

平成21年 4月 17日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19790307  
 研究課題名 (和文) 熱帯熱マラリア原虫人工染色体の作製と応用

研究課題名 (英文) Construction of artificial chromosome of Plasmodium falciparum

## 研究代表者

岩永 史朗 (IWANAGA SHIROH)  
 鳥取大学・医学部・講師  
 研究者番号:20314510

## 研究成果の概要：

熱帯熱マラリア原虫の新規遺伝子操作ツールの開発を目的とし、熱帯熱マラリア原虫人工染色体の開発を試みた。まず、人工染色体開発に必須なセントロメア領域をクローニングし、これを組込んだプラスミドを作製した。さらにこれにテロメアを組み込み、人工染色体を作製した。セントロメアプラスミド及び環状人工染色体は実際に染色体様に挙動し、新規ツールとして有効であることが示された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

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：マラリア原虫・人工染色体

## 1. 研究開始当初の背景

マラリア原虫の分子生物学は1993年の遺伝子導入法の開発に始まり、2002年の熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) 全ゲノム配列解読により大きく前進した。この分野の研究成果は新規薬剤及びワクチン開発に大きく貢献すると期待され、世界各国で様々な研究が活発に進められている。よって、研究を強力に推進する新規遺伝子ツールの開発や技術革新は極めて重要な課題であり、多くの研究者に切望されている。一方、申請者はオランダ・ライデン大学・Andrew P Waters 教授の下に留学し、独自に

クローニングしたセントロメア (動原体) を組込んだネズミマラリア原虫 (*P. berghei*) 人工染色体の開発に世界で初めて成功して、これまでの技術とは一線を画す新規遺伝子導入法の開発を完了している。この技術の特徴は次のような点である。

(1) ネズミマラリア原虫人工染色体は大腸菌とのシャトルベクターとして設計され、通常の大腸菌を用いた遺伝子操作技術により、自由に改変することが可能である。

(2) 原虫には従来、用いられてきたエレクトロポレーション法により、高効率且つ簡便に導入することができる。

(3) ネズミマラリア原虫人工染色体は原虫の細胞分裂時に、実際の染色体と同様に挙動して、99.7%の効率で娘細胞へと分配される。これにより血液・肝臓・蚊の全ての成育ステージにおいて、薬剤非存在下で極めて安定的に遺伝子を発現する組換え原虫を作出することができた。

## 2. 研究の目的

以上の研究成果を受け、本研究では「熱帯熱マラリア原虫人工染色体の作製と応用」計画する。具体的にはまず、熱帯熱マラリア原虫のゲノムを解析し、染色体分配に関わるセントロメア領域の同定と機能的証明を行い、続いて同じく、ゲノムを解析し、テロメア領域を組み込み、人工染色体を作製する。本研究の成果はマラリア原虫の分子生物学に新たな視点を与え、その発展に大きく寄与すると期待される。また、ネズミマラリア原虫での成功を熱帯熱マラリア原虫に適用することで、新規薬剤・ワクチン開発の成功をより実現性の高いものへと導くと期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) 熱帯熱マラリア原虫のセントロメア領域の推定

既に決定・公開されている熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum* 3D7) の全ゲノム配列に対し、Artemis10 及び Dotlet などのプログラムを使用し、A/T 含量・繰返し配列の存在を指標にゲノム上のセントロメアの位置・配列を正確に推定する。続いてこれを基に全染色体より、セントロメアを PCR によりクローニングする。

### (2) セントロメアプラスミドの構築

セントロメアを組み込んだプラスミド(図1, セントロメアプラスミド)を構築する。セントロメアプラスミドには緑蛍光タンパク質 (GFP) とヒト由来ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (*hdhfr*) を組み込む。大腸菌とのシャトルベクターとして設計する。また、このセントロメアプラスミドに組み込む遺伝子等はセントロメア以外、全てネズミマラリア原虫 (*P. berghei*) 由来のものを使用する。

### (3) セントロメアプラスミドの原虫へ導入

セントロメアプラスミドを同調培養した熱帯熱マラリア原虫にエレクトロポレーション法により導入する。次に常法に従い、薬剤(ピリメサミン)添加培地を用いて、感染赤血球(人工染色体保持原虫)が出現するまで培養する。出現後、薬剤非添加培地を用い、更に培養を継続する。寄生率が3%に達したら、継体培養し、これを繰り返す。

### (4) セントロメアの機能評価

原虫の継体時に一部を採取し、核染色する。次に蛍光顕微鏡により核染色された原虫(全原虫)中の GFP 発現原虫(セントロメアプラスミド保持原虫)の割合を計算し、人工染色体の安定性を検討し、セントロメアの機能を評価する。また、原虫よりセントロメアプラスミドを回収し、その状態をサザンハイブリダイゼーションにより確認する。

### (5) テロメア配列の解析

公開されている熱帯熱マラリア原虫のテロメア領域の配列と我々研究グループが独自に得ていたネズミマラリア原虫のテロメア配列を比較する。

### (6) 人工染色体の構築

テロメアをコードする DNA 断片の両端に制限酵素領域を導入し、その後、二つのテロメア DNA 断片を向かい合わせにクローニングしたテロメアカセットを作製する。次にこれをセントロメアプラスミドに組み込み、人工染色体を構築する。人工染色体の機能評価は(4)と同様の実験を行い、検討する。

## 4. 研究成果

### (1) セントロメア領域の推定

PlasmoDB (<http://www.plasmodb.org/>) より熱帯熱マラリア原虫の全ゲノム配列をダウンロードし、塩基配列プログラム Artemis10 により解析を行った。その結果、第10番染色体を除いた13本の染色体上にA/T含量が96%のセントロメア推定領域を見出した。次に見出したセントロメア推定領域を Dotlet プログラムを用いたドット・マトリックス解析にかけた。その結果、いずれのセントロメア推定領域も1つもしくは2つの繰返し配列領域を持つことが明らかとなった。既にクローニングしていたネズミマラリア原虫のセントロメア推定領域もこれらと同様に繰返し配列領域を含むことから、これらの特徴はマラリア原虫に共通したものであることが、あきらかとなった。次に最小サイズのセントロメア領域をクローニングすることを目的とし、*nested-PCR* により第5番染色体由来のセントロメア推定領域(約1.5 kb)のクローニングを試みた。その結果、予想されるサイズのPCR産物を得、更に配列を検討した結果、セントロメア推定領域のクローニングに成功していることが確認された。

### (2) セントロメアプラスミドの構築

次にクローニングしたセントロメア領域を組み込んだセントロメアプラスミドを構築した(図1)。構築したプラスミドは大腸菌内で安定的に維持されていた。また、このプラスミドには *gfp* 遺伝子及び *hdhfr* 遺伝子の

他にネズミマラリア原虫由来の *ef-1a* の 5' -UTR と HSP の 3' -UTR、*dhfr-ts* 遺伝子の 3' -UTR を調節遺伝子として利用した。

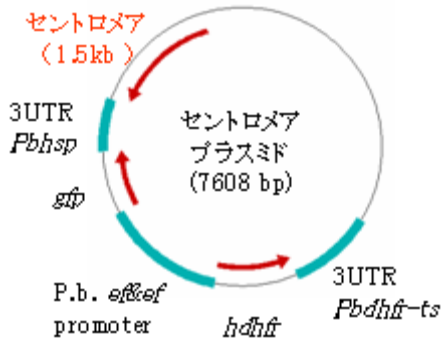


図1: セントロメアプラスミド

(3) セントロメアプラスミドの原虫へ導入構築したセントロメアプラスミド及びセントロメアを持たないコントロールプラスミドを熱帯熱マラリア原虫へエレクトロポレーション法により導入した。その結果、コントロールプラスミドでは導入後、組換え原虫獲得までに少なくとも20日間を要するのに対し、セントロメアプラスミドでは約10~14日間で組換え原虫を得ることができた(図2)。

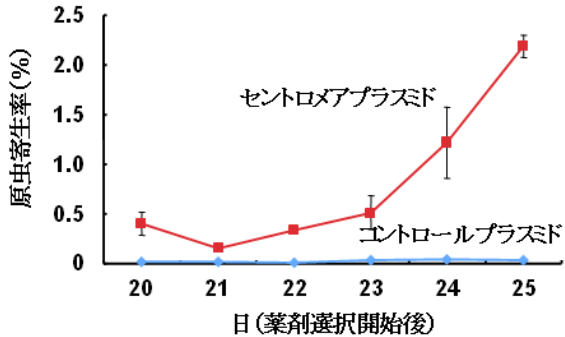


図2 組換え原虫獲得までの日数

これは核分裂時の娘細胞へのプラスミドの分配時、セントロメアが機能し、効率よく、セントロメアプラスミドが分配された結果であると考察された。更に薬剤存在下での組換え原虫の生育速度を比較した結果、セントロメアプラスミドを導入した原虫はコントロールプラスミドを導入した原虫と比較し、明らかに生育速度が速いことが示された(図3)。この結果も前考察を支持する結果であった。

(4) セントロメアの機能評価

セントロメアプラスミドを持つ原虫とコントロールプラスミドを持つ原虫を一定期間、薬剤存在下で維持し、その後、薬剤非存

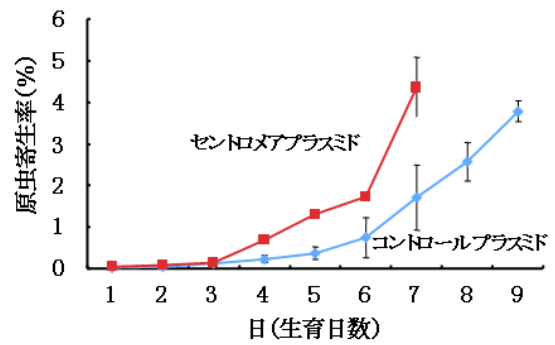


図3 原虫の生育速度(薬剤存在下)

在下で維持して、各原虫のGFPの発現状態を検討した。その結果、薬剤非存在下ではコントロールプラスミドを持つ原虫でGFPを発現している原虫は全体の約30%程度であるのに対し、セントロメアプラスミドを持つ原虫は約80%の原虫がGFPを発現していた(図4)。

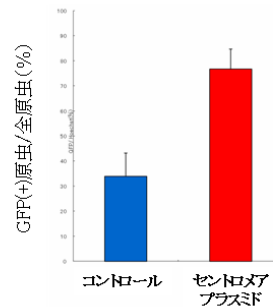


図4 薬剤非存在下でのセントロメアプラスミドの原虫内での安定性

通常、原虫内では細胞分裂時、プラスミドの娘細胞への分配が不均一に起こり、このため、薬剤非存在下ではプラスミドを持たない原虫集団が出現し、最終的にはほとんどのプラスミドが原虫内より失われる。これに対し、セントロメアが機能した結果、セントロメアプラスミドは均等分配が起こり、原虫内でプラスミドが安定的に維持され、これによりGFP発現原虫の割合が高いと考察される。以上のことより、クローニングした第5番染色体由来のセントロメア推定領域は実際に原虫内でセントロメアとして機能するということが明らかとなった。続いて、原虫よりセントロメアプラスミドを回収し、その状態をサザンハイブリダイゼーションにより調べた。その結果、コントロールプラスミドでは複製時の以上により、コンカテメリゼーションが起こり、プラスミドが原虫内で巨大化するのに対し、セントロメアプラスミドは正常に複製していることが明らかとなった(図5)。更にコピー数を比較した結果、コントロールプラスミドでは>20コピー以上になっているのに対し、セントロメアプラスミドでは<2コピー以下となっていることが明らかとなった(図6)。これらの違いはセン

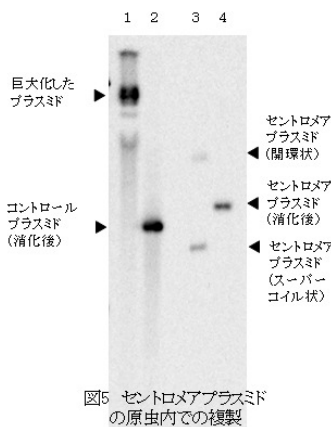


図5 セントロメアプラスミド  
の原虫内での複製

トロメアによるものであり、これからも、導入したセントロメアが正常に機能していることが支持された。

#### (5) テロメア配列の解析

熱帯熱マラリア原虫の染色体末端に位置するテロメア領域の配列と、既に我々の研究グループでクローニングに成功していたテロメア領域の配列を比較した結果、どちらも CCT (A/G) AA からなる保存配列が繰り返す配列特徴を持つことが確認された。これにより、マラリア原虫間では種を超えて、テロメア配列が高度に保存されていることが示された。

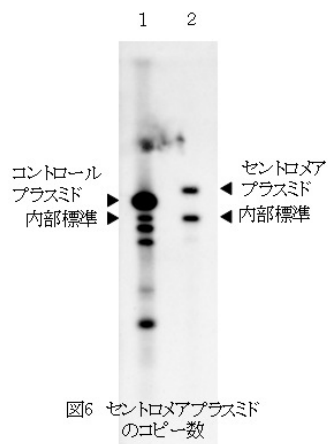


図6 セントロメアプラスミド  
のコピー数

#### (6) 人工染色体の構築

(5) で得たテロメア領域を 500bp のスペーサー配列を挟み、向かい合わせにクローニングしテロメアカセットを作製した。また、スペーサー配列の両末端 (即ちテロメア末端、図7) には制限酵素部位を導入した。続いて、テロメアカセットをセントロメアプラスミドに導入し、人工染色体を構築した (図7)。構築した人工染色体はスペーサー部位に導入した制限酵素部位で消化して直鎖状のものも調製した。続いて環状及び直鎖状の人工染色体をエレクトロポレーション法により、熱帯熱マラリア原虫へ導入した。その結果、環状の人工染色体はセン

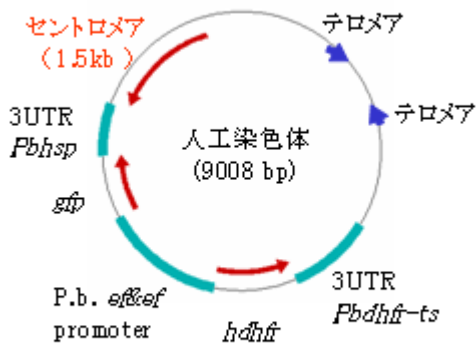


図7 人工染色体

トロメアプラスミドとほぼ同等の効率で原虫内に導入することができたが、直鎖状の人工染色体はこれらよりも効率が劣っていた。次に環状及び直鎖状人工染色体の原虫内での安定性を調べた。その結果、環状の人工染色体は原虫内で安定的に保持されたが、直鎖状の人工染色体は分子内で相同組換えを起こすことが明らかとなった。以上の結果より環状人工染色体を構築することに成功したが、直鎖状の人工染色体を作製するためには更なる検討が必要であることが明らかとなった。

#### 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)

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. Identification of a transcription factor in the mosquito-invasive stage of malaria parasites. Mol. Microbiol. 査読有 2009 Mar;71(6):1402-14.

[学会発表] (計 5 件)

(1) 岩永 史朗 (代表者) ネズミマラリア原虫人工染色体の開発 第58回日本寄生虫学会大会 2009年3月 東京都

(2) S. Iwanaga. Centromere and telomere improve the segregation of the episomal plasmid during the cell division of Plasmodium berghei. The 8<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2008年9月 兵庫県

(3) S. Iwanaga. Functional

identification of the (syntenic)  
conserved centromere of Plasmodium.  
Molecular Approach to Malaria 2008, 2008  
年2月, ローン(オーストラリア)

(4) 岩永史朗 Plasmodium berghei の人工  
染色体の開発 第6回分子寄生虫・マラリア  
研究フォーラム 2007年10月愛媛県

(5) 岩永 史朗 Plasmodium bergheiへの新  
規遺伝子導入法の開発 第76回日本寄生虫  
学会大会 2007年4月 大阪府

[産業財産権]

○出願状況(計 1件)

産業財産権の名称: マラリア原虫人工染色

発明者: 岩永史朗・油田正夫 権利者: 鳥

取大学・三重大学 産業財産権の種類、番

号 特許権: 特願2009-051454 出願年

月日: 2009年3月5日 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩永 史朗 (IWANAGA SHIROH)

鳥取大学・医学部・講師

研究者番号: 20314510

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし