

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650125

研究課題名(和文) ヒト-熱帯熱マラリア原虫共進化

研究課題名(英文) Coevolution of human and plasmodium falciparum malaria

研究代表者

大橋 順 (Ohashi, Jun)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80301141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)： タイ人熱帯熱マラリア患者において、rs87186-Gアレルが重症マラリア抵抗性と関連していた。Gアレルは分泌型EPCR量を増加させるため、分泌型EPCRが赤血球表面上のPfEMP1に優先的に結合することで、膜結合型EPCRと感染赤血球との結合を阻害している可能性がある。

熱帯熱マラリア原虫のTRAP分子はスポロゾイト上に発現しており、ヒトの肝細胞に感染する際に重要な役割を果たす。タイの32個体の熱帯熱マラリア原虫のTRAP遺伝子を解析し、39個の非同義SNPと2個の同義SNPとを検出した。分子進化的解析により、TRAP遺伝子には強い多様化選択が作用してきたことが確認された。

研究成果の概要(英文)： The EPCR protein, encoded by the PROCR gene, has recently been identified as an endothelial receptor for specific *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) subtypes containing domain cassettes 8 and 13. In this study, a total of 707 Thai patients with *P. falciparum* malaria were genotyped for rs867186. The rs867186-GG genotype showed significant association with protection from severe malaria. The present results suggest that PfEMP1-EPCR interaction, which can mediate cytoadhesion or reduce cytoprotective and anti-inflammatory effects, is crucial to the pathogenesis of severe malaria.

TRAP is expressed in sporozoites of *P. falciparum* malaria and plays a crucial role in sporozoite gliding and invasion of human hepatocytes. The evolutionary analyses showed that the ratio of the number of nonsynonymous to synonymous polymorphic sites suggest that the TRAP gene has been subject to diversifying selection in the Thai *P. falciparum* population.

研究分野：人類遺伝学

キーワード：熱帯熱マラリア 共進化 自然選択 多型間相互作用

### 1. 研究開始当初の背景

宿主-病原体間の共進化とは、二種の生物が互いに選択圧をかけあいながら、それに互いに適応することにより共存してきた過程といえる (Woolhouse et al., 2002)。すなわち、宿主はその免疫応答を含めた様々な防御対策により病原体を排除しようとして進化し、病原体は宿主の防御対策を回避するように進化する。病原体が宿主の細胞に侵入する過程について考えると、病原体のリガンドは宿主細胞のレセプターに効率的に結合するように進化し、宿主のレセプターは結合しにくくなるように進化する。しかし、このような宿主と病原体の分子が直接的に作用しあう感染過程において、相互作用による共進化が起きているのか、また起きているとするとどの程度の選択圧が作用するか (選択強度) を知ることは容易ではない。

自然選択を検出する一般的手法として、一方の種に着目し、近縁種との遺伝子配列比較から非同義置換速度 (dN) と同義置換速度 (dS) とを比較することで、当該遺伝子に自然選択が作用した痕跡を見いだす手法がある。しかし、dN/dS による計算からは、自然選択上有利なために固定した非同義置換部位やその選択強度まではわからない。

本研究は、熱帯熱マラリア患者から抽出した同一人物由来のヒトと熱帯熱マラリア原虫のゲノム DNA を研究材料とし、両者の遺伝子を同時に解析する。それにより、マラリア患者とその患者に実際に感染しているマラリア原虫の、一対一対応関係を利用した統計解析が可能である。

本研究によって、熱帯熱マラリア感染の成立・維持において重要な役割を果たす遺伝子の分子進化メカニズムの理解が進むだけでなく、相互作用で重要な役割を果たすアミノ酸部位 (薬剤やワクチンの直接のターゲットとなりうる) が同定されれば、熱帯熱マラリアの予防薬・治療薬・ワクチンの開発にむけた基盤情報としての利用も可能と思われる。

### 2. 研究の目的

本研究は、ヒト (宿主) と熱帯熱マラリア原虫 (病原体) を対象に、(1) 熱帯熱マラリア原虫 (メロゾイト) のヒト赤血球への侵入、(2) 熱帯熱マラリア原虫感染赤血球 (原虫由来赤血球表面抗原) とヒト血管内皮細胞への接着、のマラリア感染の成立・維持の過程において、直接的に作用しあうヒト側分子と原虫側分子をコードする遺伝子を同時解析することにより、ヒトと原虫の遺伝子多型間の相互作用を検出すること (遺伝疫学的アプローチ) と、各遺伝子に作用する正の自然選択の検出と選択強度を推定すること (集団遺伝学的アプローチ) を通して、宿主と病原体の共進化メカニズムの理解を目指す。

### 3. 研究の方法

タイ北西部に居住する熱帯熱マラリア患

者 784 名のゲノム DNA と当該患者に感染している熱帯熱マラリア原虫 784 個体のゲノム DNA を対象とした。

(1) (i) マラリア原虫 (メロゾイト) が赤血球へ侵入する過程と、(ii) マラリア原虫感染赤血球 (原虫由来赤血球表面抗原) が血管内皮細胞に接着する過程で働く分子群 (原虫側およびヒト側) の超並列シーケンサーによる候補遺伝子変異スクリーニング

本研究の候補遺伝子 (ヒト遺伝子と熱帯熱マラリア原虫遺伝子) は以下の通りである。

|            | 熱帯熱マラリア原虫遺伝子  | ヒト遺伝子                      |
|------------|---|----------------------------|
| 赤血球への侵入    | MSP1, MSP2, AMA-1, EBA175, EBA140, RhopH1, PhopH2, RhopH3 | GYPB, GYPB, GYPC           |
| 血管内皮細胞への接着 | PFEMP1 (var), rif, stevor, CLAG9 (RhopH1)                 | CD36, ICAM-1, PECAM-1, CR1 |

上表の全遺伝子について、直接塩基決定法により、ヒトゲノム 45 検体と熱帯熱マラリアゲノム 45 個体のコード領域の配列解析を行った。なお、一部の領域しか解析できなかった遺伝子もある。データベース (NCBI, 1000 genomes database, PlasmoDB など) も利用し、検出された多型を確認する。候補遺伝子中の多型中からアミノ酸置換を起こす多型 (非同義 SNP、ナンセンス変異、挿入欠失変異など) を抽出した。

(2) 検出された多型 (主に非同義 SNP) のタイピング

TaqMan アッセイにより、ヒト遺伝子多型とマラリア原虫遺伝子多型をタイピングした。原虫の多重感染 (同一検体由来のマラリア原虫において複数アリルが観察される) については、両アリルの増幅具合をもとに有無を慎重に確認した。

(3) ヒト-マラリア原虫多型間相互作用の検出 (統計検定)

カイ 2 乗検定を用いて、ヒト遺伝子多型と原虫遺伝子多型との相互作用を検出した (検出力の低下を防ぐため、マイナーアリル頻度が高い多型を対象とする)。多重感染が認められた場合には、その多型については、当該サンプルを 2X3 の表からは除いた。さらに、得られたデータをもとに、STRUCTURE 解析と系統樹解析を行い、マラリア原虫集団の階層化についても検討した。

(4) 正の自然選択の検出と選択強度の推定 (コンピュータシミュレーション)

相互作用が検出されたヒト多型とマラリア多型のそれぞれについて、ハプロタイプホモ接合度 (EHH) を計算した。正の自然選択が作用したアリルについては、前向きコンピュータシミュレーション (文献: [ , ,

] )により自然選択強度の推定を行った。

#### <引用文献>

Kawashima M, Ohashi J, Nishida N, Tokunaga K (2012) Evolutionary analysis of classical HLA class I and II genes suggests that recent positive selection acted on DPB1\*04:01 in Japanese population. *PLoS ONE* 7: e46806.

Ohashi J, Naka I, Tsuchiya N (2011) The impact of natural selection on an ABCC11 SNP determining earwax type. *Molecular Biology and Evolution* 28: 849-857.

Ohashi J et al. (2004) Extended linkage disequilibrium surrounding the hemoglobin E variant due to malarial selection. *American Journal of Human Genetics* 74: 1198-1208.

#### 4. 研究成果

##### (1) 熱帯熱マラリア原虫 EBA175 遺伝子の解析

熱帯熱マラリア原虫は、自身の EBA175 分子をリガンド、ヒトの GYPA 分子をレセプターとして利用し赤血球へ侵入する。32 個体の熱帯熱マラリア原虫の EBA175 遺伝子の region II と region III の配列解析を行い、region III に位置する F セグメントと C セグメントの分子進化解析を行った。その結果、F セグメント自体、C セグメント自体には正および負の自然選択が作用した痕跡は検出されなかったが、両セグメントはほぼ同時期に誕生したと推察された。データベースからチンパンジーに感染する *P. reichenowi* の配列を取得して比較したところ、両セグメントは、熱帯熱マラリアと *P. reichenowi* の双方で維持されてきたことが示唆された。

##### (2) ヒトの PROCR 遺伝子多型の解析

ヒトの EPCR 分子には膜結合型と分泌型の二種類が存在し、膜結合型 EPCR は熱帯熱マラリア原虫の赤血球表面抗原 PfEMP1 のレセプターとして機能することが報告されている。EPCR の膜結合型と分泌型の生産量には個人差が存在し、EPCR をコードする PROCR 遺伝子の単塩基多型 rs87186 がその生産量と関連することが知られている。熱帯熱マラリアに感染した 677 名のタイ人マラリア患者の rs87186 遺伝子型を解析したところ、派生型アリル G が重症マラリア抵抗性と関連していた。G アリルを保有すると分泌型 EPCR の量が増えるため、分泌型 EPCR が赤血球表面上の PfEMP1 に優先的に結合することで、膜結合型 EPCR と感染赤血球との結合を阻害している可能性を示唆している。

##### (3) 熱帯熱マラリア原虫 TRAP 遺伝子の解析

熱帯熱マラリア原虫の thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) 分子はスポロゾイト上に発現してお

り、ヒトの肝細胞に感染する際に重要な役割を果たす。タイの 32 個体の熱帯熱マラリア原虫の TRAP 遺伝子を解析し、39 個の非同義 SNP と 2 個の同義 SNP とを検出した。*P. reichenowi* の TRAP 遺伝子配列を用いたマクドナルド・クレイトマン検定により、タイの熱帯熱マラリア原虫には、強い多様化選択が作用してきたことが確認された。また、同じタイであっても、異なる地方の熱帯熱マラリア原虫の TRAP 遺伝子とも分化しており、多様化選択は比較的最近も作用していることが示唆された。

##### (4) TRAP アミノ酸多型とヒト HLA クラス I アリルとの相互作用

TRAP 遺伝子の配列解析から予測されたアミノ酸多型について、タイ人熱帯熱マラリア患者に高頻度で観察される HLA クラス I アリルがペプチドとして結合する領域に存在するかを推定した。相互作用を示す可能性のある 30 通りのアミノ酸多型と HLA クラス I アリルの組合せが検出され、そのうちの 2 つの組合せは、カイ 2 乗検定によって統計学上有意差を示した。

##### (5) 感染赤血球の表面に発現するマラリア抗原と接着する PECAM1 分子をコードする遺伝子のタグ SNP の解析を行い、脳性マラリアと関連する 2 つの独立な SNP (2 つの連鎖不平衡ブロック) を同定した。

#### 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 6 件)

Ohashi J, Naka I, Hananantachai H, Patarapotikul J. Association of *PECAM1/CD31* polymorphisms with cerebral malaria. *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics* (in press) (査読有)

Mita T, Culleton R, Takahashi N, Nakamura M, Tsukahara T, Hunja C, Win Z, Htike W, Marma A, Dysoley L, Ndounga M, Dzodzomenyo M, Akhwale W, Kobayashi J, Uemura H, Kaneko A, Hombhanje F, Ferreira M, Endo H, Ohashi J. Little polymorphism at the K13 propeller locus in worldwide *Plasmodium falciparum* populations prior to the introduction of artemisinin combination therapies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (in press) doi: 10.1128/AAC.02370-15. (査読有)

Yasukochi Y, Naka I, Patarapotikul J, Hananantachai H, Ohashi J (2015) Genetic evidence for contribution of human dispersal to the genetic diversity of EBA-175 in *Plasmodium falciparum*.

Malaria Journal 14: 293. DOI:  
10.1186/s12936-015-0820-2. ( 査読有 )  
Naka I, Patarapotikul J, Hananantachai  
H, Imai H, Ohashi J (2014) Association  
of the endothelial protein C receptor  
(PROCR) rs867186-G allele with  
protection from severe malaria. Malaria  
Journal 13: 105. DOI:  
10.1186/1475-2875-13-105. ( 査読有 )  
Naka I, Patarapotikul J, Hananantachai  
H, Ohashi J (2014) Lack of association  
between BSG polymorphisms and cerebral  
malaria. Japanese Journal of Infectious  
Diseases 67: 432-435.  
doi.org/10.7883/yoken.67.432. ( 査読有 )  
Ohashi J, Suzuki Y, Naka I,  
Hananantachai H, Patarapotikul J (2014)  
Diversifying selection on the  
thrombospondin-related adhesive  
protein (TRAP) gene of Plasmodium  
falciparum in Thailand. PLoS ONE 9:  
e90522. doi:  
10.1371/journal.pone.0090522. ( 査読有 )

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

大橋 順 (Ohashi, Jun)

東京大学・大学院理学系研究科・准教授

研究者番号 : 80301141