

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460516

研究課題名(和文) アフリカに生息するサルを宿主とするマラリア原虫 *P. gonderi* のゲノム解析研究課題名(英文) Genome analysis of malaria parasite *Plasmodium gonderi*

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：アフリカに生息するサルを宿主とするマラリア原虫 *Plasmodium gonderi* のゲノムを解読した。NGSから8.0Gbの塩基データを得て、核ゲノム14本、ミトコンドリアゲノム1本、色素体ゲノム1本の合計16本にまとめた。核ゲノムからは5,180個の遺伝子を同定した。近縁マラリア原虫7種間において、シンテニーは非常に良く保存されていた。抗原遺伝子ファミリーや赤血球への接合侵入関連分子の遺伝子において種間で遺伝子数のばらつきが観察されたが、それ以外の遺伝子は種間で保存されていた。比較ゲノム解析からは原虫の赤血球への接合に関与するDBL分子の数の変化が宿主域に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Genome of *Plasmodium gonderi*, a malaria-causing parasite of african monkey, was analyzed. We obtained a total of 8.0 Gb nucleotide data from the combination of PacBio RS and Miseq (Next Generation Sequencer). Nucleotide data was assembled at 16 supercontigs (14 is corresponding to the 14 parasite chromosomes, one is the mitochondria genome and one is the plastid genome). 5,180 genes were identified from 14 chromosomes. Synteny was well conserved among 7 closely related malaria species. The gene number of antigen multigene families, blood cell binding genes (DBL, RBL etc) were varied, but other genes were well conserved. From the comparative genome analysis, it was suggested that the gain/loss of duffy binding like protein genes was related to the host switch between human and monkey.

研究分野：寄生虫学

キーワード： *Plasmodium gonderi* マラリア原虫 ゲノム解析 比較ゲノム 進化系統樹

1. 研究開始当初の背景

マラリアは世界中の熱帯、亜熱帯地域で猛威をふるう感染症であり、毎年約2億人が感染し、100万人余りが死亡する。2002年には最も重篤な症状を引き起こすヒト熱帯熱マラリア原虫 *P. falciparum* のゲノムが解読され、その知見は治療薬やワクチン開発の分野に大きな貢献をした。一方、休眠体となり、ヒト体内で越冬するために、熱帯亜熱帯のみならず寒冷地でも流行するため感染例が多いヒト三日熱マラリア原虫 *P. vivax* については2008年にゲノム情報が公開された。*P. vivax* は *P. falciparum* を凌ぐ年間8千万-1億の感染例があり、公衆衛生上の大問題であるヒトマラリアである。しかし、*P. vivax* は *in vitro* における培養系が確立されていないために研究は困難を極めており、比較ゲノム解析によるアプローチが有効であると考えられている。2008年に *P. vivax* に近縁でありアジア地域でヒトへのアウトブレイクが報告されたマカクマラリア原虫 *P. knowlesi* のゲノム情報が公開され、更に2012年、本研究組織を構成するメンバーらを含むグループは、*P. knowlesi* よりも *P. vivax* に近縁であるとされるマカクマラリア原虫 *P. cynomolgi* のゲノム配列を明らかにした。トリヤヒトを含む大型類人猿を宿主とするマラリア原虫についても、ゲノムプロジェクトが進行中であり、情報の蓄積に伴い、ようやく各マラリア原虫に固有の生物学的特徴に關与している遺伝的な因子を同定するための比較ゲノム解析が始まり、成果につながりつつある。比較ゲノムからマラリア原虫に特徴的な生命現象に關わる遺伝的因子を探索するためには、比較に用いた原虫種の分岐順が明確にされてなければならない。そのためにはアフリカに生息するサルマラリア原虫のゲノム情報が不可欠な状況にあり、本研究課題を実施するに至った。

2. 研究の目的

ヒト三日熱マラリア原虫 *Plasmodium vivax* はミトコンドリアゲノム配列や核ゲノムコードの rRNA 配列などによる分子系統解析からアジアのマカクを宿主とするマラリア原虫にその起源があるとされてきたが、我々はアピコプラストゲノム配列を用いた最新の解析からアフリカに生息するサルを宿主とするマラリア原虫に由来する可能性を新たに見いだした。*P. vivax* の生物学的特徴を理解するための比較ゲノムにはアジアのサルを宿主とするマラリア原虫の情報だけでは不十分であり、それらの外群に相当するアフリカに生息するサルを宿主とするマラリア原虫の遺伝情報を取り入れることが必須である。そこで、アフリカのサルを宿主とするマラリア原虫の一種である *P. gonderi* のゲノムを解読し、*P. vivax* とその近縁のマラリア原虫との比較ゲノムを行い、宿主免疫応答回避システムに關連する抗原分子、宿主特異性に關

連する分子、宿主赤血球への進入と脱出に關わる分子など、マラリア原虫のユニークな特徴に關連する分子種を探索し、今後の研究の発展に貢献しうる情報を提供する。また、アフリカのサルを宿主とする *P. gonderi*、ヒトを宿主とする *P. vivax*、アジアのサルを宿主とするマラリア原虫 *P. cynomolgi* と *P. knowlesi* など、ゲノム情報が公開されている種間で系統解析を行い、*P. vivax* を含む霊長類マラリア原虫種間の系統関係の解明に挑戦する。

3. 研究の方法

アフリカに生息するサルを宿主とするマラリア原虫 *Plasmodium gonderi* が感染している血液サンプルから Tachibana et al. Nature Genetics 44(9), 1051-1055(2012)に記載されている方法により原虫の gDNA を抽出し、超高速シーケンサー (Pacific Biosciences: PacBio RS 及び illumine: MiSeq) により、ゲノムシーケンスを行った。2種類のシーケンサーから得られた塩基配列について、CLC Genomic Workbench によりアセンブリーを行い、コンティグ配列を得ると共に、約5,180の遺伝子を同定した。また、既知のマラリアゲノムにおける染色体上での遺伝子の並び順を参考に *P. gonderi* のコンティグ間の結合を予測し、PCR とその産物のシーケンス (Sanger 法) を必要に応じて行い、コンティグを14本と予想される染色体と同数の super-contig、ミトコンドリアゲノム1本、アピコプラスとゲノム1本の合計16本にまとめた。これまでにゲノム情報が利用可能なアジアのマカクを宿主とするマラリア原虫5種とアフリカのオナガザルを宿主とする *P. gonderi*、ヒトを宿主とする *P. vivax* の7種間において比較ゲノム解析を行った。*P. coatneyi* は遺伝子の同定がされておらず、また *P. inui*、*P. fragile* については遺伝子領域を予測するプログラムにより遺伝子が同定されていたため、ミスが多くこれら3種については新たに遺伝子領域の同定を行い解析に用いた。更に、1番から4番染色体上にある遺伝子の中から7種間でオルソログ遺伝子が存在する627遺伝子、991,500座位(330,500アミノ酸座位)を用いて系統樹解析を行った。系統樹解析には RAxML raxml 8.2.7 を使用した。

4. 研究成果

アフリカに生息するオナガザルを宿主とするマラリア原虫 *Plasmodium gonderi* のゲノムの概要を Table 1 にまとめた。染色体数、ゲノムサイズ、などは近縁マラリア原虫種のものとは大きな差はないが、核ゲノムの GC 含量は三日熱マラリア原虫 *P. vivax* の42.3%、マカクマラリア原虫 *P. cynomolgi* の40.4%と比較すると低いことがわかった。サルマラリア原虫は三日熱マラリア原虫を除くヒト・類人猿マラリア原虫、げっ歯類マラリア原虫、鳥マラリア原虫などと比較して、GC 含量が高い傾向があるが、*P. gonderi* の GC 含量はげ

っ菌類マラリア原虫と同等であり、サルマラリア原虫の系統では *P. gonderi* の分岐後に GC 含量が高くなる方向へ進化していたことが伺える。超高速シーケンサー Pacific Biosciences: PacBio RS から 5.1 Gb、illumina: MiSeq から 2.9 Gb、合計 8.0 Gb の塩基データをアセンブリーにより核ゲノム 14 本、ミトコンドリアゲノム 1 本、アピコプラストゲノム 1 本の合計 16 本にまとめた。14 本の核ゲノムからは 5,180 個の遺伝子を同定した。染色体上での正確な位置づけが不明なリードが 220,009 本残ったがそれらのほとんどがテロメア領域に存在するものと考えられ、そこには *Plasmodium interspersed repeats (pir)* と称される免疫回避に関わる抗原分子が数多く存在していると考えられた。アジアに生息するマカクを宿主とする 5 種のサルマラリア原虫 (*P. cynomolgi*, *P. knowlesi*, *P. fragile*, *P. coatneyi*, *P. inui*)、アフリカのオナガザルを宿主とする *P. gonderi*、ヒトを宿主とする三日熱マラリア原虫 *P. vivax* の 7 種間において、シンテニーはテロメア領域以外では非常に良く保存されていた。抗原遺伝子ファミリー (*pir*, *sera*, *msp3*, *msp7* など) や赤血球への接合侵入関連分子の遺伝子、rRNA unit 数などにおいて種間で数のばらつきが観察されたが、それ以外の遺伝子は染色体上の位置も含めて種間で良く保存されていた。

Table 1 *Plasmodium gonderi* genome features

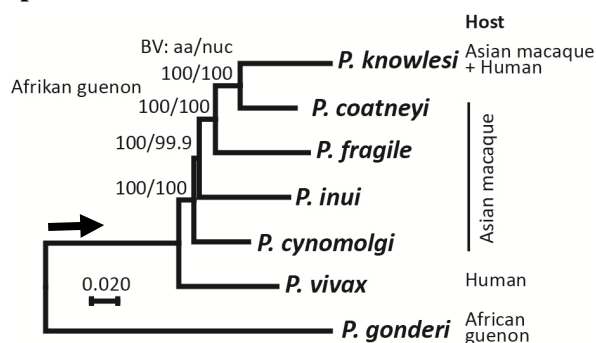
Assemble	
size (Mb)	23.4
Number of scaffolds	16
Coverage	341
GC content (%)	26.1
Genes	
No. of protein coding genes	5,180
Mean gene length (bp)	2,050
Gene density (bp/gene)	4517.4
Percentage coding	45.4
Nuclear genome	
number of chromosome	14
Mitochondria genome	
Size (bp)	5,989
GC(%)	29.9
No. of protein coding genes	3
Apicoplast genome	
Size (bp)	34,507
GC(%)	14.1
No. of protein coding genes	30

Table 2 Nucleotide and amino acid number used for the phylogenetic analysis

Chr. No	gene	nuc	aa
Chr. 1	153	267,318	89,106
Chr. 2	136	204,657	68,219
Chr. 3	182	289,284	96,428
Chr. 4	156	230,241	76,747
total	627	991,500	330,500

1 番から 4 番染色体上にある遺伝子の中からアジアのマカクを宿主とするマラリア原虫 5 種とアフリカのオナガザルを宿主とする *P. gonderi*、ヒトを宿主とする *P. vivax* の 7 種間でオルソログ遺伝子が存在する 627 遺伝子、991,500 座位 (330,500 アミノ酸座位 (Table 2)) を用いて系統樹解析を行った。

Fig. 1 Phylogenetic tree of 7 *Plasmodium* species



Program: RaxML-8.2.7,
Model: aa = PROTGAMMA,
nuc = GTRGAMMA
Bootstrap analysis: 1000 resampling

その結果、Fig. 1 に示すようにヒト三日熱マラリア原虫 *P. vivax* の分岐位置はアフリカのオナガザルを宿主とする *P. gonderi* の次、すなわち、アジアのマカクを宿主とする 5 種のマラリア原虫の根元である可能性が強く支持された。このことは、これまでの通説「三日熱マラリア原虫 *P. vivax* の起源はアジアのマカクを宿主とするマラリア原虫からヒトへの宿主転換」を覆し、アジアのマカクを宿主とするマラリア原虫よりも *P. vivax* の起源の方が古いということを表している。アフリカ大陸の西側では Duffy 抗原マイナスのヒト集団が存在しており、これは三日熱マラリア原虫による選択圧の結果だと考えられることから、三日熱マラリア原虫はアフリカで発生し、その後アジア地域に広がったとする説が昔から提唱されている。しかしながら分子データによる解析 (Escalante AA et al. PNAS 102(6) 1980 - 1985 (2005) 他) では三日熱マラリア原虫の分岐位置はアジアに生息するマカクの中に位置付けられ、最近では

三日熱マラリア原虫のアジア起源説が支持されていた。今回は大量のゲノムデータから解析を行ったことで、三日熱マラリア原虫の起源がアフリカにあることを示唆する解析結果が得られた。また、アジアに生息するマカクを宿主とするマラリア原虫の系統は短い期間に一気に種分岐が生じたことから系統関係を明確にすることが難しかったが、大量のゲノムデータを用いることで関係を明らかにできる可能性が見いだされた。

Fig. 2 Bootstrap value of *P. gonderi*, *P. vivax* and *P. cynomolgi* monophyletic clade

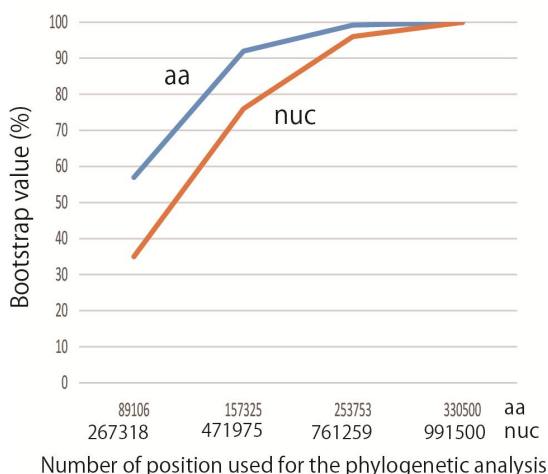


Fig. 1 の矢印の位置のブートストラップ値は *P. gonderi*, *P. vivax*, *P. cynomolgi* の3種が単系統である確率を示すものであるが、この値が系統樹解析に取り入れる塩基もしくはアミノ酸数を増やすことで劇的に上昇していることが **Fig. 2** に示されており、大量のゲノムデータを使って解析することで系統樹の解像度が飛躍的に改善することが良く示されている。

原虫の赤血球への接合に関与する分子、Duffy Binding Protein (DBL) の宿主特異性への関与がこれまでの比較ゲノム解析から示唆されているが、*P. vivax* の祖先系である *P. gonderi* を含めた *P. vivax* 近縁マカクマラリア原虫では DBL のコピー数は2つ以上あり、これが *P. vivax* において1つに減少したことが *P. vivax* のヒト、類人猿に特化した宿主域に関与している可能性が本研究からも示唆された。

今回の研究課題で明らかにした *P. gonderi* のゲノムデータは、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録の手続きを準備中である。

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)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計1件)

有末伸子、本間一、川合覚、東岸任弘、田邊和祐、堀井俊宏 「サルマラリア原虫 *Plasmodium gonderi* のゲノム解析 - マラリア原虫の系統関係解明に向けて - 」第23回分子寄生虫学ワークショップ&第13回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム(2015年8月30日~9月2日、帯広市)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

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

本間 一 (HONMA, Hajime)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：10617468

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

(3)連携研究者

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

田邊 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

橋本 哲男 (HASHIMOTO, Tetsuo)
筑波大学・生命環境科学研究科(系)・教授
研究者番号：50208451

川合 覚 (KAWAI, Satoru)
獨協医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70275733