

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号： 14101  
 研究種目： 挑戦的萌芽研究  
 研究期間： 2011～2012  
 課題番号： 23659210  
 研究課題名（和文） 熱帯熱マラリア原虫における直接遺伝子導入法の確立  
 研究課題名（英文） Development of a direct transfection method in *Plasmodium falciparum*  
  
 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

## 研究成果の概要（和文）：

熱帯熱マラリア原虫の遺伝子操作は導入効率が低い間接法によって行われており技術改良が求められている。本研究では成熟シizontを大量調製し、これに直接遺伝子を導入する直接導入法の開発を試みた。マラリア人工染色体を用い遺伝子導入をおこなった結果従来法に比して約1000倍の効率で遺伝子を導入することに成功した。本成果は熱帯熱マラリア原虫の遺伝子操作技術を飛躍的に改善するものであり波及効果は極めて大きい。

## 研究成果の概要（英文）：

At present, genetic manipulation of *Plasmodium falciparum*, the most important human malaria parasite is carried out with indirect transfection method that is of low efficiencies. In this study we attempted to develop a direct transfection method in this parasite and improve the efficiencies. By establishing a method to purify a large amount of mature schizonts and using a *P. falciparum* artificial chromosome, we succeeded in introducing a foreign DNA into the parasites with approximately 1000-fold efficiency compared to that with indirect transfection method. The method developed in this study will improve genetic manipulation of this parasite and have a great impact on this research field.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：寄生虫学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学（含衛生動物学）

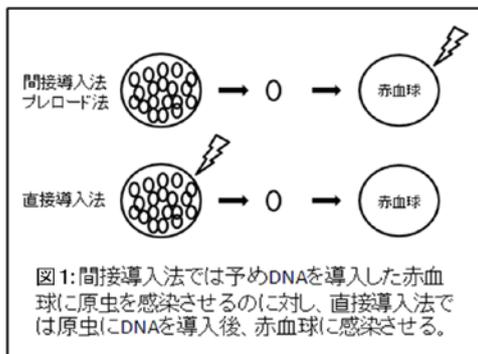
キーワード：原虫

## 1. 研究開始当初の背景

マラリアは *Plasmodium* 属原虫の感染により引き起こされ、年間約3億人の感染者と約200万人の死者を出す世界3大感染症の一つである。特に熱帯熱マラリア原虫による被害は深刻であり、新規ワクチン・薬剤創成に向けたゲノム配列情報に基づく遺伝子機能

解析が精力的に進められている。この熱帯熱マラリア原虫の遺伝子機能解析において外来DNA導入法は基盤技術である。しかし現在、熱帯熱マラリア原虫への外来DNA導入は赤血球に予めDNAを導入し、これに原虫を感染させDNAを取り込ませる間接的な手

法(プレロード法)により行われており、導入効率が低いという問題点がある(図1参照)。更に同手法を用いた外来 DNA の原虫染色体への挿入は導入効率が低いため環状 DNA を用いたシングルクロスオーバーによる相同組換えに制限される。シングルクロスオーバーによる遺伝子改変では染色体内で再び相同組換えが起こり、挿入 DNA の欠落と変異体の表現型が野性型へ復帰する欠点がある。よってこれらの問題を解決するには導入効率が高い直接導入法を開発し、挿入 DNA の欠落等が無いダブルクロスオーバーに基づく遺伝子改変を行う必要がある。しかし導入に適した赤血球侵入直前の成熟したシズントの調製が困難であること、及び遺伝子導入時のエレクトロポレーションによる衝撃のため殆どの原虫が死滅することから直接導入法は確立されておらずダブルクロスオーバーによる遺伝子改変は未だ利用可能な技術とはなっていない。



## 2. 研究の目的

現在、熱帯熱マラリア原虫の遺伝子操作は導入効率が低い間接法によって行われており技術改良が求められている。そこで本研究では成熟シズントを大量調製し、これに直接遺伝子を導入する直接導入法の開発を試みる。本研究の成果は迅速な遺伝子改変原虫の作出を可能とし、熱帯熱マラリア原虫の遺伝子操作技術が飛躍的に改善するものであり研究領域全体への波及効果は極めて大きい。

## 3. 研究の方法

本研究ではまず成熟シズントの大量調製法の確立を試み、次いで精製した成熟シズントへの遺伝子直接導入法確立を試みた。さらに新規に開発した熱帯熱マラリア原虫人工染色体と精製した成熟シズントを用い直接法による遺伝子導入を試みた。

### 成熟シズントの大量調製法の確立

成熟シズントを大量に調製するためには細胞周期が高度に同調された原虫を準備する必要がある。そこでまず試験管内培養した熱帯熱マラリア原虫よりパーコール濃度勾配遠心法によりシズント(成熟・未成熟を含む)を回収し、新鮮な赤血球に感染させ、4時間後にソルビトール処理を行ってリング期原虫以外を死滅させた。以上の操作により細胞周期が感染直後から4時間目までの原虫を調製した。同様の操作を繰り返しながら徐々に培養規模を拡大し、高度に同調した原虫を大量に調製した。次に同調した原虫より前述のパーコール濃度勾配遠心法によりシズントを精製し、ヒト血清を含む完全培地(赤血球非存在下)で培養した。赤血球は直接遺伝子導入時に不要であるためこの段階で除去した。

### 直接導入法の確立

成熟シズントの大量調製に成功した後、熱帯熱マラリア原虫人工染色体を用いて原虫への直接導入を試みた。DNA導入はマラリア原虫への遺伝子導入に実績のあるAMAXA社製のNucleofectorIIデバイスによるエレクトロポレーションによって行った。即ちDNAをT-cell nucleofectorに溶解し精製した成熟シズントと混合後、エレクトロポレーションによって熱帯熱マラリア原虫人工染色体を

原虫内へ導入し直ちに赤血球と混合して感染させた。使用する熱帯熱マラリア原虫人工染色体にはピリメサミン耐性の薬剤マーカー及び GFP 発現コンストラクトを組み込み込んだものを使用し、ピリメサミン選択によって人工染色体が導入された原虫を選択した。最終的に選択した原虫 GFP を発現していることを蛍光顕微鏡で観察し、正常に遺伝子導入が行われたことを確認した。人工染色体導入時には①細胞数、②DNA 量を変化させ最適条件を決定した。

#### 4. 研究成果

様々な精製条件を試み改良を繰り返すことで最終的に一回の精製で約  $1.0 \times 10^9$  個の原虫を精製する条件を確立した。図 2 に本手法で精製した熱帯熱マラリア原虫シゾントの顕微鏡像を示す。右側が核染色像である。成熟シゾント中に数十個のメロゾイトが含まれていることがわかる。これまで熱帯熱マラリア原虫で遺伝子導入可能なシゾントの大量調整は不可能とされており、本技術の確立は熱帯熱マラリア原虫研究における技術的なブレークスルーである。

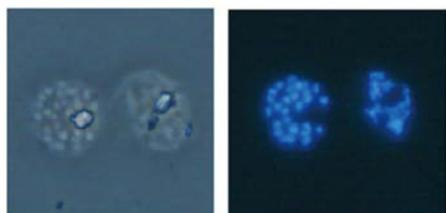


図2: 精製された成熟シゾント

また図 3 は精製したシゾントを用いて行った直接導入の結果を表したグラフである。人工染色体と組み合わせた場合従来法（プラスミド+間接導入法）に比べて約 1 週間原虫の上昇が早い。従来法ではプラスミドの量を十倍使用しており、このことは本法が従来の方法に比して約 1000 倍導入効率が良いことを示している。

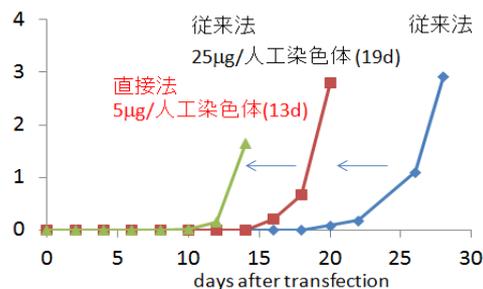


図3: 開発した直接導入法と間接導入法の比較

これまで用いられてきたプレロード法による外来遺伝子導入には通常数ヶ月の期間を要し、研究の律速段階となっていた。本研究の成功は研究期間の大幅な短縮を可能とし、研究領域全体への波及効果は極めて大きい。原虫の遺伝子改変は正確な実験を行う上で必須なものであり、ワクチン・薬剤開発等、安全性が最重要視されるマラリア研究において極めて重要な技術となると予想される。

#### 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 8 件)

(すべて査読有り)

- ① Orito, Y, T. Ishino, S. Iwanaga, T. Kato, I. Kaneko & M. Yuda, (2012) Liver-specific protein 2: a Plasmodium protein exported to the hepatocyte cytoplasm and required for merozoite formation. *Molecular microbiology* 87:66-79
- ② Iwanaga, S., T. Kato, I. Kaneko & M. Yuda, (2012) a Transcription Factor That Is Critical for Malaria Liver Stage Development. *PloS one* 7:e47557
- ③ Iwanaga, S., I. Kaneko & M. Yuda, (2012) A high-coverage artificial chromosome library for the genome-wide screening of drug-resistance genes in malaria

parasites. Genome research 22: 985-992.

- ④ Iwanaga, S., T. Kato, I. Kaneko & Masao Yuda. (2012) Centromere plasmid: a new genetic tool for the study of Plasmodium falciparum. PloS one 7: e33326.
- ⑤ Miyakoda, M., D. Kimura, K. Honma, K. Kimura, M.Yuda & K. Yui, (2012) Development of Memory CD8+ T Cells and Their Recall Responses during Blood-Stage Infection with Plasmodium berghei ANKA. J Immunol. 189:4396-3404
- ⑥ Megumi Sumitani, Katsumi Kasashima, Daisuke S. Yamamoto, Keita Yagi, M. Yuda, Hiroyuki Matsuoka and Shigeto Yoshida (2012) Reduction of malaria transmission by transgenic mosquitoes expressing an anti-sporozoite antibody in their salivary glands. Insect Mol Biol. 22:41-51
- ⑦ Chang, J., S. Oikawa, G. Ichihara, Y. Nanpei, Y. Hotta, Y. Yamada, S. Tada-Oikawa, H. Iwahashi, E. Kitagawa, I. Takeuchi, M. Yuda & S. Ichihara, (2012) Altered gene and protein expression in liver of the obese spontaneously hypertensive/NDmcr-cp rat. Nutrition & metabolism 9: 87.
- ⑧ Tamura, T., K. Kimura, M. Yuda & K. Yui, (2011) Prevention of experimental

cerebral malaria by Flt3 ligand during infection with Plasmodium berghei ANKA. Infection and immunity 79: 3947-3956.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 第 82 回日本寄生虫学会大会  
金子伊澄、加藤知美、岩永史朗、油田正夫  
マラリア原虫転写因子 AP2-O のオーキネット形成に果たす役割  
2013 年 3 月 29 日～31 日、東京医科歯科大学
- ② 第 81 回日本寄生虫学会大会  
金子伊澄、岩永史朗、加藤知美、油田正夫  
マラリア原虫肝臓ステージの遺伝子発現を制御する転写因子の研究  
2012 年 3 月 23 日～24 日、兵庫医科大学

[その他]

ホームページ等  
医動物学ホームページ  
<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