

3. マラリア原虫薬剤耐性の分子生物学的解析

田中真奈実

(掲載決定:平成3年8月7日)

はじめに

薬剤耐性について解析するには薬剤を唯一の stress pressure として選別した耐性株を得ることが望ましい。1976年, Trager と Jensen により確立されたマラリア原虫の *in vitro* 培養法は, 上記の問題を解決し, さらに, 虫体とその遺伝子材料の豊富な供給を可能にした。ピリメサミン (以下 Pyr と略す) はメトトレキサート (Methotrexate) と同様核酸代謝拮抗阻害剤で, 標的酵素 Dihydro-folate reductase (DHFR) と特異的に結合し, その活性を阻害する。DHFR は, 虫体内では thymidylate synthase (TS) と連続してコードされている。本稿では, マラリア原虫における Pyr 耐性獲得機序を, (1)DHFR の質的变化 (点突然変異の発生とそれに起因する三次元構造の変化), (2)遺伝子増幅に

よる DHFR の量的変化, (3)染色体多型, に分けて検討する。

1. Pyr 耐性突然変異株の選択

まず初めに Pyr 耐性株樹立法とその注意点について述べる。耐性株は, すべて Pyr 感受性ガンビア株 FCR 3 から選択された。図1は具体的選別法を示す。選別法の要点は, 培養液に一定濃度となるよう Pyr を添加し, 徐々に濃度を上げつつ, 長期間維持して生存虫体を得る, ということである。熱帯熱マラリア原虫は48時間周期で増殖するが, 核酸合成は後半の24時間に偏って行われるため, 形態学的には, 薬剤投与初期段階で ring form → trophozoite/schizont への移行は可能だが, trophozoite/schizont → ring 期ではほとんどが死滅する。

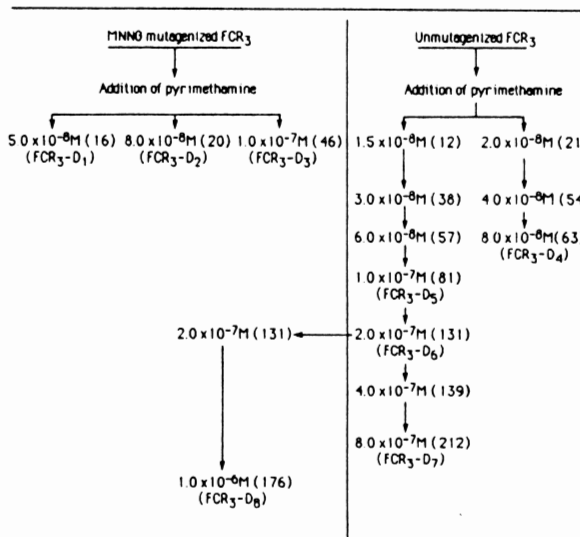


図1 *Plasmodium falciparum* FCR株からの *in vitro* ピリメサミン耐性株の選択過程。メチルニトロニトロソグアニジン (MNNG) 処理及び非処理原虫を様々な濃度のピリメサミン存在下で培養し, 耐性株クローン D1 から D8 を得た。() 内は培養日数を示す。

生存し、かつ増殖が認められる原虫をさらに限界希釈法でサブクロニングし、耐性株の FCR 3 D1 ~ FCR 3 D8 を得た。

ここで、特に留意すべき点は、(1)耐性株の成長速度はより遅く、しかも耐性度に比例するわけではない、(2) revertant (復帰突然変異体) の発生 - 長期間 Pyr 非存在下で維持すると感受性株もしくはより耐性度の低い株に逆行する場合がある、ということである。FCR 3-D8 株では、revertant の発生が認められた (Tanaka *et al.*, 1990a) ため、再び 1×10^{-6} M もしくは 5×10^{-6} M の Pyr 存在下で 3 ヶ月以上培養し、サブクロニングを行ってあらたに D81, D85 を得た。

II. Pyr 耐性株における DHFR 遺伝子の変化

1987年、マラリア原虫の DHFR の遺伝子の塩基配列が明らかとなり (Bzik *et al.*, 1987), これにより PCR 法 (polymerase chain reaction) (Saiki *et al.*, 1988)

を用いた原虫株別 DHFR の解析・比較が行われる様になった。PCR 法の利点は、DNA 塩基配列の決定、制限酵素によるマッピング、新しいベクター系への導入、ハイブリダイゼーションのプロープとしてなど、目的標的 DNA の大量合成にある。PCR で増幅した原虫株別 DHFR 遺伝子塩基配列の比較は、耐性に付随する点突然変異の検出に役立つのみならず、その部位によっては制限酵素による切断片のパターン比較による DNA 診断も可能となる。

現在までに得られている Pyr 耐性株における点突然変異に起因する DHFR の一次構造の変化を表 1 に示す (Tanaka *et al.*, 1990b; Cowman *et al.*, 1988)。結論から言えば、Pyr 耐性株に特異的に認められる突然変異部位は複数あり、いくつかの組合せにより耐性度の増強が見られた。それらの突然変異によるアミノ酸の置換は DHFR の Pyr との結合に関わる三次元構造を変化させるため、薬剤の阻害能力を減少・消失させると考

Table 1 Point mutations and pyrimethamine susceptibility in *P. falciparum*

Clone or isolate			Amino acid residue							
Name	Origin		16	51	54	59	108	164	223	
Natural isolates										
3 D 7	The Netherlands	S*	Ala	Asn	Asp	Cys	Ser	Ile	Phe	
SL/D 6	Sierra Lenoe	S	Ala	Asn	Asp	Cys	Ser	Ile	Phe	
UPA	Uganda	S	Val	Asn	Asp	Cys	Thr	Ile	Phe	
FCR 3	The Gambia	S	Val	Asn	Asp	Cys	Thr	Ile	Phe	
FCB	Columbia	S	Val	Asn	Asp	Cys	Thr	Ile	Phe	
It. G 2. F 6	Brazil	S	Val	Asn	Asp	Cys	Thr	Ile	Phe	
HB 3 (CDC)	Honduras	R+	Ala	Asn	Asp	Cys	Asn	Ile	Phe	
It. D12	Brazil	R	Ala	Ile	Asp	Cys	Asn	Ile	Phe	
W 2	Indonesia	R	Ala	Ile	Asp	Arg	Asn	Ile	Phe	
V 1/S	Vietnam	R	Ala	Ile	Asp	Arg	Asn	Leu	Phe	
In vitro selected mutants										
FCR 3 - D 4 to D 6		R	Val	Asn	Asp	Cys	Thr	Ile	Ser	
FCR 3 - D 7		R	Val	Asn	Asp	Cys	Thr	Ile	Ser	
FCR 3 - D81		R	Val	Asn	Asp	Cys	Thr	Ile	Ser	
FCR 3 - D85		R	Val	Asn	Asn	Cys	Thr	Ile	Ser	

* Pyrimethamine Sensitive

+ Pyrimethamine Resistant

えられる。自然耐性株では Ala-16 及び Asn-108 が必ず認められ (Peterson *et al.*, 1988), これに Ile-51 や Arg-59 (Peterson *et al.*, 1990) が付加することによってより耐性となる, とされている。これに対して私達が得た *in vitro* 耐性株においては, Ser-223 に特異的な変化があり, FCR 3-D85 株にのみ, Asn-54 の変化が追加して起こっている (Tanaka *et al.*, 1990a, b)。

Ⅲ. Pyr 耐性株における DHFR 遺伝子の増幅

点突然変異とその組合せは Pyr 耐性のある程度説明するが, *in vitro* 耐性株における耐性度の大きな差を説明するにはそれ以外の機構もあると思える。D7, D81 では, Ser-223 の変化以外の何かが耐性度の上昇をもたらしているはずである。メトトレキサート耐性の *Leishmania* や哺乳類細胞における DHFR 遺伝子の増幅はよく知られている。従って, Pyr 耐性のマラリア原虫, とりわけ D7, D81 において DHFR 遺伝子の増幅が起こっているかどうかは興味深い。

マラリア原虫の染色体はパルスフィールド電気泳動 (PFGE) (後述) により分離できるので, この方法を応用し Pyr 耐性原虫株において DHFR 遺伝子の増幅が染色体レベルの変化として見られるかどうか調べてみた。DHFR 遺伝子をプローブに染色体とハイブリダイゼーションを行ったところ, D7 においては DHFR 遺伝子の局在する第 4 染色体において強いシグナルが得られた (Inselbrug *et al.*, 1987)。第 4 染色体に属する DHFR 以外の他の遺伝子では増幅は認められなかった。従って, D7 においては, DHFR の点突然変異と DHFR 遺伝子増幅の合併は確かに耐性度を上昇させると思える。しかし, 他の Pyr 耐性株においては DHFR 遺伝子の増幅は認められず, マラリア原虫においてはこの遺伝子の増幅は Pyr 耐性の獲得の主たる機序ではないと考えられる。

Ⅳ. Pyr 耐性株における染色体の多型

Schwartz と Cantor (1984) により, アガロースゲルを用いた簡便な巨大 DNA の分離法が紹介された。この手法はパルスフィールド電気泳動 (PFGE) と呼ばれ, 装置の改良も加えて現在広く使用されている。電圧による刺激方向を変化させつつ, 巨大分子 DNA を少しずつ形を変えてアガロースのメッシュをゆっくり通していく, というのがおおよその原理である。マラリア原虫染色体の PFGE による分離は Van der Ploeg ら (1985) により初めて行われた。現在, 分離精度向上のための条件が検討されて, より明解な分離が可能となった。14本の染色体は, サイズの小さなものから順 (0.8 ~ 3.5Mb) に番号がつけられ, DHFR はその 4 番目

(第 4 染色体) に位置する。

PFGE の応用により, マラリア原虫の染色体マッピングが可能になると共に, さらに染色体組換え機構に肉薄していく道が開けた。一度分離した染色体をアガロースゲルから切り出し, 種々の制限酵素で処理後, 再び PFGE によって細断片として次の実験に用いるのである。この技法を Pyr 耐性マラリア原虫の染色体の解析に用いた。その結果, いくつかの耐性株間の差による PFGE の泳動パターンに大きな違い, つまり染色体多型が認められた (図 2)。なお, この現象の解析には *in vitro* での耐性株の選別が必須となる。というのは, しぜんからの分離株では耐性となる前の元の感受性株と耐性株との比較が不可能だからである。FCR 3 と Honduras-1 とのパターンの差は, 分離株の地理的差異を反映し, 感受性株と耐性株との比較は, 第 4 染色体に起きた選択的变化をよく示している。

D4 ~ D6 ではまだ染色体上の変化は認められないが, D7 では染色体サイズが約 100Kb ほど増大し, DHFR を含むかなり大きい部分が増幅している (図 2)。しかし, ここで, 他の第 4 染色体特異的遺伝子を Probe として, PFGE 分離後の染色体サザンプロットハイブリダイゼーションを行った場合, DHFR 遺伝子の増幅は認められなかった。さらに, 驚くべきことには, D81 及び D85 では第 4 染色体が断裂し, 結果として 15本の染色体を持つマラリア原虫が誕生するとともに, 断裂してできた 2本の染色体上に等しく DHFR 遺伝子が検出された (図 3)。D81 と D85 における解析は, 重複するようになった第 4 染色体が, それぞれ多型性を示すと考えられる。このような, 染色体間にまたがる遺伝子の translocation は未だ記載がない。

図 3 では, FCR 3 と D81 及び D85 の重複染色体のマッピングを示した。DHFR は染色体のほぼ中央 (centromere) (図の白棒部分) に位置し, この部分はどの変異染色体でもよく保持されていたが, 終末部 (telomere) は高率に組換わっていた。この染色体組換えがどのようなシステムであるにせよ, かなり複雑な組換え機構が存在するものと考えられる。

おわりに

マラリア原虫の Pyr 耐性の分子機序を *in vitro* の系において調べてみると, 点突然変異, DHFR 遺伝子の増幅, 染色体の多型という様々なレベルにおいて原虫は薬剤というひとつの選択圧に対応できることがわかった。自然における Pyr 耐性株には染色体の多型を示すものはまだ発見されていないので, 本研究の知見がどの程度本来の原虫の姿を描き出しているのかはわからない。しかし, その反面, 本研究からは, 原虫がいと簡単に人

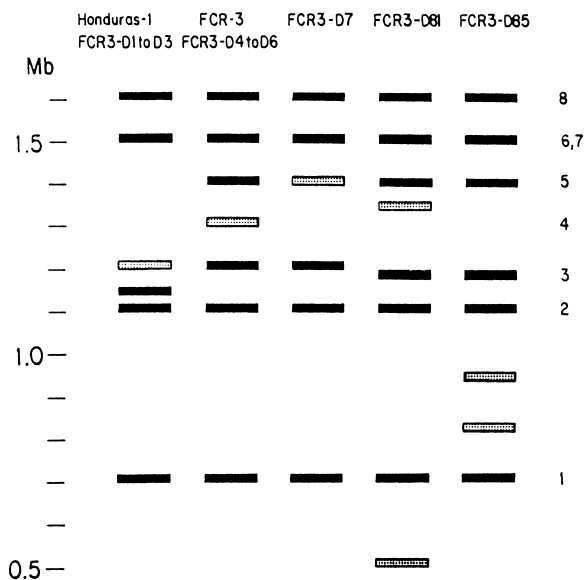


図2 FCR 3 株, Honduras-1 株及び FCR 3 株由来ピリメサミン耐性株 (D1 から D8) における染色体多型。第 1 ~ 第 8 染色体のうち, 第 4 染色体特異的のプロープに反応する染色体を灰色で示している。

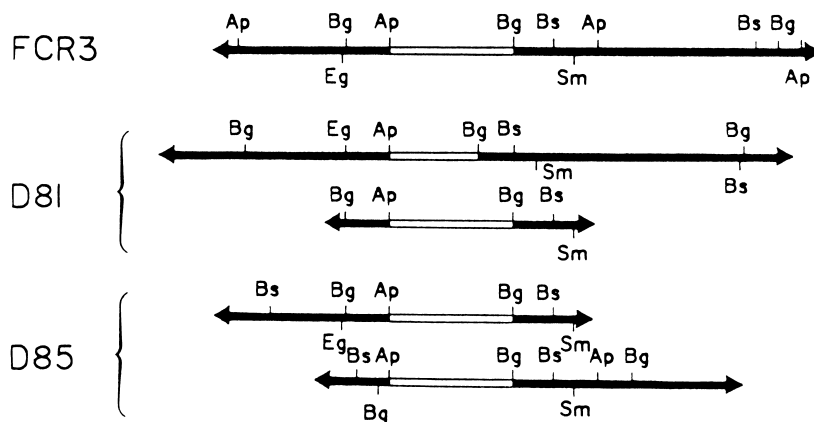


図3 *P. falciparum* 第 4 染色体のマクロ制限酵素地図。FCR 3 株及び FCR 3 株由来ピリメサミン耐性株 (D81 及び D85) の染色体をパルスフィールド電気泳動後, 第 4 染色体を回収し, 以下の制限酵素にて切断し, 第 4 染色体 DNA 断片をプローブにしてマクロ地図を作成した。Ap=*Apa* I, Bg=*Bal* I, Bs=*Bss*H II, Eg=*Eag* I, Sm=*Sma* I。中央部の白い所は DHFR 遺伝子とハイブリダイズする部位を示す。

間の作り出す選択圧（薬剤）に適応するポテンシャルを有していることがわかる。この意味において、原虫の薬剤耐性獲得機序のより一層の解明は将来効果的なマラリア剤開発の基礎となるものと考えられる。

謝 辞

本稿で述べた研究は、筆者が Dartmouth Medical School, USA において行ったものであり、Inselburg 教授をはじめとする共同実験者に心から感謝いたします。

References

- 1) Bzik, D. J., Li, W. B., Horii, T. and Inselburg, J. (1987) : Molecular cloning and sequence analysis of the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 84, 8360-8364.
- 2) Cowman, A. F., Morry, M. J., Biggs, B. A., Cross, G. A. M. and Foote, S. J. (1988) : Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 84, 9109-9113.
- 3) Inselburg, J., Bzik, D. J. and Horii, T. (1987) : Pyrimethamine resistant *Plasmodium falciparum* : overproduction of dihydrofolate reductase by a gene duplication. Mol. Biochem. Parasitol., 26, 121-134.
- 4) Peterson, D. S., Walliker, D. W. and Well-ems, T. E. (1988) : Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in *falciparum* malaria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 84, 9114-9118.
- 5) Peterson, D. S., Milhaus, W. K. and Well-ems, T. E. (1990) : Molecular basis of differential resistance to cycloguanil and pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* malaria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 87, 3018-3022.
- 6) Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. (1988) : Primer-directed enzyme amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 239, 487-491.
- 7) Schwarts, D. C. and Cantor, C. R. (1984) : Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gelelectrophoresis. cell, 37, 67-75.
- 8) Tanaka, M., Gu, H. -M., Bzik, D. J., Li, W. -B. and Inselburg, J. (1990a) : Dihydrofolate reductase mutations and chromosomal changes associated with pyrimethamine resistance of *Plasmodium falciparum*. Mol. Biochem. Parasitol., 39, 127-135.
- 9) Tanaka, M., Gu, H. -M., Bzik, D. J., Li, W. -B. and Inselburg, J. (1990b) : Mutant dihydrofolate reductase-thymidylate synthase genes in pyrimethamine resistant *Plasmodium falciparum* with polymorphic chromosome duplications. Mol. Biochem. Parasitol., 42, 83-92.
- 10) Van der Ploeg, L. H. T., Smits, M., Ponnudurai, T., Vewmeulen, A., Meuwissen, J. H. E. T. and Langsley, G. (1985) : Chromosome-sized DNA molecules of *Plasmodium falciparum*. Nature, 315, 347-350.