

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790401

研究課題名(和文) ミューテーターマラリア原虫のゲノムワイド変異解析：分子疫学的・実験的研究

研究課題名(英文) Genome-wide mutation analysis of malaria mutator: epidemiological and experimental study

研究代表者

本間 一 (Honma, Hajime)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：10617468

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)：ネズミマラリア原虫のDNAポリメラーゼの校正機能を欠損することで作製したミューテーター原虫の変異傾向を詳細に解析した。ミューテーター原虫で生じる変異は一様ではなく、またその塩基置換率はDNA配列の並びに影響を受けることが明らかとなった。また、ミューテーター原虫を用いることで抗マラリア薬クロロキンに対して耐性を示す原虫の創出に成功した。世界中のマラリア流行地域で採取された熱帯熱マラリア原虫のDNA検体についてゲノムの複製や安定性に関わる遺伝子のシーケンス解析を行い、それら遺伝子の多型について基盤的知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Detailed mutational trend of a mutator malaria parasite possessing proofreading deficient DNA polymerase was analyzed. The mutation spectrum was biased, and the base substitution of the parasite was influenced by sequence context. By using the mutator parasite, chloroquine resistant parasites were successfully generated. DNA sequencing analysis of genes involved in genome replication and/or stability with global *Plasmodium falciparum* DNA samples was also conducted, and fundamental information on the genetic polymorphism was obtained.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア ミューテーター Plasmodium 分子疫学 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

マラリアは、毎年数億人の感染者と100万人以上の死亡者を出しており、エイズ、結核とともに世界三大感染症のひとつに数えられている。抗マラリア薬による早期治療はマラリア対策における重要な柱であるが、新規薬剤が投入されても耐性原虫が出現し、流行地域に拡散することが大きな問題となっている。そのため、マラリア制御戦略の創出には薬剤耐性の出現・拡散メカニズムの理解が必須である。

近年、熱帯熱マラリア原虫における薬剤耐性の拡散メカニズムに関する集団遺伝学的研究から、1) 薬剤耐性原虫は限られた地域からごく稀にしか出現しない、2) 薬剤耐性原虫の移入によって耐性蔓延地域が拡散していく、などの知見が得られてきた。とりわけ、東南アジアや南米の一部が耐性原虫出現のホットスポットであることが明らかとなっており、当該地域における徹底した薬剤耐性原虫の出現・拡散抑止対策が求められている。しかし、なぜ耐性原虫出現のホットスポットが存在するのかは明らかにされていない。

一般に生物の突然変異率は極めて低く保たれているが、ゲノムの安定性を保つ機能が欠損すると突然変異をより速く蓄積するミューテーターと呼ばれる形質が獲得される。薬剤耐性は耐性関連遺伝子における突然変異により引き起こされることから、ミューテーター原虫は薬剤耐性を獲得しやすい可能性がある。病原性細菌では、ミューテーターが野生株より1,000倍も抗生物質に対する耐性を獲得しやすいことが明らかになっている。さらに最近、多剤耐性を示す培養熱帯熱マラリア原虫株ではDNA mismatches修復機能の働きが低下していることが報告された。したがって、薬剤耐性原虫の出現に極端な地域偏在がみられることは、ミューテーター原虫の地理的分布により説明される可能性がある。

しかしこれまで、ミューテーター原虫の存在が薬剤耐性原虫の出現に関連しているのかについての詳細な研究はほとんど行われていない。申請者のグループは、ネズミマラリア原虫 *Plasmodium berghei* のDNAポリメラーゼの校正機能を欠損させることにより突然変異をより速く蓄積するミューテーターマラリア原虫を開発することに世界で初めて成功した。このようなミューテーターマラリア原虫を用いることにより、DNA修復機能の欠損が薬剤耐性獲得に寄与する役割について検証することが可能である。一方で、大腸菌や酵母におけるこれまでの研究から、ミューテーター形質の賦与にはDNA修復に関わる様々な遺伝子での突然変異が関与することが明らかとなっている。つまり、ミューテーター形質の評価には複数のDNA修復関連遺伝子を網羅的に解析する必要があるが、マラリア原虫においてはそれら遺伝子群にお

ける変異は全く調べられていない。

2. 研究の目的

上記の背景のもとに、本研究では、1) ミューテーター原虫が野生株よりも薬剤耐性を実際に獲得しやすいのかをマウス感染実験系により明らかにすること、2) ミューテーター形質を賦与する遺伝子変異の同定および地理的分布を分子疫学的アプローチにより明らかにすることを目指す。具体的には以下の項目について明らかにする。

薬剤耐性株の効率的な創出には、ミューテーター原虫の長期継代を行うことで変異を集団に蓄積した原虫ライブラリを構築することが重要であると考えられる。そこで最初に、ミューテーター原虫と野生型原虫についてマウスを用いた継代を繰り返す。次に、変異を蓄積したミューテーターマラリア原虫集団を用いて薬剤耐性原虫創出試験を行う。抗マラリア薬には耐性機構が複雑であることから、実験室レベルではこれまで耐性株が創出されていないクロロキンを用いる。ミューテーター原虫の耐性獲得のしやすさ、あるいは耐性の強さを野生株と比較する。

ゲノムの安定性はDNAポリメラーゼの持つ校正機能と、DNA複製時に生じるエラーの修復機能により保たれている。熱帯熱マラリア原虫ではすでにゲノムプロジェクトが終了し、ゲノムの安定性に関わる遺伝子のいくつかが明らかとなっている。世界中の各流行地域から採取された熱帯熱マラリア原虫検体についてこれら遺伝子の配列を決定し、多型を明らかにする。得られた各遺伝子の多型情報をもとに、マラリア原虫にミューテーター形質を賦与する遺伝子変異を同定する。

3. 研究の方法

ミューテーターマラリア原虫を用いたマウス感染実験系によるクロロキン耐性原虫の創出

P. berghei の感染赤血球100万個を静脈注射により接種すると、3-4日で赤血球感染率が数%まで上昇する。そこで、ミューテーター原虫と野生型原虫について3-4日おきに感染マウスから血液を採取し新たなマウスに100万個の感染赤血球を接種することで、原虫のマウス継代を約25週間繰り返す。この継代の際に蓄積した変異の程度を明らかにするため、継代した原虫集団からクローンを得てイルミナシーケンサーによるゲノムワイドな変異解析を行う。得られた変異データを用いて、ミューテーター原虫の変異傾向を解析する。

野生型原虫に対して40 mg/Lのクロロキンを含む水を自由飲水(マウス1kgあたり8.3 mg/dayに相当)により与えたところ、原虫の増殖が抑えられた。そこで、ミューテーター原虫に対してこの濃度よりもやや低い30 mg/Lのクロロキンを含む水を自由飲水(マウス1kgあたり6.3 mg/dayに相当)で与え始め、

原虫の増殖が確認された場合には投与するクロロキン濃度を徐々に増加させていく。

マラリア原虫のゲノムの安定性に関わる遺伝子の多型解析

ブラジル(4検体)、コンゴ(2検体)、ケニア(2検体)、タンザニア(10検体)、バングラデシュ(7検体)、タイ(9検体)、フィリピン(7検体)、パプアニューギニア(2検体)、ソロモン諸島(6検体)から得た熱帯熱マラリア原虫のDNA検体を用いて、DNA複製やゲノム修復に関わると考えられる14個の遺伝子(表1)をPCRで増幅する。得られたPCR産物について、イルミナ次世代シーケンサーによりシーケンス解析を行う。

表1. PCR増幅した遺伝子

ID	遺伝子
PF3D7_0411900	DNA polymerase alpha
PF3D7_0505500	DNA repair protein, putative
PF3D7_0625300	DNA polymerase 1, putative
PF3D7_0630300	DNA polymerase epsilon, catalytic subunit a, putative
PF3D7_0706700	DNA mismatch repair protein MSH2, putative (MSH2-2)
PF3D7_0726300	mismatch repair protein pms1 homologue, putative
PF3D7_1017000	DNA polymerase delta catalytic subunit
PF3D7_1037000	DNA polymerase zeta catalytic subunit, putative
PF3D7_1117800	DNA mismatch repair protein MLH
PF3D7_1226600	proliferating cell nuclear antigen 2
PF3D7_1343400	DNA repair protein RAD5, putative
PF3D7_1411400	plastid replication-repair enzyme
PF3D7_1425400	DNA-directed DNA polymerase, putative
PF3D7_1427500	DNA mismatch repair protein Msh2p, putative

4. 研究成果

ミューテーターマラリア原虫を用いたマウス感染実験系によるクロロキン耐性原虫の創出

ミューテーター原虫について3系列(Ma、Mb、Mc)と野生型原虫について3系列(Wa、Wb、Wc)、独立した継代ラインで約25週間の静脈注射による継代を行った(図1)。さらに、ミューテーター原虫ではもう1系列(Md)以前から100-1000個の感染赤血球を腹腔内注射することで行う継代を約160週間にわたり続けてきた継代ラインが存在する(図1)。これらの継代ラインからそれぞれクローンを採取し、イルミナシーケンス解析を行った。得られたシーケンスデータを用いて、それぞれのクローンにおいて継代の過程で蓄積した塩基置換を明らかにした。

野生型原虫とミューテーター原虫の塩基置換率を比較したところ、ミューテーター原虫の方が36倍高い塩基置換率を有する

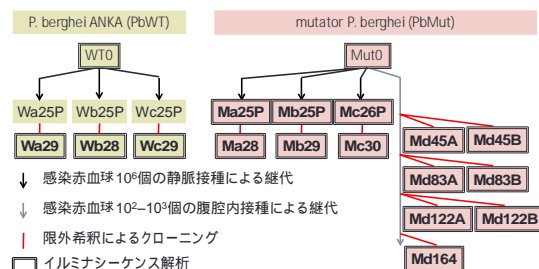


図1. 継代の模式図。

ことが明らかとなった(図2)。さらに、ミューテーター原虫の塩基置換傾向を詳しく見たところ、6種類存在する塩基置換が一樣に生じているのではなく、C/G>A/Tが頻繁に生じる一方でC:G>G:Cがほとんど生じないなど、バイアスが存在することが明らかとなった(図3)。また、塩基置換率が周囲の配列の影響を受けるのかを明らかにするために、3塩基単位での塩基置換率を算出した(図4)。興味深いことに、塩基置換率は塩基の並びの影響を受け、特にTCTの塩基の並びにおける中央のC:G塩基対で全体の塩基置換率よりも5.8-9倍高い塩基置換率が観察された。このようなバイアスは、ミューテーター原虫を用いて創出することが可能な突然変異体の多様性に影響を及ぼしている可能性が考えられる。

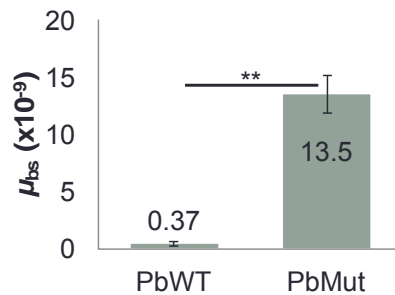


図2. 野生型原虫 (PbWT) とミューテーター原虫 (PbMut) の塩基置換率。 **P<0.01。

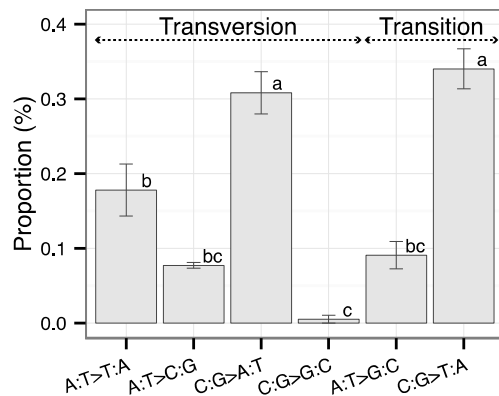


図3. ミューテーター原虫の変異スペクトル。異なるアルファベット間で有意な差が検出された (P<0.05)。

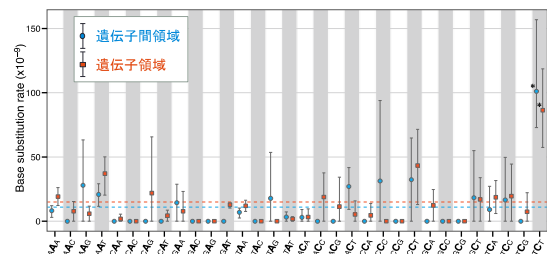


図4. 3塩基単位での塩基置換率。青い点線: 遺伝子間領域全体の平均値、赤い点線: 遺伝子領域全体の平均値。 *P<0.05。

次に、約 25 週間継代した Ma、Mb、Mc の原虫集団を用いてクロロキン耐性原虫の創出を試みた。それぞれの原虫集団の感染赤血球 $1.4-8.8 \times 10^7$ 個を、各 5 匹のマウスに静脈注射により接種した。いずれのマウスにおいても 30 mg/L クロロキンの自由飲水による投与では原虫の増殖が確認されたため、野生型原虫では増殖が抑えられた 40 mg/L に投与量上げたが、増殖が認められた(図 5)。さらに、50 mg/L (マウス 1kg あたり 10.4 mg/day に相当)に増加させたが、それでも原虫の増殖が観察された(図 5)。50 mg/L のクロロキン投与下で原虫増殖が見られたマウスから血液を採取し、新しいマウスに接種して同様の試験を続けた。この試験を 3 回行いクロロキン耐性原虫の候補が得られたところで、クロロキン投与量を正確にするためにゾンデによる投与方法に変更した。最終的に、マウス 1kg あたり 20 mg のクロロキン投与下でも増殖が認められる原虫が 2 つ (Mb 由来と Mc 由来のものが 1 つずつ) 得られた。これは野生型原虫の増殖が抑えられたクロロキン濃度よりも約 3 倍高い濃度である。ミューテーター原虫の薬剤耐性研究への有用性が示された。現在、得られたクロロキン耐性原虫についてその耐性メカニズムを解明するため、詳細な解析を行っている。

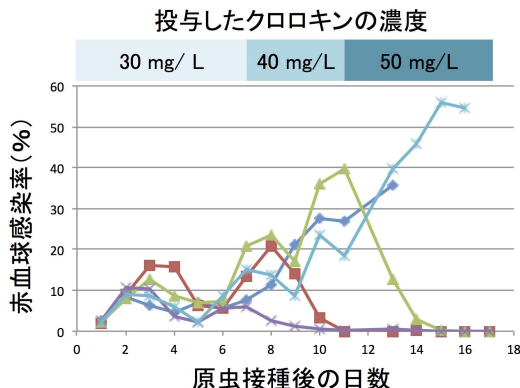


図 5. Ma 原虫集団を感染させたマウスでのクロロキン投与試験 1 回目。

マラリア原虫のゲノムの安定性に関わる遺伝子の多型解析

世界中のマラリア流行地で得られた熱帯熱マラリア原虫 49 検体分の DNA について 14 遺伝子(表 1)を標的とした PCR 増幅を行い、得られた PCR 産物についてイルミナシーケンサーで網羅的に配列決定を行った。得られたシーケンスデータを公開されている *Plasmodium falciparum* 3D7 株の参照配列にマッピングし、多型を同定した。その結果、多型の程度は遺伝子によって大きく異なることが明らかとなった。今後、観察された多型について、遺伝子機能に影響を及ぼす変異が存在するか詳細に検討していく。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 5 件)

Tanabe K, Zollner G, Vaughan JA, Sattabongkot J, Khuntirat B, Honma H, Mita T, Tsuboi T, Coleman R. *Plasmodium falciparum*: Genetic diversity and complexity of infections in an isolated village in western Thailand. *Parasitol Int.* (査読有り) 2015 Jun;64(3):260-6. doi: 10.1016/j.parint.2013.09.011.

Honma H, Hirai M, Nakamura S, Hakimi H, Kawazu S, Nirianne MQP, Hisaeda H, Matsuoka H, Kawai S, Endo H, Yasunaga T, Ohashi J, Mita T, Horii T, Furusawa M, Tanabe K. Generation of rodent malaria parasites with a high mutation rate by destructing proofreading activity of DNA polymerase. *DNA Res.* (査読有り) 2014 Aug;21(4):439-46. doi: 10.1093/dnares/dsu009.

Tanabe K, Jombart T, Horibe S, Palacpac NM, Honma H, Tachibana S, Nakamura M, Horii T, Kishino H, Mita T. *Plasmodium falciparum* mitochondrial genetic diversity exhibits isolation-by-distance patterns supporting a sub-Saharan African origin. *Mitochondrion.* (査読有り) 2013 Nov;13(6):630-6. doi: 10.1016/j.mito.2013.08.008.

Ikarashi M, Fukuda Y, Honma H, Kasai K, Kaneta Y, Nakai Y. First description of heterogeneity in 18S rRNA genes in the haploid genome of *Cryptosporidium andersoni* Kawatabi type. *Vet Parasitol.* (査読有り) 2013 Sep 1;196(1-2):220-4. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.12.053.

Tachibana SI, Sullivan SA, Kawai S, Nakamura S, Kim HR, Goto N, Arisue N, Palacpac NM, Honma H, Yagi M, Tougan T, Katakai Y, Kaneko O, Mita T, Kita K, Yasutomi Y, Sutton PL, Shakhbatyan R, Horii T, Yasunaga T, Barnwell JW, Escalante AA, Carlton JM, Tanabe K. *Plasmodium cynomolgi* genome sequences provide insight into *Plasmodium vivax* and the monkey malaria clade. *Nat Genet.* (査読有り) 2012 Sep;44(9):1051-5. doi: 10.1038/ng.2375.

(学会発表)(計 10 件)

本間一、平井誠、新倉保、美田敏宏、小林富美恵、堀井俊宏、遠藤弘良。ミューテーターマラリア原虫を用いた突然変異蓄積パターンの解析。第 84 回日本寄生虫学会大会。杏林大学三鷹キャンパ

ス(東京・三鷹市). 2015年3月21-22日.
櫻井美樹、Betty Balikagala Mawagali、八代聖基、池田美恵、Edward Ntege、佐伯亜美、本間一、Nirianne M. Q. Palacpac、片岡正俊、坪井敬文、木村英作、遠藤弘良、堀井俊宏、美田敏宏。ウガンダにおける ex vivo 薬剤感受性試験を用いた熱帯熱マラリア原虫のクロロキン感受性の回復。第84回日本寄生虫学会大会。杏林大学三鷹キャンパス(東京・三鷹市)。2015年3月21-22日。
本間一、平井誠、新倉保、美田敏宏、小林富美恵、堀井俊宏、遠藤弘良。DNAポリメラーゼの校正機能欠損による高頻度突然変異発生型ネズミマラリア原虫のゲノムワイド変異解析。第37回日本分子生物学会年会。パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)。2014年11月25-27日
平井誠、新井明治、安彦真文、本間一、岡本龍史、鈴江一友、今井孝、谷口委代、堀井俊宏、田邊和裕、久枝一。比較トランスクリプトームによるマラリア原虫受精関連因子の探索。第83回日本寄生虫学会大会。愛媛大学城北キャンパス(愛媛県・松山市)。2014年3月27-28日。
本間一、平井誠、塚原高広、美田敏宏、遠藤弘良。マラリア原虫におけるサルファ剤耐性とオルガネラゲノムコピー数増加との関連性。第83回日本寄生虫学会大会。愛媛大学城北キャンパス(愛媛県・松山市)。2014年3月27-28日。
本間一。高頻度突然変異発生ローデントマラリア原虫のゲノムワイド変異解析。NGS現場の会 第三回研究会。神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)。2013年9月4-5日。
塚原高広、巖城隆、本間一、遠藤弘良、奥野奈央、岸野真衣子、石川一郎、中村真一、白鳥敬子。上部消化管内視鏡検査で偶然発見された *Bolbosoma* 属鉤頭虫感染の1例。第24回日本臨床寄生虫学会。東大寺総合文化センター(奈良県・奈良市)。2013年6月15日。
美田敏宏、本間一、村井謙治、高橋延之、塚原高広、遠藤弘良、Hombhanje, F、田邊和裕。薬剤耐性マラリア原虫の急速な選択は原虫集団の遺伝的多様性を低下させうるのか-パプアニューギニアにおける検討。第72回日本寄生虫学会東日本大会支部会 第10回分子寄生虫・マラリアフォーラム合同大会。群馬大学医学部刀城会館(群馬県・前橋市)。2012年10月12-13日。
平井誠、安彦真文、岡本龍司、本間一、鈴江一友、今井孝、堀井俊宏、田邊和裕、

久枝一。比較トランスクリプトームによるマラリア原虫受精因子の探索。第72回日本寄生虫学会東日本大会支部会 第10回分子寄生虫・マラリアフォーラム合同大会。群馬大学医学部刀城会館(群馬県・前橋市)。2012年10月12-13日。

本間一。マラリアミューテーターを用いた薬剤耐性研究。第20回分子寄生虫学ワークショップ。神戸市立神戸セミナーハウス(兵庫県・神戸市)。2012年8月26-29日。

〔その他〕

ホームページ等

東京女子医科大学国際環境・熱帯医学教室HP:

<http://www.twmu.ac.jp/Basic/int-trop/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本間一 (HONMA, Hajime)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号: 10617468