

機関番号：14401
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008 ~ 2010
 課題番号：20590422
 研究課題名 (和文) 三日熱マラリア原虫で観察される低流行度と高度多重感染のパラドックス
 研究課題名 (英文) How *P. vivax* parasite maintains multiple infection in areas of low intensity malaria?
 研究代表者
 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

研究成果の概要 (和文)：多重感染の状態を保ったままで感染状態を持続させるという三日熱マラリア原虫 (*P. v*) の感染パラドックスを明らかにするために、タイ、トルコ、アフリカから分離した原虫について、6 つの座位の塩基配列を比較した。いずれからも高い多重感染度と多型が観察された。一方、Group IV SERA の多様度が熱帯熱マラリア原虫 (*P. f*) に比べて、200 倍も大きいことが発見された。多重感染を保ったままの状態での感染を持続させるメカニズムの背景には、*P. v* のほうが *P. f* よりも高い原虫集団多様性と、宿主からの高い免疫選択圧の結果であると考えられる。

研究成果の概要 (英文)：In *P. vivax* patients, multiple infection is common even in low infection intensity areas. This study was conducted to understand the paradox. Haplotype diversities and the number of allele of the *Plasmodium vivax* population isolated from Thailand, Turkey and Africa were analyzed using two antigen coding genes (*msp1*, *sera5*) and four microsatellite makers (2.21, 3.35, AT, GT). All parasite samples showed multiple numbers of alleles and high degree of haplotype diversities against each locus. The nucleotide diversity of Group IV sera genes of *P. vivax* were 200 times higher than those of *P. falciparum*, implying possible immune pressure from the host. The multiple infection of *P. vivax* seemed to be caused by the divergent parasite population and it might be result in the positive selection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
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：三日熱マラリア原虫、遺伝子多型、多重感染、流行度、組み換え

1. 研究開始当初の背景

我々は熱帯熱マラリア原虫の SERA5 タンパク質がワクチン抗原となりうることを見だし、この抗原を用いた臨床試験を実施中である。この SERA タンパク質をコードす

る遺伝子は、複数の遺伝子からなる遺伝子ファミリーとして、ゲノムプロジェクトが行われている 8 種のマラリア原虫全てに存在することを明らかにした (Arisue et al. 2007 J Mol Evol 65:82-91)。また、三日熱マラリア

原虫の sera 遺伝子ファミリーが 12 個の sera 遺伝子から構成されることを同定し、感染患者から分離した原虫を用いて、sera 遺伝子の発現解析を行ったところ、12 個の sera 遺伝子の中の一つ Pvi_sera4 の転写量が全ての患者試料において最大であることが判明した (Palacpac et al. 2006 Mol Biochem Parasitol 150:353-358)。一方、これらの実験過程で 20 例以上の患者から分離した血液試料において、例外無く多数の対立遺伝子配列が存在していた。つまり、三日熱マラリア感染では、熱帯熱マラリア感染以上の多重感染が生じていることが示唆された。マラリア原虫は抗原変異抗原多型、分子煙幕など、宿主からの免疫応答を回避するための機構を備えていることが知られているが、三日熱マラリア感染では遺伝子の多様性を保ったままで感染状態を持続させることにより、免疫回避をするような新たなメカニズムが存在する可能性があると考え、本課題の提案に至った。

2. 研究の目的

三日熱マラリア原虫 (*Plasmodium vivax*) によるマラリア感染は世界の広い範囲で起こっており、年間 7~8 千万件の感染例があると報告されている。アジアやラテンアメリカではマラリア感染の約半分が三日熱マラリア原虫によるものである。我々は三日熱マラリア原虫のワクチン開発研究の過程で、三日熱マラリア患者において極めて高い多重感染がおこっていることを観察した。熱帯熱マラリアでは流行地域住民の 10%(流行度)が感染している状況で多重感染度は 1.5 程度であるが、三日熱マラリアでは、流行度が 1.0% 以下であっても多重感染度は 5.0 を超えている場合があった。この結果は三日熱マラリア原虫がその寄生戦略として常に多重感染を維持するメカニズムを発達させていることを示唆する。本研究課題の目的は、多様性を保ったままで感染状態を持続させるという感染現象として極めて興味深い三日熱マラリア原虫のメカニズムを明らかにすることである。

3. 研究の方法

タイ、トルコ、アフリカの各地域における三日熱マラリア原虫感染者の血液から原虫の gDNA を抽出。Pvi_msp1, Pvi_sera5, マイクロサテライトマーカ-4 領域(AT, GA, 2.21, 3.35)の合計 6 領域について、PCR で断片を増幅。クローニングの後に、プラスミドを抽出し、1 PCR 産物あたり 50 クローン以上のシーケンスを行い、塩基配列の比較解析から多重感染度(対立遺伝子の数= allele number)、多型頻度(haplotype diversity)を解析した。

表 1 解析に用いた原虫試料の由来と数

Source of samples		n
Thailand	Mae Sot	13
Turkey	Sanliurfa	8
Angola*		1
Sao Tome*		1
Madagascar*		5

* アフリカ地域の国

また、世界の異なる地域に由来する原虫株、*P. vivax* 10 株、*P. falciparum* 13 株について、sera 遺伝子 (*P. vivax* =sera1 ~ 12, *P. falciparum*= sera1~9) の塩基配列を決定し、塩基多様度 (π) の値を比較した。

4. 研究成果

抗原分子をコードする遺伝子、msp1 の block5-7 及び、sera5 の C-末領域、また、中立的な進化をするマイクロサテライト領域 4 カ所のシーケンスから、感染患者一人から分離された原虫集団が有する対立遺伝子数を決定した。

表 2 遺伝子座あたりの対立遺伝子数

	antigen		microsatellite			
	msp1	sera5c	2.21	3.35	AT	GA
Thailand						
BT6	3	2	2	2	2	1
BT7	1	3	2	1	1	1
BT8	2	4	3	2	1	2
BT9	5	6	2	1	2	1
BT10	2	1	1	3	1	3
1713	2	1	2	2	3	3
PvKS826	3	1	1	2	1	2
BT11	4	4	3	3	2	1
BT13	2	1	1	2	1	1
BT14	4	2	3	3	2	1
BT15	4	3	2	2	2	1
BT16	2	1	2	2	1	2
BT17	6	6	2	3	2	3
Turkey						
TT8	1	1	2	3	2	2
TT9	4	2	3	3	3	4
TT11	4	1	2	2	2	1
TT12	2	2	3	4	2	3
TT13	4	3	3	3	2	3
TT27	3	1	4	3	2	1
TT33	1	2	3	3	2	1
TT72	1	1	2	3	2	2
Africa						

52	4	2	1	3	3	4
R	4	4	3	2	1	2
MB	2	1	1	2	2	3
MI	3	2	1	2	2	3
MJ	3	2	1	3	2	1
ML	1	1	2	2	3	3
MR	1	1	1	2	3	1

タイの Mae Sot は住民の原虫保有率が 0.7% と低流行度であるにもかかわらず 2~6 の高い多重感染度が観察された。タイよりも流行度の高いトルコ、流行度の低いアフリカでの値も同程度であり、流行度にかかわらず常に多重感染の状態を保っていることがこれら 3 地域においても再確認された。

表 3 原虫集団毎の対立遺伝子数の平均値

Gene locus	Mean number of alleles		
	Thailand n=13	Turkey n=8	Africa n=7
msp1	3.1	2.5	2.6
sera5c	2.7	1.6	1.8
2.21	2.0	2.7	1.4
3.35	2.1	3.0	2.3
AT	1.6	2.1	2.3
GA	1.7	2.1	2.4

表 4 原虫集団毎の多様度

Gene locus	Haplotype diversity (h)		
	Thailand n=13	Turkey n=8	Africa n=7
msp1	0.94	0.91	0.96
sera5c	0.97	0.92	0.96
2.21	0.87	0.83	0.89
3.35	0.90	0.78	0.83
AT	0.89	0.79	0.84
GA	0.88	0.76	0.85

多型解析の結果を表 3~5 に示した。いずれの遺伝子マーカーについても、一人の患から分離された原虫集団中に存在する対立遺伝子の数が 1 を超えていることは、多重感染が生じていることを意味している。抗原分子である msp1、sera5 のみならず、中立的な進化をするマイクロサテライトマーカー遺伝子においても高い多型頻度が示されたことは、*P. vivax* が種分岐してから長い時間が経過していることを示唆しているものと考えられる。

表 5 三日熱マラリア原虫集団の多様性

	Allele number	Haplotype diversity
msp1	31	0.9646 ±0.0075
sera5c	43	0.9852 ±0.0063
2.21	11	0.8736 ±0.0272
3.35	13	0.8674 ±0.0183
AT	14	0.8686 ±0.0288
GA	15	0.9194 ±0.0155

これまで、*P. vivax* の多様性を解析してきたが、それを *P. falciparum* のものと比較するために、ワールドワイドな株の塩基多様性 (π) をオルソログな関係にある遺伝子同士で比較検討した。

マラリア原虫の sera 遺伝子は遺伝子ファミリーを形成しており、詳しい系統解析から、4 つのグループに分類されている (Arisue et al. 2007 J Mol Evol 65:82-91)。今回の多型解析 (図 1、2) から、種分岐後の遺伝子重複により、種特異的な進化を遂げてきた Group IV に分類される SERA の系統 (*P. vivax* SERA1-9、システインプロテアーゼの活性中心がセリンに置換されているという特徴を持つ) において、sera の多様度が *P. falciparum* に比べて、*P. vivax* では 200 倍も大きく、これらの分子が宿主から大きな免疫圧を受けてきた可能性が示唆された。スライディングウィンドウの手法により、遺伝子の狭い領域毎の塩基多様度の値を算出し、その変化を調べたところ、SERA タンパクのプロテアーゼドメインと推測される中央領域の両側に相当する、N 末と C 末に近い領域に多様度が特に高い領域 ($dN > dS$) がみつき、ここに変異が蓄積されていることが判明した。

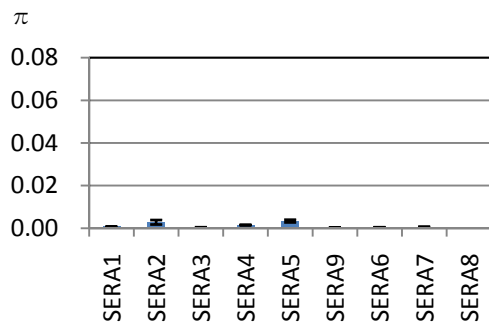


図1 熱帯熱マラリア原虫 *P. falciparum* の sera 遺伝子の塩基多様度 (π)

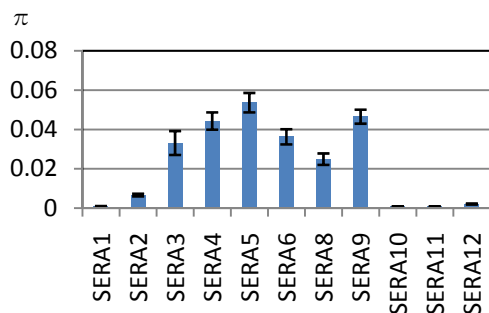


図2 三日熱マラリア原虫 *P. vivax* sera 遺伝子の塩基多様度 (π)

多重感染を保ったままの状態ヒトから蚊、蚊からヒトへの感染を持続させるメカニズムの背景には、元々の原虫集団がもつ多様性が *P. vivax* のほうが *P. falciparum* よりも高くそれは宿主からの高い免疫圧を受け、ポジティブセレクションが起こった結果であると考えられた。中立的な進化をするマイクロサテライト領域においても多型頻度の値が高かったことは、*P. vivax* が種分岐してから長い時間が経過していることを示唆しているものと考えられた。

本研究課題における解析から *P. vivax* の sera はワクチン抗原として開発が進められている熱帯熱マラリア原虫 *P. falciparum* の sera とは、異なる遺伝的背景を持って進化していることや、宿主からの免疫圧を受けて進化してきた可能性が示唆された。これらの知見は今後のワクチン開発に対して非常に有用なものであると考えられる。

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8件)

①有末伸子、Nirianne M. Q. Palacpac、川合寛、平井誠、田邊和祐、堀井俊宏、マラリア原虫 SERA 遺伝子ファミリーの系統特異的な進化、第9回 分子寄生虫・マラリア研究フォーラ

ム、2010年10月9日長崎

②Nobuko Arisue, Nirianne M. Q. Palacpac, Satoru Kawai, Makoto Hirai, Kazuyuki Tanabe, and Toshihiro Horii, The SERA gene family from several *Plasmodium* species: Picking important clues for the evolutionary puzzle of this gene family, The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2010年9月9日淡路島

③有末伸子、Nirianne M. Q. Palacpac、田邊和祐、堀井俊宏、マラリア原虫 sera 遺伝子ファミリーの多型解析、第79回日本寄生虫学会大会、2010年5月20日旭川

④Nirianne M. Q. Palacpac, Nobuko Arisue, Kazuyuki Tanabe, Hiromi Sawai, Richard Culleton, RachaneeUdomsangpetch, JetsumonSattabongkot, FadileZeyrek, CevayirCoban, Toshihiro Horii, Comparative analysis of human *vivax* malaria infections in different endemic area, International Joint Forum on Infectious Disease 2009, 2009年9月16日 Bangkok

⑤Nobuko Arisue, Nirianne M. Q. Palacpac, Satoru Kawai, Makoto Hirai, Kazuyuki Tanabe, Toshihiro Horii, The SERA gene family: Important clues from several *Plasmodium* species, International Joint Forum on Infectious Disease 2009, 2009年9月16日 Bangkok

⑥Nirianne M. Q. Palacpac, Nobuko Arisue, Kazuyuki Tanabe, Hiromi Sawai, Richard Culleton, RachaneeUdomsangpetch, JetsumonSattabongkot, FadileZeyrek, CevayirCoban, Toshihiro Horii, Comparative analysis of human *vivax* malaria infections in different endemic area, The 9th AWAJI International Forum on Infection and Immunity, 2009年9月10日淡路島

⑦Nobuko Arisue, Nirianne M. Q. Palacpac, Satoru Kawai, Makoto Hirai, Kazuyuki Tanabe, Toshihiro Horii, The SERA gene family: Important clues from several *Plasmodium* species, The 9th AWAJI International Forum on Infection and Immunity, 2009年9月10日淡路島

⑧Nirianne M. Q. Palacpac, Nobuko Arisue, Richard Culleton, Kazuyuki Tanabe, FadileYildizZeyrek, CevayirCoban, JetsumonSattabongkot, TakafumiTsuboi, Motmi, Torii, RachaneeUdomsangpetch, Toshihiro Horii, Diversity in geographically distinct *Plasmodium vivax*

populations. 第 77 回日本寄生虫学会大会、
2008 年 4 月 4 日長崎

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

石井 健 (ISHII KEN)
大阪大学・微生物病研究所・准教授
(現在の所属；医薬基盤研究所・創薬基盤研
究部・プロジェクトリーダー)
研究者番号：00448086
(2008, 2009 年度のみ)

東岸 任弘(TOUGAN TAKAHIRO)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号：20379093

八木 正典 (YAGI MASANORI)
大阪大学・微生物病研究所・特任研究員
研究者番号：60452463

田井 久美子 (TAI KUMIKO)
大阪大学・微生物病研究所・教務職員
研究者番号：00187907
(2009, 2010 年度のみ)

(3) 連携研究者

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

(4) 研究協力者

Nirianne M. Q. Palacpac
一般財団法人阪大微生物病研究会

Cevayir Coban
大阪大学・免疫学フロンティア研究センター

Fadile Yildiz Zeyrek
Harran University Medical Faculty, Turkey

Rachanee Udomsangpetch
Mahidol University, Thailand

Jetsumon Sattabongkot
USAMC Armed Forces Research Institute of

Medical Sciences, Thailand

Richard Culleton
長崎大学・熱帯医学研究所