

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：10105

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658235

研究課題名(和文)ファンクショナルミュタジェネシスによる原虫変異体バンクの開発

研究課題名(英文)Development of the functional mutagenesis system on Plasmodium 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) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子機能変異体を用いた方法論は感染症研究において極めて有用であり、バベシア・タイレリア・コクシジウムなど獣医学上重要な原虫病研究に対しても応用が期待される。しかしながら、複雑な真核細胞体からなる原虫に対しては、ゲノムワイドな機能的変異体作製技術は存在しない。そこで研究代表者はトランスポゾンを用いた、原虫機能変異体ライブラリーの作製を試みた。その結果、マラリア原虫遺伝子機能増強型変異体ライブラリーの作製に成功した。また、このライブラリーをスクリーニングすることでベクター媒介性に関与する遺伝子座を数種類同定することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Genetic mutant is a powerful tool for the infectious disease research. Thus, the development of mutant screening system in the parasitic disease in veterinary field is desired. In this study, we tried to develop the transposon based random mutant screening system using murine malaria parasite as a model pathogen. As a result, we successfully established the gain-of function mutant parasite library system. Furthermore, with this system, we successfully could identify the genomic locus that highly concerns to vector transmission.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：マラリア ベクター

1. 研究開始当初の背景

感染症とは、病原体と宿主の相互作用の結果としてもたらされる生命現象である。その病態は宿主と病原因子の相互作用の結果として規定される。病原因子に由来する感染表現型は病態を構成する一要素であり、各種病原因子の相互作用により、多様な病態が誘導される。病原因子を規定する収束的な責任因子は遺伝子であり、ゲノム情報が明らかとなった現在、ウイルス・細菌などの病原体では、病原遺伝子に関する研究が飛躍的に加速している。これらの病原因子の研究において、重要な基盤技術となっているのが、ゲノムワイドな変異体である。感染表現型とその原因遺伝子の同定に力を発揮するのが、特定の遺伝子の機能が増強・減衰された、遺伝子機能変異体であり、ウイルスにおけるリバースジェネティクス、細菌におけるトランスポゾンミュータントなど各種の方法が用いられている。これら手法の際だった特徴は、ゲノムワイドに変異体を作成可能な点である。ある病原体が持つ全遺伝子に対しての網羅的な変異体の作製が可能のため、表現型に対して余すことなく、その責任因子の同定が可能なのである。以上のような遺伝子機能変異体を用いた方法論は感染症研究において極めて有用であり、バベシア・タイレリア・コクシジウムなど獣医学上重要な原虫病研究に対しても応用が期待される。しかしながら、複雑な真核細胞体からなる原虫に対しては、ゲノムワイドな機能的変異体作製技術は存在しない。その理由として、一部の原虫を除き遺伝子組換え技術すら確立されていないこと、また可能であったとしても単一の遺伝子機能変異体の作製に数ヶ月を要するなど、様々な技術的問題が存在することがあげられる。したがって、比較的単純な構造から成るウイルスや細菌などとは異なり、数千遺伝子から構成される長大な原虫ゲノムを網羅的にカバーするような変異体群の作製は、現時点での一般的な原虫の遺伝子改変技術では不可能であった。

2. 研究の目的

本研究は獣医学領域上重要な問題となっている原虫性疾患に着目し、申請者が独自に開発した網羅的な機能変異体原虫作製技術を基盤とした新規実験系の応用により、原虫病研究全体のボトムアップと新たな局面への展開を目的とするものである。

近年、ヒトにマラリアを惹起する熱帯熱マラリア原虫で、動く遺伝子“トランスポゾン”による遺伝子組導入法が報告された。トランスポゾンは細菌・昆虫・植物などの多様な生物種で変異体作製に利用され、基礎生物学の発展に大きく寄与した。申請者はこの方法に着目し、獣医学上重大な問題となっている血液寄生原虫のモデルとして、遺伝子改変技術が比較的確立しているマウスマ

ラリア原虫を用いてその応用を試みた。その結果、トランスポゾンにより原虫ゲノムの改変は可能ではあるが、組換え効率・変異体分離効率等の問題から、機能的変異体分離法としては実用に耐えないものであった。これらの問題を解決すべくトランスポゾンをを用いたゲノム改変法の改良研究を行うことを目的とした。また、本法の特徴として、詳細なゲノム情報が不要、実験系構築に必要な原虫種固有のコンポーネントはプロモーターのみ、の2点がある。したがって、他の原虫種に対しても、簡便に同様の実験系を樹立可能であり、優れた汎用性を持つ。さらに、トランスポゾンを利用した遺伝子導入法は従来の相同組換え法と比較し、極めて効率が良い。したがって、従来では遺伝子改変が不可能であった原虫種においても遺伝子改変技術を確立できる可能性が高く、実験手法の限界から立ち後れがちな原虫病研究全体を、大幅に進展させる可能性を有するものと考えられる。

3. 研究の方法

研究代表者の現在までの研究によって開発した、トランスポゾンコンストラクトの改良により機能減衰型・機能増強型変異体の作製を試み、これらの変異体について、サザンブロットニング、リアルタイムPCR法などの分子生物学的手法を用いることで、変異体分離法の性能評価をおこなった。1バッジに数百の変異体を含む、変異体ライブラリーの作出を試みた。また、変異体ライブラリーを用いた表現型スクリーニングを試みた。

4. 研究成果

トランスポゾンをを用いた遺伝子機能変異体原虫作出法の改良を行い、プロモータートラップ法を基盤として、機能増強型変異体群および機能減衰型変異体群作製法を試みた。その結果、機能増強型変異体の作製については当初の計画に基づいた実験系が構築できることが明らかとなった。しかしながら、機能減衰型変異体においては、マラリア原虫の多くの遺伝子プロモーター領域が双方向性に機能し得ることが申請者の実験において明らかとなり、このことが変異体分離性能を阻害したことから、機能増強型と比較するとライブラリー中の目的変異体割合は50%を切ることが明らかとなった。このことは、スクリーニングシステムの実用性を考慮すると改良の余地があり、今後のさらなる研究の進展が望まれる点であった。本法では一度の遺伝子導入実験で20種以上のランダムな変異体原虫群が得られた。計算上、50回の実験により1,000種の変異体の分離が可能であり、既存の技術では不可能であった、個人研究者レベルでのゲノムワイドな変異体の分離が実現可能となった。機能増強型変異体について計算上、1,000変異体を含む原虫ライブラリーの作製を行い、このライブ

ラリーについてベクター感染性スクリーニングを行った結果、5 種程度の遺伝子座を同定することに成功した。この結果は本研究で開発した機能増強型変異体ライブラリーが原虫病研究の進展に寄与し得ることを示すものであった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Saiki, E., Nagao, K., Aonuma, H., Fukumoto, S., Xuan, X., Bannai, M., Kanuka, H.: Multivariable analysis of host amino acids in plasma and liver during infection of malaria parasite *Plasmodium yoelii*. *Malar J* 2013, 12:19. 査読有: DOI: 10.1186/1475-2875-12-19
2. Masuda-Suganuma, H., Usui, M., Fukumoto, S., Inoue, N., Kawazu, S.: Mitochondrial peroxidase TPx-2 is not essential in the blood and insect stages of *Plasmodium berghei*. *Parasit Vectors* 2012, 5:252. 査読有: DOI: 10.1186/1756-3305-5-252
3. Bando, H., Okado, K., Guelbeogo, W. M., Badolo, A., Aonuma, H., Nelson, B., Fukumoto, S., Xuan, X., Sagnon, N., Kanuka, H.: Intra-specific diversity of *Serratia marcescens* in *Anopheles* mosquito midgut defines *Plasmodium* transmission capacity. *Sci Rep* 2013, 3:1641. 査読有: DOI: 10.1038/srep01641
4. Badolo, A., Okado, K., Guelbeogo, W. M., Aonuma, H., Bando, H., Fukumoto, S., Sagnon, N., Kanuka, H.: Development of an allele-specific, loop-mediated, isothermal amplification method (AS-LAMP) to detect the L1014F *kdr-w* mutation in *Anopheles gambiae* s. l. *Malar J* 2012, 11:227. 査読有: DOI: 10.1186/1475-2875-11-227
5. Kimura, A., Nishikawa, H., Nomura, N., Mitsuyama, J., Fukumoto, S., Inoue, N., Kawazu, S.: In vitro and in vivo antimalarial activities of T-2307, a novel arylamidine. *Antimicrob Agents Chemother* 2012, 56:2191-3. 査読有: DOI: 10.1128/AAC.05856-11
6. Doi, Y., Shinzawa, N., Fukumoto, S., Okano, H., Kanuka, H.: Calcium signal regulates temperature-dependent transformation of sporozoites in malaria parasite development. *Exp Parasitol* 2011, 128:176-80. 査読有: DOI: 10.1016/j.exppara.2011.02.011
7. Usui, M., Fukumoto, S., Inoue, N., Kawazu, S.: Improvement of the observational method for *Plasmodium*

berghei oocysts in the midgut of mosquitoes. *Parasit Vectors* 2011, 4:118. 査読有: DOI: 10.1186/1756-3305-4-118

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Saiki E, Nagao K, Fukumoto S, Bannai M, Kanuka H. Amino acid-related host nutrition dynamics during malaria infection. *Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology : Malaria*. JW Marriott New Orleans, New Orleans, Louisiana USA (平成 25 年 1 月 20 日- 25 日)
2. Hironori Bando, Kiyoshi Okado, Moussa Guelbeogo, Athanase Badolo, Hiroka Aonuma, Shinya Fukumoto, N' Fale Sagnon, and Hirotaka Kanuka Impact of intra-specific diversity of mosquito midgut bacteria on *Plasmodium* development. 第 80 回米国熱帯医学会, フィラデルフィア・ペンシルバニア (平成 23 年 12 月 4 日- 8 日)
3. Badolo A. Okado K., Aonuma H., Guelbeogo W.M., Bando H., Yoshimura A. Fukumoto S., Sagnon N' F and Kanuka H. Development of allele-specific loop-mediated isothermal amplification method (AS-LAMP) for detection of the L1104F *kdr-* mutation in *Anopheles gambiae* s.l. Gordon Research conference, Pisa, Italy July (平成 23 年 7 月 31 日- 8 月 5 日)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :