

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19089

研究課題名(和文)新規ミューテーターマラリア原虫の開発と突然変異体創出システムの構築

研究課題名(英文) Development of mutator *Plasmodium falciparum* and its application for mutants generation.

研究代表者

本間 一 (Honma, Hajime)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：10617468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：CRISPR/Cas9を用いて、熱帯熱マラリア原虫3D7株の主要なミスマッチDNA修復タンパク質のひとつと考えられるMSH2-1の513番目のプロリンをスレオニンへ置換した変異体を作製した。野生型原虫(3D7株)とMSH2-1変異体をin vitro培養系で約200日間継代し、その間に自然発生した突然変異を次世代シーケンサーでゲノムワイドに評価した。MSH2-1変異体ではマイクロサテライトにおける挿入・欠失変異の増加やサブテロメア領域の構造変異の増加が認められた。

研究成果の概要(英文)：MSH2-1 is thought to be one of the major DNA mismatch repair proteins of *Plasmodium* species. The MSH2-1 mutant of *P. falciparum* 3D7 was generated by substituting the 513rd proline to threonine with CRISPR/Cas9 based gene editing. The parent strain 3D7 and the MSH2-1 mutant were maintained by the continuous in vitro culture for around 200 days, and then spontaneous mutations were genome-widely evaluated by high-throughput sequencing. Increases of insertion/deletion mutations in microsatellites and structural variants in subtelomeric regions were observed in the MSH2-1 mutant.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア *Plasmodium falciparum* MSH2 ミスマッチDNA修復 CRISPR/Cas9 ミューテーター

### 1. 研究開始当初の背景

マラリアは毎年 2 億人の感染者と 70 万人近くの死亡者を出しており、エイズ、結核とともに世界三大感染症のひとつに数えられている。マラリアの制御を困難にしている一因が薬剤耐性原虫の出現と流行地域への拡散である。最も重篤なマラリアを引き起こす熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* では、過去あらゆる抗マラリア薬に対して耐性株が出現してきた。最近では、現在最も有効とされるアルテミシニンに対しても耐性株が報告されてきている。マラリア制圧を達成していくためには、薬剤耐性など重要な形質に関するより詳細な生物学的理解が必須であり、これまでにない革新的な研究アプローチが求められる。

もし、フィールドでの薬剤耐性原虫の出現に先んじて実験室で耐性株をつくりその耐性メカニズムを解明できれば、抗マラリア薬のより有効な使用プログラムの策定につながられる。マラリア原虫が薬剤耐性などの新規形質を獲得する原動力はゲノムに生じる突然変異である。そのため、突然変異率が上昇した変異体（ミューテーター）は薬剤耐性などの突然変異体を実験室において効率的に生み出せる可能性があり、新しい順遺伝学的研究ツールとして有用かもしれない。これまで、核ゲノム DNA の複製を担う DNA ポリメラーゼ  $\delta$  の校正機能をネズミマラリア原虫 *P. berghei* ANKA において欠損させることで、ミューテーターネズミマラリア原虫（以下、PbMut）が開発された。PbMut についてゲノム解析が行われた結果、野生株よりも突然変異率が約 40 倍高いが、生じる変異の種類に「偏り」があることが示された。この結果は、PbMut が順遺伝学的研究ツールとして有用である可能性を示唆する一方、創出しうる遺伝的多様性には限界があることを意味する。

多様な突然変異体を効率的に創出する系を構築するには、PbMut に加えて異なるタイプのミューテーター原虫を開発することが有効と考えられる。DNA 複製の際に生じる誤った塩基の対（ミスマッチ）はミスマッチ DNA 修復機構により認識され除去されるが、この機能の欠損は一般に突然変異率を 100-1,000 倍高めるとされている。DNA 修復には種々のタンパク質が関わるが、必須なものの一つに MSH2 (MutS homolog 2) がある。MSH2 はミスマッチの認識を担い、その機能欠損は強力なミューテーター形質を付与することが出芽酵母やヒト細胞の研究でわかっている。興味深いことに、マラリア原虫は真核生物で唯一、MSH2 の遺伝子をゲノムに 2 個 (MSH2-1 遺伝子と MSH2-2 遺伝子) 持っている。ネズミマラリア原虫を用いて行われた大規模ノックアウトプロジェクトの結果、MSH2-1 遺伝子のノックアウトは著しい増殖速度の低下を引き起こし重要な働きを担うと考えられるが、詳細はわかっていない。

### 2. 研究の目的

ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 システムを用いることで、熱帯熱マラリア原虫の MSH2-1 遺伝子に変異を導入し新規のミューテーター原虫を開発する。熱帯熱マラリア原虫は最重要視されるヒトマラリア原虫であり、この原虫での実験系の構築は意義が大きい。開発した変異体において自然発生する突然変異を解析することで MSH2-1 が原虫ゲノムの安定性にどのように寄与しているかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) CRISPR/Cas9 による熱帯熱マラリア原虫のゲノム編集の条件検討

熱帯熱マラリア原虫 3D7 株でゲノム編集を行うためにプラスミドをエレクトロポレーションした後、ゲノム編集に成功した原虫を得るために薬剤による選択を行う必要がある。本研究では、選択薬剤にピリメサミンとブラストサイジン S を用いることとした。この実験系の検討のため、CRISPR/Cas9 による熱帯熱マラリア原虫の P230p 遺伝子への赤色蛍光タンパク質 GuajilloRFP 発現カセットの挿入を試みた。図 1 に示す二つのプラスミドを構築し、エレクトロポレーション後の薬剤選択のスケジュールなど一連のプロトコルを検討した。

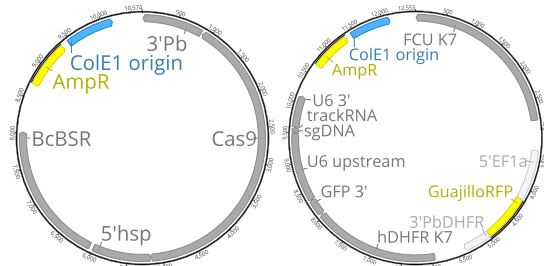


図 1. P230p 遺伝子のゲノム編集に用いたプラスミド。

#### (2) 熱帯熱マラリア原虫 MSH2-1 遺伝子のゲノム編集

熱帯熱マラリア原虫 MSH2-1 遺伝子の 513 番目のプロリンをスレオニンに置換した変異体（以降、MSH2-1 変異体）の作製を試みた。熱帯熱マラリア原虫 MSH2-1 遺伝子における P513T の変異は、出芽酵母 MSH2 遺伝子において 100 倍以上の突然変異率の上昇を引き起こす変異 P640T に相当する。熱帯熱マラリア原虫 MSH2-1 遺伝子への P513T の変異導入のため、図 2 に示す二つのプラスミドを構築した。熱帯熱マラリア原虫 3D7 株の感染赤血球に図 2 のプラスミドをエレクトロポレーションし、ピリメサミンとブラストサイジン S で薬剤選択を行った。増殖してきた原虫の MSH2-1 遺伝子に P513T の変異が導入されているかをサンガーシーケンス解析により確認した。変異が確認された場合、限外希釈によるクローニングを行った。

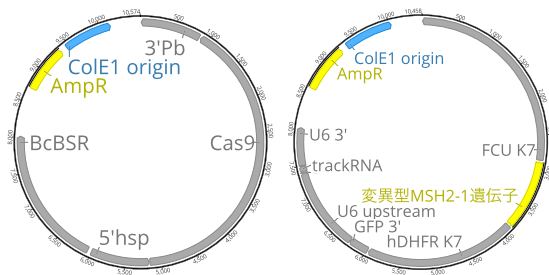


図 2. MSH2-1 遺伝子のゲノム編集に用いたプラスミド。

### (3) 増殖試験

MSH2-1 遺伝子への P513T の変異の導入が原虫の増殖に及ぼす影響を調べるため、野生型原虫と MSH2-1 変異体の増殖を *in vitro* の培養系で比較した。野生型原虫と MSH2-1 変異体について初期パラシテミア 0.1% で培養を開始し、パラシテミアの確認のため一日 2 回の顕微鏡観察を 10 日間行った。増殖試験はそれぞれの原虫について 6 反復で行った。得られた結果をロジスティック方程式にフィットさせ、成長速度と最大パラシテミアの値を野生型原虫と MSH2-1 変異体の間で比較した。

### (4) ゲノムワイド変異解析

野生型原虫と MSH2-1 変異体についてそれぞれ独立した 6 系統の継代ラインを設け、*in vitro* での培養を 200 日前後行った。この継代培養の間に自然発生した変異を同定するため、Illumina HiSeq4000 でゲノムシーケンス解析を行った。得られた配列データを用いて、一塩基置換、挿入・欠失 (インデル)、ゲノム構造変異を検出した。

## 4. 研究成果

### (1) CRISPR/Cas9 による熱帯熱マラリア原虫のゲノム編集の条件検討

プラスミドをエレクトロポレーションした日を 0 日目としたとき、1-6 日目に 50 ng/mL ピリメサミンと 2.5 μg/mL プラストサイジン S を培地に加え、7 日目以降は 2.5 μg/mL プラストサイジン S のみを培地に加えて薬剤選択を行った。その結果、19 日目に原虫の増殖が認められたため、P230p 遺伝子上に挿入配列を挟むように設計したプライマーを用いて PCR による確認を行ったところ、図 3A のようにバンドシフトが確認された。この PCR 産物についてサンガーシーケンス解析を行ったところ、P230p 遺伝子領域に GuajilloRFP 発現カセットの挿入が認められた。この原虫を 40 μM 5-フルオロシトシンを培地に加えることでネガティブセレクションを行い、プラスミドを保有しない原虫 (以降、GR) を得た。GR を蛍光顕微鏡下で観察したところ、図 3B のように赤色蛍光が観察された。

以上の結果から、熱帯熱マラリア原虫 3D7 株の CRISPR/Cas9 によるゲノム編集の手順が確立された。

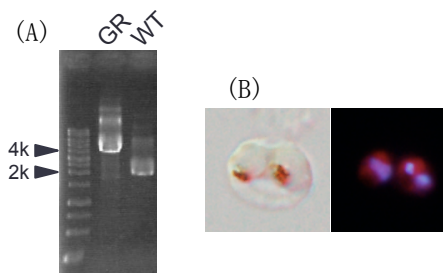


図 3. (A) ゲノム編集の確認で行った PCR の電気泳動像。CRISPR/Cas9 を行った原虫 (GR) では野生型原虫 (WT) よりも約 2k bp 長い産物が得られ、P230p 遺伝子に GuajilloRFP 発現カセットが挿入されたことが確認された。(B) GR 感染赤血球の明視野と蛍光視野における微分干渉顕微鏡画像。Hoechst33342 を用いて核を染色した。GR では原虫の細胞質において赤色蛍光が観察された。

### (2) 熱帯熱マラリア原虫 MSH2-1 遺伝子のゲノム編集

図 2 に示すプラスミドを熱帯熱マラリア原虫 3D7 株にエレクトロポレーション後、GR と同様に薬剤選択を行ったところ、24 日目に原虫の増殖が確認された。サンガーシーケンス解析を行ったところ、MSH2-1 遺伝子に目的の変異の導入が確認された (図 4)。増殖原虫について限外希釈によるクローニングを行い、MSH2-1 変異体を得た。



図 4. CRISPR/Cas9 を用いて熱帯熱マラリア原虫 MSH2-1 遺伝子の 513 番目のプロリン (CCA) をスレオニン (ACA) へ置換した。この変異の近傍にシールド変異としてアミノ酸置換を伴わない A>T の塩基置換も導入した。

### (3) 増殖試験

ギムザ染色した薄層血液塗抹標本を顕微鏡観察し、パラシテミアを測定した。1 日 2 回の観察を 10 日間行い、得られた結果をロジスティック方程式にフィットさせ、野生型と MSH2-1 変異体それぞれについて増殖速度とパラシテミアの最大値を求めた。原虫の増殖速度については野生型原虫と MSH2-1 変異体の間で統計学的に有意な差は認められなかった (図 5A)。一方で、パラシテミアの最大値については MSH2-1 変異体が野生型原虫よりも 1% 水準で有意に低かった (図 5B)。

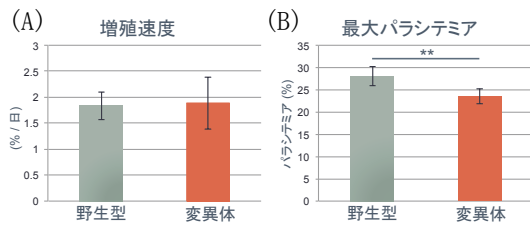


図5. 野生型原虫とMSH2-1変異体について10日間観察したパラシテミアの結果をロジスティック方程式にフィットさせて算出した(A)増殖速度と(B)最大パラシテミア。エラーバーは標準偏差を表す。\* $P < 0.01$  (ウェルチのt検定)。

#### (4) ゲノムワイド変異解析

約200日間継代培養を行った野生型原虫とMSH2-1変異体において蓄積した突然変異を次世代シーケンサーでゲノムワイドに評価した。野生型原虫と比較して、MSH2-1変異体ではマイクロサテライトにおける挿入・欠失変異の増加が示唆された。また、MSH2-1変異体では染色体末端のサブテロメア領域において相同組換えなどのゲノム構造変異が増加傾向にあることが示唆され、この領域の不安定化が引き起こされていると考えられた。MSH2-1変異体におけるサブテロメア領域のゲノム構造変異の結果、遺伝子の消失、獲得または融合が生じており、ダイナミックな遺伝的多様性の創出が観察された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- (1) [Honma H](#), Kawai S, Motooka D, Nakamura S, Tougan T, Horii T, Arisue N. Draft Genome Sequence of *Plasmodium gonderi*, a Malaria Parasite of African Old World Monkeys. *Genome Announc.* 2017 13;5(28). pii: e00612-17. doi: 10.1128/genomeA.00612-17. 査読有
- (2) [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  $\delta$ . *Sci Rep.* 2016 15;6:36971. doi: 10.1038/srep36971. 査読有
- (3) Tanabe K, Zollner G, Vaughan JA, Sattabongkot J, Khuntirat B, [Honma H](#), Mita T, Tsuboi T, Coleman R. *Plasmodium falciparum*: Genetic diversity and complexity of infections in an isolated village in western Thailand. *Parasitol Int.* 2015 64(3):260-6. doi: 10.1016/j.parint.2013.09.011. 査読有
- (4) [Honma H](#), Hirai M, Nakamura S, Hakimi H, Kawazu S, Nirianne MQP, Hisaeda H,

Matsuoka H, Kawai S, Endo H, Yasunaga T, Ohashi J, Mita T, Horii T, Furusawa M, Tanabe K. Generation of rodent malaria parasites with a high mutation rate by destructing proofreading activity of DNA polymerase  $\delta$ . *DNA Res.* 2014 21(4):439-46. doi: 10.1093/dnares/dsu009. 査読有

[学会発表] (計6件)

- (1) [本間一](#)、高橋延之、杉下智彦 熱帯熱マラリア原虫のDNA修復タンパク質MSH2-1変異体の作製と性状解析 第87回日本寄生虫学会 2018年
- (2) 彦坂健児、馮雪、[本間一](#)、松崎素道、元岡大祐、中村昇太、野呂瀬一美、北潔 ディープシーケンスによるマラリア原虫のアトバコン耐性に関わる点変異の解析 第87回日本寄生虫学会大会 2018年
- (3) Nobuko Arisue, [Hajime Honma](#), Satoru Kawai, Takahiro Tougan, Toshihiro Horii Whole-genome sequencing of a *Plasmodium gonderi* and evolutionary relationship of malaria parasites International Union of Microbiological Societies IUMS2017: 15th International Congress of Bacteriology & Applied Microbiology 2017
- (4) 有末伸子、[本間一](#)、川合覚、東岸任弘、元岡大祐、中村昇太、田邊和裕、堀井俊宏 大量ゲノムデータを用いたマラリア原虫の系統解析 第24回分子寄生虫学ワークショップ&第14回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 2016年
- (5) 彦坂健児、[本間一](#)、松崎素道、野呂瀬一美、北潔 マラリア原虫の遺伝子点変異によるアトバコン耐性獲得様式の解明 第85回日本寄生虫学会大会 2016年
- (6) 有末伸子、[本間一](#)、川合覚、東岸任弘、田邊和裕、堀井俊宏 サルマラリア原虫 *Plasmodium gonderi* のゲノム解析-マラリア原虫の系統関係解明に向けて- 第23回分子寄生虫学ワークショップ&第13回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 2015年

[その他]

ホームページ等

- (1) <https://twmu-inttrop.info/>
- (2) <http://www.twmu.ac.jp/univ/news/?kbn=1&ym=201612>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

[本間一](#) (HONMA, Hajime)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号: 10617468