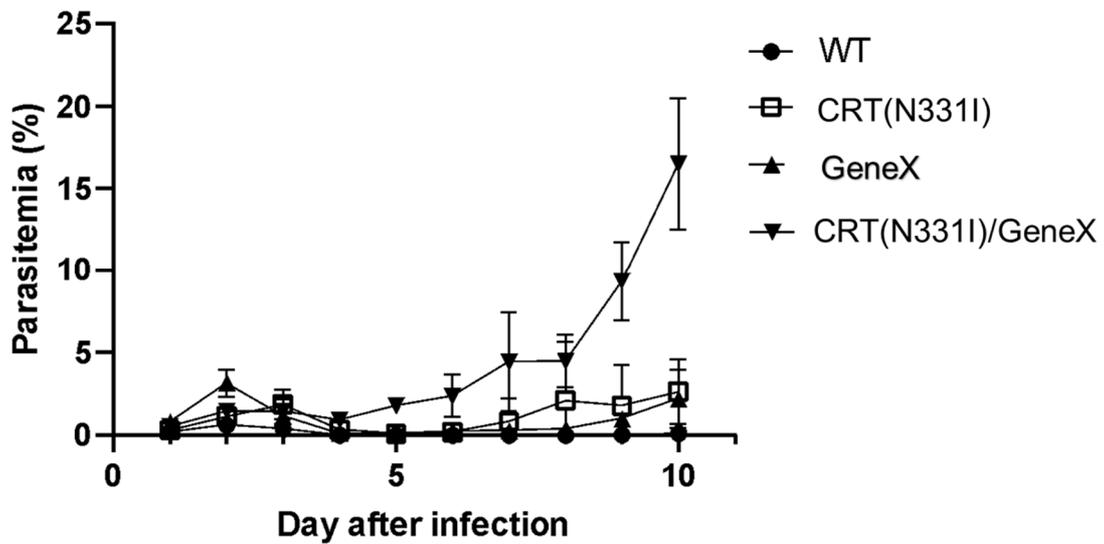


Fig.1

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 5件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Hirai Makoto, Maeta Akimasa, Mori Toshiyuki, Mita Toshihiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Pb103 Regulates Zygote/Ookinete Development in Plasmodium berghei via Double Zinc Finger Domains	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 1536 ~ 1536
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pathogens10121536	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mita Toshihiro, Hirai Makoto, Maki Yoshiko, Nahar Saifun, Yoshida Naoko, Oshima Yoshiteru, Kikuchi Haruhisa, Kubohara Yuzuru	4. 巻 194
2. 論文標題 Derivatives of Dictyostelium differentiation-inducing factors suppress the growth of Plasmodium parasites in vitro and in vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 114834 ~ 114834
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bcp.2021.114834	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamauchi Masato, Hirai Makoto, Tachibana Shin-Ichiro, Mori Toshiyuki, Mita Toshihiro	4. 巻 222
2. 論文標題 Fitness of sulfadoxine-resistant Plasmodium berghei harboring a single mutation in dihydropteroate synthase (DHPS)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Tropica	6. 最初と最後の頁 106049 ~ 106049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.actatropica.2021.106049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ikeda Mie, Hirai Makoto, Tachibana Shin-Ichiro, Mori Toshiyuki, Mita Toshihiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Isolation of Mutants With Reduced Susceptibility to Piperazine From a Mutator of the Rodent Malaria Parasite Plasmodium berghei	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2021.672691	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kubo-Irie Miyoko, Hirai Makoto, Irie Masaru, Mohri Hideo	4. 巻 38
2. 論文標題 Postulated Process of Axoneme Organization in the Male Gametogenesis of Malaria Parasite Plasmodium berghei	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 187-192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2108/zs200064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukuda N, Tachibana S-I, Ikeda M, Sakurai-Yatsushiro M, Balikagala B, Katuro O, Yamauchi M, Emoto S, Hashimoto M, Yatsushiro S, Sekihara Makoto, et al	4. 巻 81
2. 論文標題 Ex vivo susceptibility of Plasmodium falciparum to antimalarial drugs in Northern Uganda	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102277 ~ 102277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2020.102277	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Miotto Olivo, Sekihara Makoto, Tachibana Shin-Ichiro, Yamauchi Masato et al	4. 巻 16
2. 論文標題 Emergence of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum with kelch13 C580Y mutations on the island of New Guinea	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1009133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1009133	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Balikagala Betty, Sakurai-Yatsushiro Miki, Hirai Makoto et al	4. 巻 19
2. 論文標題 Recovery and stable persistence of chloroquine sensitivity in Plasmodium falciparum parasites after its discontinued use in Northern Uganda	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Malaria Journal	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12936-020-03157-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ikeda M, Kaneko M, Tachibana S, Balikagala B, et al	4. 巻 24
2. 論文標題 Artemisinin-Resistant Plasmodium falciparum with High Survival Rates, Uganda, 2014?2016	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Emerging Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 718 ~ 726
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3201/eid2404.170141	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Mori Toshiyuki, Hirai Makoto, Mita Toshihiro	4. 巻 9
2. 論文標題 See-through observation of malaria parasite behaviors in the mosquito vector	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-38529-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sekihara Makoto, Tachibana Shin-Ichiro, Yamauchi Masato, Yatsushiro Shoki, Tiwara Steven, Fukuda Naoyuki, Ikeda Mie, Mori Toshiyuki, Hirai Makoto, Hombhanje Francis, Mita Toshihiro	4. 巻 17
2. 論文標題 Lack of significant recovery of chloroquine sensitivity in Plasmodium falciparum parasites following discontinuance of chloroquine use in Papua New Guinea	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Malaria Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12936-018-2585-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Hayamichi Soki, Ayako Uchida, Meiji Arai, Rie Kubota, Naoaki Shinzawa, Toshihiro Mita and Makoto Hirai
2. 発表標題 Characterization of the mutant with the reduced susceptibility to piperazine from roden malaria parasite, Plasmodium berghei
3. 学会等名 日本寄生虫学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中野 由美子、泉山 信司、平井 誠、川野 哲郎
2. 発表標題 赤痢アメーバミューターを利用したミルテフォシン耐性株の迅速単離と全ゲノム解析による耐性遺伝子変異の同定
3. 学会等名 日本寄生虫学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平井 誠、森 稔幸、美田 敏宏
2. 発表標題 アルテミシニン耐性マーカーKelch13 ネズミマラリア原虫オルソログの機能解析
3. 学会等名 日本寄生虫学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 美田 敏宏、関原 誠、橘 真一郎、山内 祐人、ロベルト アマト、ソムヤ メーラ、池田 美恵、森 稔幸、平井 誠、バリー アリサ、大橋 順、フランシス ホンバンジェ、ミオットー オリボ
2. 発表標題 パプアニューギニアに出現した K13 C580Y 変異熱帯熱マラリア原虫の集団ゲノム解析
3. 学会等名 日本寄生虫学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ochiai S, Hirai M, Mita T, Mori T.
2. 発表標題 Synthetic biotin ligase enables to label surface invasion factors of cultured human malaria parasite, Plasmodium falciparum
3. 学会等名 Annual meeting of American Society of Tropical Medicine and Hygiene (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------