

科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金)研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号 : 32607

研究種目 : 挑戦的萌芽研究

研究期間 : 2011~2012

課題番号 : 23658254

 研究課題名(和文) いわゆる現代病の症状軽減に向けて: 機能性蛋白質を運ぶ
微胞子虫ベクターの確立

 研究課題名(英文) For decrudescence of modern diseases: Establishment of
a microsporidia vector carrying functional protein of
modern diseases

研究代表者

筏井 宏実 (IKADAI HIROMI)

北里大学・獣医学部・准教授

研究者番号 : 80327460

研究成果の概要(和文): *Encephalitozoon cuniculi* は遺伝子導入法が確立されていない。そこで本研究は、*E. cuniculi*の組換え体作製方法を確立する目的で行われ、以下の結果を得た。① *E. cuniculi* 精製虫体を効率良く回収可能となった。② 薬剤選択マーカーとしてneoR 遺伝子が候補となった。③ エレクトロポレーションによる遺伝子導入法の条件が決定した。

研究成果の概要(英文): As for *Encephalitozoon cuniculi*, the genetic manipulation method is not established. In this study, we tried to establishment of the genetic manipulation method for *E. cuniculi* and obtained the following results. (I) Establishment of purification of spores from in vitro cultured *E. cuniculi*-infected cells. (II) neoR gene became a candidate as a drug selective marker of *E. cuniculi*. (III) The condition of the genetic manipulation method by the electroporation was decided.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野: 農学

科研費の分科・細目: 畜産学・獣医学 応用獣医学

キーワード: 寄生虫、原虫、微胞子虫、遺伝子組換え

1. 研究開始当初の背景

(1) 偏性細胞内寄生真核生物である微胞子虫類は~150属1200種以上存在し、脊椎動物(ヒトを含む哺乳類、魚類等)から節足動物(ミツバチ等)まで宿主感染域は広い。また、微胞子虫類は polar tube (PT) を用いた特徴ある感染様式を持つ。

2001年に微胞子虫類である *Encephalitozoon cuniculi* の全ゲノム配列が解読され、真核生物としては最も小さいゲノムを持つ生物である事が明らかとなった(11本の染色体、22-32万塩基対)。しかし、遺伝子発現解析としての組換え体作製技術および遺伝子機能阻害技術につながる遺伝子導入法は確立されていない。

(2) いわゆる現代病として重要な四疾病、悪性腫瘍(特に脳腫瘍)、糖尿病、肥満、貧血は既にいくつかの疾患進行抑制に働く機能性蛋白質候補が存在する事から、機能性蛋白質を運ぶ微胞子虫ベクター作製およびその応用への検証を可能とする。

2. 研究の目的

本研究では、特徴的な感染様式を持つ *E. cuniculi* の組換え体作製方法を確立する事を第一の目的とした。本目的の将来目標は、機能性蛋白質を運ぶ微胞子虫ベクターの作製を行なう事により、その応用検証を目指したものである。

3. 研究の方法

(1) 原虫

E. cuniculi type I (50503 株: American Type Culture Collection : ATCC, USA)を非貪食細胞 Human lung fibroblast (HLF:WI-38 : ATCC, USA)を支持細胞として感染させることにより虫体増殖を行ない、本研究に用いた。

(2) 培養

培養液は Fetal Bovine Serum (FBS : JRH Biosciences)濃度による細胞増殖試験には Vero 細胞を、感染試験には HLF 細胞を用いた。基礎培養液には Minimum Essential Medium Eagle (Sigma) を使用し、2 % もしくは 10 % FBS になるように添加を行ない培養に用いた。

(3) 精製法

培養した *E. cuniculi* 感染細胞を 0.05 (w/v) % トリプシン-0.53 mmol EDTA (Wako) にて培養フラスコより剥がし、26G 針を数回通す事により支持細胞破損を行なった。その後、0.05 % TritonX-100 および 0.05 % Saponin-PBS を加えることで細胞片などの夾雑物を可溶化した。精製は 50 % Percoll-PBS (GE Healthcare) による密度勾配遠心を行なった。

(4) 薬剤感受性試験

以下の薬剤を用いて検討を行なった。

- ① Pyrimethamine (PYR : Sigma) : PYR 12.5 mg を 50 % ethanol-50 % acetone 2.5 ml で溶かしストックとした。さらに 1% BSA 添加 PBS 47.5 ml で溶かし、0.45 μ m フィルターをかけて 1 mM PYR を作製した。5 μ M、10 μ M および 50 μ M 濃度で感受性の比較検討を行なった。
- ② Blasticidin (BSD : Sigma) : BSD 4.589 mg を PBS で溶かし、フィルターをかけて 10 mM BSD ストックとした。12.5 μ M、25 μ M および 125 μ M 濃度で感受性の比較検討を行なった。
- ③ Geneticin (Gene : Wako) : Gene 320 mg を PBS 10 ml で溶かし、フィルターをかけて 2 mg/ml Gene ストックとした。500 μ M、2,000 μ M および 4,000 μ M 濃度で感受性の比較検討を行なった。
- ④ 24 well 用カバーグラスにアルコールを浸け、火炎滅菌処置した後、24 well プレートの穴に入れた。PYR, BSD では HLF 細胞を Gene では Gene 耐性 Vero 細胞を 24 well プレート穴に 1×10^4 細胞を播き、37 °C で over night した。細胞がシートした well の上清を捨て、各種薬剤濃度に調製された MEME 500 μ l を各濃度 6 well ずつ

入れた。その後、MOI 200 (Day 4 は 1×10^6 spore/well, Day 12 は 0.4×10^6 spore/well) となるように、精製した *E. cuniculi* を各 well に入れた。4 日おきに上清を新しいものに交換し、4 日目、8 日目および 12 日目でグラム染色を行い、顕微鏡で観察した。一視野のすべての HLF を 1000 細胞計測し、シスト形成されている HLF 数を比較した。

(5) 組換え用プラスミドベクターの構築

E. cuniculi 由来の small ribosomal RNA (GeneBank:L17072.1) を 5'-ATGAGAAGTG-ATGTGTGTGCG-3' (EZCUF) と 5'-TGCCAT-GCACTCACAGGCATC-3' (EZCUR) プライマーで、プロモーター領域を含んだ Neomycin 耐性遺伝子 (Neo 耐性遺伝子) を 5'-CAAAA-AGGATCTTACCTAGATCC-3' (Neo-5') と 5'-TGCCTCACTGATTAAGCTAA-3' (Neo-3') プライマーでそれぞれ PCR にて増幅した。その後、増幅した遺伝子をそれぞれ pCR-BluntII-TOPO (Life Technologies) に組込み small ribosomal RNA 遺伝子を含む Neo 耐性遺伝子プラスミドを作製した。

(6) 遺伝子導入法の条件検討

真菌 (DNA 量 : 10 μ g、Medium & Wash solution : 1 M Sorbitol、細胞数 : 10^7 、電圧 : 1.5 kV)、原虫である *Toxoplasma* (DNA 量 : 10 μ g、Medium & Wash solution : Cytomix、細胞数 : 10^7 、電圧 : 2.0 kV) の条件とさらに両条件を組み合わせた条件 (DNA 量 : 10 μ g、Medium & Wash solution : 1 M Sorbitol、細胞数 : 10^7 、電圧 : 2.0 kV) の 3 つでエレクトロポレーション (BioLad) による遺伝子導入条件を検討した。

遺伝子導入の確認は、導入後の虫体を Medium で 5 回遠心洗浄を行い、沈殿物を DNA 抽出後に PCR を用いて確認した。*E. cuniculi* は nested-PCR によって検出を行なった。nested-PCR 用の 1st プライマーは 5'-TGAATG(G/T)GTCCCTGT-3' (MSP-1) と 5'-TCACTCGCCGCTACT-3' (MSP-2A)、2nd プライマーは 5'-GGAATTCACACCGCCC-GTC(A/G)(C/T)TAT-3' (MSP-3) と 5'-CCAA-GCTTATGCTTAAGT(C/T)(A/C)AA(A/G)GGG T-3' (MSP-4A) によって行なった。導入プラスミドの検出は Gene 耐性遺伝子検出用 Neo-5' と Neo-3' プライマーを用いて検出を行なった。

また、エレクトロポレーション後の *E. cuniculi* を Vero 細胞がシートしている Cell Culture Slide (Toho) にまき、3 日後に観察し生死確認を行なった。生死確認はスライドを 1 % Uvitex-PBS で染色し、蛍光顕微鏡下でシスト形成細胞を観察することで評価した。

(7) PCR

EZCUF と EZCUR プライマーを用いたものは、94°C 5 min の後、94°C 1 min、55°C 30 sec、72°C 1 min で 40 cycles、72°C 7 min の条件で行なった。それ以外のプライマーは、94°C 5 min の後、94°C 1 min、55°C 1 min、72°C 1 min を 35 cycles、72°C 7 min の条件で行なった。

4. 研究成果

(1) *E. cuniculi* 至適培養条件

FBS 濃度の違いにより Vero 細胞の細胞増殖速度を検討した。75 cm 平方フラスコに 5.0×10^4 Vero 細胞を播き、37 °C で over night して細胞を接着させた。その後、0、2 および 4 日目の細胞数を算出した。その結果、2 % FBS 加 MEME 培養液では 0 日目は 6.0×10^4 、2 日目は 8.1×10^4 、4 日目は 12.8×10^4 であった。10%FBS 加 MEME 培養液では 0 日目は 9.5×10^4 、2 日目は 37.7×10^4 、4 日目は 57.8×10^4 であった。

本結果より *E. cuniculi* を支持細胞に感染させて虫体を増殖培養および精製する場合、培養液、支持細胞、*E. cuniculi* 増殖培養期間および精製時における夾雑物等を考慮し、2 % FBS 加 MEME 培養液が至適培養条件であると考えられ、以下の実験に供する事とした。

(2) Percoll 密度勾配遠心精製方法の検討

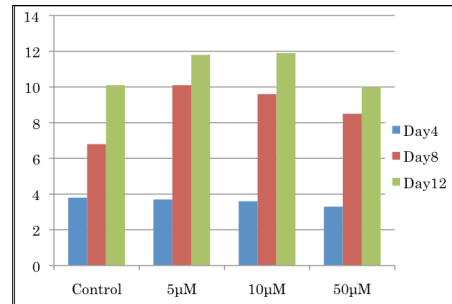
従来の精製方法の培養細胞をトリプシン-EDTA で剥がし、23G 針を数回通して支持細胞を破損させた後、Percoll 密度勾配遠心法にて *E. cuniculi* 精製を行なったものでは、精製後の細胞夾雑物が多く *E. cuniculi* 数の計測に多くの時間と労力を必要とした。そこで、23G 針を数回通して細胞を破損させる時の溶液に 0.05 % Saponin-0.05 % TritonX-100 を加える事で *E. cuniculi* 以外の細胞夾雑物の除去に関する検討を行った。

75 cm 平方フラスコに 5×10^4 Vero 細胞を播き、37 °C で over night して細胞を接着させた。その後、 1.2×10^3 *E. cuniculi* を感染させて 4 週間後に 0.05 % Saponin-0.05 % TritonX-100 の有無の精製法で *E. cuniculi* 数を比較した。0.05 % Saponin-0.05 % TritonX-100 の無しでは 9.0×10^6 、0.05 % Saponin-0.05 % TritonX-100 の有では 7.9×10^6 であった。この結果から、*E. cuniculi* 数は 0.05 % Saponin-0.05 % TritonX-100 の有無に影響されない事が確認された。加えて、Percoll 密度勾配遠心精製方法の分離度も高く、細胞夾雑物についても明らかに 0.05 % Saponin-0.05 % TritonX-100 処理した方が少ない結果となった。本方法は、*E. cuniculi* 数の計測に多くの時間と労力を必要としない事が確認された事から、精製法の有用な方法である。

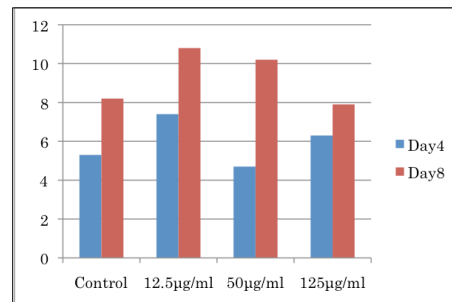
(3) 薬剤マーカーの選択

Plasmodium、*Toxoplasma*、*Eimeria*、*Sarcocystis* など原虫の遺伝子組換え時に使用する選択薬剤 PYR、BSD および Gene を用いて *E. cuniculi* に対する薬剤感受性試験を行なった。

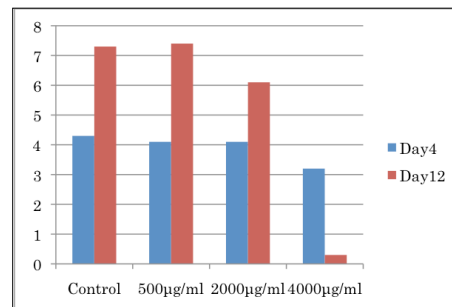
①PYR : 4 日目、8 日目および 12 日目を比較した所、5 μ M、10 μ M および 50 μ M のどの濃度においても 100 支持細胞中の *E. cuniculi* シスト形成数は増加していた。この結果より、*E. cuniculi* は PYR に対し薬剤感受性を持たない事が確認された。



②BSD : 4 日目と 8 日目を比較した所、12.5 μ M、50 μ M および 125 μ M のどの濃度においても 100 支持細胞中の *E. cuniculi* シスト形成数は増加していた。この結果より、*E. cuniculi* は BSD に対し薬剤感受性を持たない事が確認された。



③Gene: 4 日目と 12 日目を比較した所、500 μ g/ml、2,000 μ g/ml および 4,000 μ g/ml の濃度依存的に 100 支持細胞中の *E. cuniculi* シスト形成数は減少していた。4,000 μ g/ml においては 12 日目で明らかにシスト形成を抑制していた。この結果より、*E. cuniculi* は Gene に対し薬剤感受性を持つ事が確認された。



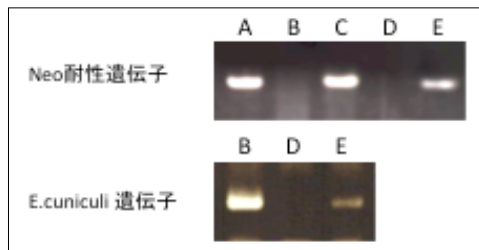
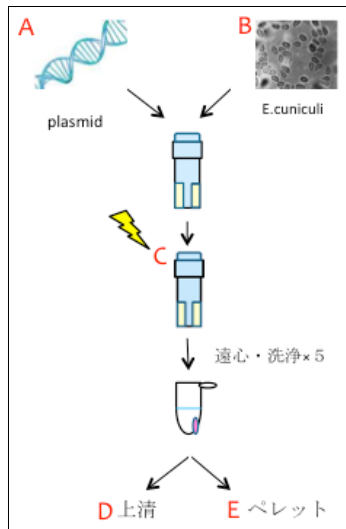
以上の結果から、組換え用プラスミドベクターの構築は、薬剤選択マーカー遺伝子として Neo 耐性遺伝子 (neoR 遺伝子) を使用し、遺伝子導入後の薬剤選択は Gene 4,000 µg/ml で行なう事とした。

(4) 遺伝子導入法の条件検討

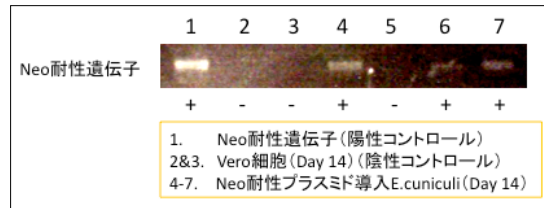
作製した組換え用プラスミドを用い、真菌 (DNA 量: 10 µg、Medium & Wash solution: 1M Sorbitol、細胞数: 10⁷、電圧: 1.5 kV)、原虫である *Toxoplasma* (DNA 量: 10 µg、Medium & Wash solution: Cytomix、細胞数: 10⁷、電圧: 2.0 kV) の条件とさらに両条件を組み合わせた条件 (DNA 量: 10 µg、Medium & Wash solution: 1M Sorbitol、細胞数: 10⁷、電圧: 2.0 kV) の3つでエレクトロポレーションによる遺伝子導入条件を検討した。

① 3種類の条件にてエレクトロポレーションを行い、その後の *E. cuniculi* の生存率をシスト形成数で比較した所、真菌の条件で行なったものが *Toxoplasma* および組み合わせた条件より3倍以上の生存率を示した。

② 真菌の条件でエレクトロポレーションを行い、組換え用プラスミドが *E. cuniculi* 虫体内に導入されているのか PCR 法にて確認を行なった (下記図)。その結果、組換え用プラスミドが *E. cuniculi* 虫体内に導入されている事が確認された。



③エレクトロポレーション後に14日間 Gene 加培養液で培養を行い、PCRにて *E. cuniculi* 遺伝子検出による生存確認および作製した Neo 耐性遺伝子組換え用プラスミドの導入確認を行なった。Neo 耐性遺伝子を導入されていない *E. cuniculi* は *E. cuniculi* 遺伝子が検出されなかったため、Gene により死滅したものと考えられた。Neo 耐性遺伝子組換え用プラスミドをエレクトロポレーションにより導入された *E. cuniculi* は *E. cuniculi* 遺伝子が検出され、かつ、Neo 耐性遺伝子も検出された。



(5) 今後の展望

今回の研究成果により組換え用プラスミドが *E. cuniculi* 虫体内に導入されている事が確認された。今後は、導入された遺伝子がゲノムに組み込まれ、組換え蛋白質として発現する事を確認する必要がある。その後、機能性蛋白質を運ぶ微胞子虫ベクターの作製を試み、モデル動物での応用検証行なう事により、各種疾病に対して独創的かつ斬新な予防法や治療法の確立を目指す事が可能となると考えられる。また、微胞子虫における遺伝子の機能解析および感染成立に関する分子レベルでの解明も可能となる。

今後本研究は、類似研究が少ない事からきわめて先駆的かつ独創的な結果が得られる可能性を秘めている。

5. 主な発表論文等

[その他]
ホームページ

<http://www2.vmas.kitasato-u.ac.jp/parasitology/>

6. 研究組織

(1) 篠井 宏実 (IKADAI HIROMI)
北里大学・獣医学部・准教授
研究者番号: 80327460