



Title	マラリア病原体における分子生物学的研究の現状
Author(s)	Horii, Toshihiro
Citation	生物物理. 1987, 27(5), p. 214-218
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/94547
rights	This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License.
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

マラリア病原虫における分子生物学的研究の現状

大阪大学理学部生物学教室 堀 井 俊 宏

The major concern to investigate how to control the malaria disease is to identify effective antigenic genes for the development of vaccine. Several research groups have been reporting isolation and characterization of genes for the antigens in some stages of parasite development. Whereas, there is few concrete evidence for the protective ability of the antigens thus far reported. Recent advancement of the research suggested the existence of defence mechanism in malaria parasite against the immune system of human. We might have to solve this problem to get an effective vaccine. Here, I briefly reviewed the recent works in this field and also reported the construction of cDNA expression bank and analysis of the gene for the protective antigen p.126. This work was done with Drs. Joseph Inselburg and David Bzik in Dartmouth Medical School.

malavia / vaccine / cDNA expression library

I はじめに

基礎科学の一つである分子生物学にとって、“遺伝子操作を利用したワクチン作り”という研究は重要な応用分野であると同時に、経済をその第一原理とする現代社会に対する格好の宣伝文句である。一方、日本を含む先進諸国がマラリアに対するワクチンを直接必要としなくとも、地球規模で見ればマラリアは人類に対して衰えることのない脅威を与えつづけている。実際、WHOの報告によれば全人口の40%が流行地域に暮らし、年間の死者数は100万人とも200万人ともいわれている¹⁾。これらのことから、マラリアの分子生物学的研究のほとんど全てがワクチン開発を目標としたものであるとしても不思議ではないし、またその研究規模もまだまだ小さいと言わざるをえない。マラリアワクチン開発の分子生物学的研究は1980年以来、アメリカ、オーストラリア、イギリス、フランスなどで進行しているが、本稿では、それらの研究を概観し、また著者が米国ダートマス医科大学で行ってきた若干の研究について紹介したい。

II マラリアワクチン開発の現状

マラリア病原虫は原生動物門に属しプラスモディウ

Molecular biology of the Malaria for developing vaccine

Toshihiro HORII

Osaka University

ム類、あるいは住血胞子虫類に分類されている。現在最もよく研究に用いられているのは *Plasmodium falciparum* という種で、致死性が高く、マラリアによる死亡原因の90%以上といわれている。その生活環を図1に示す。一般にマラリアは、蚊から人体に侵入する際

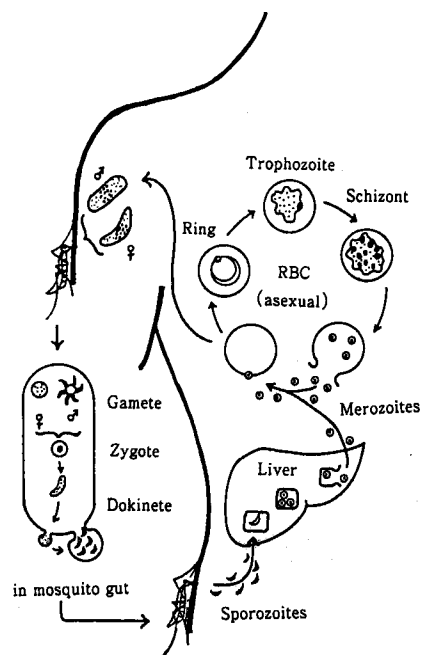


図1 マラリアの生活環

にはスポロゾイトと呼ばれる細胞型であり、これは短時間で肝細胞に到達し吸着侵入する。肝細胞で増殖した後、メロゾイトと呼ばれる細胞型が放出され、これは赤血球細胞に移行する。赤血球におけるステージでマラリアは大量に増殖しつづけて主な病状をもたらす。*P. falciparum* では、赤血球での一世代が4-8時間であり、リング、トロフォゾイト、シャイズント（スキゾント）と呼ばれる形態を経て増殖し、10-20のメロゾイトが新たに放出される。この増殖は無性的であるが、赤血球に侵入したメロゾイトの一部はガメトサイトと呼ばれる有性型態に移行し、蚊に取り込まれた後、有性世代に入る。そして新たな感染源となるのである。マラリアワクチンの開発では、これら3種のステージに対するそれぞれの有効抗原を得ることが理想とされるが、ガメトサイトは、材料を得るのが困難であるため、あまり研究が進んでいない。以下、他の2つのステージにおける抗原遺伝子の研究について簡単に述べる。

これまでに報告されてきた主な表面抗原蛋白質を表1にまとめる。一般にマラリア病原虫の表面抗原の特徴は、単離されたほとんどの遺伝子あるいは蛋白質で反復配列が見られ、またその含有量が高いことである。これら反復配列の5'側及び3'側（N末側及びC末側）の隣接領域の配列は種内でよく保存されているにもかかわらず、反復配列自体はその繰り返しの回数、反復単位の長さ及びそのアミノ酸配列について、各地域で分離された株のあいだで多様化が珍しくない。

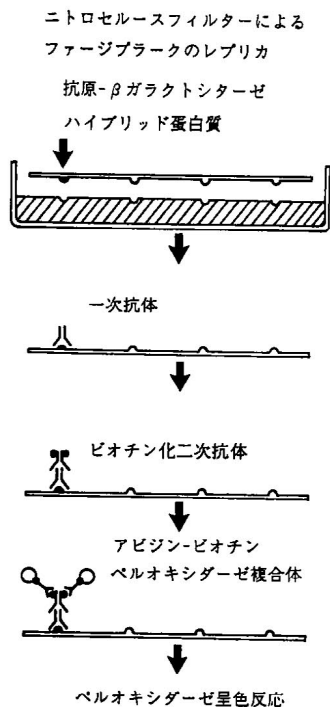
スポロゾイトではCS蛋白質（circum sporozoite

protein）と呼ばれる抗原の遺伝子が単離され、その構造解析も終了している。このCS蛋白質はスポロゾイト細胞表面をおおう主要表面抗原であり、ワクチンの主たる候補の1つである。サルマラリア、*P. cynomolgi* のCS蛋白質では調べられた6株の内2株だけが同一の配列を示し、他は全て互いに高い多様化を示した²¹。一方、ヒトマラリア *P. falciparum* のCS蛋白質では Asn-Ala-Asn-Pro という四アミノ酸の反復構造が分子全体の36%を占めるが種内変異は極めて少ないといわれている。Nassenzweig のグループはこの反復配列を基本単位として長いペプチドを合成し、現在はボランティアを使っでの疫学的なフィールドワークを行っている³。ただし、CS蛋白質が防御抗体を誘導する能力については疑問が持たれており⁴、またワクチンとしての効果があったという報告もまだない。

これに対して赤血球ステージの細胞型については現在まだ有効な抗原性を発現する遺伝子の検索、あるいは、解析中であると言ってよい。しかしながら、赤血球ステージに作用するワクチンは主として以下の2点の理由から極めて重要であると考えられている。第一の理由は、CS蛋白質に対する抗体はスポロゾイトを不活化するのに有効であるとしても、赤血球ステージの増殖に対しては無効であり、1つのスポロゾイトでもこの防御から逃れれば以後の増殖を正常に行う。スポロゾイトは極めて短時間で肝細胞に到達するため、その効果に疑問が持たれるという点である。第二は、先に述べたように他種のマラリアCS蛋白質では高度な種内変異が存在するにもかかわらず、*P. falciparum*

表1 同定されている主な *P. falciparum* 抗原とその特徴

抗 原	発 現 場 所	分 子 量	特 徴
スポロゾイト	スポロゾイト表面	58kd	繰り返し構造を持つ 株特異性は低い
CS-蛋白質			
赤血球ステージ	血漿中	分子量は株により 大きく異なる	分子の大半が繰り返し構造から成る ワクチンとなる可能性は極めて低い
S-抗原 ⁽¹³⁾			
RESA ⁽¹⁴⁾	リングに感染した 赤血球表面	155kd	繰り返し構造を持つ
MESA ⁽¹⁵⁾	トロフォゾイト、 シャイズントに感 染した赤血球表面	250-280kd	株特異性が高い
FIRA ⁽¹⁶⁾		>300kd	繰り返し構造を持つ 防御抗体を誘導しない
MSPP ⁽¹⁷⁾	メロゾイト表面	190-220kd	株特異性、種特異性を示す領域及び 種間共通の各領域を持ち、繰り返し 構造を持つ
(195kd抗原)	蛋白質前駆体		
p126蛋白質 ^(6,7,8)	トロフォゾイト 液胞	105-126kd	連続したセリン残基の他には際立っ た繰り返し構造はない

図2 in situ イムノアッセイ¹⁹⁾

ではその反復配列が保存されているため、逆にこの反復配列はヒトの免疫系に対してマラリアのサバイバル戦略上、何か有利性をそなえているかもしれないという点である⁴⁾ (本文V章参照)

Ⅲ 赤血球ステージ ランダムアクセス cDNA バンクの作製

著者らは上記の点を考慮して、赤血球ステージの病原虫から cDNA 発現ライブラリーを作り、ワクチンの候補と考えられる遺伝子の検索を行おうと考えた。赤血球ステージの生活環において蛋白合成は主としてトロフォゾイトとシャイズントで行われるため、この時期の poly(A)mRNA を調製し、cDNA 合成の鋳型とした。合成した cDNA は EcoRI リンカーを用いて発現ベクター λgt11 に挿入した。このようにして得られたファージライブラリーは図2に示す抗原抗体反応とペルオキシダーゼの呈色反応を利用してスクリーニングされるが、我々はまず一次抗体としてマラリアに対する免疫を獲得した人より得られた複数の血清を混合したものを用いた。混合した血清は抗体価が高いため一次スクリーニングには向いているが、病原虫の持つほとんど全ての蛋白質と交叉反応を行うため、かな

らずしも防御抗体を誘導する抗原遺伝子の指標とはならない。しかしながら、上記のスクリーニングで得られた多くのクローンは、その元となる mRNA の頻度から考えて主要抗原遺伝子のコピーを含むと考えられる。従って、我々は288個の正のクローンを単離し、ランダムアクセスバンクとした。図3にその一部を示す。このバンクは特定のモノクローナル抗体によって容易にスクリーニングが行えると同時にまた、以下のようにして利用できるのではないかと考えられる。それは、決め手となる指標（例えば強力な増殖阻害能を持つモノクローナル抗体）が少ない現時点としては、DNA ハイブリダイゼーション等を用いて各クローンをグループに分け、それぞれのグループについて代表となるファージの産生蛋白質に対するモノスペシフィックな抗体を得、さらにその防御能力を調べること等によって、有効な遺伝子を同定するというものである。

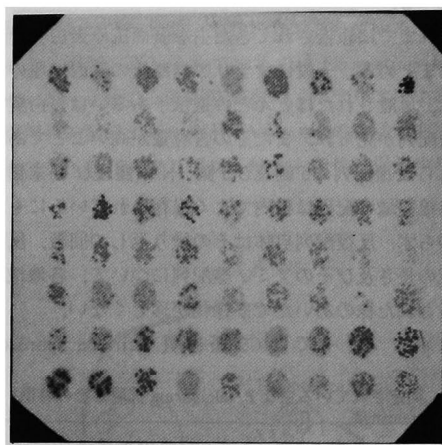


図3 マラリア cDNA ランダムアクセスバンク
これは、cDNA 発現ライブラリーを混合血清 (本文参照) でスクリーニングし、正の反応を示す4のを選択したランダムアクセスバンクの一部である。72種のファージクローンが、大腸菌プレートの上にスポットされ、図4に示した in situ ノムノアッセイにより、ペルオキシダーゼの呈色反応を示している。各ファージクローンは純化されていないため、若干の非反応性ファージを含む。

Ⅳ p126蛋白質遺伝子の単離とその構造解析

一方、幸い我々はすでにマウスで得られた防御力のあるモノクローナル抗体を数種類持っていたため⁵⁾、これらを用いて上記のバンクをスクリーニングした。その結果、288個のクローン中11個が5H10あるいは43E5モノクローナル抗体と正の反応を示した。これ

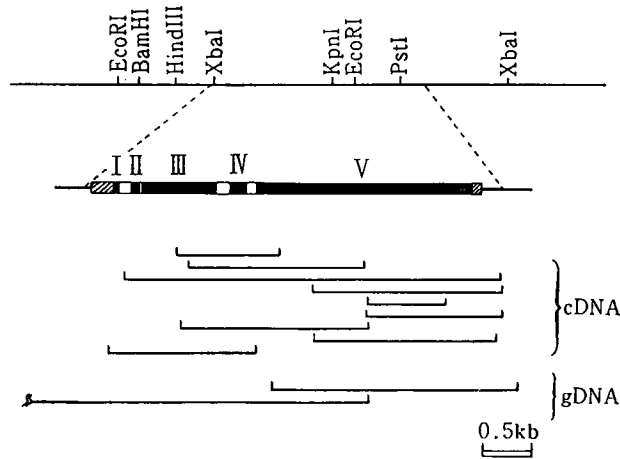


図4 P126遺伝子の構造と、その解析に用いたファージクローン

黒太線は遺伝子の構造領域を示し、その上のローマ数字はエクソンの番号を表わす。白ぬきはイントロンを示す。各ファージクローンに挿入されたcDNA及びgDNAをその下に示す。cDNA断片はエクソンのみを含み、イントロンは含まないが、便宜上並列に示した。

ら2種のモノクローナル抗体は、同等の分子量を持つ蛋白質と交互反応をするところから、同じ抗原蛋白質上の異なるエピトープを認識すると考えていた⁵⁾。しかしながら、それぞれの抗体に反応する代表として#22と#366ファージクローンに挿入されたcDNA断片の塩基配列を調べたところ、両クローンは弱いながら相互に交叉反応をするにもかかわらず、塩基配列あるいは、それから得られるアミノ酸配列上に共通性は見られなかった。また、これらcDNA断片をプローブとしてgDNAの構造をサザンハイブリダイゼーション法で調べたところ、両者はそれぞれ独立の遺伝子であることがわかった。#22cDNAのもととなる遺伝子については現在解析中であるが、#366cDNAはその遺伝子構造の解析がほぼ終了した。図4に解析に利用したファージクローンと得られた遺伝子の構造を示す。この遺伝子のコードするアミノ酸配列は989個から成り、またその特徴は、マラリア遺伝子にはめずらしくイントロンが4つも存在するということと、アミノ酸配列上191番目から225番目までセリンが35個連続しているという点である。一方、CDC（ホンデュラス株）とFCR-3（ガンビア株）の2株で制限酵素地図を比較したところほとんど差が見られなかったため、種内変異が少ないと思われる。これは、一般性という点で、ワクチンの候補としては大きな利点である。この遺伝子のおおよその発現頻度を知るため、#366cDNAをプローブとして、オリジナルのcDNAライブラリーを*in situ* DNAハイブリダイゼーション法で調べ

た。その結果、全cDNAコピーの約1%が反応したため、発現頻度もこれに近い値であろうと考えられる。最近、他の研究グループから断片的に報告された塩基配列の1つに同じ遺伝子と思われるものがあった⁶⁾。そのDNAクローンをスクリーニングするのに用いたモノクローナル抗体は、P126と呼ばれるシャイゾントの主要抗原の1つと反応する。また、この抗原蛋白質はメロゾイトが放出されるときに分解を受け、その一部である50kdの蛋白断片が培養液中に放出されるという報告がある^{7,8)}。残念ながら、彼等はそのモノクローナル抗体が防御能力を持つかどうか報告していない。しかし、これらのデータは我々が報告してきたデータと大きく矛盾しない。我々はこの抗原遺伝子をワクチン開発へのよき候補として、さらに実験を進めようとしている。

V おわりに

以上、早足でマラリアワクチン開発の現状について述べてきたが、分子生物学の手法をマラリアに適応する際に痛感するのは、やはり遺伝学的なバックグラウンドの欠如である。そこで、我々は、1つの研究方向として、薬剤耐性突然変異株を分離し⁹⁾、またその薬剤の標的となる酵素遺伝子を単離、解析¹⁰⁾することによってマラリアにおける形質転換系を開発しようとしている。——ワクチン開発には、表面抗原遺伝子を単離すればこと足りると思われるがちであるが、マラリア病原虫にも事情があって、彼らはヒトの免疫系からい

かに逃れるかというサバイバル戦略を展開している。本文中でも少し述べたが、マラリア病原虫というのは種内変異が非常に多く、特定の地域のマラリアに対する免疫を獲得しても、他の地域のマラリアに感染するということがある。蚊というベクターは人から人へ移ってゆくため、マラリアの遺伝子が効率よく混合されるのであろう。それが遺伝子の反復配列構造と重なり合って高いバリエーションを生み出すのかもしれない。従って、ワクチンの候補としては、なるべく一般性の高い(よく保存された)ものが要求される。さらに、マラリアが産生する多くの抗原蛋白質はヒトに防御免疫を誘導しない。——マラリアはヒト免疫系に対して非防御抗体を大量に誘導し、防御抗体の産生を遅らせるという考え方(煙幕モデル: smoke screen model)¹¹⁾もある。これについては小論¹²⁾を参照していただきたい。

マラリアの分子生物学的研究は、まだその緒についたところである。今後、様々なレベルで研究は発展してゆくであろうし、またそうでなければならない。マラリアは人類に残された大きな課題の1つである。

ここに記した研究は、米国ダートマス大学医学部。Dr. Joseph, Inselburg の研究室で、同教授及び Dr. David Bzik とともに行なわれたものである。彼らの友情と才能のおかげで有意義な時を過ごせたことに対して、ここに感謝の意を記す。また執筆の機会を与えられた伊藤建夫博士に感謝する。

文 献

- 1) *World Health Statistical Quarterly*. (1984) 34 130-XXX.

- 2) Galinski, M. R., Arnot, D. E., Cochrane, A. H., Barnwell, J. W., Nussenzweig, R. S. and Enea, V. (1987) *Cell*, 48 311-319.
- 3) Miller, L. H., Howard, R. J., Carter, R., Good, M. F., Nussenzweig, V., and Nussenzweig, R. S. (1986) *Science*, 234 1349-1356.
- 4) Godson, G. N., *Scientific American*,
- 5) Banyal, H. S., and Inselburg, J. (1985) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34 1055-1064.
- 6) Weber, J. L., Lyon, J. A., and Camus, D., (1987) *Molecular Strategies of Parasitic Invasion* pp 379-388 Alan R. Liss inc.
- 7) Delplace, P., Dubremetz, J.-F., Fortier, B. and Vevnes, A. (1985) *Mol. Biochem. Parasitol.*, 17 239-251.
- 8) Bhatia, A., Delplace, P., Fortier, B., Dubremetz, J.-F. and Vernes, A. (1987) *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 36 15-19.
- 9) Inselburg, J., Bzik, D., and Horii, T., *Mol. Biochem. parasitol. in press*.
- 10) Bzik, D., Horii, T., and Inselburg, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA in press*.
- 11) Kemp, D. J., Coppel, R. L., Stahl, H. D., Bianco, A. E., Corcoran, L. M., McIntyre, P., Langford, C. J., Favaloro, J. M., Crewther, P. E., Brown, G. V., Mitchell, G. F., Culvenor, J. G. and Anders, R. F. (1986) *Parasitology*, 91 S83-S108.
- 12) 堀井俊宏 (1987) 蛋白質・核酸・酵素 32, 967-969.
- 13) Young, R. A. and Davis, R. W. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80 1194-1198.
- 14) Young, R. A., Bloom, B. R., Grosskinsky, C. M., Ivanyi, J., Thomas, D., and Davis, R. W. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82 2583-2584.

ほりい としひろ



昭和51年阪大理学部生物学科卒業、同大学院にすすみ、昭和55年より阪大理学部生物学教室小川英行教授のもとで助手として勤務、現在に至る。大腸菌SOS機能の制御機構及び *recA* 蛋白質の構造と機能の研究を行っている。日頃より生物学におけるポストモダンの問題に腐心し、リボゾームとリゾームの関係を真剣に考えている。昭和59年より61年まで米国ダートマス大学でマラリア研究に従事。

☎ 06-844-1151内線4306