

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15676

研究課題名(和文) マラリア原虫におけるrho0細胞を用いた人工ミトコンドリアDNAの導入

研究課題名(英文) A study towards establishing a cell line depleted of mitochondrial DNA in malaria parasites

研究代表者

彦坂 健児 (Hikosaka, Kenji)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：30456933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マラリア原虫のミトコンドリア(mt)DNAの転写および翻訳機構を解明する目的で、エチジウムブロマイド(EtBr)暴露によるマラリア原虫におけるmtDNA欠損細胞(rho0細胞)の樹立を目指した。その結果、げっ歯類マラリア原虫およびヒトマラリア原虫におけるEtBrへの感受性が明らかとなった。本知見は今後のマラリア原虫rho0細胞を用いたmtDNA組換え技術の確立に貢献することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の継続によりマラリア原虫のミトコンドリアDNA(mtDNA)の転写・翻訳機構が明らかとなれば、その機序はヒトのものとは大きく異なることが期待されるため、新規抗マラリア薬の有用な標的となり得る。また、マラリア原虫でmtDNAを消失させた細胞であるrho0細胞作出技術が確立されれば、同じ生物群に属する寄生生原虫であるトキソプラズマ、コクシジウム、ピロプラズマなどにも応用が効くことが予想され、生物学的に新たな知見が多く得られることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In malaria parasites, transcriptional and translational mechanisms of mitochondrial DNA (mtDNA) remain unclear. To elucidate these mechanisms, we tried to generate a cell depleted of mtDNA using ethidium bromide (EtBr) in malaria parasites.

Our study showed that the human malaria parasite has higher sensitivity to EtBr compared with a rodent malaria parasite. These findings would provide a valuable information to a study towards establishing a cell line depleted of mitochondrial DNA in malaria parasites.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア原虫 ミトコンドリアDNA rho0細胞 組換え原虫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは真核生物においてエネルギー転換の役割を担う細胞内小器官で、細胞内共生していたと考えられる原核生物に由来する独自のゲノムをもつ。このミトコンドリアゲノム(以下、mtDNA)には主に酸化リン酸化経路に関与する遺伝子が存在する。脊椎動物では mtDNA のサイズが約 16 kb と保存されているが、他の生物種では 6 kb~200 kb 以上と多様であり、最小サイズ(6 kb)の mtDNA はマラリアを引き起こすマラリア原虫より見出されている。マラリア原虫の 6 kb の mtDNA には、3 つのタンパク質遺伝子(cytochrome *c* oxidase subunit I、*cox1*; cytochrome *c* oxidase subunit III、*cox3*; cytochrome *b*、*cob*: いずれも酸化リン酸化経路関連遺伝子)、高度に断片化した LSU および SSUrRNA(断片長 16 nt~195 nt)が同定されているのみで、これらの領域が全 mtDNA 領域の 85%以上を占める。さらに、翻訳で利用される mt tRNA は同定されていない。このことからマラリア原虫の mtDNA には、(i)遺伝子の転写・翻訳はどのように制御されているのか?、(ii)断片化 rRNA 遺伝子は機能しているのか?、(iii)ミトコンドリアで利用する tRNA はどこに存在しているのか?、など生物学的な疑問が多く残されている。これらの疑問を解明するためには mtDNA の組換え技術が必須である。しかし、従来の電極を用いた遺伝子導入装置による相同組換え法では、マラリア原虫の mtDNA は 1 細胞あたり 50~150 コピー存在するため、全ての mtDNA をホモプラスミーの状態にすることが困難である。さらに従来法では二重膜をもったミトコンドリアへのベクターの移送効率が悪いことから mtDNA の組換え技術は確立されていない。

そこで本研究では、マラリア原虫においてミトコンドリアより mtDNA を消失させた細胞(*rho0* 細胞)を作製後、遺伝子銃によって人工 mtDNA を導入し、これらの問題点を解決することを着想した。*rho0* 細胞の作製は、ヒトやマウス細胞、単細胞生物では酵母でなされており、代表的な方法としては臭化エチジウム(EtBr)を用いた方法がある。マラリア原虫の赤血球内発育ステージ(赤内型)のミトコンドリアは、酸化リン酸化がほとんど機能しておらず、ピリミジン合成の点で生存に必須であることが報告されている。本原虫にはピリミジン合成系を構成するミトコンドリア局在型のジヒドロオロト酸脱水素酵素(DHODH)のみが存在するが、この報告では、これを酵母の細胞質局在型 DHODH (*yDHODH*)の発現によって補うことで、抗マラリア薬(アトバコン)に耐性を持つことが示されている。ミトコンドリア局在型の DHODH は酸化リン酸化経路での電子伝達の役割も兼ね、アトバコンは本原虫の酸化リン酸化経路を阻害する薬剤である。以上より、マラリア原虫に *yDHODH* を発現させた場合、酸化リン酸化経路関連タンパク質のみをコードする mtDNA を欠失させても原虫が生存できる可能性が考えられる。

マラリア原虫の mtDNA はサイズが 6 kb と小さいことから、PCR による人工的な塩基配列の置換や挿入、欠失などの改変が容易である。また、他の研究グループの報告では、植物や酵母で遺伝子銃を用いたミトコンドリアへの DNA 断片の導入に成功している。

2. 研究の目的

今までのところ、マラリア原虫の mtDNA の組換え技術が確立されておらず、同原虫がもつ 6 kb の mtDNA の転写・翻訳といった基本的な仕組みが未解明のままである。そこで本研究では、mtDNA そのものを人工的に自由に構築し、マラリア原虫の mtDNA 消失細胞(*rho0* 細胞)のミトコンドリアに“入れ替える”という画期的な発想により、マラリア原虫の mtDNA 配列の謎を解き明かすことを目指し、そのための基盤情報を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マラリア原虫の *rho0* 細胞株を確立するために、mtDNA にコードされるタンパク質が機能せずとも増殖が可能であると考えられる *yDHODH* (酵母ジヒドロオロト酸脱水素酵素)を導入したげっ歯類マラリア原虫の組換え体作成を行った。組換え部位はマラリア原虫の赤血球内増殖発育ステージである赤内型で発現している AP2-G を標的とした。組換えの確認は PCR によって行い、発現は RNA 抽出後逆転写 PCR によって行った。

(2) *yDHODH* を導入したマラリア原虫では、mtDNA にコードされている 3 つの酸化リン酸化関連酵素(*cox1*、*cox3* および *cob*) が機能せずとも増殖が可能であるはずなので、*cob* を標的とする抗マラリア薬であるアトバコンを用いて、耐性をもつか否かを調べた。アトバコンの投与量は、これまでの実験で野生型のげっ歯類マラリア原虫が致死となる投与量となることがわかっている 10 µg/mL の濃度のアトバコン溶液の自由飲水とした。

(3) エチジウムブロマイド(EtBr)暴露実験に向けた *P. berghei* の *in vitro* 培養時間の検討を行なった。一般的に、培養細胞で *rho0* 細胞を樹立する際は 14 日間の低濃度 EtBr 暴露が必要である。また、*P. berghei* の *in vitro* 培養では、発育ステージがシゾントまでしか進まないことがわかっている。そこで、*P. berghei* が *in vitro* 培養でどこまで生存できるかを調べた。

(4) *P. berghei* の *in vitro* 培養系を用いて EtBr の暴露試験を行った。原虫株は *yDHODH* 導入株と野生型を用い、22 時間~24 時間培養した。EtBr 濃度は 0~50 µg/mL で検討した。

(5) げっ歯類マラリア原虫では in vitro 培養時間に限界があり mtDNA の消失には至らないことが推測されたため、長期間 in vitro 培養が可能なヒト熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*) を用いてエチジウムブロマイド暴露試験を行った。一般的な *P. falciparum* の in vitro 培養条件を採用し、培養液中に濃度が 0~1 µg/mL となるように EtBr を溶解した。

4. 研究成果

(1) げっ歯類マラリア原虫組換え体作成には *Plasmodium berghei* (ANKA 株) を用いた。薬剤選択によって増殖した原虫より抽出した DNA を用いた PCR によって、目的の部位に yDHODH が挿入されていることを確認し、逆転写 PCR によって mRNA の発現も確認した。

(2) アトバコンの自由飲水では、*P. berghei* の yDHODH 組換え体と野生型の増殖に違いが認められず、組換え原虫において cob の機能が生存に必須になっていることが示唆された。この現象は、既に報告のある熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*) の yDHODH 導入株においても、株の違いでアトバコンに対する耐性の度合いに大きな差があることが報告されている。これは各株において酸化的リン酸化を含むエネルギー転換系のタンパク質の働きに違いがあるためと考えられている。このため、*P. berghei* では mtDNA の消失操作が難しいと判断し、他の種のげっ歯類マラリア原虫 (*P. yoelii* および *P. chabaudi*) で yDHODH 導入原虫株の作成を試みた。方法は、上述の方法 (3. 研究の方法、(1)) に準じた。しかし、両種のげっ歯類マラリア原虫では yDHODH 導入が困難であり、また、*P. berghei* での適応によるエネルギー代謝系の変化を期待し、ここまでで作成した *P. berghei* yDHODH 導入株と野生株を用いて EtBr 暴露試験を行うこととした。そこで、まず、暴露時間の検討のために同原虫株における in vitro 培養での生存時間の確認を行なった。

(3) *P. berghei* は in vitro 培養において 24 時間では正常にシゾントまで発育するが、48 時間では形態に変化が認められ、さらに、3 日間の培養では感染赤血球数が減少することが明らかとなった。これは、培養時の血清の種類、培地のグルコース濃度、採血の際の抗凝固剤の種類を変えても変わりがなかった。このため、EtBr 暴露時間を 24 時間に設定した。

(4) EtBr に対する感受性は両原虫株で大きな差異はなく、5~10 µg/mL の EtBr 濃度で原虫は致死となることがわかった。また、EtBr に暴露し増殖したすべての原虫で mtDNA が消失する現象は認められなかった。

(5) *P. falciparum* を用いた in vitro 培養においては、EtBr 濃度 10 ng/mL で増殖が抑制されることがわかり、*P. berghei* よりも感受性が高いことが示唆された。*P. berghei* を用いた EtBr 暴露試験の結果より 24 時間という短時間での EtBr 暴露では、mtDNA を消失させることが難しいことが予測されたため、今後は、本研究成果をもとに *P. falciparum* の in vitro 培養系を用いた EtBr の低濃度・長時間暴露を検討し、マラリア原虫 rho0 細胞の作成を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ajobaye O, Osuntoki AA, Balogun EO, Olukosi YA, Iwalokun BA, Oyebola KM, Hikosaka K, Watanabe YI, Ebioma GU, Kita K, Amambua-Ngwa A	4. 巻 19
2. 論文標題 Genetic polymorphisms in malaria vaccine candidate Plasmodium falciparum reticulocyte-binding protein homologue-5 among populations in Lagos, Nigeria.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Malaria Journal	6. 最初と最後の頁 6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12936-019-3096-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Shinjo N, Nakayama H, Ishimaru K, Hikosaka K, Mi-Ichi F, Norose K, Yoshida H	4. 巻 74
2. 論文標題 Hypericum erectum alcoholic extract inhibits Toxoplasma growth and Entamoeba encystation: an exploratory study on the anti-protozoan potential.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 294-305
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11418-019-01369-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ueda T, Tarui H, Kido N, Imaizumi K, Hikosaka K, Abe T, Minegishi D, Tada Y, Nakagawa M, Tanaka S, Omiya T, Morikaku K, Kawahara M, Kikuchi-Ueda T, Akuta T, Ono Y	4. 巻 111
2. 論文標題 The complete mitochondrial genome of Sarcoptes scabiei var. nyctereutis from the Japanese raccoon dog: Prediction and detection of two transfer RNAs (tRNA-A and tRNA-Y)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genomics	6. 最初と最後の頁 1183-1191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ygeno.2018.09.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Feng Xue, Norose Kazumi, Li Kexin, Hikosaka Kenji	4. 巻 141
2. 論文標題 Utility of the cytochrome c oxidase subunit I gene for the diagnosis of toxoplasmosis using PCR	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Microbiological Methods	6. 最初と最後の頁 82 ~ 86
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mimet.2017.08.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 彦坂健児、馮雪、本間一、松崎素道、元岡大佑、中村昇太、野呂瀬一美、北潔
2. 発表標題 ディープシーケンスによるマラリア原虫のアトバコン耐性に関わる変異の解析
3. 学会等名 第87回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2018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
研究協力者	新倉 保 (Niikura Mamoru)		
研究協力者	小林 富美恵 (Kobayashi Fumie)		