

Phonepadith Xangsayarath

論文内容の要旨

主論文(テーシス)

Temporal dynamics of the amino acid allele frequency distribution of
Plasmodium falciparum polymorphic antigens
(熱帯熱マラリア原虫多型抗原のアミノ酸型頻度分布の経時的ダイナミクス)
Phonepadith Xangsayarath

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 新興感染症病態制御学系専攻
(主任指導教員 : 金子修 教授)

緒言 : 熱帯熱マラリア原虫はいまだに途上国では重大な問題であり、有効なワクチンの開発が求められている。熱帯熱マラリア原虫の分子の中でも防御免疫を誘導する分子は通常高い多型性を示す。そのため、多型分子の多型が、多様性を増す正の選択圧により形成されたのか(免疫による選択を示唆する)、そうであればさらに、多型の集団内における頻度分布が時間の経過によってどのように変化するかを明らかにすることは、多型分子をベースとしたワクチンを開発する上で、重要な研究課題である。本研究では熱帯熱マラリア原虫の surface-associated interspersed gene (surf) 遺伝子族にコードされる分子のうち、赤血球侵入型原虫メロゾイトの表面に局在し、可逆的な赤血球認識の役割を持つと言われるSURFIN_{4.1}について、その細胞外領域に対する選択圧を種々の手法により明らかにし、またアミノ酸多型の頻度分布が経年的にどのように変化するかを明らかにする事とした。また、赤血球侵入中にメロゾイトのロプトリーから放出され、感染赤血球膜上に新たに作られる陰イオンチャネル活動に関与する事が報告されたcytoadherence linked asexual gene 3.1 (Clag3.1) のパラログで、同等の機能が予想されるClag2およびClag8, Clag9についても、アミノ酸多型の頻度分布の経年的変化を検討する事とした。

対象と方法 : 1988年から1989年にかけてタイで採取し、培養株化した熱帯熱マラリア原虫46株、および、2003年と2005年に熱帯熱マラリア原虫患者から得た血液含有濾紙(2003年は22株、2005年は7株)からDNAを抽出し、SURFIN_{4.1}の細胞外領域およびClag2, Clag8, Clag9の多型領域をコードするDNA断片をPCR増幅した後、塩基配列を決定した。複数の配列が検出された際にはプラスミドにクローニングし、解析を行った。SURFIN_{4.1}については同義置換率と非同義置換率の比較、また地域集団を対象とするTajimaテストおよびFu and Liテストにより選択圧の有無を検討した。次に、組換え率や構造的・機能的制約を反映する連鎖不平衡について検討し、最後に、SURFIN_{4.1}多型と3つのClagの多型の時間的変化を明らかにするため、各分子で見出した全てのアミノ酸置換変異部位および挿入・欠失変異部位

について、14年間で頻度分布が変化したかどうかを検討した。Clag2については、多型領域を大きく5型に分類することができるため、型の割合についても検討を加えた。同時に、以前に検討した、正の選択に対して中立と考えられる4つの一塩基多型マーカーに加えて、新たに14の中立と考えられる一塩基多型マーカーの多型情報を得て、中立マーカーの変化も検討した。

結果 : ①SURFIN_{4.1}の細胞外領域を多様性の程度や、他のSURFIN相同体との相同性を元に4つの領域(アミノ末端、システイン豊富領域、変異領域1、変異領域2)に分類した。②同義置換率と非同義置換率の比較、また地域集団を対象とするTajimaテストおよびFu and Liテストにより、SURFIN相同体間で多様性に富んだ変異領域2に正の選択圧を検出した。移動窓法を用いてテストを行ったところ、TajimaテストおよびFu and Liテストにより変異領域1に正の選択圧を検出し、Tajimaテストにより、システイン豊富領域にも正の選択圧が検出できた。③1.5 kb以上の距離にわたる強い連鎖不平衡を検出し、また、1988/1989年に検出した24ハプロタイプのうち、8ハプロタイプが14年後にも存在した。④18の中立マーカーについては、1988/1989年と2003年の間でアリル頻度分布に差は認められなかった。一方、SURFIN_{4.1}についても、260変異部位のうち、アミノ酸位置703のGly/Arg置換の一か所以外では差は検出できなかった。Clag2については、1988/1989年に最も頻度が高かった1型が2003年には有意に頻度が減少していた。Clag8では、アミノ酸位置1098のSerの頻度が2003年には有意に減少していた。Clag2とClag8の他の変異部位およびClag9では二群の間で有意な差は見られなかった。

考察 : 2010年にケニアの原虫集団を用いてSURFIN_{4.1}に対する選択圧を解析した報告では、負の選択圧(純化淘汰圧)がこの分子にはかかっていた。しかし、我々がタイの原虫株を用いて解析した結果では正の選択圧が検出された。SURFIN_{4.1}の多型の程度は、以前に調べた相同体のSURFIN_{4.2}よりも高く、選択圧により強くさらされている事が示唆された。ケニアの原虫集団の配列を解析したところ、シングルトン変異が多く見られ、これが負の選択圧が検出される一つの要因と考えた。検出された連鎖不平衡と14年間にわたって同じアリルが存在することは、タイにおける組換え頻度の低さで説明されうる。最後に、ほとんどの部位でSURFIN_{4.1}およびClagのアリル頻度分布は14年間にわたって安定しており、これらの抗原多型の頻度分布は少なくとも劇的には変化しないことが分かった。一方、アリル頻度分布の変化が検出された部位が、本当に何らかの選択圧により変化したのかどうかについては、さらなる検討が必要である。