

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790326

研究課題名 (和文) マラリア原虫の転写干渉機構とその制御

研究課題名 (英文) Control of transgenes with insulators about malaria parasite

研究代表者

矢幡 一英 (YAHATA KAZUHIDE)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：40467965

研究成果の概要 (和文) : マラリア原虫に人工的に構築した遺伝子発現プラスミドベクターを遺伝子導入すると、予想した発現を示さない発現抑制現象が見られた。研究実施者は哺乳類細胞において、ゲノム DNA 上の遺伝子間領域に存在する、インスレーターを導入することで遺伝子発現を制御できることを見出していた。しかしながらマラリア原虫においては報告されておらず、マラリア原虫における他生物のインスレーターの効果とマラリア原虫にインスレーターが存在するのかを確かめるため、マラリア原虫を用いたインスレーターアッセイシステムを構築した。

研究成果の概要 (英文) : The development of transgenic methods is advancing as an analytical technique in malaria research. When an artificially constructed transgene vector is introduced into parasites, gene expression sometimes does not occur at the expected time point. However, a region called the “insulator” is known to be located between neighboring genes on the genome DNA, is inserted between adjacent transgenes using an episomal gene, the transcript interference was suppressed in human cells. To evaluate the activity of insulator in malaria parasite and identify a potential insulator on the genome DNA of malaria parasite, we developed assay system using a malaria parasite.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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・エピジェネティック・インスレーター

1. 研究開始当初の背景

| マラリアは世界中で年間 2 - 3 億人の感染

者、150万人の死者を出す重大な感染症である。近年、マラリア原虫の解析手法として遺伝子導入法の開発が進んでいるが、人工的に構築した遺伝子発現プラスミドベクターを遺伝子導入すると、予想とは異なるタイミングで発現が起こったり、発現そのものが見られない現象があることがわかってきた。このような現象は哺乳類や酵母においても知られており、隣接する遺伝子領域による転写干渉や遺伝子発現が抑制されている不活性化ヘテロクロマチン領域への遺伝子導入と導入遺伝子のヘテロクロマチン化によるものと考えられている。後者は特に遺伝子治療のために外来遺伝子を導入する際に問題となっている。酵母では遺伝子間距離が平均で500 bp ほどしかなく、隣り合った遺伝子の転写の独立性を維持するために、転写干渉を制御するインスレーターと呼ばれる遺伝子領域が存在することが分かっている。インスレーターにはヘテロクロマチン化を抑制する作用も知られている。インスレーターの存在はショウジョウバエやウニ、また哺乳類でもわかっており、この転写干渉制御の機構は種々の生物に共通して存在する。マラリア原虫の遺伝子間距離も平均1700 bp と短く、マラリア原虫に導入した遺伝子が予想とは異なる発現や不活性化したりする現象も、このような転写干渉やヘテロクロマチン化が原因となっていると思われる。しかし、マラリア原虫における転写干渉の機構やインスレーターに関する研究はほとんどない。マラリア原虫の遺伝子サイレンシングについては、PfEMP-1 と呼ばれる多重遺伝子族にコードされている接着分子の排他的発現制御について解析が行われているが、詳細な分子機構は明らかでない。本研究のようにインスレーターに着目し、転写制御の研究を行っているグループは国内外にもないため、マラリア原虫の転写制御の研究に新しい着眼点から切り込めると考えている。

2. 研究の目的

近年、マラリア原虫の解析手法として遺伝子導入法の開発が進んでいるが、人工的に構築した遺伝子発現プラスミドベクターを遺伝子導入すると、予想とは異なるタイミングで発現が起こったり、発現そのものが見られない現象があることがわかってきた。研究申請者はこれまでに、哺乳類細胞において遺伝子発現が妨げられる転写干渉を起こしている遺伝子領域にインスレーターを導入することで転写干渉を制御できることを見出して

いた。マラリア原虫に導入した遺伝子が予想とは異なる発現や不活性化したりする現象も、このような転写干渉やヘテロクロマチン化が原因となっていると思われる。しかし、マラリア原虫における転写干渉の機構やインスレーターに関する研究は報告されていない。本研究では、マラリア原虫のインスレーター領域を探索し、マラリア原虫のゲノム上における転写制御機構の一端を明らかにするため、まず初めにマラリア原虫で遺伝子発現が抑制される遺伝子発現プラスミドベクターに、他生物のインスレーター領域や、マラリア原虫の増殖・分化過程において異なる時期に発現制御される遺伝子間領域を挿入した遺伝子発現プラスミドベクターをマラリア原虫に導入して外来遺伝子のサイレンシングが解除されるのかを検証し、インスレーター領域を検討する。さらに、マラリアのインスレーター領域を同定し、マラリア原虫のゲノム上における転写制御機構の一端を明らかにするとともに、遺伝子導入ベクターにインスレーター領域を挿入することで、正確なタイミングで発現し、かつサイレンシングを起こさない効率の良い遺伝子導入法を開発する。

3. 研究の方法

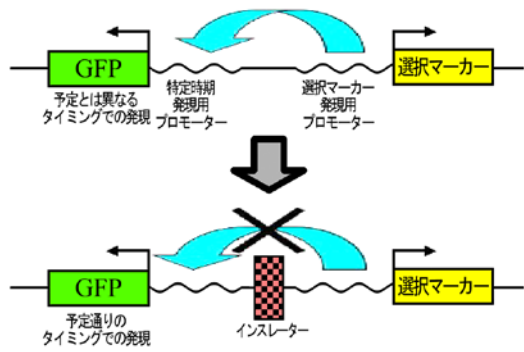
(1) マラリア原虫のインスレーター領域のクローニング

①マラリア原虫の増殖・分化過程において異なる時期に強く発現しているタンパク質をコードする遺伝子が、ゲノム上に存在している領域を複数箇所選び、遺伝子間領域の塩基配列を解析することで、インスレーター領域候補部位を選定する。選定した領域はPCR増幅し、クローニングする。

②他の生物からのインスレーターとして、ショウジョウバエ、ウニ、ニワトリ等のインスレーターをこれまで報告されているベクターよりPCR増幅し、クローニングする。

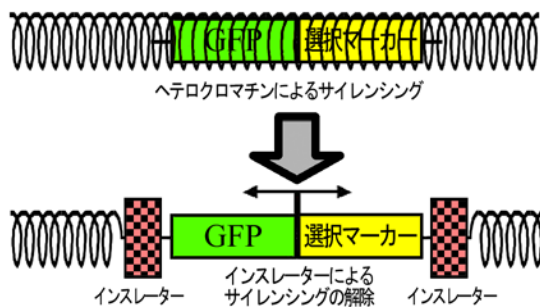
(2) マラリア原虫のインスレーターを同定するためのアッセイシステムの構築-1

①構成上はレポーター遺伝子を特定時期に発現すると予想されるプロモーターであるにもかかわらず、他の時期にも発現がおきた遺伝子発現プラスミドベクターが存在するため、このベクターの隣接する遺伝子間に、選定したインスレーター領域候補部位を挿入する。また、他の生物で機能するインスレーターを選定し、マラリア原虫での効果を確認する(図1)。



(図 1)

- ②マラリア原虫に遺伝子発現プラスミドベクターを一過性遺伝子導入し、選択薬剤中でマラリア原虫を培養し、耐性原虫でレポーター遺伝子の発現を確認し、インスレーター効果を比較する。
- ③クローン化された原虫を薬剤による選択圧がない状態で培養し、レポーター遺伝子が発現しなくなる原虫の率を計測する。
- ④インスレーター領域を含まない遺伝子発現プラスミドベクターを遺伝子導入した原虫についても、同様の操作を行い、レポーター遺伝子発現率をコントロールとする。
- ⑤上記2群の原虫を比較することで、インスレーターがどの程度、サイレンシングの解除の役割を果たしているかどうかを評価する。



(図 2)

- ⑥種々の領域について確認し、インスレーターの効果が確認できたものについては、領域を狭めることにより、最小領域を確定する。

(3) マラリア原虫のインスレーターを同定するためのアッセイシステムの構築-2

- ①遺伝子発現量を厳密にコントロールし、比較することが必要になるため、マラリア原虫のゲノム領域に遺伝子発現プラスミドベクターを部位特異的に遺伝子導入する。基本となるシステムは Bxb1 integrase を用いた部位特異的組換え法(L. Nkrumah *et al.*, 2006)を用いる。
- ②部位特異的組換えドメインを持つ遺伝子発現プラスミドベクターを構築し、クローニングしたインスレーターを導入する。
- ③選択薬剤中でマラリア原虫を培養し、部位特異的組換えによりゲノム DNA に挿入された

薬剤耐性原虫を得る

- ④レポーター遺伝子の発現を確認し、インスレーター効果を比較する。

4. 研究成果

(1)マラリア原虫におけるインスレーター領域を探索するため、インスレーター効果の確認実験のための遺伝子発現プラスミドベクターを構築した。このプラスミドベクターには、マラリア原虫特定時期に発現するプロモーターに蛍光タンパク質をつなげた遺伝子カセットと、薬剤耐性遺伝子カセットが隣接して位置されており、構成上では蛍光タンパク質はマラリア原虫特定時期に発現すると予想されるにもかかわらず、他の時期にも発現が起きたり、発現しなくなる。したがって、蛍光タンパク質発現カセットと薬剤選択マーカー発現カセットとの間に選定したインスレーター領域候補部位を挿入し、マラリア原虫の時期特異的に発現する蛍光タンパク質を解析することでインスレーターの効果が確認できる。

(2)インスレーターアッセイシステムの確認のため、マラリア原虫の排他的発現制御が起こる PfEMP-1 領域に存在する DNA 配列、Rep20 や最も知られているトリ由来のインスレーターを用いてインスレーター効果を調べた。これらの DNA 配列はマラリア原虫において効果が確認できなかったが、マラリア原虫に遺伝子発現プラスミドベクターを一過性発現させたため、導入したプラスミドベクターのコピー数がマラリア原虫ごとに異なっている可能性があり、正確な検定を行えていない可能性があった。

(3)一過性遺伝子導入によるコピー数の違いから起こる遺伝子発現量の違いを克服するため、遺伝子発現プラスミドベクターをマラリア原虫のゲノムへ部位特異的導入法により導入し、コピー数を合わせる系を確立した。この系を用いることにより、インスレーターの候補となる DNA 配列を導入し、正確な遺伝子発現によるインスレーター効果のアッセイが行えることとなった。今後はこの系を用いて、他の時期特異的に遺伝子発現する領域のインスレーター探索を引き続きおこなう。

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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 矢幡一英、マラリア原虫への外来遺伝子の導入と制御に向けて、第 7 回感染症沖縄フォーラム、2009 年 2 月 13 日、沖縄

- 県青年会館
- ② 矢幡一英、マラリア原虫への外来遺伝子の導入とその制御、第16回分子寄生虫ワークショップ、2008年8月5日、群馬県草津セミナーハウス

[その他]

ホームページ等

<http://www.tm.nagasaki-u.ac.jp/protozoology/Member-KY-J.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢幡 一英 (YAHATA KAZUHIDE)
長崎大学・熱帯医学研究所・助教
研究者番号：40467965

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：