

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007～2008
課題番号：19570218
研究課題名 (和文) マラリア原虫 sera 遺伝子ファミリーの系統進化発生の解明と免疫抗原としての作用
研究課題名 (英文) Phylogenetic analyses of <i>Plasmodium</i> SERA genes and the function of SERA gene families as antigen.
研究代表者
有末 伸子 (ARISUE NOBUKO)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号：00242339

研究成果の概要：

霊長類マラリア原虫 10 種について sera 遺伝子の配列を決定しファミリー構造の解析と sera 遺伝子の系統解析および、発現解析を行った。sera は、シズントが壊裂して原虫感染赤血球からメロゾイトが放出されるプロセスで機能するシステインプロテアーゼである。sera のホモログは全てのマラリア原虫に保存的に存在し、互いに相同性の高い遺伝子がタンデムに並ぶ遺伝子ファミリーを形成していた。遺伝子ファミリーを形成しているマラリア原虫の抗原分子は抗原変異を示す場合が多いが、sera は抗原変異を示さず抗原多型も少ないため有力なワクチン候補抗原であるが、遺伝子ファミリーを形成している理由は解明されていなかった。今回の研究から、sera はマラリア原虫の進化の過程において、重複や欠損をを繰り返していることが明らかになり、げっ歯類マラリア原虫では、sera 遺伝子のレパートリーが 5 つであるのに対して、ヒトを宿主とする三日熱マラリア原虫とサルを宿主とするその近縁種では、遺伝子重複、欠損、フラグメント化、偽遺伝子化が高頻度に生じた結果、SERA 遺伝子数が 6 から 12 と種間で大きく異なることが解析された。また、遺伝子数の変化はプロテアーゼドメインの活性中心がシステインからセリンに置換されている SERA 遺伝子のグループの中で生じていることが系統樹推定から解析された。sera 遺伝子の発現解析からは、シズントの壊裂に関わる sera が、げっ歯類マラリア原虫と霊長類マラリア原虫では異なるグループに属するものであることが観察され、シズントの壊裂という原虫の増殖に必須なプロセスにおいて、霊長類マラリア原虫とげっ歯類マラリア原虫ではその分子機序が異なっていることが示唆された。マラリア原虫の進化の過程において、sera 遺伝子が重複により遺伝子レパートリーを変化させていったのは、多様に変化した宿主赤血球に適応するためであった可能性が高いと考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：マラリア原虫 遺伝子ファミリー 系統進化 転写解析 sera 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* の serine repeat antigen (Pfsera) 遺伝子は第2染色体上にタンデムに並ぶ8個と第9染色体上の1個の合計9個の遺伝子によりファミリーを形成している。このうち第2染色体上の5番目の遺伝子 Pfsera5 がコードする PfSERA5 タンパク質に特異的な抗体はマラリア感染に対して防御的に機能するため、PfSERA5 蛋白質はワクチン抗原として実用化に向けた臨床試験が始まっている。PfSERA5 はマラリアの制圧という使命の中で重要な抗原分子であるが、機能や遺伝的背景など不明な点が多い。*P. falciparum* には遺伝子ファミリーを形成している抗原分子が数多く存在しており、それらは増殖サイクル毎に発現する遺伝子を高頻度で変化させ宿主からの免疫応答を回避するという原虫側に備えられた機構である「抗原変異」に関与していると考えられている。しかし、Pfsera では、ファミリーを形成する9つの sera 遺伝子の中で、常に Pfsera5 の発現が顕著であり、抗原変異を示さないことが解析されている。Pfsera 遺伝子がファミリーを形成している理由は解明されていない。sera 遺伝子はマラリア原虫の進化の過程で遺伝子重複を繰り返し現在観察されるような遺伝子ファミリーを形成したと考えられるが、遺伝子重複が起こるきっかけが宿主からの免疫圧によるものなのか、それとも他の理由によるものであるのかについては解明がされていなかった。

2. 研究の目的

sera 遺伝子を多種多様なマラリア原虫から網羅的に同定し、系統学的な解析を行い、更に、Pfsera5 のように顕著な発現がみられ、重要な機能を有する蛋白質をコードしていると考えられる遺伝子が原虫の進化の過程のどの段階において生じたのかその進化的な位置づけを明らかにすることにより、sera 遺伝子が遺伝子重複により遺伝子ファミリーを形成するに至った理由を解き明かす。つまり、系統解析から、マラリア原虫が共通祖先を有していた時代に生じた sera 遺伝子とそれぞれの種に分岐してから生じた sera 遺伝子が明らかになり、それぞれの種において機能性蛋白質をコードしていると考えられる sera 遺伝子の位置づけを明らかにして、sera 遺伝子ファミリーの発生と宿主-寄生体相互作用の進化との関係について新しい理解を得ることを目的としている。

3. 研究の方法

今回の研究では (1) ゲノムプロジェクトが行われている8種のマラリア原虫に加えて、gDNA が入手可能であった2種のヒトマラリア原虫 *P. malariae* (四日熱マラリア原虫)、*P. ovale* (卵形マラリア原虫) 8種のサルマラリア原虫 *P. coatneyi*, *P. cynomolgi*, *P. simiovale*, *P. fieldi*, *P. fragile*, *P. inui*, *P. hylobati*, *P. gonderi* の合計

10種の霊長類マラリア原虫から sera 遺伝子を網羅的に同定した。これら全てを含めてマラリア原虫の sera 遺伝子ファミリーに含まれる各遺伝子間の系統学的な関係を系統樹推定により解析した。そして、マラリア原虫の sera 遺伝子が現在のようなレパートリーをもつファミリーを形成するまでの進化的な過程や遺伝子ファミリーの発生と宿主-寄生体相互作用の進化との関係について考察した。(2) 感染赤血球が入手が可能であったサルマラリア原虫3種 *P. coatneyi*, *P. cynomolgi*, *P. knowlesi*、および、げっ歯類マラリア原虫 *P. berghei* については mRNA の転写と蛋白質の発現について解析を行い、機能的な蛋白質(プロテアーゼ)として機能している分子を同定し、系統解析の結果と参照して、原虫の進化の過程のどの段階においてその分子をコードする sera 遺伝子が出現したのかを推測した。(3) 世界各地(南米、南アジア、東南アジア)において分離された三日熱マラリア原虫 (*P. vivax*) 10株について、遺伝子ファミリーを形成している12個の sera それぞれの種内多型を解析し、sera が免疫分子として作用しているのかどうかについて考察を行った。

4. 研究成果

(1) マラリア原虫 sera 遺伝子ファミリーの構成

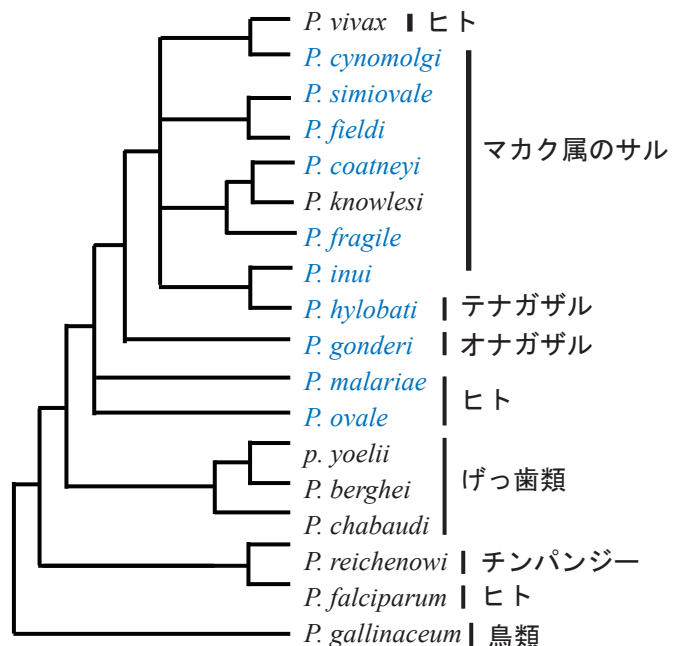


図1 マラリア原虫の系統関係

マラリア原虫の系統関係を図1に示した。本研究課題において sera 配列を明らかにした原虫種は青色で示した霊長類を宿主とする10種である。

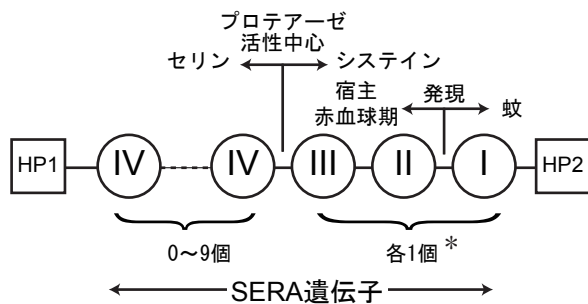


図2 SERA遺伝子ファミリーの基本構造

*トリマラリア原虫 *P. gallinaceum* では、系統樹上で Group II および Group III sera の共通祖先の枝から分岐する sera 遺伝子が1個のみ存在する

2つのHypothetical Protein (HP) 遺伝子の間に4グループ (Group I~IV) に分類される sera 遺伝子が並び基本構造はマラリア原虫種間で保存的であった。図1に示すように、Group I sera の発現は蚊の体内における発育ステージであり、Group II~IV sera の発現は哺乳類宿主の赤血球期であった。また、Group I~III sera はプロテアーゼドメインの活性中心がシステインであるのに対して、Group IV sera ではそれがセリンに置換されているという特徴があった。Group IV sera 遺伝子の数は表1に示すように、種毎に大きく異なり、特に霊長類マラリア原虫の系統において、高度に多様化していることが観察された。また、三日熱マラリア原虫とそれに近縁なサルマラリア原虫の系統 (表1において*で示した10種) では、フラグメント化、欠損などにより完全長ではなくなった sera 遺伝子の断片が数多く存在していたことから、この系統では sera 遺伝子の重複と欠損が高頻度に生じていたと考えられた。

表1 ファミリーに含まれる sera 遺伝子数

	sera 遺伝子の数 (Group IV)	不完全長 sera 遺伝子の数
<i>P. vivax</i>	12 (9)	2
* <i>P. cynomolgi</i>	11 (8)	3
<i>P. simiovale</i> *	9 (6)	3
* <i>P. fieldi</i>	9 (6)	3
* <i>P. coatneyi</i>	8 (5)	3
<i>P. knowlesi</i>	7 (4)	2
* <i>P. fragile</i>	6 (3)	3
* <i>P. inui</i>	7 (4)	5
* <i>P. hylobati</i>	7 (4)	1
* <i>P. gonderi</i>	9 (6)	≥1
* <i>P. malariae</i>	- (≥4)	-
* <i>P. ovale</i>	- (≥2)	-
<i>P. yoelii</i>	5 (2)	0
<i>P. berghei</i>	5 (2)	0
<i>P. chabaudi</i>	5 (2)	0
<i>P. reichenowi</i>	- (≥5)	-
<i>P. falciparum</i>	9 (6)	0
<i>P. gallinaceum</i>	3 (0)	0

* 本研究課題における新規データ
青字は配列データに未確定領域を含む

(2) マラリア原虫 sera 遺伝子の発現解析

マラリア原虫感染赤血球において、シズントからメロゾイトが放出される過程で機能するプロテアーゼであると解析されている熱帯熱マラリア原虫 *P. falciparum* SERA5 は、後期トロフォゾイトからシズントにかけて高発現することが解析されている (Aoki et al 2002 J. Biol. Chem. 277:47533-47540) げっ歯類マラリア原虫 *P. berghei*、サルマラリア原虫 *P. cynomolgi*、*P. coatneyi*、*P. knowlesi* について同時期の各 SERA mRNA の発現量を Taq Man probe 法による Real Time PCR により比較解析しプロテアーゼとして機能していると考えられる sera を同定した。

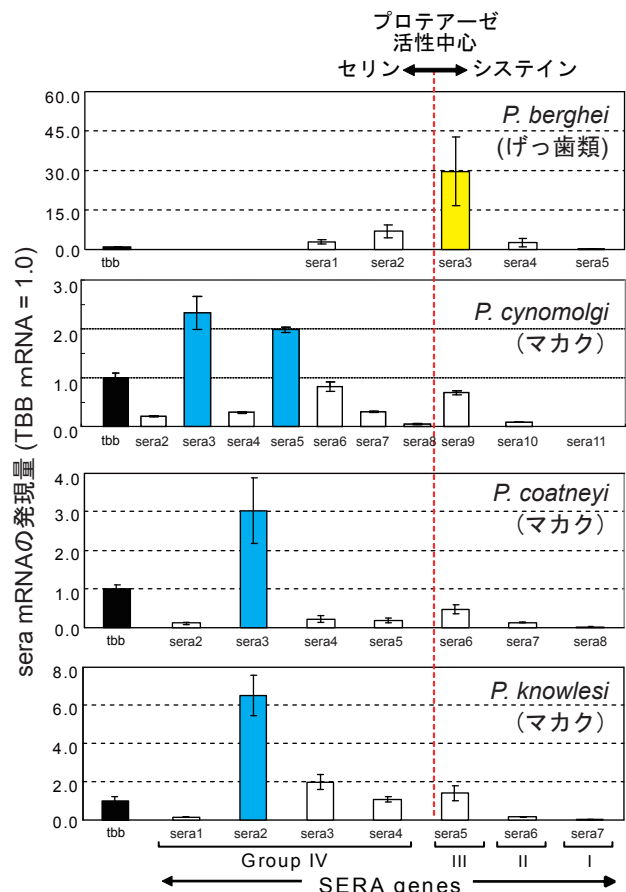


図3 sera 遺伝子の発現解析

恒常的に発現が観察されるβ-チューブリン (tbb) の発現量を 1.0 としたときの各 sera の発現量をその相対量で示した (図3)。高発現量が観察され、プロテアーゼである SERA をコードしていると考えられたのは、げっ歯類マラリア原虫である *P. berghei* では Group III に分類される sera であったのに対して、マカク属のサルを宿主とする3種のマラリア原虫ではいずれも Group IV に分類される sera であり、異なるグループに属する遺伝子であった。

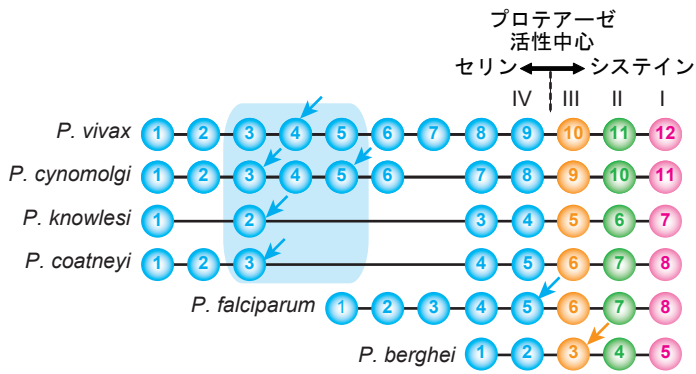


図4 シズント期に高発現量を示したsera遺伝子のファミリー内における位置づけ(矢印)

(3) シズント期原虫において高発現量を示したsera遺伝子の位置づけ

シズント期原虫において、高い発現量を示し、シズントからのメロゾイトの放出という原虫に必須のプロセスに関与する分子をコードしていると推測されるsera遺伝子は、マカク属のサルを宿主とする3種のマラリア原虫 *P. cynomolgi*、*P. coatneyi*、*P. knowlesi* とヒト三日熱マラリア原虫 *P. vivax* (Palacpac et al. 2006, Mol. Biochem. Parasitol. 150:353-358) ではGroup IVの同じサブグループに分類される遺伝子であった(図4、図5の水色で囲んだ系統)。また、霊長類マラリア原虫ではGroup IV sera、げっ歯類マラリア原虫ではGroup III seraと、高発現量を示すseraは異なるグループに属するものであったが、ヒト熱帯熱マラリア原虫 *P. falciparum* ではsera5 (Group IV)と共に、sera6 (Group III)もノックアウト出来ないとされているのに対して、げっ歯類マラリア原虫 *P. berghei* ではSERA3 (Group III)以外のSERAはノックアウトが可能であることを我々は確認した。

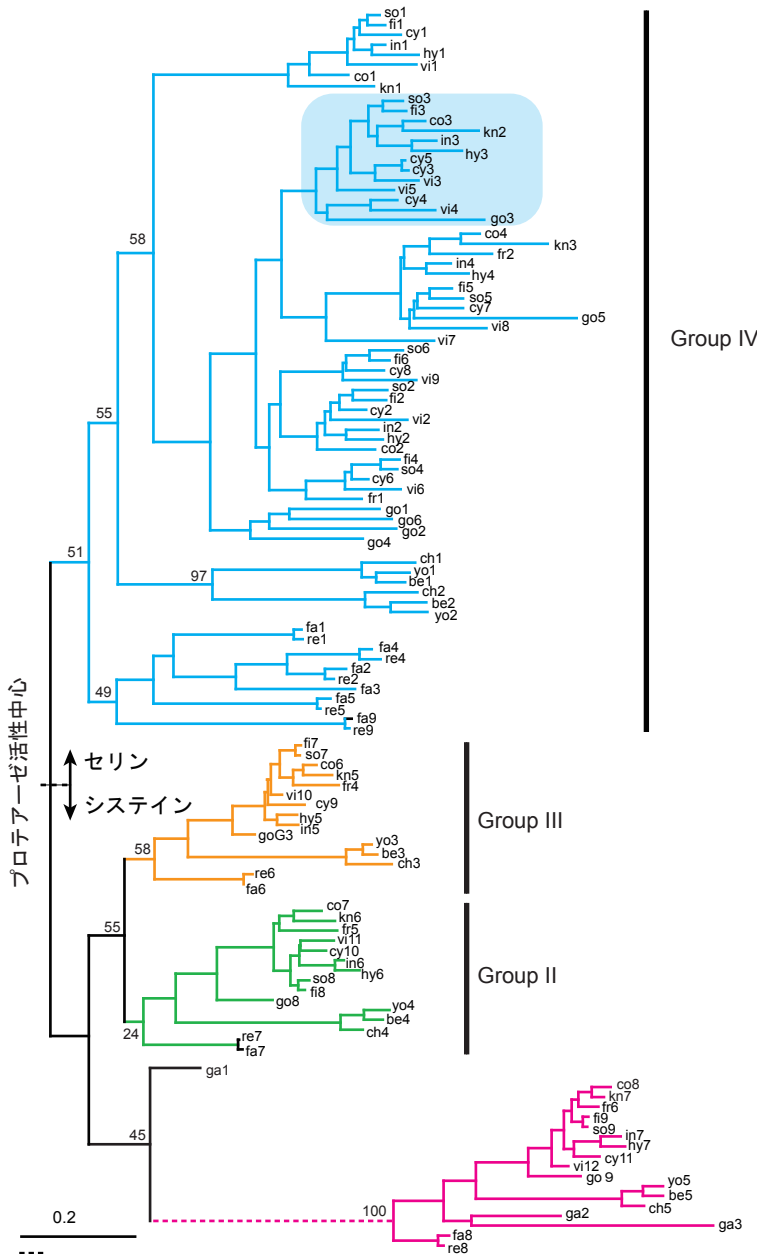


図5 マラリア原虫10種、117sera遺伝子の系統関係

117遺伝子、388座位
JTT + Γ ($\alpha=0.915$) model
PHYMLIP ver 3.7

Group IV

マラリア原虫種	sera遺伝子
<i>P. vivax</i>	Pvi1 - Pvi12
<i>P. cynomolgi</i>	Pcy1 - Pcy12
<i>P. simiovale</i>	Psi1 - Psi9
<i>P. fieldi</i>	Pfi1 - Pfi9
<i>P. coatneyi</i>	Pco1 - Pco8
<i>P. knowlesi</i>	Pkn1 - Pkn7
<i>P. fragile</i>	Pfr1 - Pfr6
<i>P. inui</i>	Pin1 - Pin7
<i>P. hylobati</i>	Phy1 - Phy7
<i>P. gonderi</i>	Pgo1 - Pgo9
<i>P. yoelii</i>	Pyo1 - Pyo5
<i>P. berghei</i>	Pbe1 - Pbe5
<i>P. chabaudi</i>	Pch1 - Pch5
<i>P. reichenowi</i>	Pre1 - Pre8
<i>P. falciparum</i>	Pfa1 - Pfa9
<i>P. gallinaceum</i>	Pga1 - Pga3

Group I

つまり、シズントの壊裂という共通のプロセスにおいて、霊長類マalaria原虫では、Group IV seraとGroup III seraの両方が必須であるのに対して、げっ歯類マalaria原虫ではGroup III seraのみが必須であり、霊長類マalaria原虫とげっ歯類マalaria原虫では異なる分子機序が存在している可能性が示唆された。このことは、seraが遺伝子重複により遺伝子のレパートリーを増やした背景に、シズントの壊裂に関する分子機序の変化が関与したことを示しており、これは、多様に变化した宿主赤血球に対応するために生じたのではないかと考えている。

(4) 三日熱マalaria原虫10株の多型解析

南米株(5)東南アジア株(2)、南アジア株(3)の合計10株について、sera遺伝子ファミリー領域約70kbの塩基配列を決定し、seraのコード領域について多型解析を行っている。詳細な解析はまだであるが、Group I-III seraに比べてGroup IV seraの多型頻度が高いことが解析された。

Group I-III seraは霊長類、げっ歯類を宿主とするマalaria原虫の系統が共通祖先を有していた時代に生じたのに対し、Group IV seraはヒト三日熱マalaria原虫を含むサルマalaria原虫の系統と、げっ歯類マalaria原虫、チンパンジーマalaria原虫とヒト熱帯熱マalaria原虫の系統が分岐した後の遺伝子重複によって各系統で独自に生じた遺伝子群である(Arisue et al. J. Mol. Evol. 2007, 65:82-91)。よって、多型頻度が高いGroup IV seraは抗原としても働いていると考えられ、宿主からの免疫圧の結果、重複によりレパートリーを増やした可能性があるのかもしれない。

抗原としてのseraと遺伝子重複の関係については今回得られた*P. vivax* 10株の配列データを元に今後、解析を行っていく予定である。

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)

[学会発表](計10件)

① 有末 伸子、Nirianne M. Q. Palacpac、川合 覚、平井 誠、田邊 和桁、堀井 俊宏、マalaria原虫SERA遺伝子ファミリーの分子進化 第78回寄生虫学会大会 2009年3月28日 東京

② Nobuko Arisue、Nirianne M. Q. Palacpac、Satoru Kawai, Makoto Hirai, Kazuyuki Tanabe, Toshihiro Horii, Molecular evolution of the malaria vaccine candidate antigen SERA. 2009 International CVRDC-RIMD Joint Symposium 2009年1月9日慶州(韓国)

③ 有末 伸子、Nirianne M. Q. Palacpac、川合 覚、平井 誠、田邊 和桁、堀井 俊宏、マalaria原虫SERA遺伝子ファミリーの分子進化 第31回日本分子生物学会年会第81回日本生化学学会大会合同大会(BMB2008) 2008年12月9日 神戸

④ 有末 伸子、Nirianne M. Q. Palacpac、川合 覚、平井 誠、田邊 和桁、堀井 俊宏、マalaria原虫SERA遺伝子ファミリーの分子進化 第7回分子寄生虫・マalaria研究フォーラム 2008年10月10日松山

⑤ 有末 伸子、Nirianne M. Q. Palacpac、田邊 和桁、堀井 俊宏、霊長類マalaria原虫のSERA 遺伝子ファミリー 第77回寄生虫学会大会 2008年4月4日 長崎

⑥ 有末 伸子、橋本 哲男、早川 敏之、三井 英也、先濱 直子、賈 黙稚、Nirianne M. Q. Palacpac、田邊 和桁、堀井 俊宏、複数遺伝子配列データによるマalaria原虫の系統解析第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学学会大会合同大会(BMB2007) 2007年12月14日 横浜

⑦ 有末 伸子、賈 黙稚、Nirianne M. Q. Palacpac、田邊 和桁、堀井 俊宏、Group I、II および III SERA 遺伝子配列から推定したマalaria原虫の系統関係 第6回分子寄生虫・マalaria研究フォーラム 2007年10月27日 松山

⑧ Nobuko Arisue, Tetsuo Hashimoto, Toshiyuki Hayakawa, Hideya Mitsui, Naoko Sakihama, Mozhi Jia, Nirianne M. Q. Palacpac, Kazuyuki Tanabe, Toshihiro Horii. Phylogenetic relationship of malaria parasites inferred from multiple gene data. The 2nd Thailand-Japan Joint Forum on Infectious Diseases 2007年10月8日 バンコク(タイ)

⑨ Nobuko Arisue, Tetsuo Hashimoto, Toshiyuki Hayakawa, Hideya Mitsui, Naoko Sakihama, Mozhi Jia, Nirianne M. Q. Palacpac, Kazuyuki Tanabe, Toshihiro Horii. Phylogenetic relationship of malaria parasites inferred from multiple gene data. The 7th Awaji International Forum of Infection and Immunity 2007年9月3日 淡路島

⑩ 有末 伸子 マalaria原虫 SERA 遺伝子ファミリーの系統進化 日本進化学会第9回大会 2007年8月31日 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有末 伸子 (ARISUE NOBUKO)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号：00242339

(2) 研究分担者

堀井 俊宏 (HORII TOSHIHIRO)
大阪大学・微生物病研究所・教授
研究者番号：80142305

ニリアン M. Q. パラックパック
(NIRIANNE M. Q. PALACPAC)
大阪大学・微生物病研究所・特任助教
研究者番号：50423108

(3) 連携研究者

田邊 和祐 (TANABE KAZUYUKI)
大阪大学・微生物病研究所・特任教授
研究者番号：40047410