

氏 名 三井 英也

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1394 号

学位授与の日付 平成 22 年 9 月 30 日

学位授与の要件 先導科学研究科 生命体科学専攻  
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 アピコプラストコード遺伝子によるマラリア原虫  
*Plasmodium* 属の分子系統

論文審査委員 主 査 教授 颯田 葉子  
特任教授 長谷川 政美  
准教授 足立 淳  
准教授 稲垣 祐司（筑波大学）

## 論文内容の要旨

アピコンプレックス類の寄生虫は *Plasmodium* 属の種を含めて色素体様オルガネラであるアピコプラストを保持している。アピコプラストには約 35kb の環状のゲノム DNA が存在しており、そのゲノムにコードされている遺伝子の配列は色素体由来の配列に類似している。しかし、アピコプラスト DNA には光合成関連の遺伝子はコードされていない。このオルガネラは紅藻類の色素体の名残であり、おそらくはアピコンプレックス類の祖先での二次共生を通して獲得されたものと考えられる。アピコプラストコードの遺伝子のほとんどは 1 コピー遺伝子であるが、逆平行繰り返し配列 (Inverted Repeats) となっている部分には一部の遺伝子が 2 コピーコードされている。しかし、それら 2 コピー遺伝子それぞれの配列は同一である。したがって、アピコプラスト DNA にコードされた遺伝子はアピコンプレックス類の寄生虫の進化の歴史を辿るのに適すると考えられる。こうした中、私はマラリア原虫の系統と進化を解明するために、アピコプラストコードの遺伝子を解析してきた。本研究において私はヒトマラリア原虫である *Plasmodium vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* の 3 種、サルマラリア原虫である *P. gonderi* (アフリカ起源), *P. hylobati*, *P. inui*, *P. knowlesi*, *P. coatneyi*, *P. cynomolgi*, *P. simiovale*, *P. fieldi*, *P. fragile* (以上東南アジア起源) の 9 種、およびトリマラリア原虫 *P. gallinaceum* の合計 13 種について、アピコプラストコードの SSUrRNA、LSUrRNA、および ClpC の各遺伝子の配列決定を行った。また、EF-Tu 遺伝子のうち配列未知であった *P. fieldi* の遺伝子の配列決定を行い、さらに公共データベースから他の EF-Tu 遺伝子の配列を取得し、すべての遺伝子による分子系統解析を行った。最初にヒトのマラリア原虫 4 種すべてを含むマラリア原虫全体の解析を行い、続いてヒト三日熱マラリア原虫 *P. vivax* および東南アジアのサルマラリア原虫の系統関係に関する解析を行った。

マラリア原虫全体の解析において、個別の遺伝子を用いた結果、ヒト三日熱マラリア原虫 *P. vivax* と、東南アジアのサルマラリア原虫、アフリカのサルマラリア原虫 *P. gonderi* が単系統であることがすべての遺伝子の解析で一貫して復元された。*P. gonderi* はサルマラリアの中で最も早く分岐したことが示された。これらは先行研究の結果と一致した。4 つの遺伝子の総合評価では、同じデータセットを情報の結合方式が異なるモデル (連結モデル 1 種類、分離モデル 4 種類) を用いて解析すると、異なる樹形が最尤系統樹として示された。しかし、これらの樹形の間統計的な有意差は検出されなかった。無根系統樹におけるトリマラリア原虫 *P. gallinaceum* とヒト熱帯熱マラリア原虫 *P. falciparum* の間のクレードは異なるモデルを用いた解析でも一貫して支持された。先行研究によりトリマラリア原虫が最初に分岐したことが示されているので、このことはヒト熱帯熱マラリア原虫が哺乳類に寄生するマラリア原虫のなかで最初に分岐したことを示している。しかしこの解析からは、ヒト四日熱マラリア原虫 *P. malariae* やヒト卵形マラリア原虫 *P. ovale* の位置付けを明確にすることはできず、系統樹の他の部分についても不明瞭な点が残された。これらの結果から、マラリア原虫全体の系統樹の解像度を得るためには、より多くの遺伝子による結合データ解析が必要であることが示唆された。

次にヒト三日熱マラリア *P. vivax* および東南アジアのサルマラリア原虫 8 種の系統関係に着目した解析を行った。アウトグループとしてはアフリカのサルマラリア原虫である *P. gonderi* を用いた。今回配列決定したアピコプラストゲノム上の SSU rRNA、LSU rRNA、ClpC の 3 つの遺伝子配列に、公共データベースから取得したアピコプラスト EF-Tu 配列を加え、4 遺伝子を連結したデータセットの解析を行った。連結モデルによる最尤系統樹は *P. inui*-*P. hylobati* と *P. coatneyi*-*P. knowlesi* それぞれの近縁関係を明確に示し、先行研究で確立されていた知見を支持した。

また、連結モデルによる解析から *P. vivax* と *P. cynomolgi* の近縁関係、*P. fragile* と *P. coatneyi* / *P. knowlesi* クレードの単系統性が明らかになった。しかし、より洗練された、タンパク質をコードする遺伝子にコドン置換モデルを適用した分離モデルを用いた解析では、*P. vivax* と *P. cynomolgi* の近縁性に対する支持は減少した。しかし、*P. fragile* と *P. coatneyi* / *P. knowlesi* クレードの単系統性への支持は頑健に維持された。本解析での *P. fragile* の位置づけは、*P. fragile* が東南アジアサルマラリアの中で最初に分岐したとする先行研究の結果を否定するものである。

さらに、本研究で用いた 4 遺伝子以外のアピコプラストコード遺伝子で、マラリア原虫の系統解析に適した遺伝子を探索するため、*P. gallinaceum* と *P. coatneyi* のアピコプラストゲノム全配列を決定した。それらの遺伝子構成・配置は *P. falciparum* のものと同じだった。全体の AT 含量は比較した 3 種のマラリア原虫すべてで 88% を越え、極めて高かった。コードされている遺伝子の配列は種間でよく保存されていた。配列の一致度は DNA 配列ではほとんどの遺伝子で 80% 以上だったが、アミノ酸配列では 50~60% 台の遺伝子もあり、種間の多様性が伺われた。先行研究で明らかにされていた *P. falciparum* のアピコプラストゲノム全配列にこれら 2 種のマラリア原虫種のアピコプラストゲノム全配列が加えられたことにより、系統解析に用いる遺伝子の選択に関して、より厳密な選定が可能になった。本研究で用いた遺伝子以外では、*rpoB*、*rpl2*、*rpl14*、*rpl16*、ORF470 などの遺伝子がさらなる系統解析の候補遺伝子として考えられた。さらに、アピコプラストゲノム全配列決定用の汎用 PCR プライマーの設計も今後、見込まれる。

マラリア原虫は、アピコンプレックス類 *Plasmodium* 属の寄生虫であり、色素体様オルガネラであるアピコプラストを保持している。アピコプラストは紅藻がアピコンプレックス類の祖先へ二次共生した結果、紅藻の色素体から進化したものと考えられており、約 35kb の環状のゲノム DNA をもっている。申請者は、マラリア原虫の系統と進化を解明するために、アピコプラスト DNA にコードされた遺伝子を解析した。

本申請論文は、3章及び序論と結論から構成されている。序論では、マラリア原虫についての概論と、マラリア原虫の系統関係解析での問題点が指摘されている。続く3章には以下に詳しく述べるように、ヒトマラリア原虫の系統解析、ヒト三日熱マラリア原虫と東南アジアサルマラリア原虫の系統解析、そして、トリマラリア原虫、サルマラリア原虫のアピコプラストゲノムの全塩基配列にもとづくゲノムの概要の解析結果が示されている。結論では、序論で提起した問題に対して、申請者のアプローチがどのような結論を導いたかをまとめている。

第1章では、ヒトマラリア原虫である *Plasmodium vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, 3種、サルマラリア原虫である *P. gonderi* (アフリカ起源), *P. hylobati*, *P. inui*, *P. knowlesi*, *P. coatneyi*, *P. cynomolgi*, *P. simiovale*, *P. fieldi*, *P. fragile* (以上東南アジア起源) の9種、およびトリマラリア原虫 *P. gallinaceum* の合計13種について、アピコプラストコードの SSUrRNA, LSUrRNA, ClpC, および EF-Tu の各遺伝子のうち配列未知であったものの配列決定を行い、ヒト熱帯熱マラリア原虫 *P. falciparum* の配列など、公共データベースに登録されていた配列を含めた分子系統解析により、種々のマラリア原虫間の系統関係を解析した。先行研究により、これらの *Plasmodium* のうちトリマラリア原虫が最初に分岐したことが示されているので、これをアウトグループとすると、ヒトの熱帯熱マラリア原虫 *P. falciparum* が次に分岐したことがはっきりと示された。さらに第2章では、ヒト三日熱マラリア *P. vivax* および東南アジアのサルマラリア原虫8種の系統関係に着目した解析を行った。単純な塩基置換モデルによる解析では *P. vivax* と *P. cynomolgi* の近縁関係が示唆されたが、置換モデルをより現実的なものにするとその支持は減少していった。このことは、系統樹推定は塩基置換モデルに依存するものであり、信頼できる系統樹を得るためには、仮定した塩基置換モデルが現実の進化過程を反映したものであることが必要だということを示している。また先行研究では、*P. fragile* が東南アジアサルマラリアの中で最初に分岐したとされたが、本研究はそれを否定するものである。第3章では上記研究で用いた4遺伝子以外のアピコプラストコード遺伝子で、マラリア原虫の系統解析に適した遺伝子を探索するため、*P. gallinaceum* と *P. coatneyi* のアピコプラストゲノム全配列を決定し、本研究で未解決だった系統関係を解明するための候補となる遺伝子を選定した。

本研究の結果は、ヒトマラリア原虫の起源と進化に関して新しい知見を与えるものであり、この方向への今後の研究の基礎を与えるものでもある。本研究は分子系統学の方法論に関しても、重要な示唆を与える研究であると判断された。また本申請論文の第2章の内容は、申請者を筆頭著者として、国際誌 GENE の450号(2010)

に掲載されている。以上の点から、本研究内容は総合研究大学院大学先導科学研究科の博士論文に十分値するものと判定できる。