

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22527

研究課題名(和文)マラリア原虫をモデル生物とした人工真核細胞の作製

研究課題名(英文)Generation of synthetic Plasmodium parasites.

研究代表者

岩永 史朗(IWANAGA, SHIROH)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：20314510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では人工染色体技術が利用可能、且つ極めて単純な転写制御機構を有するマラリア原虫に着目し、これが人工細胞作製に適した生物であることを実証することを目的とし、その第一歩として、マラリア原虫ゲノムの小型染色体を原虫細胞外で合成し、ネズミマラリア原虫に移植して、人工マラリア原虫を作製した。具体的には(1)CRISPR/Cas9法による染色体切断法を開発し、染色体移植可能なレシピエント原虫の作製、(2)マラリア原虫-出芽酵母間のシャトル人工染色体を用いた出芽酵母内での染色体合成技術の開発と移植用小型染色体の合成、(3)合成小型染色体の原虫への移植に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではネズミマラリア原虫を用い、染色体切断法、出芽酵母内でのゲノム合成法、さらに合成ゲノムの原虫への移植法の開発に成功した。これまで真核生物においては人工細胞合成研究ではゲノム合成および移植の困難さから研究は停滞していた。よって、本研究の成果は真核生物における人工細胞合成に新たな進展を与えるものであり、その推進に貢献すると期待される。また、人工細胞は細胞機能の理解に新たな手法を提示するものであることから、本研究の成果はマラリア原虫の細胞機能の理解に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Plasmodium parasites have extremely simple transcriptional regulation mechanism. In addition, the artificial chromosome technology can be used in the parasites. These biological and technical features may be useful for synthesizing the parasite artificially. In this study, to examine this idea, we attempted to synthesize the rodent malaria parasite, *P. berghei*. We developed a chromosome cleavage method by the CRISPR / Cas9 method, and prepared a recipient parasite for chromosome transplantation. Next, we created a shuttle artificial chromosome between Plasmodium parasite and *Saccharomyces cerevisiae*, and synthesized the small chromosome using it in *S. cerevisiae*. The synthesized small chromosome was successfully transplanted into the recipient parasites. These result suggested that the Plasmodium parasites is useful organism for synthesizing the eukaryotic cells.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア原虫 人工細胞

### 1. 研究開始当初の背景

J. Craig Venter Institute (JCVI)による“人工マイコプラズマの作製”はゲノムを外部で合成し移植することが可能であることを証明した。これを契機としてヒトを含む動物・植物等の人工真核生物の合成に向けた試みが本格化した。実際にはゲノムの合成・移植のツールとなる人工染色体が未開発であること、数百を超える転写因子が関与する複雑な転写制御ネットワークを理解し、人工的に再構成することが不可能であること、ゲノム最小化のための技術・情報が未整備であることから現在の科学技術では目標達成は不可能な状況にある。

一方、マラリア原虫は最小サイズのセントロメアを持ち、出芽酵母を除けば外部で人工染色体の合成が可能で唯一の真核生物である。我々はこの点に着目し、極小のマラリア原虫人工染色体(*Plasmodium artificial chromosome*(PAC),9kbp)の開発に成功した。PACは細胞外で完全合成可能であり、セントロメアの機能により、実際の染色体と同様に99.9%の効率で娘細胞に分配され、1コピーで安定的維持される。加えて長鎖DNA断片の導入に最適であり、>300kbpのDNA断片を原虫内に導入・安定維持できる特徴を持つ。また、マラリア原虫は酵母・ヒトなどの自由生活性真核生物とは大きく異なり、極めて単純な転写制御機構を持つ生物である。これまで我々は世界に先駆けて原虫の配列特異的転写因子を発見し、原虫は安定な宿主内環境への適応の結果、複雑な転写制御を失い、僅か27種の転写因子により遺伝子発現が制御されることを示した。原虫は各転写因子を生育ステージ特異的に発現し、細胞骨格・代謝から侵入・寄生に至る数百以上の遺伝子に保存された共通シス配列を利用して、ステージ形成に関わる全遺伝子発現を直接、かつ一括で制御する。この単純性ゆえ、原虫では転写因子とシス配列の関係を解明することにより、遺伝子発現の全貌を完全に理解することが可能であり、更にシス配列を利用すれば人為的に転写を制御することができることが示唆される。よってマラリア原虫では他の生物とは異なり、ゲノムの理論設計が可能であると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では上記の生物学的特徴及び技術的優位性を根拠とし、「マラリア原虫は人工細胞作製に適した生物である」と考え、その実証の第一歩として、マラリア原虫ゲノムの小型染色体を原虫細胞外で合成し、ネズミマラリア原虫に移植して、人工マラリア原虫を作製する。

具体的には(1) CRISPR/Cas9 systemによる大規模ゲノム編集により、第一番染色体の右腕100kb程度を切断し、小型染色体を持つ*P. berghei*を作製する。(2) 次に出芽酵母-マラリア原虫間のシャトル

人工染色体(yPAC)を使い、出芽酵母内で切断した小型染色体に相当する領域を合成する。(3) 最後に合成した小型染色体を(1)で作製した小型染色体を持つ*P. berghei*に移植し、小型染色体と合成小型染色体が入れ替わった人工マラリア原虫を作製する。図1に概要を示す。

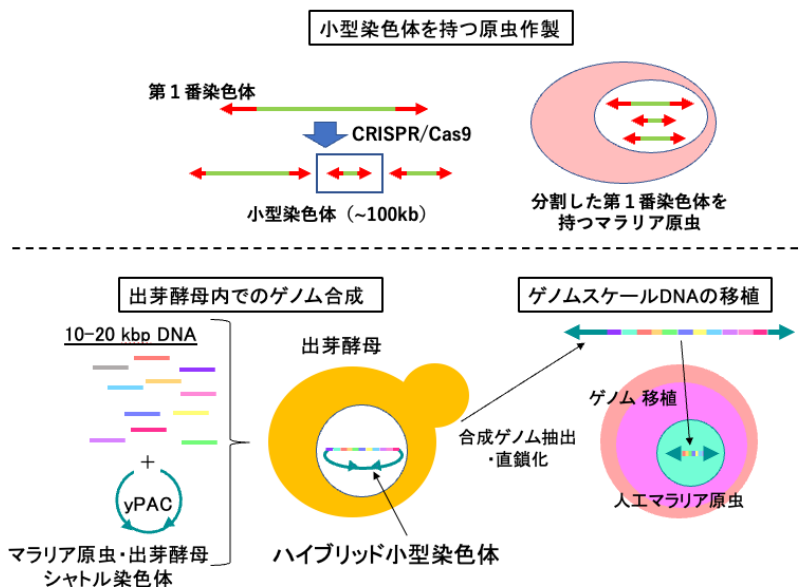


図1: 大規模ゲノム編集による小型染色体を持つ人工マラリア原虫の作製

### 3. 研究の方法

マラリア原虫が人工細胞作製に適したモデル生物であることを実証するために、*P. berghei*由来の染色体をもとに出芽酵母を使って、小型染色体を合成し、これを移植した人工マラリア原

虫の作製を行う。

#### (1) 小型染色体を持つマラリア原虫の作製

我々が開発した CRISPR/Cas9 による大規模ゲノム編集技術によって第一番染色体 (約 600kb) を分割し、100kb 程度に断片化した小型染色体を持つマラリア原虫を作製する。このときに小型染色体にはネガティブ選択マーカーである *yfcu* 遺伝子を導入する。

#### (2) 小型染色体の設計・合成

(1) で切断した 100kb 程度の小型染色体の配列をもとに PCR を行い、約 10kb からなる複数の DNA 断片を調製する。この際に増幅断片内に *NotI* 認識配列を含まないようにする。続いて、出芽酵母内 *in vivo cloning* 法を用いて、マラリア原虫-出芽酵母とのシャトル人工染色体 (yPAC) に 100kbp をクローニングし、酵母内で人工的に小型染色体の合成を行う。

#### (3) ゲノムスケール DNA 移植による合成小型染色体を持つ人工マラリア原虫の作製

合成小型染色体を持つ出芽酵母から DNA を精製し、*NotI* により酵母ゲノムを消化し、さらに *PmeI* により直鎖化する。*NotI/PmeI* 消化後の合成小型染色体をエレクトロポレーションにより、(1) で作製した小型染色体を持つマラリア原虫に導入する。yPAC 上のピリメサミン耐性遺伝子によるポジティブ選択、*yfcu* 遺伝子によるネガティブ選択によって、小型染色体と合成小型染色体が入り替わったマラリア原虫を作製する。

#### (4) 合成小型染色体のゲノム機能を調べることによる人工マラリア原虫の生物機能の検証

各種分子生物学的手法を用いて、合成小型染色体のゲノム機能 (遺伝子発現、エピゲノム状態等) が小型染色体あるいは野生型における相同ゲノム配列と同等であるかを検証し、人工マラリア原虫が正常な生物機能を持つことを実証する。

### 4. 研究成果

#### (1) 小型染色体を持つマラリア原虫の作製

ネズミマラリア原虫 (*P. berghei*) の第一番染色体右腕側のテロメア末端から約 100 kb 付近に位置する遺伝子 (PBANKA\_0111600、以降、遺伝子は ID で表記) を標的として (図 2 A)、sgRNA を設計し、sgRNA 発現用の Plasmid (psgRNA\_1) に組み込んだ。同時に切断部位近傍の配列にテロメア配列を付加した二種の相同組換え用 DNA 断片を調製した。次に sgRNA を組み込んだ psgRNA\_1 と二種の DNA 断片を Cas9 nuclease を恒常的に発現する *P. berghei* に導入し、CRISPR/Cas9 system に

よるゲノム切断をおこなった。その結果、目的とする位置で染色体が切断された組換え原虫を得ることができた (図 2 B, C)。切断された染色体は細胞周期を経ても再び、結合することはない、テロメア末端は維持され、それぞれが独立した染色体として維持された (図 2 D)。また、染色体切断が増殖スピード、赤血球内での生育には影響がないことを確認した。この小型染色体を持つ組換え原虫を split-Chr1-S と名づけ、以降の実験のレシピエント原虫として用いた。

切断された染色体は細胞周期を経ても再び、結合することはない、テロメア末端は維持され、それぞれが独立した染色体として維持された (図 2 D)。また、染色体切断が増殖スピード、赤血球内での生育には影響がないことを確認した。この小型染色体を持つ組換え原虫を split-Chr1-S と名づけ、以降の実験のレシピエント原虫として用いた。

#### (2) 小型染色体の設計・合成

マラリア原虫のテロメア近傍にはサブテロメアと呼ばれる領域がある。サブテロメア領域に

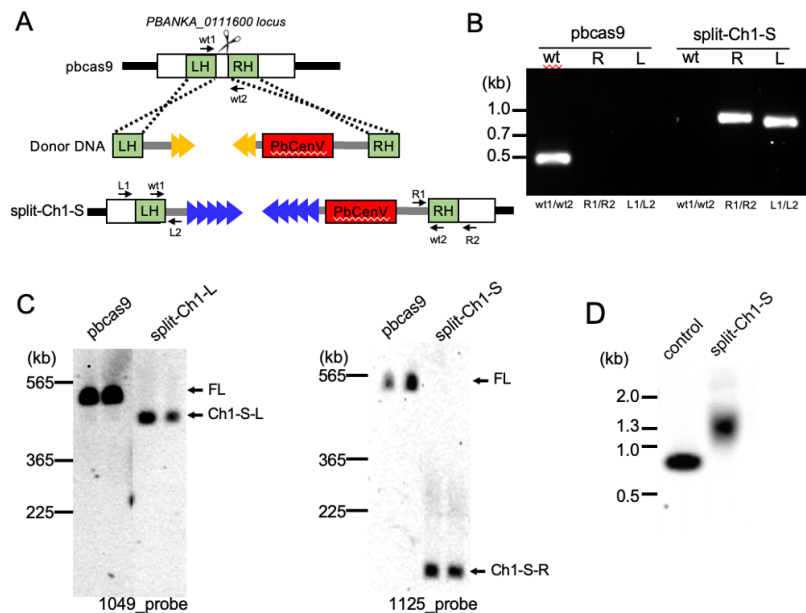
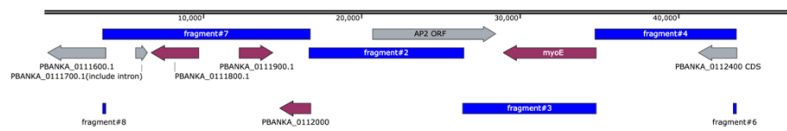


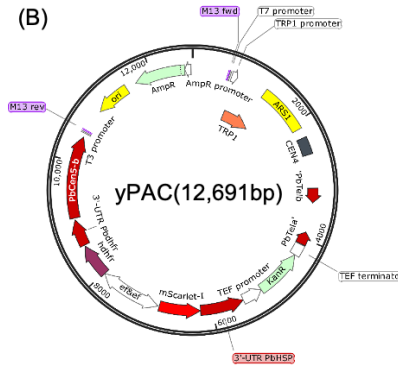
図2: 小型染色体を持つ *P. berghei* (split-Chr1-S) の作製 (A) split-Chr1-S 作製概要図。(B) genotyping PCRによる split-Chr1-S の検出。(C) CHEF電気泳動およびサザンハイブリダイゼーションによる染色体切断の確認。(D) サザンハイブリダイゼーションによるテロメア末端の検出。

は赤血球表面抗原をコードする多重遺伝子族が存在するが、これはいずれもマラリア原虫の生育には必須ではない。本研究で対象とする第一番染色体右腕側にはテロメアから約 60 kb がサブテロメア領域を形成すると推定される。そこで、本研究ではサブテロメア領域を除く約 40 kb を対象にゲノム合成を行なった (図 3A)。まず、PBANKA\_0111700 から PBANKA\_0112400 までの領域を 4 つに区切り、各領域をコードする DNA 断片(8 ~ 12 kb)を PCR により増幅した。次にこれらと直鎖化した yPAC (図 3B) を出芽酵母に化学試薬を用いて導入し、相同組換えによりこれらを連結した。得られた酵母株に対し、CHEF 電気泳動を行い、yPAC に対し特異的プローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行なった結果、目的とする約 40 kb の断片が yPAC に組み込まれていることが確認された (図 3C)。以上の結果より、人工的に小型染色体を合成することができたと判断した。

(A) *P. berghei*, Chromosome1 444,800 – 491,999



(B)



(C)

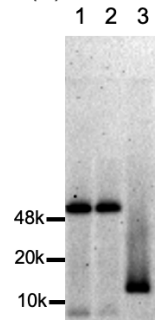
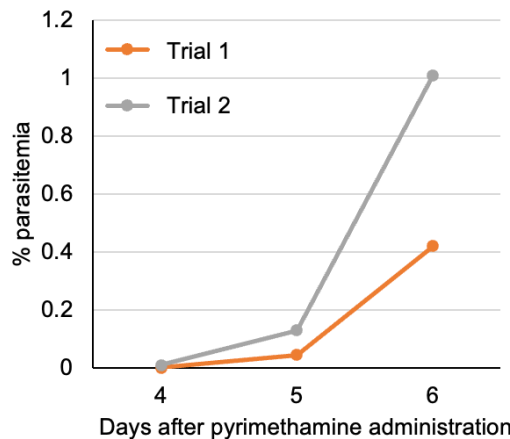


図3: yPACを用いた出芽酵母内でのゲノム合成。(A) *P. berghei*第一番染色体 444,800から491,999の概略図。青で示す領域をPCRで増幅した。(B) yPACの模式図。(C) yPACに(A)で増幅した断片が組み込まれたものを持つ酵母株についてCHEF電気泳動とサザンハイブリダイゼーションを行い、目的とする小型染色体が合成できていることを確認した。

### (3) ゲノムスケール DNA 移植による合成小型染色体を持つ人工マラリア原虫の作製

合成した小型染色体が組み込まれた出芽酵母よりゲノム DNA とともに小型染色体を回収した。続いて NotI で消化し、酵母ゲノムのみを選択的に分解後、PmeI による消化を行い、合成した小型染色体を直鎖化して切断末端にテロメア配列を持つようにした。次に (1) で第一番染色体を切断した *P. berghei* を培養し、成熟シズント期原虫を精製後、前述の PmeI 消化物をエレクトロポレーションにより導入した。エレクトロポレーション後、直ちにマウスに接種し、飲水によるピリメサミン処理を行い、合成小型染色体が導入された原虫を選択した。薬剤処理後 4 日目から末梢血内に原虫が確認され、目的とする合成小型染色体が導入された組換え原虫が作製できたことが示唆された。得られた組換え原虫から限界希釈法によりクローン原虫を樹立後、CHEF 電気泳動とサザンハイブリダイゼーションを行なった

(A)



(B)

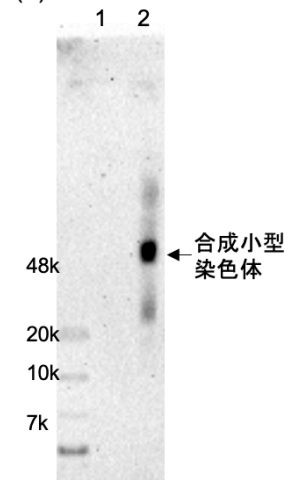


図4: 合成小型染色体の *P. berghei* への移植 (A) 合成小型染色体を導入した後の組換え原虫の増殖。(B) 合成小型染色体を移植した組換え原虫のCHEF電気泳動およびサザンハイブリダイゼーションの結果。48kb付近に合成小型染色体由来のシグナルが検出された。

結果、合成小型染色体が組み込まれていることが確認された。以上の結果より、合成染色体の移植が可能であることが示された。

(1)で行なった染色体切断時には小型染色体側にネガティブ選択マーカである *yfcu* 遺伝子が組み込まれている。そこで合成小型染色体が組み込まれた原虫から切断により生じた小型染色体を 5-FC 処理によるネガティブ選択で除去することを試みた。その結果、予想外にも合成小型染色体と小型染色体間で組換えが起きた原虫だけが選択的に生存し、目的とする染色体除去はできなかった。染色体末端は原中核内で核膜近傍に局在している。*yfcu* 遺伝子は切断部位近傍に挿入するしかなく、おそらく末端近傍が至近距離にあることから組換えが促進され、上記のような結果になったと推測される。一方で、ネガティブ選択で染色体を選択できることは示されたことから、この問題を解決すれば染色体除去は可能と考えられ、今後の課題となった。

#### (4) 合成小型染色体のゲノム機能を調べることによる人工マラリア原虫の生物機能の検証

(3)で述べたように本研究で設定した戦略では人工マラリア原虫作製の最終段階である染色体除去ができないことが明らかとなった。一方で染色体移植には成功し、合成小型染色体を持つ原虫が作製できた。この原虫は第一番染色体上の遺伝子が倍化しているにもかかわらず、増殖スピード、生殖母体形成、受精等の機能は本来の野生型原虫と同等のものであった。今後はゲノムワイドな遺伝子発現変動や合成染色体上のエピゲノム形成について詳細に検討する予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Amoa-Bosompem M., Kobayashi D., Murota K., Faizah A. N., Itokawa K., Fujita R., Osei Joseph Harold N., Agbosu E., Pratt D., Kimura S., Kwofie K. D., Ohashi M., Bonney Joseph H. K., Dadzie S., Sasaki T., Ohta N., Isawa H., Sawabe K., Iwanaga S	4. 巻 12
2. 論文標題 Entomological Assessment of the Status and Risk of Mosquito-borne Arboviral Transmission in Ghana	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 147 ~ 147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v12020147	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Shinzawa Naoaki, Nishi Tsubasa, Hiyoshi Fumiya, Motooka Daisuke, Yuda Masao, Iwanaga Shiroh	4. 巻 3
2. 論文標題 Improvement of CRISPR/Cas9 system by transfecting Cas9-expressing Plasmodium berghei with linear donor template	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-01138-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Amoa-Bosompem Michael, Kobayashi Daisuke, Itokawa Kentaro, Faizah Astri Nur, Kuwata Ryusei, Dadzie Samuel, Hayashi Takaya, Yamaoka Shoji, Sawabe Kyoko, Iwanaga Shiroh, Isawa Haruhiko	4. 巻 56
2. 論文標題 Establishment and characterization of a cell line from Ghanaian Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) focusing on Aedes-borne flavivirus susceptibility	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal	6. 最初と最後の頁 792 ~ 798
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11626-020-00504-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Prah Isaac, Ayibieke Alafate, Nguyen Thi Thu Huong, Iguchi Atsushi, Mahazu Samiratu, Sato Wakana, Hayashi Takaya, Yamaoka Shoji, Suzuki Toshihiko, Iwanaga Shiroh, Ablordey Anthony, Saito Ryoichi	4. 巻 74
2. 論文標題 Virulence Profiles of Diarrheagenic Escherichia coli Isolated from the Western Region of Ghana	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 115 ~ 121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7883/yoken.JJID.2020.356	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する



1. 著者名 Taku Izumi, Hirai Tomohiro, Makiuchi Takashi, Shinzawa Naoaki, Iwanaga Shiroh, Annoura Takeshi, Nagamune Kisaburo, Nozaki Tomoyoshi, Saito-Nakano Yumiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Rab5b-Associated Arf1 GTPase Regulates Export of N-Myristoylated Adenylate Kinase 2 From the Endoplasmic Reticulum in Plasmodium falciparum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2020.610200	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ayibieke Alafate, Kobayashi Ayumi, Suzuki Masato, Sato Wakana, Mahazu Samiratu, Prah Isaac, Mizoguchi Miyuki, Moriya Kyoji, Hayashi Takaya, Suzuki Toshihiko, Iwanaga Shiroh, Ablordey Anthony, Saito Ryoichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Prevalence and Characterization of Carbapenem-Hydrolyzing Class D $\beta$ -Lactamase-Producing Acinetobacter Isolates From Ghana	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2020.587398	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Amao-Bosompem M, Kobayashi D, Murota K, Faizah Astri N, Itokawa K, Fujita R, Osei Joseph Harold N, Agbosu E, Pratt D, Kimura S, Kwofie Kofi D, Ohashi M, Bonney Joseph H. K, Dadzie S, Sasaki T, Ohta N, Isawa H, Sawabe K, Iwanaga S	4. 巻 12
2. 論文標題 Entomological Assessment of the Status and Risk of Mosquito-borne Arboviral Transmission in Ghana	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 147 ~ 147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v12020147	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yuda Masao, Kaneko Izumi, Iwanaga Shiroh, Murata Yuhu, Kato Tomomi	4. 巻 113
2. 論文標題 Female specific gene regulation in malaria parasites by an AP2 family transcription factor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Microbiology	6. 最初と最後の頁 40 ~ 51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/mmi.14334	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Bando Hironori, Pradipta Ariel, Iwanaga Shiroh, Okamoto Toru, Okuzaki Daisuke, Tanaka Shun, Vega-Rodriguez Joel, Lee Youngae, Ma Ji Su, Sakaguchi Naoya, Soga Akira, Fukumoto Shinya, Sasai Miwa, Matsuura Yoshiharu, Yuda Masao, Jacobs-Lorena Marcelo, Yamamoto Masahiro	4. 巻 216
2. 論文標題 CXCR4 regulates Plasmodium development in mouse and human hepatocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 1733~1748
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20182227	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Kiichi, Takahashi Kentaro, Ato Manabu, Iwanaga Shiroh, Ohta Nobuo	4. 巻 201
2. 論文標題 Antimalarial activity of vitamin D3 (VD3) does not result from VD3-induced antimicrobial agents including nitric oxide or cathelicidin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Parasitology	6. 最初と最後の頁 67~77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exppara.2019.03.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計5件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kofi Dazie KWOFIE, Emmanuel Pacia Hernandez, Samuel Dadzie, Danielle Ladzekpo, 坪川大悟, 三上房子, 松林誠, 岩永史朗, 辻尚利, 八田岳士
2. 発表標題 フタトゲチマダニの胚発生における古典的のトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 第72回日本衛生動物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Michael Amoa-Bosompem, Daisuke Kobayashi, Katsunori Murota, Astri Nur Faizah, Kentaro Itokawa, Mitsuko Ohashi, Toshinori Sasaki, Haruhiko Isawa, Kyoko Sawabe, Shiro Iwanaga
2. 発表標題 Virome analyses of Aedes aegypti mosquitoes collected in Ghana and their possible impact on arbovirus transmission
3. 学会等名 第72回日本衛生動物学会
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 Shiroh Iwanaga
2. 発表標題 Transcriptional regulation of Plasmodium parasite
3. 学会等名 第15回生命医科学ネットワークシンポジウム(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平山 泰士、新澤 直明、油田 正夫、岩永 史朗
2. 発表標題 マラリア原虫有性ステージ分化におけるRNA結合型ジンクフィンガータンパク質ファミリーの解析
3. 学会等名 第79回 日本寄生虫学会東日本支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shiroh Iwanaga
2. 発表標題 Female-specific gene regulation in malaria parasite by an AP2-family transcription factor.
3. 学会等名 The 18th Awaji International Forum on Infectiopl and Immunity (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------