

โปรตีนบนผิวเมอร์โรซอซด์ชนิดที่ 1 ของพลาสมิดโมเดียม ไวแวกซ์ (PvMsp-1): การวิเคราะห์ลำดับเบส
พันธุกรรมประชากร และวิวัฒนาการ

บทคัดย่อ

168738

ความหลากหลายของโปรตีนบนผิวเมอร์โรซอซด์ชนิดที่ 1 (PvMsp-1) ของพลาสมิดโมเดียม ไวแวกซ์ ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีบทบาทในการผลิตวัคซีนนั้นเกิดจากการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมระหว่างอัลลีลที่ต่างกัน โปรตีนนี้สามารถแบ่งได้เป็น 13 ส่วน โดยมี 6 ส่วนที่มีความแตกต่างกันสูง เพื่อเป็นการตรวจสอบว่าระดับความรุนแรงของการแพร่เชื้อมาลาเรียมีอิทธิพลต่อขอบเขตความหลากหลายของ PvMsp-1 หรือไม่ คณะผู้วิจัยได้รวบรวมตัวอย่างเชื้อมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ในประเทศไทย จำนวนทั้งสิ้น 169 ตัวอย่าง จากภาคเหนือ (66 ตัวอย่าง) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (49 ตัวอย่าง) และภาคใต้ (54 ตัวอย่าง) ซึ่งมีอุบัติการณ์ในการตรวจสอบพบเชื้อมาลาเรียในรอบปีต่อประชากร 1000 ราย ในช่วงที่ทำการเก็บตัวอย่างมีค่ามากกว่า 20, 5-10 และ น้อยกว่า 2 ตามลำดับ ในจำนวนตัวอย่างเชื้อเหล่านี้พบว่า 133 ตัวอย่างประกอบด้วยเชื้อที่มี *PvMsp-1* อัลลีลเดียว จึงใช้เพียงตัวอย่างดังกล่าวในการวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วนที่ 2, 4 และ 12 ของยีน ผลการศึกษาพบว่าส่วนที่ 2 มีอัลลีล 14 แบบ ซึ่งประกอบด้วยลำดับเบสที่สร้างกรดอะมิโน 5 ตัวเรียงซ้ำกันเป็นชุด โดยมีจำนวนชุดที่ซ้ำกัน แตกต่างกันตามสายพันธุ์ของเชื้อ และพบอัลลีลใหม่ 2 แบบ ในส่วนที่ 4 และ 12 ประกอบด้วยลำดับเบสต่างกัน 5 และ 12 แบบตามลำดับซึ่งทุกแบบคล้ายกับที่คณะผู้วิจัยเคยรายงานมาก่อน ยกเว้นพบการแทนที่ของกรดอะมิโนในบางตำแหน่ง เป็นที่สังเกตว่าอัลลีลบางแบบของส่วนที่ 2, 4 และ 12 พบมากกว่าอัลลีลแบบอื่นๆ ทั้งนี้ค่าความหลากหลายของแฮปโลไทป์ (h) ค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ (π) และค่าเฉลี่ยของจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกัน (k) ของทั้งสองบริเวณดังกล่าวมีค่าสูงสุด ในประชากรมาลาเรียชนิดไวแวกซ์จากภาคเหนือของประเทศไทย จากการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนในความถี่ของอัลลีลระหว่างประชากรไม่พบความแตกต่างของ Wright's F_{st} ของทั้ง 3 ส่วน แสดงว่าส่วนของ PvMsp-1 นี้อยู่ภายใต้อิทธิพลของการคัดเลือกตามธรรมชาติ ในทำนองเดียวกันค่าเฉลี่ยของการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิดต่อตำแหน่ง (d_N) ในส่วนที่ 12 มีค่ามากกว่าค่าเฉลี่ยของการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิดต่อตำแหน่ง (d_N) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) ในประชากรมาลาเรียแต่ละภูมิภาค แสดงว่ากระบวนการคัดเลือกตามธรรมชาติในเชิงบวกส่งผลให้เกิดความหลากหลายของลำดับเบสในส่วนนี้ นอกจากนี้คณะผู้วิจัยได้หาลำดับเบสของยีนที่เทียบได้กับ *PvMsp-1* ของเชื้อมาลาเรียชนิดโนวลิซ (*PkMsp-1*) เพื่อการเทียบเคียงสำหรับการวิเคราะห์ประวัติวิวัฒนาการของ PvMsp-1 ซึ่งเชื้อมาลาเรียดังกล่าวมีความใกล้ชิดกับเชื้อมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ PvMsp-1 จำนวน 42 ตัวอย่างทั่วโลก และ PkMsp-1 พบว่ามีความคล้ายคลึงกันร้อยละ 63.4 – 65.1 ทั้งนี้ในส่วนที่มีลำดับเบสซ้ำกันเป็นชุดนั้นพบว่าทั้ง *PvMsp-1* และ *PkMsp-1* มีลำดับเบสเหล่านี้คล้ายกันหลายบริเวณ เมื่อคำนวณอัตราการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในแต่ละคู่อัลลีลใน *PvMsp-1* พบว่า d_N ในส่วนที่ 1, 5, 7 และ 9 มีค่ามากกว่า d_N แสดงว่าบริเวณเหล่านี้มีการคัดเลือกเพื่อให้เกิดความหลากหลายของการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ชนิดที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิดไป ในทำนองเดียวกันจำนวนการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ชนิดที่ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิดต่อตำแหน่ง (K_s) มีค่ามากกว่าจำนวนการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ชนิดที่ทำให้กรดอะมิโน

โนเปลี่ยนชนิดต่อตำแหน่ง (K_N) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในส่วนดังกล่าวเช่นกัน การทดสอบด้วยค่า D ของทาจิมา พบความเบี่ยงเบนจากภาวะความเป็นกลางอย่างมีนัยสำคัญในส่วนที่ 7 และ 9 ในขณะที่ค่า D^* , F^* , D และ F ของฟู และลี ให้ค่าเบี่ยงเบนจากภาวะความเป็นกลางในส่วนที่ 1, 3, 5, 7 และ 9 ซึ่งค่าบวกของการทดสอบเหล่านี้แสดงถึงการเกิดการคัดเลือกเพื่อให้เกิดการสมดุลของ *PvMsp1* นอกจากนี้การคำนวณระยะเวลาตั้งแต่ปัจจุบันถึงเวลาที่สั้นที่สุดของการมีบรรพบุรุษร่วมกัน (TMRCA) ของ *PvMsp1* โดยใช้ *PkMsp1* เป็นตัวเทียบเคียง และตั้งสมมุติฐานว่าเชื้อมาลาเรียชนิดไวเวกซ์และชนิดโนลิไซ แยกสายวิวัฒนาการออกจากกันตามโฮสต์พบว่า ค่าเฉลี่ย d_N ของ *PvMsp1* คือ 0.014 ± 0.001 และค่าเฉลี่ย K_N คือ 0.122 ± 0.007 ดังนั้นอัตราการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ชนิดที่ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยน (λ_n) ของ *PvMsp1* มีค่า 2.4×10^{-9} ถึง 3.0×10^{-9} ต่อตำแหน่งเบสต่อปี ซึ่งใกล้เคียงกับค่าเฉลี่ยกับค่าเดียวกันใน *PfMsp1* คือ 2.6×10^{-9} ต่อตำแหน่งเบสต่อปี ค่า d_N ระหว่างอัลลีลของ *PvMsp1* ที่แตกต่างกันมากที่สุด (d_{Nmax}) มีค่า 0.027 ± 0.003 ฉะนั้นความหลากหลายของ *PvMsp1* น่าจะมีการดำรงไว้เป็นเวลาประมาณ 4.5 – 5.6 ล้านปีก่อน ซึ่งตรงกับช่วงเวลาที่เชื้อมาลาเรียชนิดไวเวกซ์ และชนิดโนลิไซ แยกสายวิวัฒนาการจากกันเมื่อประมาณ 5.2 – 7.3 ล้านปีก่อน และตรงกับช่วงที่ลิงมาแตกเกิดการแยกสายพันธุ์จากกันในทวีปเอเชียเมื่อประมาณ 4.9 ล้านปีที่ผ่านมา ดังนั้นการคงอยู่ของความหลากหลายใน *PvMsp1* จึงมีเวลายาวนานกว่าที่คาดไว้ภายใต้สภาวะการคัดเลือกที่เป็นกลาง และสอดคล้องกับการคัดเลือกแบบสมดุลเพื่อดำรงไว้ซึ่งความหลากหลายของยีนนี้

Polymorphism in the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* (PvMsp-1), a blood-stage vaccine candidate, is generated by intragenic recombination between distinct alleles that can be partitioned into 13 blocks, 6 of which are variable. To test if intensity of malaria transmission influences the extent of diversity in PvMsp-1, we collected 169 *P. vivax* isolates from northern ($n=66$), eastern ($n=49$) and southern ($n=54$) Thailand where annual parasite incidence per 1,000 (API) during the period of sample collection was >20 , 5-20 and <2 , respectively. Of these, 133 isolates containing single PvMsp-1 alleles were used for analysis of variable blocks 2, 4 and 12. Results revealed that block 2 contained 14 sequence types with varying numbers of pentapeptide repeats and 2 of which were novel. The variable blocks 4 and 12 displayed 5 and 10 sequence types, respectively, all of which were essentially as reported previously except a few substituted residues. It is of note that certain sequence types of blocks 2, 4 and 12 predominated. The magnitudes of haplotype diversity (h), nucleotide diversity (π) and average number of nucleotide differences (k) in both blocks of PvMsp-1 were highest in the *P. vivax* population from northern Thailand. Analysis of inter-population variance in allele frequencies (Wright's F_{st}) revealed no significant values of both blocks ($p > 0.2$), suggesting that these loci were under balancing selection. Likewise, the mean number of nonsynonymous substitutions per nonsynonymous site (d_N) significantly outnumbered that of synonymous substitutions per synonymous site (d_S) ($p < 0.001$) in block 12 for each population, indicating that positive selection has diversified sequences in this region. To further analyze the evolutionary history of PvMsp-1, we cloned and sequenced the orthologous gene in *Plasmodium knowlesi*, a closely related species to *P. vivax*. Comparison of overall amino acid sequences between *P. knowlesi* Msp-1 (PkMsp1) and 42 worldwide isolates of PvMsp-1 revealed that these proteins shared 63.4–65.1% sequence similarity across these two species. Alignment of corresponding variable blocks of PvMsp-1 and PkMsp-1 has shown that both genes contained highly related sequence motifs. Examination of rates of nucleotide substitutions in pairwise comparison between PvMsp-1 alleles from worldwide isolates has shown that d_S in blocks 1, 5, 7 and 9 significantly exceeded those of d_N , implying that these conserved blocks were under purifying selection. Likewise, the numbers of synonymous substitutions per synonymous site (K_S) significantly outnumbered those of nonsynonymous substitutions per nonsynonymous site (K_N) between PvMsp-1 and PkMsp-1 in all conserved blocks. Tajima's D test could detect significant departure from neutrality in blocks 7 and 9 while Fu and Li's D^* , F^* , D or F tests yielded significant deviation from neutrality in blocks 1, 3, 5, 7 and 9. Positive direction of these tests indicates an excess of intermediate-frequency alleles in a population which implies the presence of balancing selection on PvMsp-1. The time to most recent common ancestor of PvMsp-1 was estimated by using PkMsp-1 as outgroup on the assumption that *P. vivax* and *P. knowlesi* diverged along with their respective hosts. The mean pairwise d_N of all conserved blocks at the PvMsp-1 locus was 0.014 ± 0.001 (S.E.) and the mean $K_N \pm$ S.E. between *P. vivax* and *P. knowlesi* 0.122 ± 0.007 . The estimated rate of nonsynonymous substitution (λ_N) for PvMsp-1 was 2.4×10^{-9} to 3.0×10^{-9} substitutions per site per year which is close to the average mutation rate for *P. falciparum* Msp-1, being 2.6×10^{-9} substitutions per site per year. The d_N between the most distant pair of allele (d_{Nmax}) was 0.027 ± 0.003 . Hence, polymorphism in PvMsp-1 seems to be maintained for around 4.5–5.6 mya, making it plausibly contemporary with the divergence time for *P. vivax* and *P. knowlesi* around 5.2–7.3 mya and the period of macaque radiation in Asia less than 4.9 mya. The persistence of Msp-1 polymorphism is thus much longer than expected under selective neutrality and is consistent with balancing selection acting to maintain the polymorphism at this locus.