

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15265

研究課題名(和文)ハイスループットな人工染色体ライブラリー作製技術の実現

研究課題名(英文) Realization of high-throughput artificial chromosome library fabrication technology

研究代表者

油田 正夫 (yuda, masao)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：90293779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：マラリア人工染色体ライブラリーは遺伝子のゲノムワイドな機能的スクリーニングを可能にする革新的なツールであり、薬剤耐性遺伝子の同定などポストゲノム研究への多様な応用が期待されている。しかしながら従来のライブラリー作製法は複雑な工程から成り、その技術的なハードルの高さが普及を妨げてきた。本研究の目的は最新のトランスポゼース技術を応用し、1ステップで人工染色体ライブラリーを作製する新技術を確立することにある。本技術はモデル生物でも実現していないハイスループットかつゲノムワイドな遺伝子解析を実現し、耐性遺伝子同定や変異体原因遺伝子の探索など多くの研究においてNGSに代わり利用されることになるだろう。

研究成果の概要(英文)：The malaria artificial chromosome library is an innovative tool that enables genome-wide functional screening of genes and is expected to be applied to a wide variety of post-genomic studies such as identification of drug-resistant genes. However technical difficulties has prevented it from being popularized. For example, it is difficult to analyze multiple samples at the same time because of the complexity of the production processes. The purpose of this research is to a establishe a new technology for producing an artificial chromosome library in a single step by applying the latest transposon technology. This technology realizes genome-wide gene analysis that is not realized even in the model organisms. It will be used in place of NGS in many studies, such as gene identification and gene discovery.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア 人工染色体

1. 研究開始当初の背景

マラリア原虫人工染色体はセントロメアと末端のテロメア配列から成る構造を持つ疑似染色体であり(1)数十から数百 kb の巨大な DNA 断片を安定して保持できる。(2)染色体と同様に高効率で分配され、かつ1コピーで保持される。(3)従来のプラスミドを利用した方法に比べ、100倍以上の極めて高効率で原虫に導入できる。という優れた特性を持つ(岩永他 Cell host & microbe 2010)。我々はこの特性を利用して、ゲノムをマルチカバーする人工染色体ライブラリーを原虫内で作製する手法を確立した(岩永他 Genome research 2012)。この方法は遺伝子をその機能(表現型)に基づいてゲノムワイドに探索することを可能にする革新的技術であり、現在我々は薬剤耐性遺伝子のスクリーニングに応用している。一方従来のライブラリー作製法は大量のゲノム DNA の調整とそれに続く複数のステップ(DNA の部分消化、ライゲーション、直鎖化等)から成り、多検体を同時に解析することは困難であった。また高度な技術と経験を要するため普及が進んでいなかった。研究代表者は今回トランスポゼース技術を応用して本工程を劇的に簡略化する方法を着想した。

2. 研究の目的

マラリア人工染色体ライブラリーは遺伝子のゲノムワイドな機能的スクリーニングを可能にする革新的なツールであり、薬剤耐性遺伝子の同定などポストゲノム研究への多様な応用が期待されている。しかしながら従来のライブラリー作製法は複雑な工程から成り、多検体を同時に解析することは困難であった。またその技術的なハードルの高さが普及を妨げてきた。本研究の目的は最新のトランスポゼース技術を応用することでこの工程を簡略化し、1ステップでマラリア原虫人工染色体ライブラリーを作製する新技術を確立することにある。この技術が実現すればマラリア原虫で少量のゲノムを利用したハイスループットな機能的解析が可能となる。少量の原虫ゲノムを用いた解析が可能となれば、患者血から直接抽出したゲノムを解析に利用でき、培養により株を樹立する必要がなくなる。このことにより本技術のフィールドへの応用が促進されるだろう。またこの成功は他の分野での人工染色体技術の発展にも寄与するだろう。

3. 研究の方法

Tn5 トランスポゼースはトランスポゾン末端配列に特異的に結合する2つの DNA 結合部位を持つトランスポゼースで、この配列に挟まれた DNA のループとトランスポゼースの複合体がトランスポソームである。Tn5 トランスポソームはマグネシウム存在下で二本鎖 DNA を切断し自身に結合していた DNA

をその部位に挿入する()。一方 DNA をループ状でなく独立した断片として結合

させれば、DNA をランダムに切断し断端に配列を結合させることができる()。今回の方法の要点は人工染色体作製の主要なステップである DNA 断片化とテロメア配列の付加を の活性を利用して瞬時にを行い、テロメア配列を結合した直鎖 DNA をゲノムから直接調製する点にある。またセントロメアは の反応を利用し、同時に内部に挿入する。したがって予め作製した2種類のトランスポソームをゲノム DNA と均等に混合し、マグネシウムを添加するだけで直鎖型人工染色体を作製できる(+)。さらにこの反応は生理的条件下で実施されるため反応液は直接に遺伝子導入に用いることができる。したがって本法では使用する DNA のロスがほとんどなく、少量の原虫 DNA から1ステップでゲノム全体をカバーするライブラリーの作製が可能である。

具体的にはまずテロメア配列付加用及びセントロメア (+選択マーカー)挿入用の2種類のコンストラクトを構築する。このコンストラクトをもとにトランスポソームを作製する。次にテロメア配列付加用トランスポソームを用い実際のマラリア原虫ゲノムを切断し、ゲノムが10 kbp 以上の断片になる最少量を決定する。同様にセントロメア挿入用のトランスポソームを作製しユニットを決定する。定量した2種類のトランスポソームを使用して実際に人工染色体ライブラリーを作製する。

4. 研究成果

(1)テロメア配列付加用コンストラクトの作製

テロメア配列は、研究代表者らがすでに所有している人工染色体作製用コンストラクトから PCR で必要部分を増幅することで調整した。この断片を epicentre 社のトランスポゾンプラスミドベクターにサブクロニングしトランスポゾン末端配列を付加した。最後にトランスポゾン末端配列を付加した断片を切り出し精製した

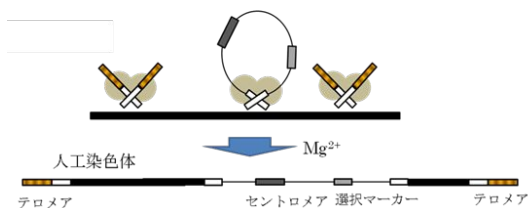
(2)セントロメア (+選択マーカー)挿入用コンストラクトの作製

セントロメア配列はテロメア配列と同様に研究代表者らがすでに所有している人工染色体作製用コンストラクトから PCR で必要部分を増幅することで調整した。選択マーカーとしては human DHFR と GFP の両者を bidirectional なプロモーターで誘導するコンストラクトを使用した。この断片を epicentre 社のトランスポゾンプラスミドベクターにサブクロニングしトランスポゾン末端配列を付加した。最後にトランスポゾン末端配列を付加したセントロメア (+選択マーカー)挿入用コンストラクトを切り出し精製した

(3)テロメア配列付加用トランスポソーム作製とトランスポソーム活性の評価
 テロメア配列付加用トランスポソームの作製は精製したトランスポソン末端配列を付加した断片とトランスポゼースとを溶液中で混合することで実施した。次に作製したテロメア配列付加用トランスポソームの定量を、熱帯熱マラリアゲノムを用いて実施した。まずおおもとのテロメア配列付加用トランスポソームから希釈系列を作製し、大部分の断片が 10 kbp 以上になる濃度をアジレント社のバイオアナライザーを用いて決定した。DNA 1 µg を 10 kbp 以上に切断する最少量を 1 ユニットとした。

(4)セントロメア挿入用トランスポソームの作製
 セントロメア挿入用トランスポソームの作製はテロメア配列付加用トランスポソーム作製と同様に精製したトランスポソン末端配列を付加した断片とトランスポゼースとを溶液中で混合することで実施した。セントロメア挿入用トランスポソームは DNA の切断では定量できないため、テロメア配列付加用トランスポソームと同様の希釈で同等の挿入活性が得られると推測し、テロメア配列付加用トランスポソームの 2 倍程度のユニットを人工染色体作製に使用することとした。

(5)人工染色体作製
 熱帯熱マラリア原虫ゲノムを用いて人工染色体を上記のトランスポソームから作製した。ゲノム 1 µg に対しトランスポソームストックを 1 ユニット(テロメア)対 2 ユニット(セントロメア)の割合で加え混合した。この溶液にマグネシウムを加えトランスポソームを活性化した。30 分インキュベートし反応を完了した(下図)。



現在完成した人工染色体ライブラリーの評価を実施している。十分な完成度があると評価されれば今後ライブラリーを直接導入法で熱帯熱マラリア原虫に導入し FACS で GFP 陽性原虫の割合を解析しトランスフェクションの効率を評価する。またセントロメア挿入用トランスポソームの量は異なった比率で複数回トランスフェクションを行うことにより最適化する予定である。マラリア原虫に導入する予定である。24 時間後に FACS で GFP 陽性原虫の割合を解析しトランスフェ

クションの効率を評価する。最終的に最適化した条件をもとに薬剤耐性株からライブラリーを作製し、耐性遺伝子の同定を試みる予定である。

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 5 件) 全て査読有

1. Akbari M, Kimura K, Bayarsaikhan G, Kimura D, Miyakoda M, Juriasingani S, Yuda M, Amino R, Yui K. (2018) Nonspecific CD8+ T Cells and Dendritic Cells/Macrophages Participate in Formation of CD8+ T Cell-Mediated Clusters against Malaria Liver-Stage Infection. *Infect Immun.* 22;86(4).
2. Shiratsuchi T, Rai U, Kaneko I, Zhang M, Iwanaga S, Yuda M, Tsuji M. (2017) A potent malaria vaccine based on adenovirus with dual modifications at Hexon and pVII. *Vaccine.* 15;35(50):6990-7000. doi: 10.1016/j.
3. Bayarsaikhan G, Miyakoda M, Yamamoto K, Kimura D, Akbari M, Yuda M, Yui K. (2017) Activation and exhaustion of antigen-specific CD8+ T cells occur in different splenic compartments during infection with *Plasmodium berghei*. *Parasitol Int.* 66(3):227-235.
4. Li X, Huang J, Kaneko I, Zhang M, Iwanaga S, Yuda M, Tsuji M. (2017) A potent adjuvant effect of a CD1d-binding NKT cell ligand in human immune system mice. *Expert Rev Vaccines.* 16(1):73-80
5. Zhang M, Kaneko I, Tsao T, Mitchell R, Nardin EH, Iwanaga S, Yuda M, Tsuji M. (2016) A highly infectious *Plasmodium yoelii* parasite, bearing *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. *Malar J.* 15(1):201.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. マラリア原虫の AP2-FG は雌生殖母体形成のマスター転写因子である、口頭、村田 優穂, 金子 伊澄, 加藤 知美, 岩永 史郎, 油田正夫, 第 87 会日本寄生虫学会大会、2018/3/17,18、国内
2. Cas9 恒常発現マラリア原虫を用いた CRISPR/Cas9 法による革新的遺伝子組換え法の確立 新澤直明、日吉郁哉、日野明紀菜、油田正夫、岩永史朗 第 87 会日本寄生虫学会大会、2018/3/17,18、国内
3. 熱帯熱マラリア原虫セントロメアプラスミドを用いた新規薬剤耐性遺伝子同定法の開発 岩永史朗、加藤知美、油田正夫

第 86 会日本寄生虫学会大会 2017/5/28

国内

4. 油田正夫 マラリア原虫転写制御機構研究 最近の成果と今後の展開 第 87 会
日本寄生虫学会西日本支部会、
2016/10/16、国内

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.medic.mie-u.ac.jp/idoubutsu/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

油田 正夫 (YUDA, MASAO)

三重大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90293779

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()