

令和 3 年 6 月 13 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22535

研究課題名(和文) 熱帯熱マラリア原虫におけるRNAi系の確立

研究課題名(英文) Establishment of RNAi system in Plasmodium falciparum

研究代表者

坪井 敬文(Tsuboi, Takafumi)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授

研究者番号：00188616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：RNAiは遺伝子の機能を探る汎用ノックダウン技術であるが、マラリア原虫にはRNAiに必須な分子群(RISC)が欠落しているため不可能であった。本研究では、マラリア原虫に恒常的にヒトRISCを発現させ、RNAiが機能するマラリア原虫を作出するというきわめて挑戦的な目標を掲げた。研究遂行中に、ネズミマラリア原虫にRISCを発現させることでRNAiが機能することが海外から報告された。しかし、熱帯熱マラリア原虫のトランスフェクション(遺伝子導入)システムは、ネズミマラリア原虫とは大きく異なり難易度が高いため、ヒトのRISCを熱帯熱マラリア原虫に恒常的に発現させる遺伝子導入実験を継続試行中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マラリア原虫は複雑なライフサイクルを持ち、多くのユニークな遺伝子配列を持つ。これらの遺伝子がコードする原虫特異的なタンパク質の機能解析は、新規な治療薬やマラリアワクチンの開発等に重要であるがほとんど進んでいない。その理由としては、赤血球期マラリア原虫のRNAiによる遺伝子ノックダウン技術が機能しないことが大きな理由である。本研究によってRNAiを行うことができるマラリア原虫株を樹立することができれば、マラリア原虫の生活環を維持するのに重要な遺伝子を探索することが容易となるため、創薬やワクチンの標的となるマラリア原虫タンパク質の発見を加速できる。

研究成果の概要(英文)：In most eukaryotes, tools for gene knockdown is available in the form of RNA interference (RNAi). However, malaria parasites lack the endogenous RNAi machinery (RISC). The lack hampers gene annotation and hence antimalarial drug and vaccine development. In this extremely challenging study, we tried to introduce the RNAi machinery of human origin into the malaria parasite and thus created RNAi-competent malaria parasite that permit inhibition of gene expression on the mRNA level. During this project, a group of oversea scientists published a success of generating transgenic rodent malaria parasite which expressing a human RNAi machinery. However, It is well-known that the technology for transgenesis in human malaria parasite which we are targeting is quite different from the one for rodent malaria parasite and is more difficult to achieve. Therefore, we are still conducting our best efforts on this technology establishment.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア原虫 RNAi

1. 研究開始当初の背景

マラリアは、2019年においても毎年2億人余りが罹患し40万余人が死に至る感染症である。2000年初頭からのグローバルな努力によって、その死亡者数は徐々に減少傾向にあったがここ数年来その減少が止まり、さらに2020年から始まった新型コロナパンデミックによって、再び増加に転じることが危惧されている(引用文献① WHO, World Malaria Report 2020)。マラリア原虫はハマダラカとヒトの間を交互に行き来する複雑なライフサイクルを持ち、多くの原虫特異的な遺伝子配列を持つ。それらによってコードされる原虫特異的なタンパク質の機能解析は、新規抗原虫薬やマラリアワクチンの開発等に重要であるが、ほとんど進んでいない。その理由としては、マラリアの病態解明に関わる赤血球期マラリア原虫の遺伝子の機能を探るために遺伝子ノックアウトを行うと、ほとんどの場合で原虫は致死となり、遺伝子の機能の解明には至らないことが知られている。さらに、他分野の研究で広く一般に用いられている遺伝子ノックダウン技術 RNAi は、二本鎖 RNA によって配列特異的に mRNA が分解され、遺伝子発現が抑制される現象である。しかし、マラリア原虫は RNAi に必要な RNA-induced silencing complex (RISC) を形成するタンパク質群を欠損しているため、RNAi を行うことはできなかった。興味深いことに、出芽酵母もマラリア原虫と同様に RISC 形成タンパク質群を完全に欠損しており、RNAi は全く機能しなかった。しかし、Suk らはヒトの RISC 関連遺伝子群を出芽酵母にトランスフェクション(遺伝子導入)して発現させることで、RNAi が機能する出芽酵母を作出することに成功した(引用文献② Suk ら、Nucleic Acids Res 2011)。そこで我々は、Suk らの研究から想を得て本研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究では、人為的にマラリア原虫に恒常的にヒト RISC を発現させ、RNAi が機能するマラリア原虫を作出するというきわめて挑戦的な目標を掲げた。本研究によって RNAi を行うことができるマラリア原虫株を樹立することができれば、マラリア原虫における遺伝子ノックダウンにおける技術的障壁を取り払うことが可能となり、マラリア原虫の生活環を維持するのに重要な遺伝子を探索することが容易となるため、創薬やワクチンの標的となるマラリア原虫タンパク質を効率的に見出すことができる。

3. 研究の方法

(1) ヒト RISC 関連遺伝子の人工合成

マラリア原虫の遺伝子塩基配列は、ヒトのそれとは異なり非常に AT リッチであるため、ヒトの RISC を形成するタンパク質 (Ago2, Dicer, TRBP) をコードする遺伝子をマラリア原虫内で機能させるために、原虫のコドン頻度にあわせた標的遺伝子を人工合成する。

(2) 熱帯熱マラリア人工染色体ベクターへのクローン化と遺伝子発現の確認

上記で人工合成したヒト RISC 関連遺伝子を、岩永らが開発したマラリア人工染色体(引用文献③ 岩永ら、Cell Host Microbe 2010) を利用した熱帯熱マラリア原虫用プラスミド pFCEN (引用文献④ 岩永ら、PLoS One 2012) にクローン化する。このプラスミドベクターは原虫内で染色体のように振る舞うため、マラリア原虫にトランスフェクション(遺伝子導入)された遺伝子コピー数を低く保つことができるだけでなく、薬剤非存在下であっても99%以上が娘細胞に受け継がれるという利点を持つため、導入した遺伝子を安定的かつ恒常的に発現させることができる。これを GFP がゲノムに挿入された GFP 恒常発現マラリア原虫株(3D7HT-GFP: 引用文献⑤ Talman ら、PLoS One 2010) に遺伝子導入する。RT-PCR を用いて当該遺伝子の原虫における発現を確認する。

4. 研究成果

まず、ヒトの RISC を形成するタンパク質(Ago2, Dicer, TRBP)をコードする遺伝子を、培養熱帯熱マラリア原虫に恒常的に発現出来るようにデザインした遺伝子導入用のプラスミドの作製を試みていたところ、2020年にドイツのグループからネズミマラリア原虫 *Plasmodium berghei* にヒト RISC 遺伝子を発現させることで RNAi が機能することが報告された(引用文献⑥ Hentzschel ら、Nucleic Acids Res 2020)。そこで、この技術を我々が標的とする熱帯熱マラリア原虫へ応用することにした。しかし、熱帯熱マラリア原虫の遺伝子導入技術は、ネズミマラリア原虫のそれとは大きく異なり難易度が高いため、ヒトの RISC を熱帯熱マラリア原虫に恒常的に発現させる遺伝子導入実験を継続試行中であるが、Dicer は 218 kDa の巨大分子であり、5769 bps に及ぶインサートの調整とライゲーションに難航している。

<引用文献>

- ① WHO, World malaria report 2020.
URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240015791>
- ② Suk K, Choi J, Suzuki Y, Ozturk SB, Mellor JC, Wong KH, MacKay JL, Gregory RI, Roth FP. Reconstitution of human RNA interference in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(7):e43. doi: 10.1093/nar/gkq1321.
- ③ Iwanaga S, Khan SM, Kaneko I, Christodoulou Z, Newbold C, Yuda M, Janse CJ, Waters AP. Functional identification of the *Plasmodium* centromere and generation of a *Plasmodium* artificial chromosome. *Cell Host Microbe.* 2010;7(3):245-55. doi: 10.1016/j.chom.2010.02.010.
- ④ Iwanaga S, Kato T, Kaneko I, Yuda M. Centromere plasmid: a new genetic tool for the study of *Plasmodium falciparum*. *PLoS One.* 2012;7(3):e33326. doi: 10.1371/journal.pone.0033326.
- ⑤ Talman AM, Blagborough AM, Sinden RE. A *Plasmodium falciparum* strain expressing GFP throughout the parasite's life-cycle. *PLoS One.* 2010;5(2):e9156. doi: 10.1371/journal.pone.0009156.
- ⑥ Hentzschel F, Mitesser V, Fräschka SA, Krzikalla D, Carrillo EH, Berkhout B, Bártfai R, Mueller AK, Grimm D. Gene knockdown in malaria parasites via non-canonical RNAi. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(1):e2. doi: 10.1093/nar/gkz927.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計21件（うち査読付論文 21件 / うち国際共著 13件 / うちオープンアクセス 14件）

1. 著者名 Nagaoka Hikaru, Kanoi Bernard N., Jinoka Kana, Morita Masayuki, Arumugam Thangavelu U., Palacpac Nirianne M. Q., Egwang Thomas G., Horii Toshihiro, Tsuboi Takafumi, Takashima Eizo	4. 巻 10
2. 論文標題 The N-Terminal Region of Plasmodium falciparum MSP10 Is a Target of Protective Antibodies in Malaria and Is Important for PfGAMA/PfMSP10 Interaction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 2669
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2019.02669	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Nagaoka Hikaru, Sasaoka Chisa, Yuguchi Takaaki, Kanoi Bernard N., Ito Daisuke, Morita Masayuki, Udomsangpetch Rachanee, Sattabongkot Jetsumon, Ishino Tomoko, Tsuboi Takafumi, Takashima Eizo	4. 巻 9
2. 論文標題 PfMSA180 is a novel Plasmodium falciparum vaccine antigen that interacts with human erythrocyte integrin associated protein (CD47)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5923
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-42366-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Reiling Linda, Boyle Michelle J., White Michael T., Wilson Danny W., Feng Gaoqian, Weaver Rupert, Opi D. Herbert, Persson Kristina E. M., Richards Jack S., Siba Peter M., Fowkes Freya J. I., Takashima Eizo, Tsuboi Takafumi, Mueller Ivo, Beeson James G.	4. 巻 10
2. 論文標題 Targets of complement-fixing antibodies in protective immunity against malaria in children	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 610
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-08528-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Bantuchai Sirasate, Nozaki Mamoru, Thongkukiatkul Amporn, Lorsuwannarat Natcha, Tachibana Mayumi, Baba Minami, Matsuoka Kazuhiro, Tsuboi Takafumi, Torii Motomi, Ishino Tomoko	4. 巻 49
2. 論文標題 Rhoptry neck protein 11 has crucial roles during malaria parasite sporozoite invasion of salivary glands and hepatocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal for Parasitology	6. 最初と最後の頁 725 ~ 735
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijpara.2019.05.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Low Leanne M., Azasi Yvonne, Sherling Emma S., Garten Matthias, Zimmerberg Joshua, Tsuboi Takafumi, Brzostowski Joseph, Mu Jianbing, Blackman Michael J., Miller Louis H.	4. 巻 10
2. 論文標題 Deletion of Plasmodium falciparum Protein RON3 Affects the Functional Translocation of Exported Proteins and Glucose Uptake	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e01460-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mBio.01460-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tokunaga Naohito, Nozaki Mamoru, Tachibana Mayumi, Baba Minami, Matsuoka Kazuhiro, Tsuboi Takafumi, Torii Motomi, Ishino Tomoko	4. 巻 9
2. 論文標題 Expression and Localization Profiles of Rhoptry Proteins in Plasmodium berghei Sporozoites	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2019.00316	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nagaoka Hikaru, Kanoi Bernard N., Ntege Edward H., Aoki Masamitsu, Fukushima Akihisa, Tsuboi Takafumi, Takashima Eizo	4. 巻 10
2. 論文標題 Antibodies against a short region of PfRipr inhibit Plasmodium falciparum merozoite invasion and PfRipr interaction with Rh5 and SEMA7A	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6573
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-63611-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Longley Rhea J., White Michael T., Takashima Eizo, Morita Masayuki, Matsuura Fumie, Kazura James, Lacerda Marcus, Sattabongkot Jetsumon, Tsuboi Takafumi, Mueller Ivo	4. 巻 26
2. 論文標題 Development and validation of serological markers for detecting recent Plasmodium vivax infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Medicine	6. 最初と最後の頁 741 ~ 749
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41591-020-0841-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takafumi Tsuboi
2. 発表標題 Post-genome unbiased strategies for discovery of malaria vaccine candidates by innovative wheat germ cell-free technology
3. 学会等名 Malaria Vaccines for The World 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Eizo Takashima and Takafumi Tsuboi
2. 発表標題 Screening for background immunity to P. vivax malaria in volunteers
3. 学会等名 MIST (Malaria Infection Study in Thailand) Kick-off Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坪井敬文
2. 発表標題 愛媛発イノベーションによるマラリアワクチン開発への貢献
3. 学会等名 日本学会議中国・四国地区会議主催学術講演会：地域にある大学としての先端学術の振興と地域産業イノベーションへの貢献（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・マラリア研究部門
<http://www.pros.ehime-u.ac.jp/malaria/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	高島 英造 (Takashima Eizo) (50366762)	愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・准教授 (16301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関