

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07134

研究課題名(和文)新規赤血球因子を介したマラリア原虫増殖抑制機構の解明

研究課題名(英文)Genetic analysis of host erythrocyte factor on proliferation of malaria parasite

研究代表者

大野 民生 (Ohno, Tamio)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90293620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：マウス9番染色体には強力なマラリア抵抗性遺伝子座Char1/Pymrが存在しているが、その原因遺伝子は同定されていない。代表者は、ゲノム編集技術で候補遺伝子に対する複数の変異マウスを作製しマラリア感受性を解析する事で、その原因遺伝子がApeh遺伝子のアミノ酸置換(p.89P>R)を伴う塩基置換によることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Apeh遺伝子がコードするアシルペプチド加水分解酵素の機能は十分に判明していない。本研究で赤血球内のこの酵素がマラリア原虫の増殖に重要な役割を持っている事が判明すると同時に、未知のマラリア原虫増殖抑制機構が存在することも示した。この新規マラリア抵抗性遺伝子の発見は、マラリアの新規治療薬の開発に繋がる重要な知見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：It was well known that the Char1/Pymr locus located on chromosome 9 is the major locus controlling proliferation of malaria parasite. However, the causative gene have not been identified. We generated novel mutant mice strains by the CRISPR/Cas9 system on NC strain. The knock-in strain which has single nucleotide substitution with amino acid substitution (p.89P>R) on Apeh gene showed suppressed parasitemia and prolonged survival. It was revealed that this substitution of Apeh gene is the causative variant which controlling malaria resistance.

研究分野：実験動物学

キーワード：ゲノム編集 赤血球 原虫増殖抑制遺伝子 ネズミマラリア原虫 マウス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) マラリアはエイズ、結核と並び三大感染症とされ、今もなお世界中で猛威を奮う寄生虫症であり、マラリア原虫が赤血球への感染と増殖を繰り返すことで重篤な病態を引き起こす疾患である。依然としてワクチンが開発できていない事や薬剤耐性株の蔓延から、新たな治療法や予防法の開発は極めて重要な課題である(WHO, World Malaria Report 2015)。マウスに実験的にネズミマラリア原虫を感染させるマラリアのモデル系は、マラリア研究において不可欠なツールとして認識されている(*Trends Parasitol*, 28:73-82, 2012.)。特に、マウス系統間にはネズミマラリア原虫感染抵抗性に大きな違いが存在することから、その原因遺伝子を同定しマラリアに対する宿主抵抗性機構を分子レベルで解明する事は、新規治療法や予防法の基盤となる知見に繋がると期待されている(*Hum Mol Genet*, 11:2469-2478, 2002.)。これまでの順行性遺伝学的手法を用いた解析により、マウス染色体上に 10 カ所以上の宿主抵抗性遺伝子座が報告され、なかでも9番染色体に存在するマラリア抵抗性遺伝子座(*Char1/Pymr*)は他の遺伝子座と比較してその効果が極端に大きく、この遺伝子座だけで各種マウス系統間に見られるマラリア原虫の増殖性の違いの大半を説明する主要な遺伝子座である(*Mamm Genome*, 22:32-42, 2011.)。しかし、研究代表者を含め複数の研究グループが、この *Char1/Pymr* 領域内の免疫系の候補遺伝子を中心に解析を実施してきたが、未だ原因遺伝子の同定には至っていない。

(2) 研究代表者はこれまでに独自の解析から以下の知見を得た。免疫不全マウス(*nude, scid*)の感染初期のマラリア原虫の増殖性は正常マウスと同レベルである。マラリア感受性系統(A/J, C3H/HeJ, NC)と抵抗性系統(C57BL/6J, CBA, 129X1)間のマイクロアレイ解析において原虫の増殖性と発現量に強い相関が見られる遺伝子には、骨髄や赤芽球特異的に発現する遺伝子(ヘモグロビンやその生合成に関与する遺伝子、赤血球膜蛋白の遺伝子、赤血球の分化に必須の転写因子の遺伝子など)が免疫系の遺伝子より圧倒的に多く、いずれも感受性系統で高発現を示す。感受性系統(NC)に抵抗性系統(129X1)由来の *Char1/Pymr* 領域を導入したコンジェニック系統はマラリア抵抗性を示すと同時に、解析で抽出した骨髄や赤芽球特異的に発現する遺伝子群の発現量が激減する。以上より、マウス系統間のマラリア原虫の増殖性を制御している主要な因子は免疫系ではなく赤血球にあり、その重要な制御因子が *Char1/Pymr* 領域内の原虫増殖性に関与する遺伝子の本体であると考えられた。

## 2. 研究の目的

マウス9番染色体のマラリア抵抗性遺伝子座(*Char1/Pymr*)の存在領域(106.57-108.25Mb)内の 69 個の遺伝子について、上述の理由から免疫系ではなく赤血球因子に絞って候補遺伝子を検討した結果、有力な新規候補遺伝子(*Rnf123*)を見出すに至った。*Rnf123* 遺伝子は当該領域内で骨髄や赤芽球で特異的に発現する唯一の遺伝子であり、その遺伝子産物が赤血球内に存在する(*Mol Cell Proteomics*, 7:1317-1330, 2008., *J Proteome Res*, 9:144-63, 2010.)。うえ、感受性系統群では抵抗性系統群に対して高発現している事から、マラリア抵抗性の原因となる極めて有力な候補遺伝子と考えられた。そこで、機能が解明されていないこの赤血球分子(RNF123)に着目し、ゲノム編集技術で欠失(KO)マウスを作製し、この遺伝子によるマラリア原虫の増殖抑制機構を解明することを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) マウス: 本研究に使用したマウスは、名古屋大学大学院医学系研究科・実験動物部門の SPF 飼育室(温度:23、湿度:55%、照明:12L12D)で飼育した。使用した NC 系統は日本 SLC 社から購入後、代表者が継代維持している系統を使用した。本研究は名古屋大学医学系研究科動物実験委員会と名古屋大学医学系研究科組換え DNA 実験安全委員会の承認下で実施した。

(2) RNF123・KO マウスの作製: *Rnf123* 遺伝子のエクソン 2 を標的とした gRNA と Cas9 タンパク質を NC 系統の受精卵に導入した。生まれたマウスのオン・オフターゲット候補の塩基配列をサンガー法で確認し、オフターゲット変異を持っていない 2 種のヘテロ KO 個体をファウンダーとして 2 系統のホモ KO 系統を樹立した。ホモ KO 系統については、RNF123 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより

RNF123 タンパク質の発現が欠失している事を確認した。

(3) APEH・KI (ノック・イン) マウスの作製: *Apeh* 遺伝子のエクソン 3 を標的とした gRNA、対象領域に 1 塩基置換を導入した ssODN、Cas9 タンパク質を NC 系統の受精卵に導入した。生まれたマウスのオン・オフターゲット候補の塩基配列をサンガー法で確認し、オフターゲット変異を持っていないヘテロ KI 個体をファウンダーとしてホモ KI 系統を樹立した。

(4) 表現型解析: 生後 8 週齢の雌個体にネズミマラリア原虫 (*P.yoelii* 17XL 株) の感染赤血球を  $1 \times 10^5$  個腹腔内投与し、感染 5 日目の血虫率と感染 21 日後 (3 週間) までの生存率を野生型マウス (NC 系統)、ゲノム編集による遺伝子改変マウス、NC 系統の *Char1/Pymr* 領域を抵抗性の 129X1 系統に置換したコンジェニック系統 (NC.129X1-*Char1/Pymr*) で比較した。*P.yoelii* 17XL 株以外のネズミマラリア原虫 (*P.chabaudi* AS 株と *P.berghei* ANKA 株) の感染では、感染赤血球を  $1 \times 10^6$  個腹腔内投与した。血虫率はギムザ染色した血液薄層塗抹標本において、観察した赤血球数に対する感染赤血球の割合として算出した。赤血球の形状は自動血球計数装置を用いて測定した。

#### 4. 研究成果

(1) ゲノム編集技術 (CRISPR/Cas9 システム) により、2 系統の RNF123 欠損 (KO) 系統を樹立した。当初の想定に反して、両系統ともホモ欠損個体は致死とはならず正常な発育を示したため、両系統ともホモ欠損系統として確立し、ネズミマラリア原虫感染感受性 (*P.yoelii* 17XL 株) の解析を実施した。2 系統の RNF123・KO 系統はいずれも対照 (NC) 系統と比較して同レベルの血虫率の抑制と生存率の上昇を示した (図 1)。一方、コンジェニック系統 (NC.129X1-*Char1/Pymr*) では NC 系統と比較してより劇的な血虫率の抑制と生存率の上昇が認められた (図 1)。すなわち、コンジェニック系統が示す *Char1/Pymr* 遺伝子座の絶大なマラリア抵抗性作用と比較して、*Rnf123* 遺伝子欠損による効果は小さかった。したがって、マラリア抵抗性系統に共通して認められる *Rnf123* 遺伝子の高発現がマラリア抵抗性に直接的に関与しているとは考えにくく、*Char1/Pymr* 領域内に別のマラリア抵抗性を規定する遺伝子が存在する可能性が高いと考えられた。

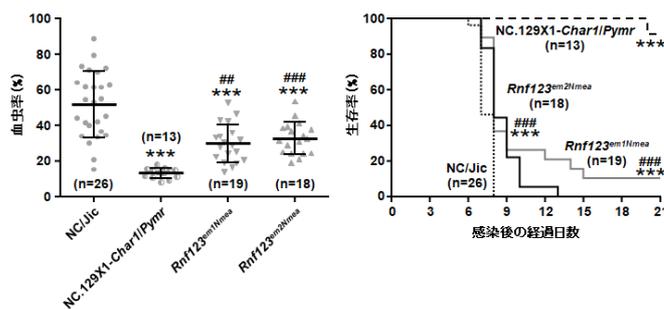


図1 NC、コンジェニック系統 (NC.129X1-*Char1/Pymr*)、RNF123欠損マウス (*Rnf123<sup>em1</sup>Nmea*、*Rnf123<sup>em2</sup>Nmea*) の 8 週齢雌個体におけるネズミマラリア原虫 (*P.yoelii* 17XL) 感染 5 日後の血虫率と感染 3 週間の生存率の比較  
血虫率: one-way ANOVA 後の Tukey 多重比較検定。  
生存率: ログランク検定 (\*\*\*)  $P < 0.001$  vs. NC/Jic, \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs. NC.129X1-*Char1/Pymr*)

(2) 当初は *Char1/Pymr* 遺伝子座のマラリア抵抗性の本体は *Rnf123* 遺伝子の発現量の違いに依るものと考えていたが、想定とは全く異なる結果となった。そこで次の候補遺伝子を探索する必要が生じ、*Char1/Pymr* 遺伝子領域内に存在する 69 個の遺伝子について再検討を行った。その結果、遺伝子産物が赤血球内に存在し、マウスのマラリア抵抗性系統と感受性系統で明確にタイプが分離できるアミノ酸置換 (p.89P>R) を有する *Apeh* 遺伝子に着目するに至った。そこで、次の候補遺伝子変異として *Apeh* 遺伝子内のアミノ酸置換を伴う 1 塩基置換に焦点を当てて解析することにした。なお、*Apeh* 遺伝子は *Rnf123* 遺伝子に隣接し、その遺伝子産物の機能は十分に解明されていない。

(3) ゲノム編集技術 (CRISPR/Cas9 システム) により APEH・KI 系統を樹立し、ネズミマラリア原虫 *P.yoelii* 17XL 株の感染実験を実施した。APEH・KI 系統は対照 (NC) 系統と比較して大幅な血虫率の抑制と顕著な生存率の上昇を示した (図 2)。コンジェニック系統 (NC.129X1-*Char1/Pymr*) と比較すると APEH・

KI 系統の血虫率は少し高く生存率も少し低い値を示したが、両系統とも NC 系統と比較して劇的な血虫率の抑制と生存率の上昇を示した(図 2)。更に、*Char1/Pymr* 遺伝子座は全てのマラリア原虫種に対して抵抗性作用を有するという特徴があるため(*Exp Anim*, 68:243-255, 2019.)、*P. yoelii* 17XL 株以外のネズミマラリア原虫株(*P. chabaudi* AS 株、*P. berghei* ANKA 株)を用いた感染実験を実施した。その結果、*P. yoelii* 17XL 株に類似して致死性の高い *P. berghei* ANKA 株では、APEH・KI 系統とコンジェニック系統は NC 系統と比較して血虫率の抑制と生存率の上昇が認められた(図 2)。また、致死性の低い *P. chabaudi* AS 株でも APEH・KI 系統とコンジェニック系統は NC 系統と比較してより劇的な血虫率の抑制を示した(図 2)。更に、赤血球の形状を自動血球計数装置を用いて測定したところ、APEH・KI 系統とコンジェニック系統では、NC 系統より MCH と MCHC が低下するという共通所見が認められた。ただし、この低下はマウス系統間に存在する MCH や MCHC のバリエーションと比較して極めて小さいものであった。これらの結果は、*Apeh* 遺伝子のアミノ酸置換を伴う 1 塩基置換が *Char1/Pymr* 遺伝子座のマラリア抵抗性遺伝子の本体であることを示していると考えられた。

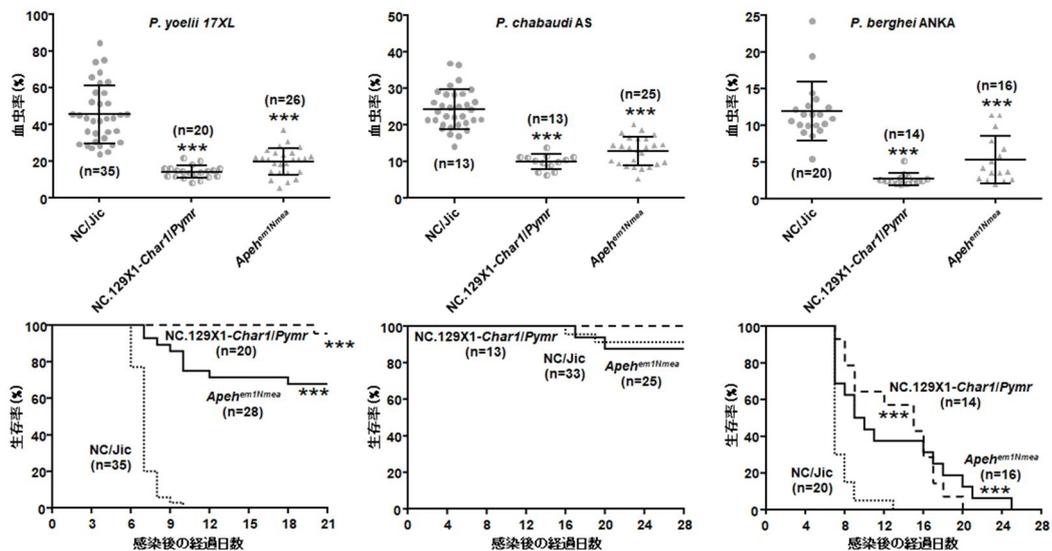


図2 NCコンジェニック系統(、NC.129X1-*Char1/Pymr*)、APEHノックインマウス(*Apehem11Nmea*)の8週齢雌個体におけるネズミマラリア原虫感染後の血虫率と生存率の比較  
血虫率: one-way ANOVA後の Tukey 多重比較検定、生存率: ログランク検定 (\*\*\*) $P < 0.001$  vs. NC/Jic)

(4) 本研究に着手した時点では APEH タンパク質とマラリアとの関係は一切報告されていなかった。研究代表者が *Char1/Pymr* 遺伝子座のマラリア抵抗性遺伝子の本体として *Apeh* 遺伝子内のアミノ酸置換を伴う 1 塩基置換に着目し解析を進めている過程で、宿主の APEH タンパク質とマラリア原虫の関係について、赤血球内のマラリア原虫は赤血球中の APEH タンパク質を原虫内に取り込んでいる。培養液に APEH タンパク質の阻害剤を加えた赤血球ではマラリア原虫の増殖が抑制される。という注目すべき論文が発表された(*mSphere*, 4:e00077-00019, 2019.)。この in vitro での解析結果は、研究代表者がマウス(in vivo)の解析で得た宿主の *Apeh* 遺伝子がマラリア抵抗性に強力に関与しているという知見と共通性があり、赤血球中の APEH タンパク質はマラリア原虫の増殖に極めて大きな役割を持っていると考えられる。今後、宿主の *Apeh* 遺伝子あるいは赤血球中の APEH タンパク質がマラリア原虫の増殖に果たす役割をより詳細に分子レベルで解析する事で、未知のマラリア抵抗性機構が解明され、新規のマラリア治療薬の開発等に繋がる事が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ohno T, Miyasaka Y, Kuga M, Ushida K, Matsushima M, Kawabe T, Kikkawa Y, Mizuno M, Takahashi M	4. 巻 68
2. 論文標題 Mouse NC/Jic strain provides novel insights into host genetic factors for malaria research.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Exp Anim	6. 最初と最後の頁 243-255
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1538/expanim.18-0185	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮坂勇輝・大野民生
2. 発表標題 マウス第9番染色体に存在するマラリア原虫感染抵抗性遺伝子座の解析
3. 学会等名 第26回分子寄生虫学ワークショップ
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮坂勇輝・丹羽祥太・小林美里・堀尾文彦・大野民生
2. 発表標題 Rnf123遺伝子のネズミマラリア原虫増殖性への関与について
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮坂勇輝・小林建介・小林美里・堀尾文彦・大野民生
2. 発表標題 Apeh遺伝子の1アミノ酸置換はマウスのネズミマラリア原虫増殖性を規定する
3. 学会等名 第89回日本寄生虫学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮坂勇輝・丹羽祥太・舩屋智美・石井玲佳・小林美里・堀尾文彦・大野民生
2. 発表標題 E3ユビキチンリガーゼRNF123欠損はネズミマラリア原虫 (Plasmodium yoelii 17XL) 感染初期の血虫率を低下させる
3. 学会等名 第90回日本寄生虫学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関