

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15125

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適応因子の同定

研究課題名(英文) Molecular basis of the adaptation of Plasmodium knowlesi to human erythrocytes using mutator parasite lines

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトに感染する可能性があるサルマラリア原虫 *Plasmodium knowlesi* (Pk) のヒト適応機序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、責任遺伝子を同定する事を試みた。平成26年度に培養に成功した Pk 株に進化速度を早めるプラスミドを導入し、段階的にサル赤血球をヒト赤血球に置換したが、本研究期間中にはヒト赤血球で飛躍的に増殖率が増加した原虫を得ることはできなかった。さらに、蚊から分離されサルで維持されてきた Pk 株が低効率ながらもヒト赤血球に侵入することが分かった。

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, we generated a panel of mutator parasite lines in which mutation rate would be artificially increased. Continuous in vitro culture with rhesus monkey erythrocytes, in which amount of human erythrocytes are gradually increased, however, did not yield *P. knowlesi* line with increased growth speed during supported period. Furthermore, we found that Hackeri line that was isolated from a mosquito and maintained in monkey was also able to invade human erythrocytes even the frequency was low.

研究分野：基礎医学・寄生虫学(含衛生動物学)

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、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2013年にされた [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す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。

最近、ネズミマラリア原虫において DNAポリメラーゼ  $\delta$  の校正機能を欠失させることで、突然変異率が100倍程度増加する方法が発表された [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。平成25-26年度に課題名「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」の研究を行い、分離されて以来、培養系に適応することなくニホンザルで維持されてきた2株 (H-DMU株と Hackeri 株) の Pk の培養株化の樹立に成功し、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、研究室でルーチンに遺伝子導入を行える体制を整えることができた。

## 2. 研究の目的

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分子を遺伝子導入し、適応進化を加速することでヒト赤血球で効率よく増殖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

を目的とした。

## 3. 研究の方法

ヒト赤血球非増殖 *P. knowlesi* はアカゲザル赤血球と AlbuMAXII を用いて培養した。アカゲザル赤血球は医薬基盤研究所 霊長類医学科学研究センターから供与を受けた。*P. knowlesi* のクローニングは限界希釈法により行い、遺伝子導入は Nucleofector 2b device を用いた。

## 4. 研究成果

サルの赤血球で培養しているヒト赤血球非増殖 *P. knowlesi* H-DMU 株をクローン化し、4 クローンを得た。熱帯熱マラリア原虫 HSP86 プロモーターもしくは *P. knowlesi* DNA ポリメラーゼ  $\delta$  プロモーターにより、*P. knowlesi* の変異型 DNA ポリメラーゼ  $\delta$  (校正機能欠損、正確性欠損、校正機能+正確性欠損の3種類) を発現するプラスミドを導入し、遺伝子組換え原虫を作製した。野生型 DNA ポリメラーゼ  $\delta$  を発現するプラスミドを発現するコントロール原虫群も作製した。組換え DNA ポリメラーゼ  $\delta$  の発現は付与したタグ配列に対する抗体により確認できた。

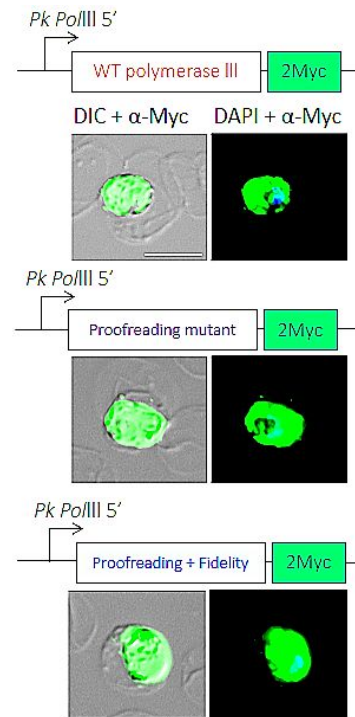


図1. 2myc エピトープタグを付与した組換え DNA ポリメラーゼ  $\delta$  を間接蛍光抗体法により検出した。

段階的に培地中のサル赤血球をヒト赤血球に置換しながら培養したが、本研究期間中には、ヒト赤血球で飛躍的に増殖率が増加した原虫を得ることはできなかった。時々、原因が不明ながらサルマラリア原虫の培養が不

安定化し、実験が中断することがあったが、大学院生をロンドン大学衛生熱帯医学大学院の共同研究者の研究室に派遣し、培養条件を再検討することで 24 時間で 3 倍の効率で増殖が可能となった。遺伝子導入等の手技の確立のために行った実験の結果を論文発表した。培養株化に世界で初めて成功した *P. knowlesi* の Hackeri 株のクローン化を行い、4 クローンを樹立した。Hackeri 株は蚊から分離され、サル体内で継代されてきた株であるにもかかわらず、ヒト赤血球に低効率ながらも侵入することが分かった。

## 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 1 件)

- (1) Lucky AB, Sakaguchi M, Katakai Y, Kawai S, Yahata K, Templeton TJ, Kaneko O. *Plasmodium knowlesi* Skeleton-Binding Protein 1 Localizes to the 'Sinton and Mulligan' Stipplings in the cytoplasm of monkey and human erythrocytes. *PLOS ONE* 11(10):e0164272. (2016) doi: 10.1371/journal.pone.0164272 査読有

[学会発表](計 7 件)

- (1) Lucky AB, Sakaguchi M, Katakai Y, Kawai S, Yahata K, Templeton TJ, Kaneko O. *Plasmodium knowlesi* SkeletonBinding Protein 1 Localizes to the 'Sinton and Mulligan' Stipplings in the Cytoplasm of Monkey and Human Erythrocytes. U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program. Novotel Ambassador Seoul Gangnam 130 Bongeunsa ro Gangnam gu Seoul (Seoul, Republic of Korea) (2017 Feb 7-9) (口頭)
- (2) Lucky AB, Sakaguchi M, Katakai Y, Kawai S, Yahata K, Templeton TJ, Kaneko O. *Plasmodium knowlesi* Skeletal Binding Protein 1 (PkSBP1) localises to Sinton and Mulligan stipplings in infected monkey and human erythrocytes. London-Nagasaki Networking Meeting, London School of Hygiene and Tropical Medicine Week. London School of Hygiene and Tropical Medicine (London. UK) (2016 Sep 19-23) (ポスター)
- (3) Asare KK, Lucky AB, Chitama BYA, Asada M, Miyazaki S, Sakaguchi M, Katakai Y, Kawai S, Yahata K, Kaneko O. Characterization of Maurer's cleft-like structures in *Plasmodium knowlesi*-infected erythrocyte 第 5 回感染症若手フォーラム、淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県淡路市) (2016 Sep 4 - 6) (口頭)
- (4) Lucky AB, Sakaguchi M, Katakai Y, Kawai

S, Yahata K, Templeton TJ, Kaneko O. *Plasmodium knowlesi* Skeleton-Binding Protein 1 Localizes to the 'Sinton and Mulligan' Stipplings in the Cytoplasm of Monkey and Human Erythrocytes. (poster) TICAD VI Pre-event; The 3rd International Symposium for the Promotion of Science and Technology Innovation Cooperation between Africa and Japan. -Life Innovation and Green Innovation-, JICA 研究所国際会議場 (東京都新宿区) (2016 July 13)

- (5) Lucky, AB, 坂口美亜子, 宮崎真也, 加賀谷 渉, 片貝祐子, 川合 覚, 矢幡一英, Templeton T, 金子修 マラリア原虫による寄生赤血球の改変 Workshop 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会、神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市) (2015 Dec 1 - 4) (招待・オーガナイザー) (口頭)
- (6) Lucky AB, Sakaguchi M, Katakai Y, Kawai S, Yahata K, Templeton T, Kaneko O. Transport and localisation of *Plasmodium knowlesi* Skeletal Binding Protein 1 (SBP1) in infected monkey and human erythrocytes (poster) The 14th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji Yumebutai International Conference Center (兵庫県淡路市) (2015 Sep 8-11)
- (7) Lucky AB, Sakaguchi M, Katakai Y, Kawai S, Yahata K, Templeton T, Kaneko O. Transport and localisation of *Plasmodium knowlesi* Skeletal Binding Protein 1 (SBP1) in infected monkey and human erythrocytes. 第 4 回感染症若手フォーラム、アテーナ海月 (兵庫県淡路市) (2015 Sep 6 - 8) (口頭)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

## 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: 5 0 3 2 5 3 7 0

### (2)研究分担者

川合 覚 (KAWAI, Satoru)  
獨協医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 7 0 2 7 5 7 3 3

### (3)研究協力者

片貝 祐子 (KATAKAI, Yuko)  
(社) 予防衛生協会・研究支援開発部・

部長

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

アムザ ビヤルハンガ ラッキー (LUCKY,  
Amuza Byarhanga)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(新興感染症病態制御学系)・博士課程大学院生

クワメ クミ アサレ (ASARE, Kwame  
Kumi)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(新興感染症病態制御学系)・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