

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成24年6月8日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23659211

研究課題名（和文）不均衡変異導入ミューテーターマラリア原虫による超加速進化モデル
実験系の構築研究課題名（英文）Establishment of an experimental model system for a highly accelerated
evolution using mutator malaria parasites generated by the disparity
mutagenesis

研究代表者

田辺 和祐 (TANABE KAZUYUKI)

大阪大学・微生物病研究所・招へい教授

研究者番号：40047410

研究成果の概要（和文）：本研究では、DNAポリメラーゼ δ の校正機能を欠損させることによって高頻度に突然変異を発生するネズミマラリア原虫 *Plasmodium berghei*（ミューテーター原虫）を用い、原虫の進化を予測する進化モデル実験系の構築を目指した。ミューテーター原虫に生じた変異をゲノムワイドに解析した結果、変異率は対照原虫よりも75-100倍上昇していた。また、サルファ剤耐性試験の結果から、ミューテーター原虫は薬剤耐性の予測を可能にする新たな研究手法となり得ることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：The present study was aimed to establish an experimental model system for predicting evolution of malaria parasites using a highly mutagenic *Plasmodium berghei* (mutator malaria parasite), which has defective proof reading activity of the parasite DNA polymerase δ . Genome-wide sequence analysis of spontaneous mutations in the mutator parasite, after passages in mice over two years, revealed that mutation rate in the mutator was 75 to 100 times higher than that of control. Further, results of sulfadoxine-resistance tests suggest that the mutator system can be a novel innovative research tool, which enables us to predict drug resistance of malaria parasites.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

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：マラリア、ミューテーター、*Plasmodium*、ゲノム、進化、突然変異

1. 研究開始当初の背景

マラリアは毎年2億人の患者と約80万人の命を奪っている最大の原虫感染症である。マラリアの治療と制圧のために抗マラリア剤が使われているが、薬剤耐性マラリア原虫が世界的に蔓延し、マラリア禍を深刻なものとしている。そのため新規抗マラリア薬の開発が希求されているが、例え開発されたとしても早晚、耐性原虫が現れることが予想さ

れる。

従来、マラリア原虫の薬剤耐性に関する研究は、フィールドにおいて分離された薬剤耐性原虫株を用いて耐性原因遺伝子や耐性の分子的機序を調べるものが主となっている。こうした現在の研究手法ではマラリア薬剤耐性の原因遺伝子変異と耐性原虫の出現頻度を実験的に予測することは不可能で、今後導入される新規薬剤をより有効に使用す

るためにはそれらを予見する新たな手法の開発が必要となる。

2. 研究の目的

私たちは最近、DNA ポリメラーゼ δ の校正機能を欠損させたネズミマラリア原虫 *Plasmodium berghei* (ミューテーターマラリア原虫) を作製した (未発表)。このミューテーターマラリア原虫では高頻度に突然変異が発生する。従って、この原虫では薬剤耐性は野生型原虫よりもより早く出現することが予想される。本研究では、このミューテーター原虫における自然突然変異率がどの程度上昇しているかをゲノムシーケンシングにより解析し、さらに、ミューテーターマラリア原虫が薬剤耐性獲得 (原虫の進化) を予測できる超加速進化モデル実験系として有用であるかどうかを検討する。

3. 研究の方法

(1) マラリア原虫

ネズミマラリア原虫の *P. berghei* ANKA 株を用いた。すでに作製している変異型および野生型 DNA ポリメラーゼ δ をそれぞれ導入した変異原虫 (PbMut) および対照原虫 (PbCtl) (未発表) を用いた。

(2) 原虫のマウス継代

PbMut および PbCtl を一週間毎にマウス継代をくり返して原虫を増殖、維持させた。継代では 100 個から 1000 個の感染赤血球を腹腔内接種した。

(3) ゲノムシーケンシング

継代の第 42-45 代、第 82-83 代、第 122 代において限界希釈により原虫クローンを得た。各世代について 1-2 クローンずつ Illumina HiSeq システムを用いてゲノムシーケンシングを行った。約 100b のショートリードで、各クローンについて 1Gb (10 億塩基) の塩基配列を取得した。*P. berghei* のゲノムサイズは約 20Mb なので、このデータ量は 50 倍の冗長性に相当する。取得した配列データにおける突然変異の確認はサンガー研究所が公開している *P. berghei* ANKA 株のゲノムデータを参照配列として行った。変異の検出では、10 本以上のリードがマップされたサイトで、80%以上のリードが同じ変異を示したときに変異と見なした。この基準で検出され

た塩基置換について、ナンセンス突然変異を中心に 21 個をサンガー法で解析したところ、全て確認された。

(4) 抗マラリア薬耐性原虫の創出

抗マラリア薬として sulfadoxine 及び sulfadiazine を用いた。PbCtl において完全に原虫が消失する条件、すなわち、sulfadoxine の皮下投与では 10mg/kg、2 週間の投与、また sulfadiazine の飲用投与では 15 mg/L、2 週間、常時飲用という条件で、PbMut が再燃するかどうかを調べた。

4. 研究成果

(1) ゲノムにおける変異の蓄積

下図は PbCtl の 42 代のクローンと PbMut の 45 代のクローン A について検出された塩基置換の 14 本の染色体上での位置および個数を示す。PbCtl では 1 個の塩基置換しか検出されなかったのに対して、ミューテーターでは 82 個が検出された。

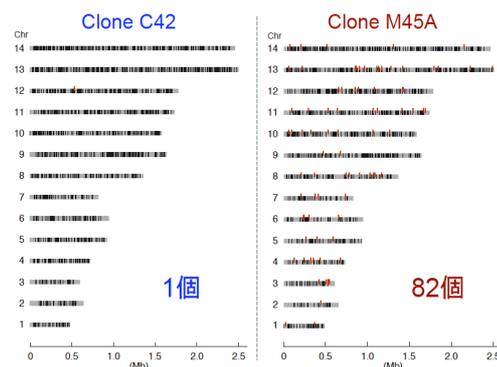


図 1 : ゲノムにおける変異の蓄積。

染色体の黒い部分は解析の対象になった領域で、灰色の部分は対象にならなかった領域。オレンジ色の線は塩基置換の位置を示す。

82、83 代では、PbCtl で 1 個、PbMut では 133 個の塩基置換が検出された。122 代では、PbCtl で 2 個、PbMut で 174 個が検出された。

なお、122 代の PbCtl と PbMut のクローンの増殖速度を比較したところ差はなかった。これは、PbMut で蓄積した変異は原虫の増殖には影響しない変異であることを示唆する。

(2) 塩基置換の内訳

下の円グラフは PbMut で検出された塩基置換の内訳を示す。

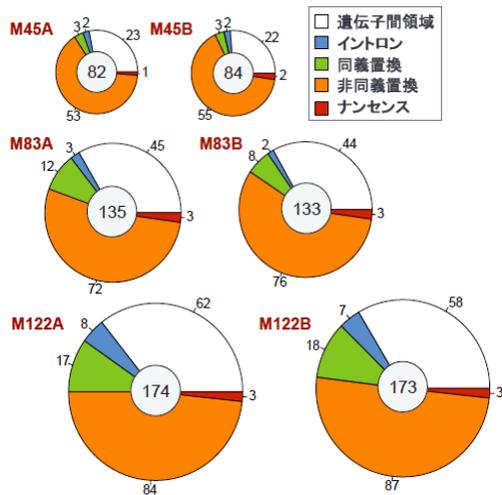


図2: PbMut で検出された塩基置換の内訳。円の真ん中は塩基置換の総数を示す。

いずれのクローンでもオレンジ色で示した非同義置換が最も大きな割合を占めた。これは、*P. berghei* のゲノムは約 80% という高 A+T 比を有することから、タンパク質コード領域に生じた塩基置換が非同義置換を起こしやすいと考えられる。非同義置換を多く誘導したことは、PbMut が突然変異体の効率的な創出に適することを示唆する。

(2) 突然変異率の推定

継代した日数と検出された変異数から、1日あたり塩基あたりの塩基置換率を算出した。PbMut の塩基置換率は $1.2-1.6 \times 10^{-8}/\text{bp}/\text{day}$ で、PbCtl よりも 75-100 倍高かった。

(3) サルファ剤耐性原虫の創出

第 91 代の PbMut に sulfadoxine 投与を行ったところ、一部のマウスで再燃が生じた。その原虫株では熱帯熱マラリア原虫で sulfadoxine 耐性に必須とされているジヒドロプテロイン酸合成酵素のアミノ酸 437 番目の Ala→Gly 変異と同一の変異が認められた。

同様の条件で PbMut の第 1 代を用いた試験も行ったところ、再燃はなく、耐性株は創出されなかった。そのため、継代の繰り返しによる集団への変異の蓄積が薬剤耐性原虫の創出に重要であると考えられた。

また、第 61 代の PbMut に sulfadiazine を投与しても sulfadoxine の場合と同一の変異、すな

わち、アミノ酸 437 番目の Ala→Gly の変異を有した耐性原虫株が創出された。この耐性原虫にさらに高濃度(60 mg/L)の sulfadiazine を飲用させたところ、9 週目で別のアミノ酸サイト(アミノ酸 408 番目)で Phe→Val の変異が追加された。

(4) 結論

ミューテーター原虫はコントロール原虫よりも 75-100 倍塩基置換率が高く、非同義置換が多いことが明らかになった。さらに、ミューテーターを用いることで効率的な薬剤耐性原虫の創出にも成功し、継代の繰り返しによる集団への変異の蓄積が重要であることが示唆された。

本研究から、マラリアミューテーターが人為的変異原を用いない自然に近い状態での薬剤耐性出現の予測をラボにおいて可能にする新たな研究手法となり得ることが明らかになった。

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 8 件)

(1) Toshiyuki Hayakawa, Shin-Ichiro Tachibana, Kenji Hikosaka, Nobuko Arisue, Atsushi Matsui, Toshihiro Horii, Kazuyuki Tanabe. (7 人中 7 番目) (2012) Age of the last common ancestor of extant *Plasmodium* parasite lineages. **Gene** 502: 36-39. 査読有

DOI: 10.1016/j.gene.2012.04.037

(2) Nobuyuki Takahashi, Kazuyuki Tanabe, Takahiro Tsukahara, Mawuli Dzodzomenyo, Lek Dysoley, Boualam Khamlome, Jetsumon Sattabongkot, Masatoshi Nakamura, Miki Sakurai, Jun Kobayashi, Akira Kaneko, Hiroyoshi Endo, Francis Hombhanje, Takafumi Tsuboi, Toshihiro Mita. (15 人中 2 番目) (2012) Large-scale survey for novel genotypes of *Plasmodium falciparum* chloroquine-resistance gene *pfcr*. **Malar. J.** (in press). 査読有

DOI: 10.1186/1475-2875-11-92

(3) Nobuko Arisue, Tetsuo Hashimoto, Hideya Mitsui, Nirianne M. Q. Palacpac, Akira Kaneko, Satoru Kawai, Masami Hasegawa, Kazuyuki Tanabe and Toshihiro Horii (9 人中 8 番目) (2012) The *Plasmodium* apicoplast genome: conserved structure and close

relationship of *P. ovale* to rodent malaria parasites. **Mol. Biol. Evol.** (in press). 査読有

(4) Kazuyuki Tanabe, Nobuko Arisue, Nirianne M. Q. Palacpac, Masanori Yagi, Takahiro Tougan, Hajime Honma, Marcelo U. Ferreira, Anna Färnert, Anders Björkman, Akira Kaneko, Masatoshi Nakamura, Kenji Hirayama, Toshihiro Mita, Toshihiro Horii. (14人中1,6番目) (2012) Geographic differentiation of polymorphism in the *Plasmodium falciparum* malaria vaccine candidate gene SERA5. **Vaccine** 30: 1583-1593. 査読有

DOI: org/10.1016/j.vaccine.2011.12.124,

(5) Yumiko Saito-Nakano, Kazuyuki Tanabe, Toshihiro Mita. (3人中2番目) Identification of pyrimethamine- and chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* in Africa between 1984 and 1998: genotyping of archive blood samples. **Malar. J.** 10: 388. 査読有

(6) Richard Culleton, Cevayir Coban, Fadile Yildiz Zeyrek, Pedro Cravo, Akira Kaneko, Milijaona Randrianarivelojosa, Voahangy Andrianaranjaka, Shigeyuki Kano, Anna Farnert, Ana Paula Arez, Paul M. Sharp, Richard Carter, Kazuyuki Tanabe. (13人中13番目) (2011) The origins of African *Plasmodium vivax*; insights from mitochondrial genome sequencing. **PLoS One** 6: e29137. 査読有

DOI:10.1371/journal.pone.0029137

(7) Hajime Honma, Jung-Yeon Kim, Nirianne MQ Palacpac, Toshihiro Mita, Wonja Lee, Toshihiro Horii, Kazuyuki Tanabe. (7人中1,7番目) (2011) Recent increase of genetic diversity in *Plasmodium vivax* population in the Republic of Korea. **Malar. J.** 10: 257. 査読有

DOI: 10.1186/1475-2875-10-257

(8) Toshihiro Mita, Meera Venkatesan, Jun Ohashi, Richard Culleton, Nobuyuki Takahashi, Takahiro Tsukahara, Mathieu Ndounga, Lek Dysoley, Hiroyoshi Endo, Francis Hombhanje, Marcelo U. Ferreira, Christopher V. Plowe, and Kazuyuki Tanabe. (13人中13番目) (2011) Limited geographical origin and global spread of sulfadoxine-resistant *dhps* alleles in *Plasmodium falciparum* populations. **J. Infect. Dis.** 204: 1980-1988. 査読有

DOI: 10.1093/infdis/jir664

[学会発表] (計10件)

(1) 本間一、平井誠、中村昇太、後藤直久、彦坂健児、美田敏宏、安永照雄、堀井俊宏、古澤満、田邊和祐(10人中1,2,10番目) 高頻度突然変異発生マラリア原虫(マラリアミューター)のゲノムワイド変異解析と薬剤耐性研究への応用、第81回日本寄生虫学会大会、2012.3.23.西宮

(2) 美田敏宏、大橋順、塚原高広、遠藤弘良、田邊和祐(5人中5番目) Sulfadoxine/Pyrimethamine 耐性をもたらす熱帯熱マラリア原虫 *dhfr/dhps* 遺伝子型はどのように進化していくのか、第81回日本寄生虫学会大会、2012.3.23.西宮(兵庫県)

(3) 平井誠、本間一、中村昇太、後藤直久、美田敏宏、鈴江和友、今井孝、松岡裕之、安永照雄、古澤満、堀井俊宏、久枝一、田邊和祐(13人中1,2,13番目) 超加速変異型ネズミマラリア原虫の創出とその順遺伝学への応用、第81回日本寄生虫学会大会、2012.3.23.西宮(兵庫県)

(4) Richard Celleton, Richard Carter, 田邊和祐(3人中3番目) The origins of African *Plasmodium vivax*; Insights from mitochondrial genome sequencing、第81回日本寄生虫学会大会、2012.3.23.西宮(兵庫県)

(5) 美田敏宏、田邊和祐(2人中2番目) パプアニューギニアにおける抗マラリア薬併用療法による熱帯熱マラリア原虫薬剤耐性遺伝子の頻度の上昇、日本熱帯医学会総会、2011.11.4.東京大学

(6) Nobuko Arisue, Tetsuo Hashimoto, Hideya Mitsui, Akira Kaneko, Nirianne M Q, Palacpac, Masami Hasegawa, Kazuyuki Tanabe, Toshihiro Horii. (8人中7番目) Phylogenetic analysis of apicoplast genome-encoded genes reveals close affinity of the human malaria parasite, *Plasmodium ovale*, with rodent parasites. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. (Sapporo) 2011.9.9.

(7) 田邊和祐(1人中1番目) 日本におけるマラリア原虫学の展開、第80回日本寄生虫学会大会、2011.7.17.東京

(8) 橘真一郎、川合覚、後藤直久、中村昇太、有末伸子、片貝祐子、本間一、パラクパックニリアン、八木正典、澤井裕美、東岸任弘、北潔、保富康宏、堀井俊宏、安永照雄、田邊和祐(16人中7,16番目) サルマラリア原虫のゲノム解説及び比較ゲノム解析による三日

熱マラリア原虫特異的なゲノム変化の網羅的
同定、第80回日本寄生虫学会大会、
2011.7.17. 東京

(9) 有末伸子、田邊和裕、Nirianne M. Q.
Palacpac、堀井俊宏(4人中2番目) 霊長類マ
ラリア原虫 sera 遺伝子の多型解析、第80回
日本寄生虫学会大会、2011.7.17. 東京

(10) 美田敏宏、大橋順、高橋延之、塚原高広、
遠藤弘良、田邊和裕(6人中6番目)
Sulfadoxine 耐性熱帯熱マラリア原虫の進化、
第80回日本寄生虫学会大会、2011.7.17. 東
京

〔図書〕(計1件)

(1) Nobuko Arisue, Nirianne M. Q. Palacpac,
Kazuyuki Tanabe, Toshihiro Horii. Clues to
evolution of the SERA multigene family in the
genus *Plasmodium*. (2011) In “Gene
Duplication” (Ed. Felix Friedberg) InTech,
printed in Croatia. 397 p. (315-332 p.)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)
なし

○取得状況(計0件)
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田邊 和裕 (TANABE KAZUYUKI)
大阪大学・微生物病研究所・招へい教授
研究者番号：40047410

(2) 研究分担者

平井 誠 (HIRAI MAKOTO)
群馬大学・大学院医学系・講師
研究者番号：50326849

本間 一 (HONMA HAJIME)
大阪大学・微生物病研究所・特任研究員
研究者番号：10617468

(3) 研究協力者

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

美田 敏宏 (MITA TOSHIHIRO)
東京女子医科大学・医学部・講師
研究者番号：80318013

中村昇太 (NAKAMURA SHOTA)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号：90432434