

平成 2 8 年 1 0 月 1 2 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670198

研究課題名（和文）レトロウイルスを用いた遺伝子改変日本住血吸虫作製の試み

研究課題名（英文）Trial testing for generating gene-modified *Schistosoma japonicum* by the use of retroviruses

研究代表者

太田 伸生（Ohta, Nobuo）

東京医科歯科大学・医歯（薬）学総合研究科・教授

研究者番号：10143611

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000 円

研究成果の概要（和文）：住血吸虫は生活史に中間宿主を要求するため、一般的な遺伝子改変個体作製技術を応用することが困難である。その解決のために住血吸虫に感染するレンチウイルスを用いてゲノムに遺伝子を導入する方法を検討した。その結果、GFP遺伝子はゲノムに導入されたことは確認できたが、mRNAからタンパク質の発現において阻害がかかる可能性が考えられた。しかし、mRNAへの転写は起こっているので、遺伝子導入効果よりも転写阻害を起こして遺伝子ノックダウンの方法としての応用性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：Since schistosome parasites use intermediate snail hosts for their life cycle, gene manipulation techniques is not easy to use for schistosome parasites. To overcome the difficulty, an approach using Lentivirus was considered. In our trial, it was tested to insert GFP gene into the parasite genome together with Lentivirus. After then, it was possible to detect mRNA of GFP gene, and it was also confirmed that GFP gene was inserted into schistosome genome. There was no frame-shift of the inserted gene. However, we could not detect expression of GFP in the parasite, suggesting the presence of inhibition mechanism for protein expression from mRNA. Although protein expression was not available in our new system, it might have been possible to construct gene-knockdown system by inducing mRNA with inhibitory functions.

研究分野：寄生虫学、熱帯医学

キーワード：日本住血吸虫 遺伝子改変 レンチウイルス GFPタンパク質

1. 研究開始当初の背景

住血吸虫は生活史に中間宿主を要求し、その中間宿主の中で幼性生殖を行って個体数を増やすため、通常行われるような受精卵に遺伝子を導入して遺伝子導入個体を選別することによる遺伝子改変個体をその発生段階から選別する方法をとることが殆ど不可能である。住血吸虫の寄生適応メカニズムの解析には遺伝子改変住血吸虫を用いて研究することが重要であるが、技術的な困難が大きな障害であった。遺伝子改変住血吸虫を製作することはインパクトが大きいことであり、住血吸虫研究の今後のためにも高い応用性が期待される。その結果として、住血吸虫症のワクチン開発や新規薬剤開発などに関するブレイクスルーが期待されると考えられた。

2. 研究の目的

住血吸虫ゲノムに外来遺伝子を導入して発現させる系として、レンチウイルスを用いた方法の開発を目指した。当面の目的は住血吸虫ゲノムに何らかのマーカー遺伝子を導入して発現させる方法を確立して、新しい遺伝子改変住血吸虫作製方法の標準化を目指した。

これまでマンソン住血吸虫において、応用可能な遺伝子導入ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクターシステムとして Pseudotyped murine leukemia virus を利用する方法が検討されていた。しかし、レトロウイルスベクターでは、非分裂細胞での発現が見られない問題があることから、安定した発現系を目指す上でレンチウイルスベクターによる遺伝子導入についての検討を行うこととした。今回、日本住血吸虫にて、レンチウイルスベクターによる遺伝子導入という初めての試みを行ない、安定的な発現株作製を試みた。

3. 研究の方法

(1) 日本住血吸虫特異的プロモーターの検討

日本住血吸虫ゲノムでの安定した発現を可能にするために、日本住血吸虫特異的なプロモーター配列の検討を行った。すべての发育ステージで発現されて、かつ発現量が高いことを選択の条件とした。これまでの報告により、発現ステージによらず安定した遺伝子発現の見られる2つの遺伝子をピックアップした。今回の研究では Actin-2 と EF-1 についての検討を行った。

(2) レンチウイルスベクター作製

レンチウイルスベクターとして Clontec 社の pLVSiN ベクターに蛍光タンパク質遺伝子 *gfp* が組み込んであるものを採用した。この GFP 遺伝子上流に、それぞれの選択した遺伝子上流 1500bp の領域を組換えにより挿入し、大腸菌にてクローニングを行った。

(3) 日本住血吸虫プロモーター領域を含んだ

レンチウイルスの作製

作製したベクターは、パッケージング細胞である 293T 細胞にトランスフェクションし、目的とするレンチウイルスを作製した。ウイルス力価はリアルタイム PCR にて測定を行った。

(4) レンチウイルスベクターによる遺伝子導入

研究室で維持している日本住血吸虫山梨株を用いた。发育ステージとしてシストソミューラ期を選択することにして、感染ミヤイリガイから遊出するセルカリアを集めて、その尾部を人工的に離断した "mechanical schistosomula" を作製した。

ウイルスベクター内のプロモーターが機能しているかを確認するために、ベクター単独での発現チェックを行った。導入にはエレクトロポレーションを用いて、幼虫への遺伝子導入を行った。次に、作製したレンチウイルスを培養上澄に添加することで、幼虫へのウイルス感染を行った。感染には 1.0×10^8 copy/ml の条件下で行った。感染させた幼虫は培養下で1週間後に RNA と DNA を抽出した。同時に共焦点レーザー顕微鏡で発光を観察した。さらに、感染させた幼虫をマウス体内に移入することで、住血吸虫の感染を行った。感染後、7週後に成虫と虫卵の回収を行ない、同様の解析を行った。

また、虫卵への遺伝子導入を確認するために、同様の操作を虫卵にて行った。具体的には、レンチウイルスを虫卵の培養液に添加し、4日後に回収した。虫卵から中の幼虫を孵化させて、培養液中でスポロシストへと転換した。9日後に RNA を回収して *gfp* 遺伝子の発現解析を行った。

(5) アンカーPCR によるゲノムへの遺伝子導入確認

遺伝子導入がゲノム中に行われているかの確認法としてアンカーPCR法を採用した。この方法は、導入された遺伝子内に1つのプライマーを作製し、もう一つのプライマーを住血吸虫特異的なレトロトランスポゾンの配列内にプライマーを作製するものであり、その二つのプライマーで PCR が起こるかを確認する方法である。用いたレトロトランスポゾン配列は SjR2 でありゲノム中に最も多く存在する配列の一つである。この PCR を2段階 PCR で行うことで、遺伝子導入のチェックを行う。

(6) *gfp* 遺伝子の発現確認

導入された *gfp* 遺伝子の発現解析はリアルタイム PCR 法にて行った。また、GFP タンパク質の発現は共焦点レーザー顕微鏡にて行った。

4. 研究成果

(1) GFP 発現レンチウイルスベクターの構築と導入

GFP タンパク質を発現することを目指したレンチウイルスベクターを作製し、クローニ

ングした。そのベクター pLVSIN-EF1 α -AcGFP1-N1 のマッピングを図 1 に示した。

Vector map for pLVSIN-EF1 α -AcGFP1-N1:

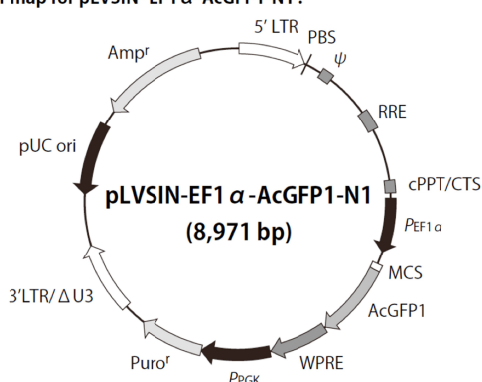


図 1 GFP 発現レンチウイルスベクター

このベクターの gfp 遺伝子の上流に日本住血吸虫特異的プロモーターを挿入した。日本住血吸虫のゲノムデータベースを参考にして、Elongation factor 1(EF)- および Actin2 を、日本住血吸虫の全発育ステージに亘って高い発現量であることが確認できたので、そのプロモーターに挿入して GFP タンパク質が発現できることを期待した。それぞれの配列の上流 1500bp を求めてプロモーター領域とした。それぞれは以下の配列となっている。

Actin2:

5':GAATGTGATTAGTAGTTTTTCGAC ~
TATAGTTAAGAAACGATC:3'(1,460 bp)

EF1- α :

5':TTAATCTTCGAGGCTTCTA ~
GAACCGTTGGTTGTGACA:3' (1495 bp)

この配列を挿入したベクターを用いて、最初にシストソミラへの遺伝子導入を行った。その結果、gfp 遺伝子の mRNA 発現は、導入後 3 日目をピークとして発現が見られるものの、その後は発現量の減少が見られた。特に Actin2 プロモーターを用いた系では強い発現が観察された (図-2)。

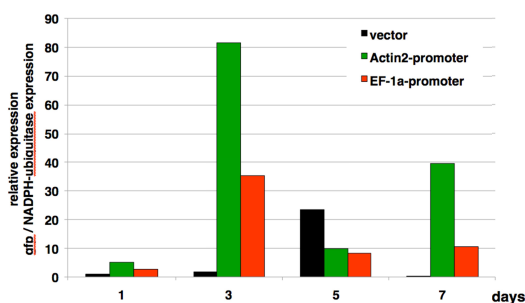


図-2 Actin2 または EF1- プロモーターを用いた gfp 遺伝子発現の比較

図-2 に示した結果からは、Actin2 プロモーターを用いた場合に高い発現効率が観察された。

次に、これらのプロモーター挿入ベクターを 293T 細胞に導入することで、パッケージ

ングを行ない、レンチウイルスを作製した。作製されたウイルスを使って、シストソミラ期の幼虫に遺伝子導入を行った。導入後 1 週間後に DNA と RNA を回収し解析を行った。その結果、mRNA レベルでの gfp 遺伝子の発現とアンカー-PCR によるゲノム中への遺伝子導入は確認されるものの、GFP による蛍光は確認できなかった。また、ウイルス感染させたシストソミラ (300-400) をマウスに移入した後 7 週後に成虫と虫卵を回収した。回収できた成虫は共に 3 ペアであり、この成虫とそこから排出された虫卵の DNA と RNA を回収したが、これらの虫体、および虫卵において、gfp 遺伝子の発現、ゲノム DNA への挿入は確認できなかった。

一方で、虫卵を用いた遺伝子導入において、虫卵にウイルス感染を行った後に孵化させた幼虫をスポロシストに転換し培養したところ、9 日後のスポロシストでは gfp 遺伝子の mRNA 発現は見られた (図 3)。この場合、EF-1 α プロモーターを用いたレンチウイルスの方が強い遺伝子発現を誘導した。このことから、少なくとも二つの宿主内での幼虫ステージでのレンチウイルスによる遺伝子導入と mRNA 発現に関しては確認できた。

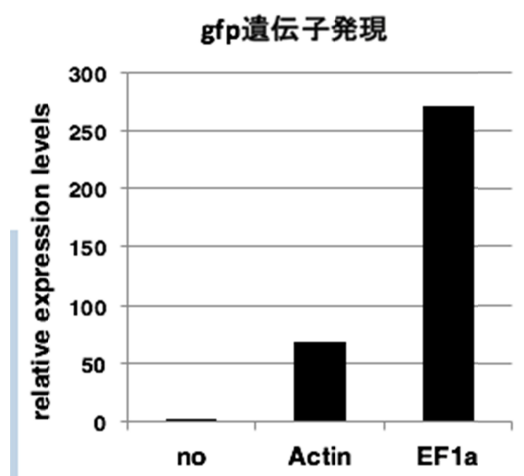


図 3 レンチウイルスによる遺伝子導入を行ったスポロシストでの gfp 遺伝子発現

(2) 考察

レンチウイルスベクターを用いて、日本住血吸虫に遺伝子導入を試みた結果、日本住血吸虫特異的なプロモーターによる発現誘導が確認された。特に、シストソミラへの遺伝子導入では、Actin-2 が、スポロシストでは、EF-1 α のプロモーターが活性を持つことがわかり、両種ともに使用可能であり、発育段階での発現調節も可能である可能性が示唆された。しかしながら、gfp 遺伝子は確かに導入され、mRNA での発現が確認されたものの、GFP タンパク質の発現を確認することができなかった。導入遺伝子のシーケンスを確認した結果、フレームシフト等の変異は認められなかったことと、トランスポゾン配列を用いたアンカー-PCR 法によるゲノムへの挿入

を確認したことから、gfp 遺伝子はゲノムに挿入され、転写されていると考えられた。従って、翻訳の段階での阻害が起こっていることが考えられたが、その詳細については不明のままである。

今回の方法ではタンパク質への翻訳阻害が克服できない可能性も考えられるが、mRNA への転写は起きていることから、RNA 干渉による遺伝子ノックダウンへの応用は可能であると考えられる。特に、ベクター誘導型の RNAi をコンデンショナルにおこなうことの可能性を示唆するデータであり、解決すべき課題は残ったが、今後の応用性については十分な期待が出来る成果を挙げることが出来た。また、ウイルス感染させた幼虫をマウスに感染させた場合、遺伝子導入を受けなかった成虫だけが回収された。このことから、住血吸虫への遺伝子導入は寄生現象を阻害する要因がふくまれていると考えられた。これらの原因を追求することで、ウイルス感染が関与する寄生現象への影響について新知見が得られる可能性もあり、今後の研究の方向性を示していると考えられた。

引用文献

Correnti JM, Jung E et al. Transfection of *Schistosoma mansoni* by electroporation and the description of a new promoter sequence for transgene expression. Int J for Parasitol, 37:1107-15, 2007.

Mann VH, Suttiprapa S et al. Pseudotyped murine leukemia virus for schistosome transgenesis: approaches, methods and perspectives. Transgenic Res, 2014 Jun;44(3):539-56. doi:10.1007/s11248-013-9779-3

Rinaldi G, Eckert SE et al. Germline transgenesis and insertional mutagenesis in *Schistosoma mansoni* mediated by murine leukemia virus. PLoS Pathogens.2012;8(7) e1002820. doi:10.1371/journal.ppat.1002820.

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 1 件)

Mbenefo EC, Kumagai T, Kodama Y, Kurosaki T, Furushima-Shimogawara R, Cherif MS, Mizukami S, Kikuchi M, Huy NT, Ohta N, Sasaki H, Hirayama K. Immunogenicity and anti-fecundity effect of nano particle coated glutathione-S-transferase DNA vaccine against murine *Schistosoma japonicum* infection. Parasitol Int, 査読有 64:24-31, 2015.

〔学会発表〕(計 2 件)

熊谷 貴、市村浩一郎、山邊将史、下河原理江子、太田伸生 赤血球の摂取、およびペアリングによって分泌される日本住血吸虫の細胞外小胞内 mRNA。第 38 回日本分子生物学会 第 88 回日本生化学会合同会議、2015 年 12 月、神戸市

Kumagai T, Ichimura K, Yamabe M, Shimogawara R, Ohta N. Female-biased mRNA production through the extracellular vesicles induced by the erythrocyte uptake in the adult worm of *Schistosoma japonicum*. Annual Meeting of US-Japan Cooperative Medical Science Program. January 2016, Washington DC, USA.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 伸生 (OHTA, Nobuo)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：10143611

(2) 研究分担者

熊谷 貴 (KUMAGAI, Takashi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号：40369054