

令和元年6月19日現在

機関番号：10105

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15035

研究課題名（和文）原虫ヴェノムデリバリーシステムを用いたベクター媒介性感染症制御法の開発

研究課題名（英文）Development of vector-borne disease control method using venom expression parasite

研究代表者

福本 晋也（Fukumoto, Shinya）

帯広畜産大学・原虫病研究センター・准教授

研究者番号：50376422

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：蚊などのベクターによって媒介される感染症対策においては、殺虫剤によるベクターコントロールが主体となる。しかしながら殺虫剤使用は耐性獲得・副作用など様々な問題を抱えている。そこで本研究では天敵生物が持つ天然毒のヴェノムに着目し、メリチンをモデルとしてヴェノム発現マラリア原虫を作製することに成功した。また新規の齧歯類マラリア原虫の遺伝子組換え法の開発に成功し、現在まで困難だった多重非変異体の作製が容易にした。またヴェノム発現原虫はワクチン開発へ応用可能であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により蚊感染ステージ特異的にヴェノム発現原虫を作製可能であることが確認された。この結果は、今後の更なる研究の継続と進展により、現在までの主流であったケミカル殺虫剤に依存しない蚊への対策法の確立と全く新たな概念に基づくワクチンの開発に繋がることを示唆された。

また本研究で新たに開発された齧歯類マラリア原虫遺伝子改変技術はマラリア研究の基底スピード向上に繋がるものであり、マラリア根絶に向け寄与可能な結果であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In vector-borne infection measures such as mosquitoes, vector control by insecticides is the most important strategy. However, the use of insecticides has various problems such as acquiring resistance and side effects. In this study, we focused on Venom, a natural poison possessed by natural enemies. We succeeded in producing venom-expressing malaria parasites using melittin as a model. In addition, we succeeded in developing a new gene recombination method for rodent malaria parasite, and it has facilitated the production of multiple mutants that were difficult to date. It was also suggested that venom-expressing parasite could be applied to vaccine development.

研究分野：獣医学

キーワード：マラリア原虫 ハマダラカ ヴェノム

1. 研究開始当初の背景

1800年代終盤に病原体と蚊やダニなどの節足動物による伝播が発見されて以来、100余年の時を経た今も、ベクター媒介性感染症への対策主体は殺虫剤に依存している。しかしながら近年、農業における害虫対策を含め、DDT・ピレスロイドに代表される殺虫剤使用について様々な問題が浮上してきた。殺虫剤耐性昆虫出現による有効性の低下、目的外生物に対する非特異的生態学的影響、さらにはヒトにおける不妊を代表とする哺乳動物への毒性などの理由から新たな害虫防除論の提唱が望まれている。

生物由来製剤として近年、害虫対策として、天敵であるクモやサソリが持つ天然毒である“ヴェノム”が注目されている。ヴェノムは数百万年にわたる進化の過程において、虫の捕食のため、標的への高い親和性と特異性を手に入れるに至った。したがって、ヴェノムは既存の殺虫剤とは異なる作用機序により、哺乳動物に対する安全性と、環境負荷の低さが利点として上げられる。ヴェノムの多くはペプチド・タンパクからなり、遺伝子工学技術による作物へのヴェノム遺伝子導入、極めて高コストではあるが人工合成物の噴霧等の手法により、次世代の害虫対策法として実用化へ向けた研究がなされている。

ベクター媒介性感染症制圧の歴史を紐解くと、その成功はベクター対策の成否に大きく依存していることがわかる。その主体は殺虫剤によるものであるが、耐性昆虫の出現などの諸問題により標準法としての存在が危ぶまれてきている。そこで近年、次世代の殺虫分子として、天敵昆虫や昆虫寄生菌から分離された生物由来分子の利用が模索されている。殺虫剤の主要マーケットである農業においては、使用対象である作物は固定され人間の支配下にあるため、その利用は容易い。しかしながら、本研究で対象とするベクターは飛翔等に代表される遁走・移動能力を有するため、その用法には課題が山積している。

ベクターと病原体の関係において特徴的な現象が、宿主特異性である。病原体の伝播は吸血行動による機械的な移動によるものではなく、ベクター体内での複雑な分化・増殖プロセスの結果、初めて次世代の感染が可能となる。したがって、病原体とベクターの間には固有の相関関係である特異性が生まれる。本研究ではこの特異性に着目し、囿誘引法との組合せにより病原体をヴェノムデリバリーの担体として用い、ベクター媒介性感染症の制御に応用できるのではないかとこの着想に至った。即ち、対象とするベクターに特異的に感染する病原体にヴェノムを発現させ、これを囿誘引法の応用によりベクターに感染させる。病原体が作り出すヴェノムの働きにより、ベクターを殺滅し感染症を制圧しようとするものである。

そこで本研究計画では哺乳動物・節足動物の両ステージを実験室内で再現可能である、齧歯類特異的マラリア原虫-ハマダラカ媒介系をモデルとして用いることにより、申請者が提唱する、ヴェノム発現原虫によるベクター防除論の実現の可能性と有効性の評価を行った。

2. 研究の目的

本研究はベクター媒介性感染症に着目し、天敵生物が持つ天然毒“ヴェノム”と病原体によるデリバリーシステムを用いた、新たなベクター防除論の開発と有効性評価を行おうとするものである。ベクターコントロールの主体である殺虫剤の使用は、様々な問題を抱えている。そこで本申請では、ベクターと病原体との間に存在する関係“宿主特異性”を利用することで、標的とするベクター生物種にのみ特異的に感染する病原体にヴェノムを導入し、標的とする生物種のみをコントロールする、既存の殺虫剤が抱える問題を克服し、全く新たな概念に基づくベクター媒介性感染症制御法の開発を目的とする。

以上の目的の達成のため、本研究計画ではハマダラカに対して毒性を示すヴェノムのスクリーニング、齧歯類マラリア原虫におけるヴェノム組換えシステムの開発、ヴェノム発現原虫の作出およびハマダラカでの表現型解析を行う事を目的として研究を展開した。

3. 研究の方法

(1) インジェクション法によるヴェノムハマダラカ毒性評価

ハマダラカの属する *Diptera* に対して毒性を示すことが既に報告されているヴェノムについて、インジェクション法により、毒性評価スクリーニングを行った。実体顕微鏡下でガラスマイクロニードル電動インジェクターを用いて、ヴェノム溶液を腹節基部にインジェクションする。麻酔覚醒後、通常環境下での飼育を行い、致死率・生存日数・運動能力・吸血行動能力などを指標としてハマダラカの表現型解析を行うことで各ヴェノムの毒性を評価する。以上の解析により、使用するヴェノム、および効果的な組合せの候補を選定した。

(2) ヴェノム発現組換え原虫作製法の開発

ハマダラカステージでヴェノムを発現するためのハマダラカステージ特異的プロモーターとして、TRAP 遺伝子・MAEBL 遺伝子・CTRP 遺伝子のプロモーターのクローニングを行った。同時に多数のヴェノムを発現するマラリア原虫作製法の開発が最終目標への到達の為には必要であることが懸念されたため、宿主毒性抗生物質を使用可能な新規組換え原虫作製法の開発を試みた。短期の試験管内培養とピューロマイシン耐性遺伝子・プラストサイジン耐性遺伝子および

ピューロマイシン・ブラストサイジンを用いた組換え体作製法の検討を行った。組換え体作製の指標はレポーターである GFP の発現として評価を行った。

(3) ヴェノム発現原虫の作出とハマダラカでの感染動態解析

上記(1)でハマダラカに対して毒性を示すことが確認されたミツバチ由来ヴェノムのメリチンをターゲットとして実験を行った。メリチン遺伝子を齧歯類マラリアコドン使用頻度に基づき人工合成、シグナル配列の人工的不可により分泌発現系構築を行った。(2)で新規に開発した方法を用いてメリチンを発現する組換え原虫の作製を試みた。メリチン発現原虫のハマダラカへの感染実験を行い、メリチン転写量などの解析を行った。

4. 研究成果

マイクロインジェクション法によりヴェノムのスクリーニングを行い高い毒性を示したこと、および、コマーシャルに入手が容易なことなどの理由から、ミツバチ由来ヴェノムであるメリチンをプライマリーターゲットとした。メリチンのハマダラカマイクロインジェクション法による毒性について半数致死量 LD_{50} を解析したところ、 $LD_{50}=1.03 \times 10^{-5}$ mg/ハマダラカであった。

次にメリチン発現マラリア原虫作製を行うこととしたが、ハマダラカでの動態を観察する場合原虫が GFP などのレポーター遺伝子を共発現していることが非侵襲的解析を行う上で望ましいこと、ヴェノムの多重発現系が必要になる可能性等の課題が浮上した。しかしながら齧歯類マラリア原虫では多重変異体の作製が困難であるため、ヴェノムとレポーターの共発現および数種のヴェノムの独立トランスフェクションによる共発現は難しいとの問題があった。そこで代表者らは新規の組換え原虫作製法の開発に着手、実験系の盤石化を目指した。齧歯類マラリア原虫は長期試験管内培養が困難なため組換え体作出実験を生体内で実施する必要がある。したがって、マウスに毒性を示すポジティブセレクション用抗生物質およびマーカーが使えないとの問題がある。このような抗生物質は哺乳動物細胞等で組換え体を選択するにあたり極めて一般的に用いられているが、本原虫では使用できない。そこで代表者らは試験管内での短期間培養とマウスでのリカバリーセットの繰り返しにより組換えマラリア原虫を作製する新規実験系の開発を行った。その結果、ピューロマイシンおよびブラストサイジンの宿主毒性薬剤を用いた組換え体作製法の開発に成功した。これらの方法の開発により、現在までに困難だった齧歯類マラリア原虫で容易に多重変異体を作り出すことが可能になった。独立した3つのマーカーにより3重の連続した組換え導入をシーケンシャルに行うことが可能となった。また、本実験系開発成功における副産物として、容易に組換え原虫をクローニングすることが可能になった。現在までに一般的に行われていた組換え原虫作製法においては組換え効率および生体内で薬剤選択を行う必要性から、薬剤選択後の組換え体の割合が10-20パーセントと極めて低かった。本原虫の組換え体のクローニングはマウスを用いたインビボ限界希釈法によるため、選択割合の低さからこの作業に多大なる労力と数十匹のマウスを使用する必要があった。しかしながら、我々が開発に成功した新規実験系においては薬剤選択後の目的原虫の割合をほぼ100パーセントにまで高めることが可能であった。すなわち齧歯類マラリア原虫組換え体作出におけるボトルネックとなっていたクローニング作業が極めて容易となり、5匹程度のマウスで行うことが可能となり、マラリア研究全体の基底スピード向上に大きく貢献できたと考えられる。

上記の組換え原虫作製法を用いて、メリチン発現原虫の作製を試みた。数種のプロモーターから高活性を示したことを理由にCSプロモーターをメリチン発現ドライバーとして使用した。CSプロモーター支配下でメリチンを分泌発現するピギーバックリコンビネーションコンストラクトを作製し、GFP発現マラリア原虫にトランスフェクション、またドラッグセレクションを実施し、クローニングを行った。その結果、PCR法により目的コンストラクトをマラリア原虫ゲノムに持つ原虫クローンの分離に成功したことを確認した。この結果は、ベクターステージ特異的プロモーターを使用することでマラリア原虫に対し毒性を持つ物質の遺伝子を導入した変異体の作製が可能になることを示すものであった。

メリチン遺伝子導入マラリア原虫をハマダラカに感染させその挙動を解析した。レポーターとして導入したGFPを指標として非侵襲的に感染動態を観察した。その結果、オーシストについては正常な形成能力を有することが明らかとなった。次に唾液腺スポロゾイトの形成能を解析した。野生型と比べ減少傾向ではあるが、唾液腺スポロゾイトが形成されることが明らかとなった。またメリチン遺伝子の転写をリアルタイムPCR法により解析した。その結果ハマダラカステージにおいて特異的にメリチン遺伝子が転写されていることを確認した。以上の結果より、メリチンを発現するマラリア原虫はハマダラカに感染能を持ち、かつスポロゾイトを形成可能であることが示唆された。次にハマダラカに対する毒性を解析した。頻回の解析の結果、メリチンをドライブするCSPプロモーターの活性が高まる感染後10日前後において10-30%のハマダラカが死亡することが確認された。しかしながら実験間におけるばらつきが大きく再現性に問題があった。そこでメリチン転写量を詳細に解析したところ、同一プロモーター支配下のCS遺伝子とくらべて有意に転写量が低いことが確認された。この結果はメリチン転写においてなんらかの負のフィードバックが生じている可能性が示唆された。以上の結果より、まだ改善は必要であるものも、ヴェノムを導入したマラリア原虫を作出可能であり、これを用いたハマダラカ制御が可能であることを示唆する結果であった。次にメリチン導入マラリア原虫スポ

ロゾイトのマウスへの感染性を評価した。その結果、野生型と比較し感染性が有意に低下していることが確認された。この結果より、マラリア原虫に対するヴェノムの導入により非感染性スプロゾイトを生産可能であり、これはマラリアワクチン開発にブレイクスルーをもたらすことが可能ではないかと考えられた。

本研究ではメリチンをモデルとしてヴェノム発現マラリア原虫を作出することに成功した。また、この原虫作出にあたり、新規マラリア原虫遺伝子組換え法の開発に成功した。ヴェノム発現原虫はワクチン開発に有用性を示すことが確認された。今後、ヴェノム発現コントロール法の更なる改善により、マラリアベクターコントロールおよび感染制御に繋げることが可能であることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Sombie, A., Saiki, E., Yameogo, F., Sakurai, T., Shirozu, T., Fukumoto, S., Sanon, A., Weetman, D., McCall, P. J., Kanuka, H., Badolo, A.: High frequencies of F1534C and V1016I kdr mutations and association with pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Somgande (Ouagadougou), Burkina Faso. *Trop Med Health*, 47 2, 2019 (査読有) DOI: 10.1186/s41182-018-0134-5
2. Yusuf, Y., Yoshii, T., Iyori, M., Yoshida, K., Mizukami, H., Fukumoto, S., Yamamoto, D. S., Alam, A., Emran, T. B., Amelia, F., Islam, A., Otsuka, H., Takashima, E., Tsuboi, T., Yoshida, S.: Adeno-Associated Virus as an Effective Malaria Booster Vaccine Following Adenovirus Priming. *Front Immunol*, 10 730, 2019 (査読有) DOI: 10.3389/fimmu.2019.00730
3. Soga, A., Ko-Ketsu, M., Fukumoto, S.: Development of a bsd-blasticidin selection system in *Plasmodium berghei*. *FEBS Lett*, 592:1847-55, 2018 (査読有) DOI: 10.1002/1873-3468.13100
4. Soga, A., Bando, H., Ko-Ketsu, M., Suganuma, H., Kawazu, S., Fukumoto, S.: High efficacy *in vitro* selection procedure for generating transgenic parasites of *Plasmodium berghei* using an antibiotic toxic to rodent hosts. *Sci Rep*, 7:4001, 2017 (査読有) DOI: 10.1038/s41598-017-04244-0.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Akira Soga, Mami Ko-ketsu, Shinya Fukumoto, Development of high efficacy *in vitro* drug selection systems for generating transgenic parasite of *Plasmodium berghei*, 14th International Congress of Parasitology, 2018
2. Akira Soga, Mami Ko-ketsu, Shinya Fukumoto, Development of high efficacy *in vitro* drug selection method for sequential genetic manipulation of *Plasmodium berghei*, World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 2017
3. 曾賀晃、瀨瀬摩美、福本晋也、ネズミマラリア原虫 *Plasmodium berghei* における *in vitro* 薬剤選択法の改良、第 160 回日本獣医学会学術集会、2017
4. 曾賀晃、瀨瀬摩美、福本晋也、宿主毒性薬剤選択系を用いたネズミマラリア原虫効率的遺伝子操作法の開発、第 40 回日本分子生物学会年会、2017
5. 曾賀晃、瀨瀬摩美、福本晋也、*In vitro* 哺乳動物毒性マーカーシステムの応用によるマウスマラリアモデル多重変異体選択技術の開発、第 159 回日本獣医学会、2016
6. 曾賀晃、瀨瀬摩美、福本晋也、哺乳類宿主毒性抗生剤を利用した *Plasmodium berghei* 多重変異体作製技術の開発、第 39 回日本分子生物学会年会、2016

〔その他〕
ホームページ等

<https://www.obihiro.ac.jp/facility/protozoa/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

連携研究者氏名：相内 大吾

ローマ字氏名：Daigo Aiuchi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。