

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08453

研究課題名(和文) マラリア原虫オルガネラの遺伝子操作技術の開発

研究課題名(英文) Method for mutation in organelle genome by CRISPR/CAS9

研究代表者

平井 誠 (HIRAI, Makoto)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：50326849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：CAS9の核移行シグナルをネズミマラリア原虫のアピコプラスト(Api)、およびミトコンドリア(Mit)移行シグナルに置き換えたコンストラクトを作製、ネズミマラリア原虫に導入した。その結果、CAS9タンパクの各オルガネラへの局在は確認できなかった。一方、抗マラリア薬アトバコン耐性に関与するcytochrome bのY268Lをゲノム編集による導入を試みたが、目的とする変異体を単離できなかった。以上の結果はCAS9タンパク質のミトコンドリアへの局在、さらにはゲノム編集のコンポーネントであるgRNAとドナーDNAのミトコンドリアへの局在がこの実験系の成否を決定づけていることが推察された。

研究成果の概要(英文)：To deliver CAS9 protein into mitochondria, plasmids were constructed to replace nuclear localization signal with mitochondrial localization signal. Rodent malaria parasite, *Plasmodium berghei* was transfected with the plasmids, and localization of CAS9 protein in each transformant was investigated. As a result, no clear evidence for organelle localization of the protein was obtained. Beside, introduction of mitochondrial gene mutation by CRISPR/CAS9 (Mit) was attempted, however, desired mutation was not inserted in the genome. Taken together, these results suggest that delivery of CAS9 together with gRNA and donor DNA into organelle was critical point for successful modification of organelle genome. Further improvement should be challenged by considering these points.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア原虫 オルガネラ ゲノム編集 アトバコン cytochrome b

1. 研究開始当初の背景

マラリアは、エイズ・結核とならぶ世界三大感染症の一つである。この病気を制圧するため広汎な研究が世界中で繰り広げられているが、原虫の特性である薬剤耐性によりマラリアコントロールは困難を極めている。マラリア薬の多くはオルガネラを標的にしているが、オルガネラ自体の機能が未解明の部分が多く、その明確な分子標的と作用機構は明らかではない。核コード遺伝子の機能解析は逆遺伝学的手法が用いられるが、この手法をオルガネラゲノムへ適用できないため、オルガネラコード遺伝子の機能解析は手付かずの状態にあり、技術革新が切望されている。本研究は、マラリア原虫オルガネラコード遺伝子への操作技術を開発する。この試みは世界初であり、得られる成果はマラリア原虫にとどまらず、オルガネラ生物学を深化させる意味において国の内外を問わず極めて重要である。

マラリア原虫の核コード遺伝子は個別にノックアウトすることが可能で、この手法によりマラリア原虫生活史の分子基盤の一端が解明されてきた。研究代表者は、この手法を駆使して動植物に共通するマラリア原虫受精制御因子の同定に世界で初めて成功している (Curr. Biology, 2008)。しかし、この手法は、他の生物の場合と同様、マラリア原虫のオルガネラゲノムに適用することができない。オルガネラゲノムに対する遺伝子操作技術が未熟であることが、オルガネラ生物学を遅延させている一因となっている。本研究は、最新の核ゲノムコード遺伝子操作技術 CAS9/CRISPR をオルガネラゲノムへの遺伝子操作技術として改変し、研究ツールとして実用化するものである。

2. 研究の目的

マラリアのゲノム情報と逆遺伝学的手法により、核コード遺伝子の機能解析が進展している一方、オルガネラコード遺伝子に対して逆遺伝学的手法が適用できないという技術的な障壁により、その機能解析は今日まで手付かずである。本研究は、オルガネラゲノムの遺伝子操作技術を開発し、これまで誰も手が付けられなかったオルガネラコード遺伝子の機能解析に挑戦する。特に、この遺伝子操作技術を駆使することで、オルガネラゲノムに存在するマラリア薬の標的となりうる候補分子をあぶりだし、得られた知見を基盤とした創薬への新たな道を拓くことを目的とする (図 1)。本研究で利用する CAS9/CRISPR は、1) guide RNA (gRNA) と 2) 化膿レンサ球菌由来のヌクレアーゼ CAS9 から構成される。gRNA は標的遺伝子の相補鎖 20 塩基をコードしており、CAS9 を標的遺伝子にリクルートする機能を持つ。gRNA によってリクルートされた CAS9 は、標的遺伝子の二本鎖を切断する。切断箇所を修復する際、3) ドナー DNA が存在すれば、ドナー DNA と

の間で相同組み換えが起こる。ドナー DNA に点変異を挿入しておくことで変異の導入が可能となる。既存の CAS9 の N 末と C 末には核移行シグナルが付加されており、CAS9 が核へ移行して核遺伝子の組換えを行っている。ところで、マラリア原虫のオルガネラに局在するタンパク質の 8 割近くは核にコードされており、核で転写、細胞質で翻訳されたタンパクは、それ自身が持つ "オルガネラ移行シグナル" により、それぞれのオルガネラへ移行する。CAS9 の核移行シグナルをミトコンドリア移行シグナルに置き換えることで、CAS9 をミトコンドリアへ移行させることが可能と考える。すでに申請者は、ネズミマラリア原虫 (*Plasmodium berghei*) において、ミトコンドリア移行シグナルを同定済である (J. Biochem., 2012)。この機能同定済の移行シグナルを核移行シグナルと置き換えた CAS9 プラスミドを構築する。オルガネラに移行した CAS9 は、gRNA によりオルガネラゲノム上の標的遺伝子座にリクルートされ、高効率で相同組み換えを起こすことが期待できる。

マラリア薬 atovaquone に対して耐性を獲得した原虫は、ミトコンドリアゲノムにコードされている cytochrome b 遺伝子の Y268 に変異が入ることを申請者らは突き止めており (Parasitol. Int., 2014)、Y268 変異が atovaquone 耐性と深く関わっていると推測している。ミトコンドリアゲノム編集技術開発のためのモデルとして、Y268C 変異を導入する実験系を用いる (詳細は「方法」を参照)。変異型 Y268C を導入された原虫株が atovaquone 耐性を示すか、耐性原虫株に目的の変異が挿入されたかを検証する。この実験により、ミトコンドリアのゲノム編集技術確立と同時に、cytochrome b 遺伝子変異と atovaquone 耐性との因果関係を実験的に証明する。本研究は、これまで不可能とされてきたオルガネラゲノムへの遺伝子操作を可能にする技術開発であり、この試みは世界初である。得られる知見は、マラリア原虫にとどまらず、一般生物学におけるオルガネラの機能、進化、共生といった、これまで推測や想像されてきた事柄を実験的に証明するものである。マラリア原虫の薬剤標的の多くはオルガネラであると考えられており、オルガ

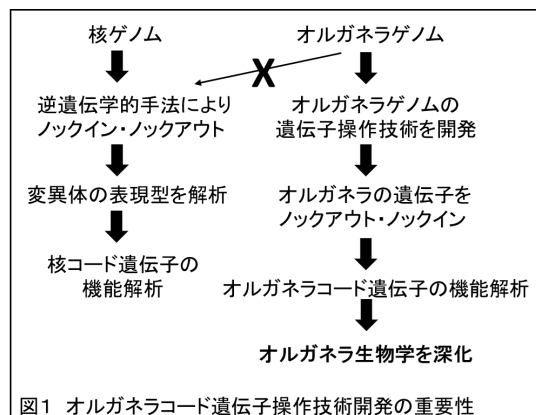


図1 オルガネラコード遺伝子操作技術開発の重要性

ネラゲノム上の遺伝子変異が薬剤耐性の原因であると“推測”されてきた。開発した技術を活用し、薬剤耐性と原虫側の遺伝子変異との関係を実験的に検証する。つまり、これまで不明だった薬剤の標的を確定する。明確化された薬剤標的に焦点を絞った新薬開発の研究基盤を固める。以上の点が本研究の目的である。

3. 研究の方法

本研究では、CRISPR/CAS9 によるオルガネラのゲノム編集を以下の方法で実施する。

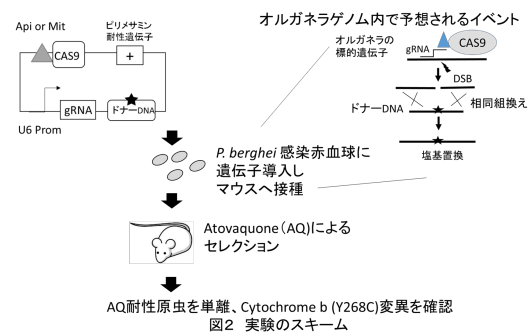
1. 既存の CAS9 の N 末と C 末には核移行シグナルが付加されており、CAS9 が核へ移行して核遺伝子の組換えを行っている。CAS9 の核移行シグナルをミトコンドリア移行シグナルに置き換えることで CAS9 をミトコンドリアへ移行させる。すでに申請者は、ネズミマラリア原虫 (*Plasmodium berghei*) のミトコンドリア移行シグナルを同定済である (J. Biochem., 2012)。オルガネラに移行した CAS9 は、gRNA によりオルガネラゲノム上の標的遺伝子座にリクルートされ、高効率で相同組み換えを起こすことが期待できる。

2. gRNA を drive する U6 Promoter の *P. berghei* オルソログをデータベースから単離する。以上、2 つの配列を既存の配列と置き換えることで *P. berghei* のオルガネラゲノム編集用プラスミドを構築する。

3. マラリア薬 atovaquone に対して耐性を獲得した原虫はミトコンドリアにコードされている cytochrome b 遺伝子に Y268L 変異が入ることを申請者らは突き止めている (Parasitol. Int., 2014)。この結果を踏まえ、ミトコンドリアゲノム編集技術開発のためのモデルとして cytochrome b 変異体 (Y268L) の作出をゲノム編集で試みる。Cytochrome b (Y268C) をドナー-DNA として上述のオルガネラゲノム編集用プラスミドに挿入する。さらに候補となる 4 つの gRNAs を Eukaryotic Pathogen CRISPR guide RNA/DNA Design Tool (<http://grna.ctegd.uga.edu/>) を用いて探索し、gRNAs を上述のゲノム編集用プラスミドに挿入する。完成したプラスミドを定法に従い *P. berghei* に電気穿孔法により導入し直ちにマウスへ接種する。原虫細胞内でプラスミドを保持させるためピリメサミン選択圧を一週間与え、その後アトバコンを経口投与すること目的の遺伝子に変異を持つ組換え体をスクリーニングした。

4. ミトコンドリア 1 個当たり数個から十数コピーのゲノムを持つ。従ってゲノム編集により変異を導入する標的遺伝子コピー数も多コピー存在する。すべての標的遺伝子コピーに変異導入することは困難である。従って、ゲノム編集で作成した組換え原虫クローンでは、野生型と変異型が混在している可能性が高い。このように野生型と変異型が混在するヘテロなゲノムコピー集団の変異解析には工夫が必要である。対策として、次世代シ

ーケンサーで取得するデータ冗長度を 1 万以上に設定する。具体的には、原虫 1 クローンあたり 1 Gb の配列を得る。*P. berghei* のミトコンドリアゲノムは 6kb なので、それぞれ冗長度約 2 万と 15 万のシーケンスデータが得られる。*P. berghei* 野生型全ゲノム配列をリファレンスとして CLC Genomic Working Bench を用いた統計処理により優位な変異を同定する。



4. 研究成果

1. CAS9 の N および C 末に存在する核移行シグナルを除去し、N 末にネズミマラリア原虫のミトコンドリア移行シグナルに置き換えたコンストラクトを作製し、これを野生型ネズミマラリア原虫に導入した。組換え原虫において抗 CAS9 抗体およびマイトトラッカーによるミトコンドリア染色を行った。その結果、CAS9 抗体によるシグナルとマイトトラッカーのシグナルはマージせず、CAS9 のミトコンドリアへの局在は確認できなかった。ミトコンドリア移行シグナルを N 末、C 末、あるいは両端に付加したプラスミドを構築し組み換え原虫を作製し、原虫細胞内の CAS9 の局在を検討したが、いずれの組換え原虫において CAS9 のミトコンドリアへの局在は確認できなかった。

2. 免疫蛍光染色は検出限界以下である可能性を想定し、当初計画とおり実験を行った。すなわち、作成した一連のプラスミドを野生型 *P. berghei* に導入、ピリメサミンによる選択圧を一週間負荷した。その後、アトバコンによる薬剤選択圧を与えた。アトバコン投与により血流中の感染赤血球は一旦消失した。アトバコン投与と停止約 1 週間後に感染赤血球を再び検出した(再燃)。再燃したマウスから全採血し、白血球除去、サポニン処理による溶血と洗浄を経たのちゲノム DNA を抽出、精製した。抽出したゲノム DNA において目的とする変異体の有無を確認するため、ドナー DNA として用いた領域の上流と下流にそれぞれプライマーを設定し、PCR を行い、その産物をダイレクトシーケンシングした。シーケンスの結果、変異に由来するシーケンス波形ピークは検出されなかった。従って、薬剤選択圧除去後に出現した原虫は、少なくとも大部分が野生型に起因すると考えられる。再燃したマウスから血液を単離し、ナイーブマウスに接種後にアトバコン投与を行ったが耐性原虫は確認されず、その後再燃

したマウスの血液サンプルを用いてゲノム DNA 抽出と PCR 産物のシーケンスを行ったが、変異体由来のシーケンスピークは得られなかった。さらに、アトバコン選択圧を負荷せずピリメサミンのみを負荷して原虫集団を得た。これについても PCR 産物のダイレクトシーケンスを行ったが野生型由来のシーケンスピークのみ検出された。以上の結果は、今回用いたミトコンドリア局在配列は CAS9 に付加することで局在活性が喪失したことを示唆している。さらに、たとえ一部の CAS9 タンパク質がミトコンドリアへ局在したとしても、ゲノム編集のコンポーネントである gRNA とドナー DNA がミトコンドリアへ局在する必要があるため、これら 3 つのハードルをクリアにすることが本実験系を成功に導くための要因であることが推察された。

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 5 件)

1. Direct evidence for the atovaquone action on the *Plasmodium* cytochrome bc1 complex. Siregar JE, Kurisu G, Kobayashi T, Matsuzaki M, Sakamoto K, Mi-ichi F, Watanabe Y, Hirai M, Matsuoka H, Syafruddin D, Marzuki S, Kita K. **Parasitol Int.** 2015 Jun;64(3):295-300. 査読有
 2. Toshihiro Mita, Shinichiro Tahibana, Makoto Hirai: *Plasmodium falciparum* Kelch13: A potential molecular marker for tackling artemisinin-resistant malaria parasites. **Expert Review of Anti-infective Therapy** 2016;14(1):125-35. doi: 10.1586/14787210.2016.1106938. 査読有
 3. Ebine K, Hirai M, Sakaguchi M, Yahata K, Kaneko O, Saito-Nakano Y. *Plasmodium* Rab5b is secreted to the cytoplasmic face of the tubovesicular network in infected red blood cells together with N-acylated adenylate kinase 2. **Malar J.** 2016 Jun 17;15:323. doi: 10.1186/s12936-016-1377-4. 査読有
 4. Honma H, Niikura M, Kobayashi F, Horii T, Mita T, Endo H, Hirai M. Mutation tendency of mutator *Plasmodium berghei* with proofreading-deficient DNA polymerase δ . **Sci Rep.** 2016 Nov 15;6:36971. doi: 10.1038/srep36971. 査読有
5. Ikeda M, Kaneko M, Tachibana SI, Balikagala B, Sakurai-Yatsushiro M, Yatsushiro S, Takahashi N, Yamauchi M, Sekihara M, Hashimoto M, Katuro OT, Olia A, Obwoya PS, Auma MA, Anywar DA, Odongo-Aginya EI, Okello-Onen J, Hirai M, Ohashi J, Palacpac NMQ, Kataoka M, Tsuboi T, Kimura E, Horii T, Mita T. Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum* with High Survival Rates, Uganda, 2014-2016. **Emerg Infect Dis.** 2018 Apr;24(4):718-726. doi: 10.3201/eid2404.170141. 査読有
- [学会発表](計 5 件)
1. 平井誠・池田恵美・橘真一郎・美田敏宏 『高頻度突然変異マラリア原虫を用いた薬剤耐性機構解明への挑戦』シンポジウム「生殖系列変異から捉える生物進化」第 39 回日本分子生物学会年会(2016 年 11 月 30 日。於：パシフィコ横浜)
 2. 平井誠「マラリア原虫の薬剤耐性機構解明に向けた取り組み」第 27 回感染研シンポジウム - 薬剤耐性菌の現状と対策 - (2017 年 5 月 22 日。国立感染症研究所)
 3. 平井誠「マラリアミューテーター：マラリア原虫薬剤耐性進化解明の新たな研究ツール」シンポジウム「原虫学・寄生虫学が現代のトップサイエンスにもたらす貢献」2017 年生命科学系学会合同次年会 (2017 年 12 月 6 日神戸ポートアイランド, 予定)
 4. Makoto Hirai, Mie Ikeda, Shin-Ichiro Tachibana, Toshihiro Mita Isolation of piperazine resistant rodent

malaria parasite from mutator malaria
Malaria: Chemotherapy and Drug Resistance
- Molecular Biology 11/7/2017 Baltimore
USA (アメリカ熱帯医学会)

5. Akimasa Maeta, Makoto Hirai, Toshiyuki
Mori, Toshihiro Mita
Pb102, a novel gene essential for female
fertility or ookinete maturation of murine
malaria parasite, Plasmodium berghei
11/7/2017 Baltimore USA (アメリカ熱帯
医学会)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平井 誠 (HIRAI, Makoto)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：50326849