

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293091

研究課題名(和文)人工染色体技術を利用した熱帯熱マラリア原虫薬剤耐性機構の解明

研究課題名(英文)Identification of drug resistance gene using Plasmodium artificial chromosome

研究代表者

岩永 史朗 (Iwanaga, Shiroh)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20314510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：現在、薬剤耐性熱帯熱マラリア原虫が地球規模で蔓延し治療は困難な状況にある。しかし対策に必要な薬剤耐性機構に関しては殆どの抗マラリア薬を含め全容解明には至っていない。本研究では独自に開発したセントロメアプラスミドを用いた新規薬剤耐性遺伝子同定法を用い、クロロキン耐性及びメフロキン耐性遺伝子の同定を試みた。その結果、クロロキン耐性遺伝子の候補としてPlasmepsinVIを同定し、ヘモグロビン分解系に作用することで耐性を発現する可能性を示唆した。またメフロキン耐性遺伝子として新規ABCトランスポーター(PfMDR7)を同定し、膜に結合したメフロキンを細胞外へと排出し、耐性を獲得することを示唆した。

研究成果の概要(英文)：The global spread of drug-resistant Plasmodium falciparum is a major obstacle to malaria treatment. Identification of drug resistance genes is crucial to efforts aimed at fighting resistant parasites, but most of them have remained unclear. In this study, we attempted to identify mefloquine- and chloroquine-resistance genes by our developed method. Briefly, high-coverage genomic libraries of a drug-resistant strain are directly generated in drug-sensitive parasites using the centromere plasmid and an improved transfection technique, and the drug resistance gene is then robustly identified from these libraries by drug screening. We successfully used this approach to identify multi-drug-resistant transporter 7, an ATP-binding cassette transporter, as a novel mefloquine resistance gene from a field-isolated parasite strain. In addition, plasmepsin VI was identified as novel chloroquine-resistance gene candidate.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア 薬剤耐性 人工染色体

1. 研究開始当初の背景

熱帯熱マラリア原虫はヒトに対し甚大な被害を及ぼし、その感染による死者は年間数十万人にも及ぶ。現在、薬剤耐性熱帯熱マラリア原虫が地球規模で蔓延し、その治療は極めて困難な状況にある。即ち殆ど全ての抗マラリア薬に対する耐性原虫の発生・分布拡大が確認され、治療効果は急激に低下している。しかし対策に必須な薬剤耐性機構に関しては、クロロキン耐性において部分的に解明されただけであり、他の抗マラリア薬を含め全容解明には至っていない。よって耐性機構を基とした新薬開発や遺伝子診断法の開発等、有効な打開策は講じられていない。

一方、現在までに申請者はネズミマラリア原虫において新規遺伝子操作ツールである「マラリア原虫人工染色体」を作製し、これを用いた薬剤耐性遺伝子迅速同定法を開発した。更に熱帯熱マラリア原虫においても人工染色体と類似の機能を持つセントロメアプラスミドと高効率遺伝子導入法を開発し、前述のネズミマラリア原虫と同様の耐性遺伝子迅速同定法を確立した(図1)。

具体的にはクロロキン耐性熱帯熱マラリア原虫株由来のゲノム DNA とセントロメアプラスミドを用いて野生型原虫(薬剤感受性原虫)内に直接、遺伝子ライブラリーを構築後、薬剤スクリーニングによって既知のクロロキン耐性遺伝子(Chloquine resistant transporter: PfCRT)及び数種の新規耐性遺伝子候補の同定に成功した。この成果はクロロキン耐性が複数の遺伝子が関与する複雑な機構に因ること示唆し、耐性機構の全容解明の糸口を与えるものである。また上記研究と並行してタイ-ミャンマー国境地帯においてフィールド研究を展開し、流行地マラリア患者血液からクロロキン、メフロキンに対する薬剤耐性熱帯熱

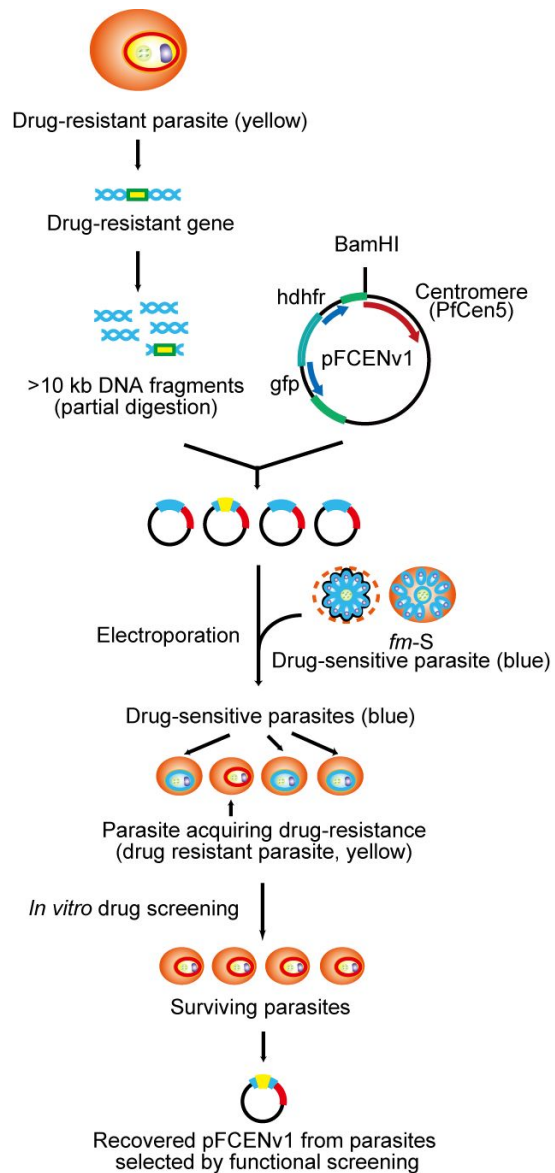


図1：耐性遺伝子迅速同定法概略

マラリア原虫株を総計 46 株獲得した。

2. 研究の目的

本研究では以下の研究計画・目標を設定する。既に同定した新規クロロキン耐性遺伝子候補の機能解析を行い、耐性への関与を明らかにする。株化したメフロキン耐性原虫より新規耐性遺伝子を同定し、得られた耐性遺伝子産物の局在解析・構造機能相関によって耐性機構を解明する。以上の研究より新たに薬剤耐性遺伝子に関する知見を得て、マラリア原虫の薬剤耐性機構に関する知見を得る。

3. 研究の方法

(メフロキン耐性遺伝子に関する研究)

タイ - ミャンマー国境地域マラリア患者より樹立したメフロキン耐性原虫株より人工染色体を用いて耐性遺伝子を同定する。即ち、メフロキン耐性原虫からゲノム DNA を抽出し制限酵素による限定分解を行って 10-50kb の DNA 断片を調製する。次にこれらをセントロメアプラスミドに組み込み、遺伝子ライブラリーを作製し、独自に開発した高効率遺伝子導入法により直接、野生型株 (薬剤感受性) へ導入する。次にライブラリーを導入した原虫をメフロキンによりスクリーニングし、新たに耐性を獲得した原虫を選択する。続いて選択した原虫を限界希釈法によりクローン化し、インサート DNA 断片が挿入されたセントロメアプラスミドを回収する。インサート DNA の配列はゲノムウォーキング法により決定し、これを基にメフロキン耐性に関与する原虫染色体上の領域を同定する。最終的に同定した領域中に存在する遺伝子を個別に導入した組換え原虫を作製して薬剤耐性を検討し、メフロキン耐性遺伝子を同定する。

(クロロキン耐性遺伝子に関する研究)

研究開始以前にクロロキン耐性原虫標準株 (Dd2 株) を用い、図 1 に示す実験を行い、耐性遺伝子 (PfCRT) 遺伝子を同定した。加えて第 3 番・5 番・14 番染色体上にクロロキン耐性に関与する領域を同定し、領域内に 9 個の遺伝子が存在することを示した。そこでまず、PfCRT 遺伝子以外の耐性遺伝子候補を個別にセントロメアプラスミドを用いて導入し、何れの遺伝子が耐性に関与するかを決定する。

クロロキン耐性はタイ - ミャンマー国境地域において高度に蔓延し、耐性遺伝子として変異 PfCRT 遺伝子を持つことが知られている。一方、蔓延するクロロキン耐性原虫の耐性は異なっていることが知られており、これらが PfCRT 遺伝子の変異以外の要

因により耐性強度を変化させていると考えられる。そこでこれらの耐性の異なる株を樹立し、PfCRT 遺伝子変異以外の耐性を与える要因を検討する。即ち、既にタイ - ミャンマー国境地域の患者由来のクロロキン耐性株をスクリーニングし、強度、中度、低度の耐性株を樹立する。次にこれらの PfCRT 遺伝子変異を調べ、耐性に与える影響を調べる。また、上記株についても図 1 の実験を行い、PfCRT 遺伝子以外の耐性遺伝子の同定を試みる。

4. 研究成果

(メフロキン耐性遺伝子に関する研究)

タイ - ミャンマー国境地域患者由来のメフロキン耐性株 (MEF1 株 IC50 値 : 33.0nM) を樹立し、これよりセントロメアプラスミドを用いて合計で 8 つの遺伝子ライブラリーを構築した。構築したライブラリーについてインサート DNA 平均長及び独立して遺伝子導入された原虫クローン数を決定して、ゲノム被覆度の合計は 12.5 であると算出した。次に構築したライブラリーについて 15nM のメフロキンを用いて 4 日間スクリーニングを行った結果、3 つのライブラリーより生き残った原虫を検出した。更に検出した原虫を同じ濃度のメフロキンで 4 日間、続いて 6 日間、スクリーニングし、最終的に 2 つのライブラリ

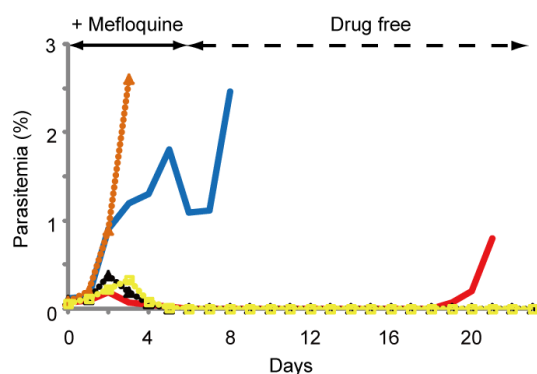


図 2: メフロキンによる 3 次スクリーニング
赤・青: ライブラリーより選択した原虫
橙: MEF1 株、黄: 3D7 株、黒: ネガティブコントロール

ーより新たにメフロキン耐性を獲得した原虫を選択することに成功した(図2)。各選択した原虫より限界希釈法により原虫をクローン化し、これらについてメフロキン耐性を評価した結果、IC50値で約21.4nMであった。野生型原虫(3D7株)のIC50値は13.8nMであったことから得られた原虫クローンが遺伝子導入によりメフロキン耐性を獲得したことが確認された。

次に得られた原虫クローンよりセントロメアプラスミドを回収し、組み込まれたインサートDNAの配列を決定した。その結果、クローンにはそれぞれ第12番染色体の436938-465288と438880-455299をコードしており、共通した遺伝子群を含むことが明らかとなった(図3)。そこで耐性遺伝子候補を

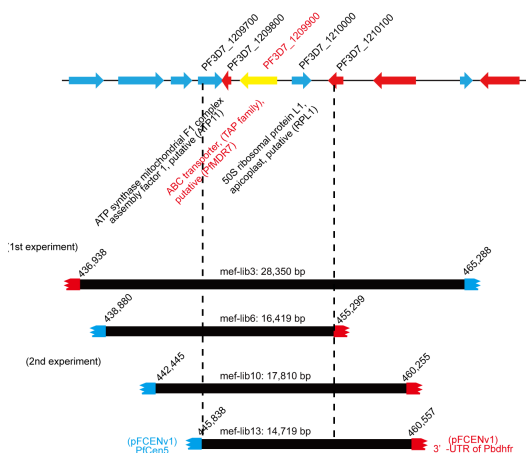


図3: 選択した原虫内に組み込まれたMEF1由来インサートDNAの解析: 1回目、2回目の試行結果を示す。

絞り込むために再度、MEF1株より8つの遺伝子ライブラリーを構築し、メフロキンによる薬剤スクリーニングを実施した。3回のスクリーニングの結果、2つのライブラリーにおいて新たにメフロキン耐性を獲得した原虫の選択に成功した。得られた原虫をクローン化し、組み込まれたMEF1由来のインサートDNAの配列を決定したところ、1回目の試行と同様に両クローン共に第12番染色体由来のDNA断片であり、それぞれ442455 - 460255

と445838-460557をコードしていることが明らかとなった。これらはいずれも1回目の試行で同定したゲノム上の領域とオーバーラップしていた。以上の結果より、MEF1株は第12番染色体上の共通領域(445838-455299)に耐性遺伝子を持つことが示された(図5)。

同定した領域には3つの遺伝子(PF3D7_1209800, putative ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 1, PF3D7_1209900; putative ABC transporter B (ABCB) family member 7, PF3D7_1210000; putative apicoplast ribosomal protein L1)がコードされていた。そこでMEF1株よりこれらを個別にセントロメアプラスミドに組み込み、得られた組み換え原虫のメフロキン耐性を検討した。その結果、PF3D7_1209900; putative ABC transporter B (ABCB) family member 7を導入した組み換え原虫ではメフロキン耐性が確認され、一方、残りの二つの遺伝子では耐性は確認されなかった。以上の結果よりMEF1株はPF3D7_1209900を使ってメフロキン耐性を獲得していることが明らかとなった。

同定したメフロキン耐性遺伝子(PF3D7_1209900)はアミノ酸配列の類似性よりABCトランスポーターファミリーに分類され、マラリア原虫においてはMultidrug resistant protein 7 (PfMDR7)と名付けられている。ABCトランスポーターは広く原核生物・真核生物において保存され、異物排出だけでなく薬剤排出に関与していることが知られている。真核生物ではABCトランスポーターは構造的な特徴より7種のサブファミリーに分類され、PfMDR7はこのうちABCBサブファミリーに属する。このABCBサブファミリーは脂溶性薬剤の排出に関与し、膜に侵入してきた薬剤を脂質二重膜内で捉え、細胞外に排出する。興味深いことにメフロキンは脂溶性の

抗マラリア薬であり、原虫細胞膜にも結合すると推定される。よって PfMDR7 は膜に侵入したメフロキンを膜内で認識し、細胞外へと排出することにより耐性を付与していると考察した(図4)。

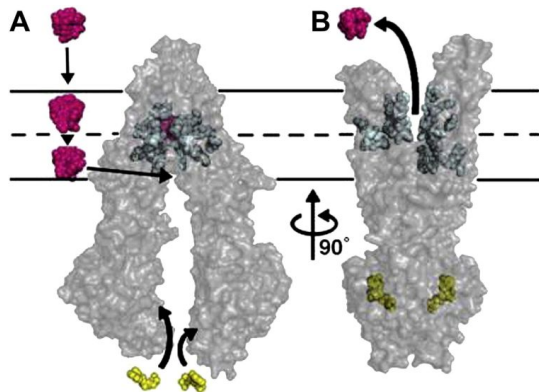


図4: ABCB サブファミリーによる薬剤排出機構: PfMDR7 はメフロキンを細胞膜内で捉え(A)、細胞外へと排出すると推定される(B)。

(クロロキン耐性遺伝子に関する研究:Dd2株由来耐性遺伝子の同定)

研究開始までにクロロキン耐性実験株(Dd2株)由来ゲノムDNAを使い、セントロメアプラスミドを使って遺伝子ライブラリーを構築していた。更にこれをクロロキンにより薬剤スクリーニングし、クロロキン耐性に関与する3か所のゲノム上の領域((第3、第5、第14番染色体)を同定していた。そこでまず、これらのゲノム上の領域の内、何れが真にクロロキン耐性を付与するか検討するために、個別に遺伝子を導入し、耐性を付与する遺伝子を同定した(図8)。その結果、第3番染色体由来のPF3D7_0311700がクロロキン耐性を付与することが明らかとなった。この遺伝子はPlasmeprin VIと命名された食胞に局在するタンパク質分解酵素をコードし、ヘモグロビン分解に関与する酵素であった。クロロキンの薬理活性はヘモグロビンの分解により生じるヘムの無毒化阻害であることが

ら、同定した酵素が食胞に何らかの役割を持ち、耐性に関与することが示唆された。

一方、タイ-ミャンマー国境地域はクロロキン耐性原虫が行動に蔓延していることが知られている。一方、これらの耐性の程度は原虫株ごとに異なっていることが報告されており、耐性の要因は複数あることが示唆される。そこで既に確立した46株の患者株についてクロロキン耐性試験を行い、IC₅₀値を指標に低・中・高度クロロキン耐性株を樹立した。その結果、IC₅₀値が約150nMの低耐性株を2種、約450nMの高耐性株を2種、得ることができた。また、前項で用いたDd2株のIC₅₀値は約330nMであったことから中耐性株であると判断した(図5)。

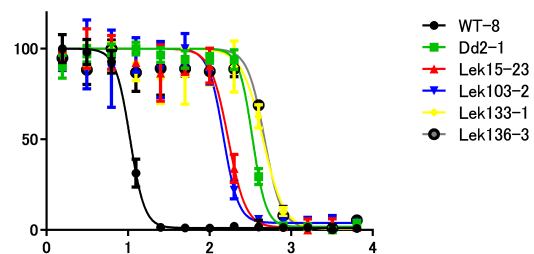


図5: タイ-ミャンマー国境地域患者由来クロロキン耐性原虫の耐性測定結果

次にこれらについて既知のクロロキン耐性遺伝子であるPfCRT遺伝子の変異を比較した。その結果、これらはどれもDd2株と同じ変異を有していることが示された。更に各株間でqPCRによりPfCRT遺伝子のコピー数を算出した結果、何れの株も1コピーであることが示された。以上の結果より少なくともクロロキン耐性の差にはPfCRT遺伝子は関与していない可能性が高いことが示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

1. A highly infectious Plasmodium yoelii parasite, bearing Plasmodium falciparum circumsporozoite protein. Zhang M, Kaneko I, Tsao T, Mitchell R, Nardin EH, Iwanaga S,

- Yuda M, Tsuji M. Malar J. 15(1):201. (2016) (査読有)
- Global transcriptional repression: An initial and essential step for Plasmodium sexual development. Yuda M, Iwanaga S, Kaneko I, Kato T. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Oct 13;112(41):12824-9. (2015) (査読有)
 - Genome-Wide Identification of the Target Genes of AP2-O, a Plasmodium AP2-Family Transcription Factor. Kaneko I, Iwanaga S, Kato T, Kobayashi I, Yuda M. PLoS Pathog. 11(5):e1004905. (2015) (査読有)
 - Horizontal gene transfer of a vertebrate vasodilatory hormone into ticks. Iwanaga S, Isawa H, Yuda M. Nat Commun. 5:3373 (2014). (査読有)

〔学会発表〕(計9件)

- Drug resistance in Malaria. Iwanaga S., The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity, , 淡路島国際会議場(兵庫県・淡路市) 06-09/09/2016 (invited speaker)
- ChIP-Seq 法を用いたマラリア原虫スポロゾイト期の転写因子 AP2-SP の全標的遺伝子の同定, 金子伊澄、岩永史朗、加藤知美、油田正夫, 第 85 回日本寄生虫学会大会, 宮崎市民プラザ(宮崎市・宮崎県) 19-20/03/2016.
- マラリア原虫の生殖母体への分化に関わるゲノムワイドな転写抑制, 岩永史朗、金子伊澄、加藤知美、油田正夫, 第 85 回日本寄生虫学会大会, 宮崎市民プラザ(宮崎市・宮崎県) 19-20/03/2016.
- Horizontal gene transfer (HGT) of a vertebrate vasodilatory hormone into ticks. Iwanaga S., BMB2015, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市), 01-04/12/2015 (Invited speaker)
- Horizontal gene transfer (HGT) of a vertebrate vasodilatory hormone into ticks. Iwanaga S., Medical Entomology Symposium at the Annual Meeting of Taiwan Entomological Society, Taipei, Taiwan, 21/10/2015 (Invited speaker)
- Horizontal gene transfer (HGT) of a vertebrate vasodilatory hormone into ticks. Iwanaga S. International meeting of Matryoshka-type Evolution, 筑波大(つくば市・茨城県) 30/09/2015 -02/10/2015 (Invited speaker)
- マラリア原虫の遺伝子発現制御機構, 岩永史朗、金子伊澄、加藤知美、油田正夫, 分子寄生虫ワークショップ 2015, 帯広畜大(帯広市・北海道), 30/08-02/09/2015
- Horizontal gene transfer (HGT) of a vertebrate vasodilatory hormone into ticks. Iwanaga S., International Symposium on Frontier Science of Pathogen-transmitting Vectors, 東京慈恵会医科大学(港区・東京都) 02/02/ 2015 (Invited speaker).
- ネズミマラリア原虫 2 種混合感染での感染動態, 石井明、柴田清、岩永史朗、油田正夫, 新倉保, 小林富美恵、第 83 回日本寄生虫学会大会, 愛媛大(松山市・愛媛県), 27-28/03/2014

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計1件)

名称: マラリア原虫のアルテミシニン耐性迅速検出法

発明者: 岩永史朗, 油田 正夫, 金子 伊澄

権利者: 国立大学法人三重大学

種類: 実用新案

番号: 2016-151355

出願年月日: 2016/8/1

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩永史朗 (Iwanaga, Shiroh)

三重大学・医学系研究科・准教授

研究者番号: 20314510