

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670203

研究課題名(和文) 超加速変異型サルマラリア原虫を用いたヒト赤血球への適応進化の解析

研究課題名(英文) Mechanism of the tropism switching of monkey malaria to human using Plasmodium knowlesi mutator line

研究代表者

金子 修 (KANEKO, Osamu)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：50325370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：サルマラリア原虫 *Plasmodium knowlesi* (Pk) はヒトに感染するが、地域で感染性や病原性が異なる。本研究ではその分子基盤を明らかにするため、ヒト赤血球では長期培養できないがサル赤血球では長期培養できる Pk 株の進化速度を人為的に加速することでヒト赤血球で効率よく発育できる原虫株を確立し、全ゲノム解析により責任遺伝子を同定する事を試みることを目的とした。まず、ニホンサルで維持され、培養系に適応したことがない 2 株の Pk の培養株化の樹立を試み、成功した。適応進化を加速する遺伝子導入プラスミドを作製した。また、Pk への遺伝子導入の条件検討を行い、研究室で遺伝子導入を行う体制を整えた。

研究成果の概要(英文)：The infectivity to and pathogenicity of *Plasmodium knowlesi*, a causative agent of monkey malaria, in human is varied depending on the endemic areas, but the molecular basis to determine this difference is not clearly understood. Because *in vitro* culture-adapted *P. knowlesi* does not grow efficiently with human erythrocytes, I hypothesized that this growth phenotype may explain the observation in the endemic areas. To identify *P. knowlesi* factor(s) that enable parasites to grow with human erythrocytes, I initiated to make mutator parasite lines in which mutation rate is artificially increased by genetic manipulation. During the supported period, I established two culture-adapted *P. knowlesi* lines that were able to be maintained for long time with rhesus monkey erythrocytes, constructed plasmids to generate mutator lines, and developed transfection system to *P. knowlesi* in the laboratory. Thus, the infrastructure to generate *P. knowlesi* mutator lines were established.

研究分野：医歯薬学

キーワード：原虫 マラリア 人獣共通感染症 遺伝子導入 進化

1. 研究開始当初の背景

2004年より、普段はサルに感染しているサルマラリア原虫 *Plasmodium knowlesi* がヒトに感染する例がマレーシアのボルネオ島を初めとして見られるようになった。その後、東南アジア一帯から本原虫によるヒト感染の報告があり、ベトナムにおいても住民の1/4に *P. knowlesi* の感染が見られる地区が見出されている [Marchand et al, 2011]。興味深いことに、*P. knowlesi* のヒト赤血球への寄生率はベトナムにおいては顕微鏡で検出できない程度の低いもので症状も明らかでない一方、ボルネオ島では寄生率が10%を越え、死亡する例も出ており、ヒトへの感染性や重症化には地域性があった。そのため、本マラリア原虫のヒト感染性・重症化の分子基盤を明らかにすることは重要な研究課題となっている。*P. knowlesi* にはサルの赤血球を用いた培養株が存在するが、ヒト赤血球での培養は困難で、培養を続けると徐々に感染率が減少し、数週間程度で原虫は消失してしまう。これはベトナムにおける *P. knowlesi* の感染状況とよく合致する。一方、最近、サル赤血球で培養されてきた *P. knowlesi* の培地に徐々にヒト赤血球を加えることで、2年間かけてヒト赤血球で培養ができる *P. knowlesi* 株が作製できたという発表がされた [Lim et al, 2013; Moon et al, 2013]。つまり、時間をかければ *P. knowlesi* はヒト体内でも効率よく発育できる事が出来るようになる可能性を持ち、ボルネオ島の *P. knowlesi* は、ヒトへの暴露期間が長く、ヒトでもよく発育できるように適応した可能性がある。

一方、最近、ネズミマラリア原虫においてDNAポリメラーゼ δ の校正機能を欠失させることで、突然変異率を100倍程度増加させることが発表された [Honma et al, 2014]。申請者らは、この方法を用いることで、*P. knowlesi* がヒト赤血球へ侵入できるようになる適応進化の過程を、培養系で迅速に再現することができると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、ヒトの赤血球では長期培養ができないが、サルの赤血球では長期培養できる *P. knowlesi* 株に突然変異率を増加させる変異型DNAポリメラーゼ δ を遺伝子導入し、適応進化を加速することでヒト赤血球で効率よく発育できる原虫株を確立し、全ゲノム解析により宿主特異性を規定している因子を同定する事を目的とした。

3. 研究の方法

サル赤血球を用いた *P. knowlesi* の *in vitro* 培養系の確立

P. knowlesi H株については、オランダ霊長

類医学研究センターの Kocken 博士からサル赤血球を用いた *in vitro* 培養系に適応した株と分担研究者の川合が国内でニホンザル体内で維持している株、ハーバード TH チャン公衆衛生大学院の Duraisingh 博士からヒト赤血球を用いた *in vitro* 培養系に適応した株を入手して用いた。*P. knowlesi* Hackeri 株は川合によりニホンザル体内で維持されてきたものを用いた。ニホンザルとアカゲザルの赤血球は川合および研究協力者の片貝より供与された。*P. knowlesi* の *in vitro* 培養条件は Lim et al (2013) や Moon et al (2013) の方法を参考にし、培地や成分の質や量、振とうの有無、培地交換の頻度等を検討した。

変異型 *P. knowlesi* DNA ポリメラーゼ δ を強発現する遺伝子導入プラスミドの作製

遺伝子導入用の各種プラスミドをライフテクノロジー社の MultiSite Gateway システムを用いて構築した。

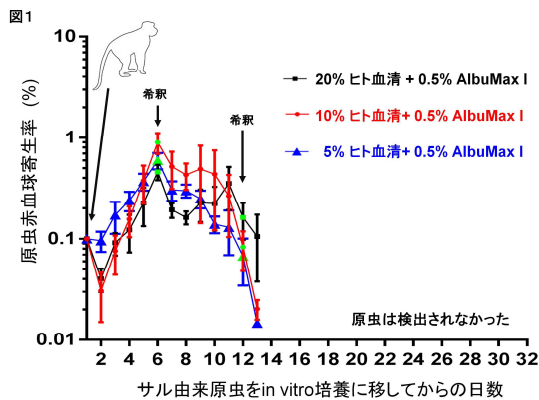
サル赤血球で *in vitro* 培養されている *P. knowlesi* への遺伝子導入

熱帯熱マラリア原虫への遺伝子導入に用いる赤血球へのプラスミド事前導入法 [Deutsch et al, 2001] とネズミマラリア原虫への遺伝子導入で用いられている Amara nucleofector による方法 [Janse et al, 2006] を試みた。遺伝子導入後、選択薬剤 WR99210 の添加下で培養することで、薬剤耐性原虫の選択を行った。導入した緑色蛍光タンパク質の発現により遺伝子導入の成否を検討した。

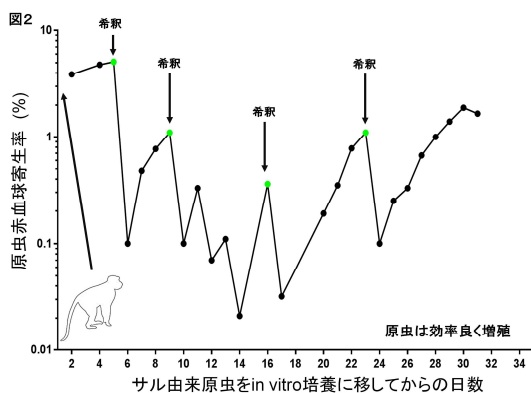
4. 研究成果

サル赤血球を用いた *P. knowlesi* の *in vitro* 培養系の確立

平成25年度にオランダ霊長類医学研究センターからサル赤血球での *in vitro* 培養系に適応した *P. knowlesi* 株の凍結保存バイアルを入手し、アカゲザルもしくはニホンザル赤血球を用いた培養を開始したが、凍結保存された原虫から培養系が立ちあがらなかった。そのため、国内でニホンザルで維持している *P. knowlesi* 株を入手し、アカゲザルとニホンザルの赤血球を用いて培養を行ったところ、1カ月はルーチンに培養できるようになったが、1カ月を超えると原虫が増殖しなくなる傾向があり、培養条件の再検討を行った。サルマラリア原虫に加えて、熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫の培養で論文報告されている種々の条件を検討したが、最長で2カ月しか培養ができなかった (図1では2週間原虫が培養から消失した例を示す)。



そのため、平成26年度に背景の項目で述べたヒト赤血球で増殖する*P. knowlesi*株の作製に成功したDuraisingh博士からヒト赤血球での培養に適応した*P. knowlesi*株を入手し[Lim et al, 2013]、彼らの研究室での最新の培養条件を参考にして培養を行うことで、サル赤血球を用いて安定的な長期培養を行うことができたようになった。確立した条件を用いて、国内でニホンサルで維持していた*P. knowlesi* (H株)に加えて、培養株が報告されていないHackeri株についてもサルで維持されていた原虫からin vitro培養株を樹立することに成功した(図2にHackeri株のin vitro培養での増殖を示す)。



変異型*P. knowlesi* DNA ポリメラーゼ δ を強発現する遺伝子導入プラスミドの作製

P. knowlesi (H株)のゲノムDNAからDNAポリメラーゼ δ のプロモーター領域と読み枠をそれぞれPCR増幅し、上流部位(pENTR41)と中間部位(pENTR13)のEntryプラスミドを構築した。作製した野生型のDNAポリメラーゼ δ を含むpENTR13プラスミドについて、読み枠のうち校正機能を担うアミノ酸を置換し、校正機能が低下している変異型DNAポリメラーゼ δ を発現するプラスミドを作製した。薬剤選択WR99210への耐性を付与する薬剤選択マーカーを含んだマラリア原虫発現用のプラスミドと組み合わせて、原虫に遺伝子導入するプラスミドを得た。

サル赤血球でin vitro培養されている*P. knowlesi*への遺伝子導入

サル赤血球へのプラスミド事前導入法とAmaya nucleofectorによるPk寄生赤血球への直接遺伝子導入法を試みた結果、プラスミド事前導入法では薬剤耐性原虫が得られなかったが、直接遺伝子導入法では薬剤耐性原虫が得られた。得られた薬剤耐性原虫においてレポーターとして導入した緑色蛍光タンパク質が発現していることも確認できたため、研究室にて*P. knowlesi*への遺伝子導入法を確立することができた。

培養条件の確立に予定以上の時間がかかったため、本研究の期間内に超加速変異型原虫の作製とその解析まで行うことができなかったが、プラスミドの準備および遺伝子導入法の確立等、その基盤を整えることができた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) Lucky AB, Takeda M, Yahata K, Katakai Y, Kawai S, Kaneko O. In vitro protracted cultivation of *Plasmodium knowlesi* for blood stage parasitology. 第84回日本寄生虫学会大会 2015年3月21日~3月22日 杏林大学三鷹キャンパス、三鷹市

(2) Lucky AB. Current status of *Plasmodium knowlesi* culture in our laboratory. The fourth International Symposium on Human and Monkey Malaria in Vietnam. 2013年11月26日~11月27日 長崎大学坂本キャンパス、長崎市

6. 研究組織

(1)研究代表者

金子 修 (KANeko, Osamu)
長崎大学・熱帯医学研究所・教授
研究者番号: 50325370

(2)研究分担者

川合 寛 (KAWAI, Satoru)
獨協医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 70275733

(3)研究協力者

片貝裕子 (KATAKAI, Yuko)
(社)予防衛生協会・研究支援企画部感染実験支援室・室長

矢幡 一英 (YAHATA, Kazuhide)
長崎大学・熱帯医学研究所・助教

LUCKY, Amuza Byarhanga
長崎大学・医歯薬学総合研究科・博士課程
大学院生

竹田 美香 (TAKEDA, Mika)
長崎大学・熱帯医学研究所・特任研究員

KOCKEN, Clemens
オランダ霊長類医学研究センター・主任研究員

DURASINGH Manoj
ハーバード TH チャン公衆衛生大学院・教授