

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20406009

研究課題名（和文）三日熱マラリア原虫感染赤血球表面分子 PvSTP の集団遺伝学解析

研究課題名（英文）Population genetics analysis of *Plasmodium vivax*-infected erythrocyte surface protein PvSTP

研究代表者

金子 修 (KANEKO OSAMU)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：50325370

研究成果の概要（和文）：三日熱マラリア原虫では PvSTP2 が PvSTP1 に比べて転写・翻訳レベルともに多く検出されること。PvSTP2 は感染赤血球膜とシュフナー斑点と呼ばれる感染赤血球の膜直下の構造と共局在を示すこと。PvSTP1 にはヒト免疫によると思われる正の淘汰圧がかかっていること。三日熱マラリア患者は PvSTP1 と PvSTP2 に対する抗体を保有すること。以上を世界で初めて明らかにした。

研究成果の概要（英文）：*Plasmodium vivax* PvSTP2 was detected more abundantly than PvSTP1 at the transcription and translation level. PvSTP2 was located on the parasite-infected erythrocyte surface and colocalized with a Schüffner's dots, dot-like structure observed beneath the parasite-infected erythrocyte membrane. Positive diversifying selection was detected on PvSTP1 gene locus and many Vivax malaria patients possessed antibodies against PvSTP1 or PvSTP2.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2009 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2010 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	13,100,000	3,930,000	17,030,000

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：原虫

1. 研究開始当初の背景

マラリアは世界中で年間 2 - 3 億人の感染者、150 万人の死者を出す重大な感染症である。最も重篤な症状を起こす熱帯熱マラリア原虫に比べて、死亡率が高くない三日熱マラリアは、優先度が低く見られがちであるが、実際は、他の感染症との合併による間接的な死亡や体力低下に伴った生産性の低下による経済的損失が多めで、東南アジアを中心に

非常に問題となっている。マラリア原虫はヒト体内では赤血球内で増殖するが、熱帯熱マラリア原虫は感染した赤血球の表面に原虫由来の接着物質を発現し、脳の末梢血管内壁に接着することで脳症状を起こし、ヒトを死に至らしめる。さらに、熱帯熱マラリア原虫の感染赤血球は血管内皮に接着するだけでなく、未感染の正常赤血球にも接着し（ロゼット形成）、病原性を高める。一方、三日熱マラリア原虫もロゼット形成を起こし、病原

性との関連が予想されているが、詳細はあきらかでない。従来、熱帯熱マラリア原虫の感染赤血球表面に発現している分子の相同体は三日熱マラリア原虫のゲノム上に全く見出されていなかったが、申請者らは熱帯熱マラリア原虫の感染赤血球表面に発現している SURFIN という一回膜貫通型タンパク質の新規リガンド候補分子を見出し、三日熱マラリア原虫にも PvSTP と呼ばれる SURFIN の相同体が存在することを明らかにした。ゆえに、SURFIN/PvSTP ファミリーはマラリア原虫の種を越えて保存し、原虫の生存にとり重要な役割を果たしていると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、流行地の三日熱マラリア原虫集団を用いて、リガンド候補分子である PvSTP に対する選択圧を分子生物学的・集団遺伝学的に明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ゲノム上に2コピー存在する PvSTP (PvSTP1 と PvSTP2) の発現の有無を、流行地で得た三日熱マラリア原虫からの定量 RT-PCR 増幅およびウェスタン解析、間接蛍光抗体法により、転写・翻訳のレベルで検討する。

(2) PvSTP には免疫による選択圧がかかっているかどうかを、多数の三日熱マラリア原虫の流行地株を用いて、集団遺伝学的に検討する。

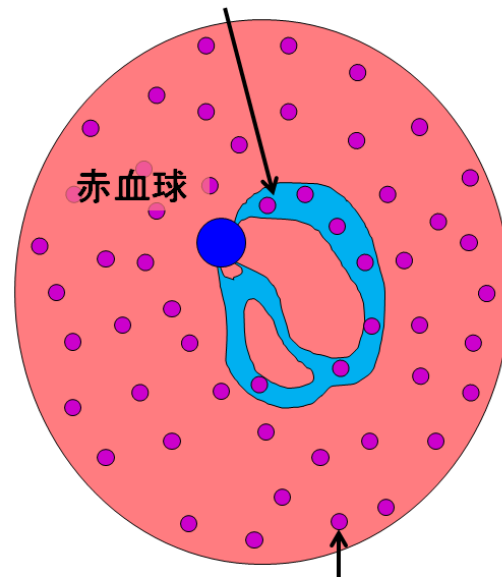
(3) 特定の型の PvSTP が三日熱マラリア原虫の病原性と関連するかどうかを、三日熱マラリア原虫で発現している PvSTP の型と患者の症状 (発熱の有無や原虫感染率等) との間で関連解析をすることで明らかにする。

4. 研究成果

(1) 三日熱マラリア原虫 PvSTP1 と PvSTP2 について定量 RT-PCR 法により転写解析を行ったところ、PvSTP2 は PvSTP1 に比べて数倍～数百倍多く転写されていることが分かった。

(2) 無細胞タンパク質合成系により、PvSTP の細胞外領域の N 末端側 (CRD 領域) および細胞内領域 (WR 領域) について組換えタンパク質を作製し、ウサギに免疫し抗血清を作製したが、ウェスタン解析および間接蛍光抗体法による局在解析では反応性が予想と異なり、非特異的反応である可能性が高いと考えた。そのため、細胞外領域の膜貫通領域

三日熱マラリア原虫



シュフナー斑点 (PvSTP2が局在)

図：マラリア原虫をギムザ染色し、顕微鏡下で観察すると感染赤血球膜にシュフナー斑点が見られる。PvSTP2 はこの斑点と共局在を示す。

に近い部位 (VAR 領域) の組換えタンパク質を作成し、マウス抗血清を作成するのに加え、一部のアミノ酸配列を用いたペプチド抗体も作成した。その結果、VAR 領域に対する抗血清では抗体価の高いものが得られなかったが、ELISA法にてPvSTP1およびPvSTP2のペプチドに対して128,000倍以上の抗体価を示すウサギ抗ペプチド血清を得ることが出来た。ウェスタン解析では、両者ともに予想分子量周囲に反応が見られたが、明瞭なバンドが検出できる PvSTP2 に対して、PvSTP1 のバンドは非常に薄かった。反応性に問題がないとすれば、転写解析の結果と良く合致する。間接蛍光抗体法により局在を観察すると、原虫感染赤血球膜と、膜上の多数の小さな点として反応が見られたが、点状のパターンは、三日熱マラリア原虫感染赤血球をギムザ染色した際に見られるシュフナー斑点に似るため、蛍光抗体反応後にさらにギムザ染色を行い、PvSTP2 の局在をシュフナー斑点の局在と比較したところ、両者の局在は良く一致した (図)。PvSTP1 については、転写量が低いことを反映するのか、ウェスタン解析でも標的バンドは非常に薄く、また、間接蛍光抗体法では明らかな反応が見られなかった。シュフナー斑点は、電子顕微鏡では赤血球表面から内側に陥凹したポケット状構造物として観察され、熱帯熱マラリア原虫でギムザ染色でモラー斑点として見られるモラー裂と相同の構造物と考えられる。熱帯熱マラリア原虫の感染赤血球表面に発現する分子は

原虫からモーラー裂に輸送された後に、赤血球表面に発現すると考えられているため、PvSTP2 とシュフナー斑点との共局在は、三日熱マラリア原虫にも熱帯熱マラリア原虫と似た赤血球分子輸送機構が存在し、PvSTP2 もシュフナー斑点を經由して感染赤血球表面に輸送される可能性を示唆する。このようなユニークな輸送機構は生物学的にも興味深いと共に、創薬の標的となりうるのではないかと考えている。

(3) PvSTP1 についてアジア由来三日熱マラリア原虫 52 株の塩基配列を直接シーケンス法で決定し、複数の型の重複感染が見られる試料についてはプラスミドを用いてクローニングした後に、塩基配列を決定し、70 の塩基配列を得た。PvSTP2 は条件検討を行ったが、現在のところ増幅に成功しておらず、現在のところ理由は明らかでない。PvSTP1 は高度多型を示し、集団遺伝学的解析により、正の淘汰圧がかかっていることが分かった。最終年度にはブラジルの三日熱マラリア原虫の標本を得て塩基配列を決定したところ、多型性の度合いがアジアのものと比較して少ないことが分かった。遺伝子型と発熱・感染率等との関連は見出されなかった。

(4) PvSTP1 と PvSTP2 の各領域で作成した組換えタンパク質を用いて、タイの三日熱マラリア感染患者から得た血清の抗体価を検討したところ、多くの患者がこれらの組換えタンパク質に反応した。しかし、遺伝子型と同様に、抗体陽性率と発熱・感染率等との関連は見出されなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 19 件)

- ① Sungkapong T, Yahata K, Culleton R, Tsuboi T, Torii M, Ruengveerayuth R, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, Kaneko O, Chotivanich K. "Antibody response to *Plasmodium vivax* Subtelomeric Transmembrane Protein (PvSTP), a homolog of *Plasmodium falciparum* SURFIN, in *P. vivax*-infected patients" Joint International Tropical Medicine Meeting 2010 and International Malaria Colloquium 2010、バンコク、タイ、平成 22 年 12 月 1 日-3 日
- ② Kaneko O. "Plasmodium vivax subtelomeric transmembrane protein 2 (PvSTP2), a homolog of *P. falciparum* SURFIN: transcription and localization" XII Brazilian Meeting on Malaria Research、オウロプエルト、ブラジル、平成 22 年 10 月 3 日-6 日
- ③ Sungkapong T, 矢幡一英, Chotivanich K, 金子修 「三日熱マラリア原虫 PvSTP の解析」第 18 回分子寄生虫学ワークショップ、草津、平成 22 年 8 月 2 日-5 日
- ④ Kaneko O. "Plasmodium SURFIN: evolution, polymorphism, and human sera reactivity" Nagasaki Singapore Symposium、シンガポール、平成 22 年 4 月 15 日-17 日
- ⑤ Kaneko O. "Plasmodium SURFIN: evolution, polymorphism, and human sera reactivity" The 4th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases、長崎、平成 21 年 11 月 26 日-28 日
- ⑥ Xangsayarath P, Kaewthamasorn M, Yahata K, Nakazawa S, Kaneko O. "Positive diversifying selection on *Plasmodium falciparum* SURFIN_{4.1}" 第 50 回日本熱帯医学会大会、宜野湾市、平成 21 年 10 月 23 日-24 日
- ⑦ Zhu XT, Kaewthamasorn M, Yahata K, Cao YM, Kaneko O. "Polymorphism patterns of *Plasmodium vivax* subtelomeric transmembrane protein 1 (PvSTP1) among China field isolates". 第 50 回日本熱帯医学会大会、宜野湾市、平成 21 年 10 月 23 日-24 日
- ⑧ Kaewthamasorn M, Yahata Y, Alexandre JSF, Nakazawa S, Torii M, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, Kaneko O. "Diversity of *Plasmodium falciparum* SURFIN_{4.2} in Thai field isolates" 第 50 回日本熱帯医学会大会、宜野湾市、平成 21 年 10 月 23 日-24 日
- ⑨ Xangsayarath P, Kaewthamasorn M, Yahata K, Nakazawa S, Kaneko O. "Positive diversifying selection on *Plasmodium falciparum* SURFIN_{4.1}" The 3rd National Health Research Forum to Support the health research systems strengthening in Lao PDR、ラオス、平成 21 年 10 月 2 日-3 日
- ⑩ 金子修 「マラリア原虫の赤血球侵入・感染赤血球表面の生物学」第 17 回分子寄生虫学ワークショップ、草津、平成 21 年 8 月 7 日-9 日
- ⑪ Zhu XT, Sungkapong T, Kaewthamasorn M, Culleton R, Tachibana M, Tsuboi T, Torii

- M, Yahata K, Cao YM, Chotivanch K, **Kaneko O.** "Plasmodium vivax subtelomeric transmembrane protein 1 (PvSTP1), a homolog of *P. falciparum* SURFIN; polymorphism and human sera reactivity." Vivax Malaria Research III: 2009 and beyond, パナマ, 平成 21 年 5 月 24 日-28 日
- ⑫ Tang J, Yahata K, Torii M, **Kaneko O.** "The diversity of the extracellular domains of *Plasmodium falciparum* SURFIN family proteins; evidence for positive diversifying selection" 第 78 回日本寄生虫学会大会、東京、平成 21 年 3 月 27-28 日
- ⑬ Sungkapong T, Culleton R, Yahata K, Tsuboi T, Torii M, Sattabongkot J, **Kaneko O.**, Chotivanch K. "Characterization of *Plasmodium vivax* subtelomeric transmembrane protein (PvSTP), a homolog of *P. falciparum* SURFIN" 第 78 回日本寄生虫学会大会、東京、平成 21 年 3 月 27-28 日
- ⑭ Kaewthamasorn M, Yahata Y, Alexandre JSF, **Nakazawa S.** Torii M, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, **Kaneko O.** "Positive diversifying selection on *Plasmodium falciparum* SURFIN_{4.2}" 第 78 回日本寄生虫学会大会、東京、平成 21 年 3 月 27-28 日
- ⑮ **金子修** 「マラリアは世界的な問題だけど、科学はどこまで追い詰めてるの？」 第 27 回日本国際保健医療学会西日本地方会、大阪、平成 21 年 2 月 28 日
- ⑯ Zhu XT, Kaewthamasorn M, Yahata K, Cao YM, **Kaneko O.** "Plasmodium vivax subtelomeric transmembrane protein 1 (PvSTP1), a homolog of *P. falciparum* SURFIN, is highly polymorphic" 43rd Annual U.S.-Japan Joint Conference of Parasitic Diseases、東京、平成 21 年 1 月 7-8 日
- ⑰ **金子修**、Kaewthamasorn M、矢幡一英、Alexandre JSF、**中澤秀介**、鳥居本美、Sattabongkot J、Udomsangpetch R 「マラリア原虫感染赤血球表面分子に対する選択圧」 第 49 回日本熱帯医学会大会・第 23 回日本国際保健医療学会学術大会合同大会、東京、平成 20 年 10 月 25-26 日
- ⑱ Kaewthamasorn M, Yahata K, Alexandre JSF, **Nakazawa S.** Torii M, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, **Kaneko O.** "Positive diversifying selection on *Plasmodium falciparum* SURFIN_{4.2}" XVIIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria、韓国、平成 20 年 9 月 29 日-10 月 3 日
- ⑲ Kaewthamasorn M, 矢幡一英、Alexandre JSF、**中澤秀介**、鳥居本美、Sattabongkot J、Udomsangpetch R、**金子修** 「マラリア原虫感染赤血球表面分子に対する選択圧」 第 16 回分子寄生虫学ワークショップ、草津、平成 20 年 8 月 3-4 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 修 (KANEKO OSAMU)
長崎大学・熱帯医学研究所・教授
研究者番号：50325370

(2) 連携研究者

中澤 秀介 (NAKAZAWA SHUSUKE)
長崎大学・熱帯医学研究所・助教
研究者番号：20180268

(3) 研究協力者

Jetsumon Sattabongkot
タイ王国在タイ米国防軍医学研究所・室長
Kesinee Chotivanich
タイ王国マヒドン大学熱帯医学部・准教授
曹雅明
中国医科大学医学部・教授
Marcelo Urbano Ferreira
ブラジル・サンパウロ大学医科学研究所・教授