

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：10105

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660223

研究課題名(和文)プロモータートラップ法によるベクター媒介性病原体伝播制御因子の網羅的同定

研究課題名(英文) Identification of the genes regulating vectorial capacity using promotor-trapping mutagenesis system

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は獣医学領域で重要な問題となっているベクター媒介性原虫疾患に着目し、申請者が開発した、ゲノムワイドな機能的変異体原虫作製技術を応用した新規実験系により、病原体のベクターに対する感染性を規定する因子を網羅的に同定し、原虫のベクター感染メカニズムを包括的に解明することを目的とするものである。変異体原虫スクリーニングにより、ベクターに高い感染性を有する原虫群の分離に成功した。責任遺伝子座の解析を行い、その欠損の結果、宿主間移動ステージにおいて恒常性を失う遺伝子座の同定に成功した。また、効率的な解析のため、新規遺伝子欠損原虫の作成法の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：This study aims to identify the parasite gene concerns to infectivity to insect vector using genome wide promoter trap mutagenesis system in malaria parasite, and investigate novel infection mechanism of the parasite to vector. As a result of mutant screening, we successfully identified the gene concern to transmission between mammalian host and insect vector. Furthermore, we successfully developed the novel mutant parasite constructing method to analyze the gene function.

研究分野：節足動物感染免疫学

キーワード：ベクター マラリア

### 1. 研究開始当初の背景

ポストゲノム時代において、変異体を利用した実験手法はウイルス・細菌などの感染症研究では一般的なものとなり、研究の推進に必須の技術となっている。原虫病研究においても同様の実験系の開発が求められているが、網羅的な変異体原虫を用いた実験系は“夢”と言えるのが現状である。この原虫研究者にとっての“夢”を現実にすべく、申請者は現在までの研究において遺伝子機能増強変異体原虫ライブラリーを開発した。本申請は、この実験系の応用により、ベクター媒介関与因子の網羅的同定を行い、ベクターによる病原体伝播メカニズムの詳細を明らかにしようとするものである。

標準的な原虫遺伝子のターゲティングは相同組換え法による。標的遺伝子座に対して薬剤耐性マーカーを導入し遺伝子を破壊、薬剤選択により目的変異体を分離する。したがって、一変異体作製に目的遺伝子座の塩基配列情報の入手、ターゲティングベクターの構築、遺伝子導入・組換え体の分離実験が必要となる。これら一連の作業を原虫の持つ数千の遺伝子に対し行うことは、個人研究レベルでは作業量上、不可能である。また、獣医学上重要となる病原性原虫に対するゲノム解析は立ち遅れており、塩基配列情報の入手が困難であるとの問題も伴う。

以上の問題を解決するため申請者は、トランスポゾンを利用した遺伝子改変手法に着目した。トランスポゾンは細菌・昆虫・植物など、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貢献した。近年、初めて原虫に対する機能的トランスポゾンが発見された (Balu et al. *PNAS*)。そこで申請者は、マウスマラリア原虫をモデルとしたトランスポゾンによる変異体作製を試みた。Balu らの方法では、トランスポゾンの挿入はゲノム上にランダムに起き、遺伝子発現制御部位に挿入される可能性は低く、機能的な変異体の分離には不向きであった。そこで申請者は挿入エレメントの改良により、プロモーター支配下にエレメントが挿入された原虫、すなわち何らかの遺伝子の機能が変異した原虫群のみを分離する手法の開発に成功した。

本法では一度の遺伝子導入実験で 20 種以上の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。申請者はこれを改良し、恒常的高活性型プロモーターで挿入エレメント下流を制御することで、遺伝子機能増強型変異体を作製・分離する手法の開発を行った。また、さらなる改良により、何らかの遺伝子機能が増強した場合、GFP レポーターを発現する変異

体ライブラリーの作製を行った。

本研究は、病原体媒介ベクターと、この変異体スクリーニングシステムの融合により、網羅的にベクター感染因子を同定しようとするものである。

### 2. 研究の目的

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または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。これらの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、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。

上記のような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。このような背景から、申請者は現在までの研究において、網羅的な遺伝子機能減衰・増強変異体原虫作製に関する研究を実施した。本申請ではこの技術を基盤として、ベクター媒介性病原体の伝播メカニズムを包括的に解析しようとするものである。

本研究ではベクター媒介性感染症の征圧に向け、病原体のベクター媒介に関与する因子を、ゲノムワイドな遺伝子機能増強変異体原虫ライブラリーを用いて、網羅的に同定することを目的とする。得られた結果を基盤として、獣医学上・医学上重要なベクター媒介性病原体伝播の分子基盤を包括的に明らかにし、原虫病研究全体の発展に資することを目標とするものである。

### 3. 研究の方法

本研究は、申請者が開発した、GFP レポーター発現型遺伝子機能増強変異体原虫ライブラリーを用いることで、病原体のベクター感染因子を網羅的に同定し、謎の多く残されている原虫のベクター媒介メカニズムの一端を紐解き、新たなる感染症制御手法の提唱を目指すものである。

現在までの研究において開発した機能増強変異体ライブラリーを用いたスクリーニングにより、ベクター感染性に寄与する候補遺伝子群の絞り込みを行った。ベクターを用いた頻回吸血実験により、高感染性を示す変異体原虫群のスクリーニングを実施した。この変異体群にたいし、変異責任遺伝子座の同定を行った。サザンプロット法、インバース PCR 法による解析により、ベクター感染性関連候補遺伝子座群を同定した。これらの何らかの遺伝子機能が増強している変異体群について、クローニングを

行いベクターへの感染表現型の解析を行った。

#### 4. 研究成果

各変異体クローンはベクターに対する優れた感染性を示したものの、その機序については機能増強型変異体のみ解析では困難な点が多いことが明らかとなった。そこで、順次候補遺伝子座を欠損した原虫を作成することを予定した。一部の遺伝子座について KO 原虫を作成し、表現型解析の結果、宿主間移動ステージにおいて正常な機能を失っていることが確認された。さらに候補遺伝子座の KO 原虫作成を計画したが、現状の遺伝子組換え技術では多種の KO 原虫の同時作成は物理的・時間的に多大なコストを要するため、簡便に KO 原虫作成可能な方法の新規開発に着手した。その結果、ピューロマイシン耐性遺伝子を用いた効率的に目的 KO クローンを樹立可能な方法の開発に成功した。

これは、クローニング法に弱点を持つ本感染モデルにおいて、革新的なメリットを持つ結果であった。従来では最低数十匹、時には 100 匹ものマウスをクローニングに必要としたが、わずか 1 ケージ・5 匹のマウスで同等の成果を得ることが可能となった。すなわち、KO 原虫作製に数十万円の費用を要していたが、これが約 1 万円(5%)程度へと驚くべきコストダウンがなされ、物理的問題の解消から多種 KO 作製実験の並行実施が可能になり、さらには使用動物数の劇的削減がなされ昨今の動物実験倫理観に即した研究が実施可能になった。更なる研究遂行上のメリットとして、真核細胞毒性型の新規薬剤選択マーカーへの使用の可能性を広げるものであり、これは多重遺伝子 KO 原虫の作製を容易かつ現実的にする画期的な研究成果であり、このベクター感染モデルの利便性・優位性をさらに高めるものであった。

今後さらなる解析を続けることで、謎が多く残されているベクターステージにおける生命現象について、その本態を明らかにされていくことが期待される。

#### 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5件)

1. Bando, H., Okado, K., Guelbeogo, W. M., Badolo, A., Aonuma, H., Nelson, B., Fukumoto, S., Xuan, X., Sagnon, N. F., and Kanuka, H. (2013) Intra-specific diversity of *Serratia marcescens* in *Anopheles mosquito* midgut defines *Plasmodium* transmission capacity. *Scientific Reports* 3, DOI: 10.1038/srep01641 (査読有)

2. Nelson, B., Freisinger, T., Ishii, K., Okado, K., Shinzawa, N., Fukumoto, S., and Kanuka, H. (2013) Activation of Imd pathway in hemocyte confers infection resistance through humoral response in *Drosophila*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 430, 1120-1125, DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.12.027 (査読有)
3. Saiki, E., Nagao, K., Aonuma, H., Fukumoto, S., Xuan, X., Bannai, M., and Kanuka, H. (2013) Multivariable analysis of host amino acids in plasma and liver during infection of malaria parasite *Plasmodium yoelii*. *Malaria Journal* 12, DOI: 10.1186/1475-2875-12-19 (査読有)
4. Usui, M., Masuda-Suganuma, H., Fukumoto, S., Angeles, J. M. M., Inoue, N., and Kawazu, S.-i. (2013) Expression profiles of peroxiredoxins in liver stage of the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Parasitology International* 62, 337-340, DOI: 10.1016/j.parint.2012.11.007 (査読有)
5. Mizutani, M., Iyori, M., Blagborough, A. M., Fukumoto, S., Funatsu, T., Sinden, R. E., and Yoshida, S. (2014) Baculovirus-Vectored Multistage *Plasmodium vivax* Vaccine Induces Both Protective and Transmission-Blocking Immunities against Transgenic Rodent Malaria Parasites. *Infection and Immunity* 82, 4348-4357, DOI: 10.1128/IAI.02040-14 (査読有)

[学会発表](計6件)

齊木 選射, 青沼 宏佳, 長尾 健児, 福本 晋也, 坂内 慎, 嘉糠 洋陸, マラリアをモデルとした重症化と宿主血中アミノ酸ダイナミクスの相関解析, 第 36 回日本分子生物学会, 平成 25 年 12 月 3 日-6 日, 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

水谷征法, 舟津知宏, 伊従光洋, AM. Blagborough, 福本晋也, RE.Sinden, 吉田 栄人, 非感染性ウイルスベクターを用いたマルチステージ三日熱マラリアワクチンの開発研究, 第 83 回日本寄生虫学会, 平成 26 年 3 月 27 日-28 日, 愛媛大学城北キャンパス(愛媛県・松山市)

曾賀晃, 瀧瀬摩美, 福本晋也, Puromycin-N-acetyltransferase マーカーを用いたマウスマラリア原虫多重変異体作製

法の開発、第 22 回分子寄生虫学ワークショップ/第 12 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会、平成 26 年 8 月 31 日- 9 月 3 日、帯広畜産大学 (北海道・帯広市)

曾賀晃、瀧瀬摩美、福本晋也、ピューロマイシン耐性遺伝子を用いたマウスマラリア原虫新規変異体作製法の検討、第 157 回日本獣医学会学術集会、平成 26 年 9 月 9 日- 12 日、北海道大学 (北海道・札幌市)

薄井美帆、増田-菅沼裕乃、中村昇太、山岸潤也、福本晋也、井上昇、堀井俊宏、河津信一郎、1-Cys 型ペルオキシレドキシリン遺伝子欠損 *Plasmodium berghei* の赤内型 RNA-seq 解析、第 84 回日本寄生虫学会、平成 26 年 3 月 21 日-22 日、杏林大学三鷹キャンパス (東京都・三鷹市)

アタナセ バドロ、瀧瀬摩美、福本晋也、LAMP 法による G119S Ace1R 変異検出法の開発と西アフリカ-ブルキナファソ採集ガンビアハマダラカでの検証、第 67 回日本衛生動物学会、平成 26 年 3 月 27 日-29 日、金沢大学宝町キャンパス (石川県・金沢市)

〔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：  
出願年月日：  
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：