

機関番号：14101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790406

研究課題名（和文）マラリア原虫（宿主）－人工染色体（ベクター）を用いた遺伝子ライブラリーの構築

研究課題名（英文）Construction of genomic library from Malaria parasite using its artificial chromosome

研究代表者

岩永 史朗（Shiroh Iwanaga）

三重大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：20314510

研究成果の概要（和文）：

ネズミマラリア原虫人工染色体を用い、薬剤耐性原虫より遺伝子ライブラリーを作製し、耐性遺伝子を同定する方法を確立した。また熱帯熱マラリア原虫人工染色体を作製し、遺伝子ライブラリー作製を試みた。

研究成果の概要（英文）：

To develop the system for the identification of drug resistance gene from parasite, we generate the high-coverage genomic library using the Plasmodium artificial chromosome (PAC) from drug resistance parasite. The targeted drug resistance gene could be identified by drug-screening from the PAC library which was made from the drug resistance parasite.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：寄生虫学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：マラリア、人工染色体

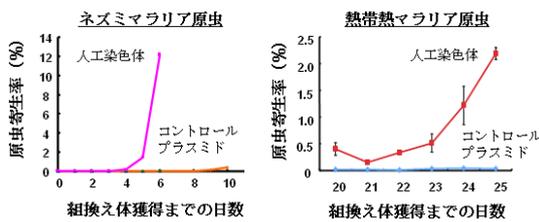
1. 研究開始当初の背景

長い歴史を持つマラリア研究では、現在までに様々な表現型を示す原虫が発見、株化されている。例えば、生殖母体細胞を産生しない原虫や、細胞周期の異常により遅生育性を示す原虫、薬剤に対する感受性が変化した原虫、媒介蚊体内で正常に生育できない原虫等がある。これらの表現型は学術上及び臨床、

極めて興味深いことから、これまで遺伝学的解析（forward genetic analysis）による原因遺伝子同定が試みられてきた。しかしながら、これらの研究では酵母等のモデル生物と同様に、興味ある表現型を示す原虫と野生型原虫を交配し、表現型を維持した原虫を選抜後、染色体上のマーカー遺伝子を指標に原因遺伝子の染色体上の位置を限定して、原因遺

伝子の同定を行っており、交配原虫の作製、選抜が困難な上、マーカー遺伝子が少ないという致命的な欠点から多大な労力と時間を必要とされた。よって、未だに少数の原因遺伝子しか同定されておらず、多くの興味深い原虫が手付かずのままとなっているのが現状である。

一方、申請者はこれまでにマalaria原虫の遺伝子操作法改良を目的とし、熱帯熱マalaria原虫及び、ネズミマalaria原虫より独自にセントロメア(動原体)とテロメアをクローニング後、これらを組み込んだマalaria原虫人工染色体の作出に世界で初めて成功して、従来の技術とは一線を画す新規遺伝子導入法の開発している(図1参照)。この技術の特徴は次のような点である。①両マalaria原虫人工染色体は原虫由来の染色体と同様に挙動し、極めて高い効率(>99.7%)で細胞分裂時に娘細胞へ分配される。②①の性質により、従来法の10~100倍以上の高効率で組換え原虫を作出でき、従来の1/10~1/1000のDNA量で組換え原虫を作出できる。③人工染色体は通常の染色体様に挙動するため、原虫由来の染色体と相同組換えを起こさず、染色体外DNAとして安定的に維持され、最終的に原虫から人工染色体を容易に回収できる。



(図1) マalaria原虫人工染色体を用いた組換え原虫作製実験

2. 研究の目的

申請者は上記の高効率遺伝子導入技術を利用して、マalaria原虫(宿主)ー人工染色体(ベクター)系を用いた遺伝子ライブラリ

ーを作製後、これをスクリーニングすることによって、興味ある表現型を持つ原虫から原因遺伝子をゲノムワイドに探索することを提案する(図2参照)。つまり、興味ある表現型を持つ原虫(もしくは野生型原虫)由来の染色体DNAを制限酵素処理後、人工染色体に組み込み、遺伝子ライブラリを作製する。これを直接、野生型原虫(もしくは興味ある表現型を持つ原虫)に導入し、一定の条件化でスクリーニングを行い、新たに表現型を獲得した原虫(もしくは機能が復元した原虫)を選択する。これらの原虫には原因遺伝子が組み込まれた人工染色体が導入されていることから、人工染色体を回収し、原因遺伝子を同定する。本研究では、この実験系のモデル実験として“薬剤耐性原虫からの原因遺伝子(耐性遺伝子)同定”を行うことを計画する。

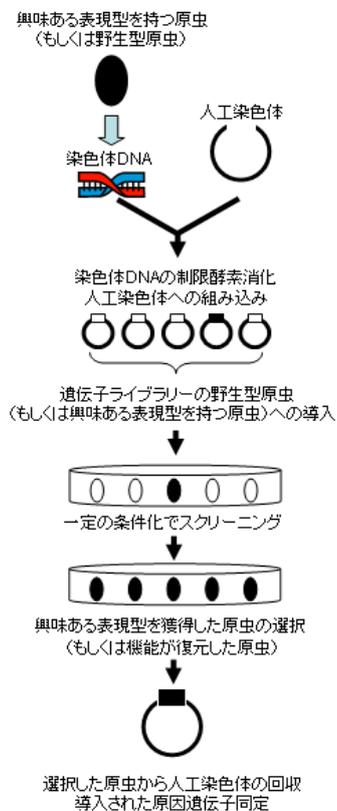


図2: 人工染色体ー原虫系による遺伝子ライブラリを用いた原因遺伝子探索(概念図)

3. 研究の方法

①ネズミマラリア原虫人工染色体を用いた遺伝子ライブラリーの作製と薬剤耐性遺伝子の同定

既に作製したネズミマラリア原虫人工染色体（図3）を用い、薬剤耐性原虫（ピリメサミン耐性）の染色体DNAから図2の方法に従い、遺伝子ライブラリーを作製する。作製したライブラリーは直接、ネズミマラリア原虫へ導入し、直ちにネズミに接種する。その後、ピリメサミンを投与し、薬剤耐性を獲得した原虫を選択する。選択された原虫が人工染色体を保持していること、並びに薬剤耐性遺伝子が組み込まれていることを確認する。

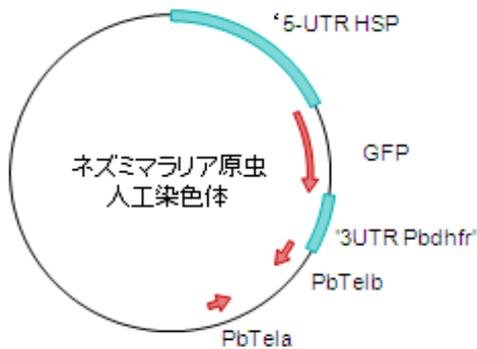


図3：ネズミマラリア原虫人工染色体

②熱帯熱マラリア原虫人工染色体の構築

ライブラリー構築用のベクターとして、図4に示すものを構築する。このベクターには熱帯熱マラリア原虫第5番染色体由来のセントロメアが組み込まれている。また、これには薬剤耐性遺伝子としてヒト由来ジヒドロ葉酸還元酵素（hdhfr）と蛍光タンパク質 GFP の遺伝子が組み込まれている。

③熱帯熱マラリア原虫人工染色体を用いた遺伝子ライブラリーの作製

クロロキン耐性の熱帯熱マラリア原虫 Dd2 株より染色体DNAを抽出し、制限酵素により限定分解して②で作製した人工染色体に組

込む。これを熱帯熱マラリア原虫に導入して遺伝子ライブラリーを構築する。

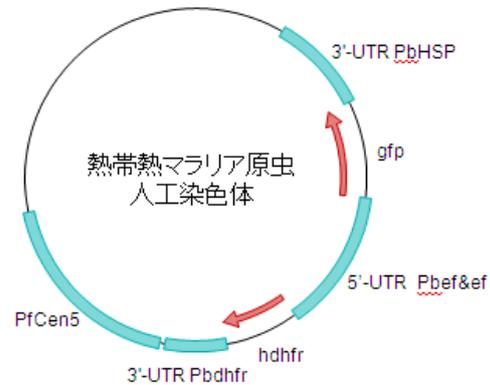


図4：熱帯熱マラリア原虫人工染色体

4. 研究成果

①ネズミマラリア原虫人工染色体を用いた遺伝子ライブラリーの作製と薬剤耐性遺伝子の同定

ネズミマラリア原虫 (*P. berghei* ANKA) の第14番染色体の任意の位置に *hdhfr* 遺伝子を組込んだ薬剤耐性原虫を作製し、これを実験試料とした。まず、薬剤耐性原虫より染色体DNAを抽出し、制限酵素で部分消化後、10–50kbのDNA断片を抽出した。次にこれを人工染色体に組み込み、野性型のネズミマラリア原虫へ導入し、ピリメサミンによる薬剤選択を行った。その結果、遺伝子導入後10日目に新たに薬剤耐性を獲得した原虫を選択できた。更に選択した原虫に組み込まれた人工染色体をCHEFにより解析した結果、図5に示すように人工染色体が組み込まれ、且つ目的とする薬剤耐性遺伝子が組み込まれていることが確認された。これにより本研究で提案する遺伝子ライブラリーの構築と標的遺伝子（薬剤耐性遺伝子）の同定が可能であることが示された。

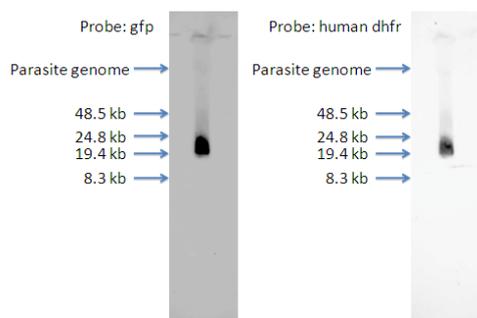


図 5 : CHEF による選択された薬剤耐性原虫内の人工染色体の解析

(左) ProbeDNA として gfp 遺伝子を使用。約 19.4kb-24.8kb 付近にシグナルがある。人工染色体のサイズが約 8kb であることを考慮し、約 11-15kb 程度のサイズの DNA 断片が組込まれている。

(右) ProbeDNA として dhfr 遺伝子を使用。サイズは左と同じ。人工染色体に目的とする薬剤耐性遺伝子 (dhfr) が組込まれている。さらに原虫染色体へ予期せぬ相同組換えにより、人工染色体が組込まれていないことがわかる。(ParasiteDNA のところにシグナルがない)。

②熱帯熱マラリア原虫人工染色体の構築

熱帯熱マラリア原虫第 5 番染色体よりセントロメアをクローニングし、図 4 に示す人工染色体の構築を試みた。その結果、セントロメア全長を含む人工染色体は大腸菌内で不安定化し、作製することはできなかった。更に他の染色体由来のセントロメアについても同様の試みを行ったが、いずれも大腸菌内で不安定化した。そこでセントロメアの配列的特徴に着目し、第 5 番染色体由来のセントロメアを短くし、これを用いて人工染色体を構築した。その結果、大腸菌内で不安定化することなく、予期せぬ変異・組換え等の無い人工染色体を構築することに成功した。続いて熱帯熱マラリア人工染色体及びコントロールプラスミドを原虫内に導入し、薬剤非存

在下で 4 日間維持した後の各原虫の GFP の発現を比較した。その結果、人工染色体を保持する原虫の 80% が GFP を発現するのに対し、コントロールプラスミドを有する原虫では約 35% のものしか GFP を発現していなかった。この結果は人工染色体が原虫内で安定的に保持されていることを示していた。

(図 6)。

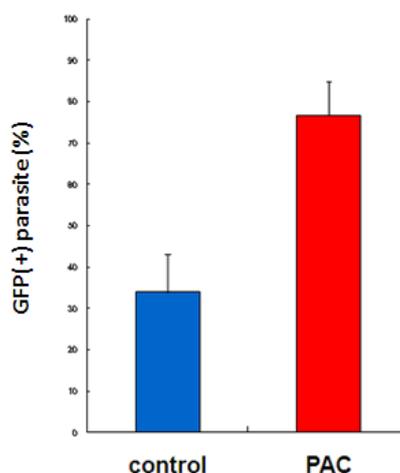


図 6 : 原虫内での熱帯熱マラリア原虫人工染色体の安定性

薬剤非存在下 (4 日間) でコントロールプラスミド及び人工染色体を保持する原虫を維持した後の GFP を発現する原虫のパーセンテージを比較した。人工染色体の方がコントロールプラスミドより安定的に原虫内で維持されている。

③熱帯熱マラリア原虫人工染色体を用いた遺伝子ライブラリーの作製

クロロキン耐性熱帯熱マラリア原虫 Dd2 株より染色体 DNA を抽出し、これを部分消化して熱帯熱マラリア原虫へ導入した。人工染色体には dhfr 遺伝子が組み込まれているので、遺伝子が導入された原虫は全てピリメサミン耐性となることから、まず同薬剤を用いてスクリーニングを行った。その結果、明らかにピリメサミン耐性を獲得した原虫を得る

ことができ、遺伝子ライブラリーが構築できたことを示唆する結果を得た。現在、詳細な解析を行っている。

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4件)

- ① Iwanaga S, Khan SM, Kaneko I, Christodoulou Z, Newbold C, Yuda M, Janse CJ, Waters AP. Functional Identification of the *Plasmodium* Centromere and Generation of a *Plasmodium* Artificial Chromosome. Cell, Host & Microbe. (査読有) 7, 3, 245 (2010)
- ② Yuda M, Iwanaga S, Shigenobu S, Kato T, Kaneko I. : Transcription Factor AP2-Sp and its Target Genes in Malarial Sporozoites. Mol Microbiol. (査読有), 75, 4, 854 - 863 (2010)
- ③ Yuda M, Iwanaga S, Shigenobu S, Mair GR, Janse CJ, Waters AP, Kato T, Kaneko I. : Identification of a transcription factor in the mosquito-invasive stage of malaria parasites. Mol Microbiol. (査読有), 71, 6, 1402 - 1414 (2009)
- ④ 岩永史朗、鎮西靖男 マラリアワクチン開発の現況、医学の歩み (査読無) 231, 3, 2009

[学会発表] (計4件)

- ① Identification of Transcription factor of Malaria Sporozoite. S. Iwanaga, I. Kaneko, and M. Yuda, Awaji, Japan (2010, Sep 9th-12th) The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity
- ② Identification of Transcription factor

of Malaria Sporozoite. S. Iwanaga, I. Kaneko, and M. Yuda ers Washington, D.C. USA (2009, Nov 18-22) American Society of Tropical Medicine and Hygiene 58th Annual Meeting

- ③ Functional Characterization of the plasmodium centromere and generation of a plasmodium artificial chromosome. S. Iwanaga, M. Yuda, I. Kaneko, C.J. Janse, and A.P. Waters Washington, D.C. USA (2009, Nov 18-22) American Society of Tropical Medicine and Hygiene 58th Annual Meeting
- ④ Generation of a Plasmodium Artificial Chromosome S. Iwanaga Awaji, Japan (2009, Sep 8th-11th) The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity

[産業財産権]
○出願状況 (計2件)

①名称：マラリア原虫人工染色体を用いた薬剤耐性遺伝子の迅速同定法および組換えマラリア原虫作製法
発明者：岩永史朗・油田正夫・金子伊澄
権利者：：国立大学三重大学種類：特許
番号：PCT/JP2011/001781
出願年月日：23年3月26日
国内外の別：PCT (国際)

②名称：マラリア原虫人工染色体を用いた薬剤耐性遺伝子の迅速同定法
発明者：岩永史朗・油田正夫
権利者：：国立大学三重大学
種類：特許
番号：特願2010-071688
出願年月日：22年3月26日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者
岩永 史朗 (Shiroh Iwanaga)
三重大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：20314510

(2)研究分担者
無し

研究者番号：

(3) 連携研究者
無し
研究者番号：