

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590501

研究課題名(和文) 超高頻度突然変異誘発型ネズミマラリア原虫の創成とその次世代分子マラリア学への応用

研究課題名(英文) Generation of rodent malaria parasite with high mutation rate and confirmation of its usefulness for next generation of malarialogy

研究代表者

平井 誠 (Makoto, Hirai)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：50326849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ネズミマラリア原虫のDNA Polymerase deltaの校正機能に必須なアミノ酸2箇所をアラニンに置換した変異遺伝子断片を作成し、これを野生型マラリア原虫に導入することで当該遺伝子を変異型に置換した。得た組み換え原虫をマウスへ継代感染を繰り返した結果、通常よりも80倍以上もの高い変異率を有することを明らかにした(DNA Research, 2014)。さらに、このミューテーターマラリア原虫から各種抗マラリア薬に対して耐性を獲得した原虫を単離することに成功した。

研究成果の概要(英文)：We have succeeded to generate mutator malaria parasite, Plasmodium berghei with destructed proof reading activity in DNA polymerase delta. We confirmed that the mutator malaria parasite shows 80 times higher mutation rate than wild-type parasite. Moreover, we succeeded to isolate several drug resistant parasites from mutator malaria parasite, which could be utilized for further research to reveal molecular mechanisms of parasite drug resistance. A series of these results provide the proof that our mutator parasite could be suitable research tool for parasite biology, especially drug resistance.

研究分野：分子寄生虫学

キーワード：mutator malaria

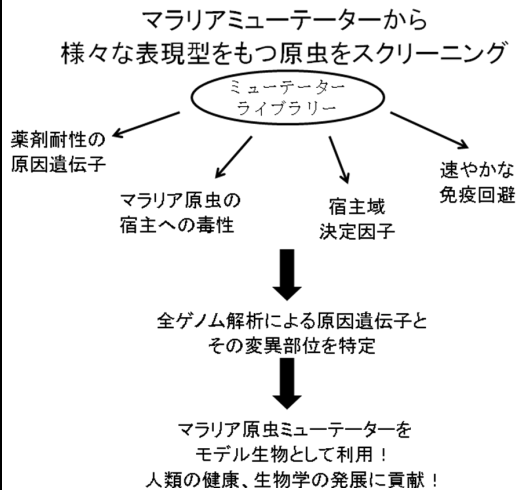
1. 研究開始当初の背景

マラリアは、エイズ・結核とならぶ世界三大感染症の一つである。この病気を制圧するため広汎な研究が世界中で繰り広げられているが、原虫の抗マラリア薬耐性と免疫回避によりマラリアコントロールは困難を極めてきている。従来までのマラリア生物学研究は逆遺伝学的手法に大きく依存してきたが、この手法には限界があり(後述)この壁を越えるためには技術革新が必須である。本研究はマラリア生物学研究のための順遺伝学的手法としてマラリアミューテーターを世界で初めて開発し、次世代分子マラリア学を創成することを最終目標とする。具体的には、この新技术を駆使しマラリアコントロールに向けた新規標的分子を同定する。この試みは世界初でマラリア学を発展させる上で国の内外を問わず極めて重要である。

マラリア原虫のゲノムは約 5000 個の遺伝子をコードしていると予想されるが、その 6 割近くが機能未知である。遺伝子の機能解析手段として逆遺伝学、すなわち遺伝子を個別に破壊した生物個体を作製し、その表現型を解析することが広く行われている。逆遺伝学のマラリア原虫への適用は、マラリア原虫生活史の分子基盤の一端を解明するなど、これまで大きな成果を上げており、研究代表者は、動植物に共通する世界初の受精制御因子をマラリア原虫から同定することに成功している(Hirai et al., Curr. Biology, 2008)。一方、逆遺伝学は生物個体の生存にとって必須な遺伝子の場合には破壊すると致死になるため、変異体の表現型解析は不可能である。多くのモデル生物では、逆遺伝学と順遺伝学的手法を車の両輪のごとく組み入れてきた。特に、酵母やショウジョウバエでは、順遺伝学的手法として化学変異原を用いたランダムミュータジェネシスによる変異体ライブラリーの作製、ライブラリーから変異体のスクリーニングが行われてきた。ランダムミュータジェネシスは、点突然変異による遺伝子破壊だけでなく、アミノ酸置換により新たな形質を変異体に付与することから、逆遺伝学的手法では見いだせなかった数多くの発見に貢献してきた。しかし、ランダムミュータジェネシスにおいて用いられるアルキル化剤や UV 照射は DNA の構造に依存した偏った変異を導入し、得られる変異体は自然界では生じないものであるという超え難い難点がある。

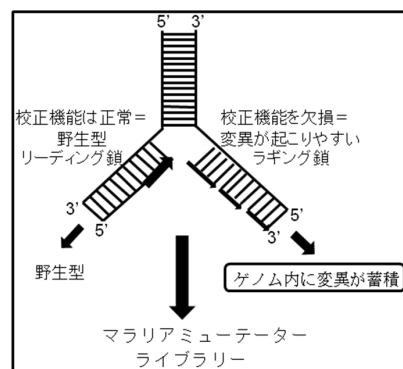
5000 個近くあるネズミマラリア原虫の遺伝子破壊の試みは、すでにオランダ・ライデン大学において現在進行中であり、同じことを日本国内で行うことは無意味と思える。むしろ近い将来、必ず直面するであろう逆遺伝学の限界を超えるため、我が国においては今こそマラリア生物学研究のための順遺伝学技術基盤を確立するときである。このような背景から、本研究はマラリアミューテーターを順遺伝学研究の革新的イノベーションと

して位置づけ、その有用性を提唱するに至った。



2. 研究の目的

マラリアの制圧における最大の障壁の一つが原虫の薬剤耐性である。マラリア原虫は遺伝子発現の量的(発現量)および質的(遺伝子変異)により耐性を獲得している。本研究課題において作成するミューテーターマラリアを用い、ミューテーターから薬剤耐性原虫を単離し、NGS による変異解析により耐性の原因となる遺伝子変異を特定する。さらに、原因変異遺伝子産物の局在・生化学的性状解析を通して薬剤耐性機構を明らかにする。通常野生型原虫から薬剤耐性原虫を単離するためには膨大な時間を要するが、ミューテーターを用いることで薬剤耐性原虫を極めて迅速に単離することを目指す。



3. 研究の方法

(1) ミューテーターマラリアの作成

マラリア原虫のミューテーター作製では、「不均衡変異導入法」を適用する。この方法は、DNA 複製時、2 本鎖のうち複製エラーが頻発するラギング鎖に注目し、ラギング鎖の複製酵素である DNA polymerase δ のエラー修復活性のみを欠損させることで、ラギング鎖における突然変異率を高める方法である。なお、不均衡変異導入法は、先行する大腸菌や酵母を用いた研究から、その有用性は証明され、突然変異率が数十倍から百倍程度高まることが認められている。

ネズミマラリア原虫 (*P. berghei*) ラギング鎖の複製酵素である DNA polymerase δ の校正機能ドメインを欠損させた原虫を作製する (ミューテーター)。

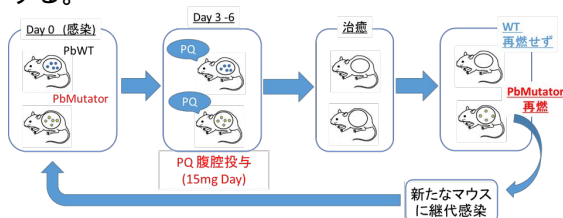
P. berghei ミューテーターはマウスを介した連続継代感染を行なうことで、ゲノム内にランダムにポイントミューテーションを蓄積させる (ミュータントライブラリーの作製)。

(2) ミューテーターの変異率を測定

連続継代感染を一定期間行なった後、ミューテーターライブラリーから任意の数クローンを単離し、全ゲノムリシーケンシングを行なう。コントロールでは野生型遺伝子で内因性遺伝子を置き換えた組み換え原虫を作成し同様に継代感染と全ゲノムリシーケンシングを行なう。同一継代期間後の変異数を両者で比較する。

(3) 薬剤耐性原虫の単離

マラリアの第一治療法である ATC (Artemisinin Combination Therapy) において用いられるアルテミシニン誘導体とパートナードラッグのうち、Dihydroartemisinin (DH), Piperazine (PQ) および Lumefantrine (LM) を選択し、それぞれの薬剤に対する耐性原虫をミューテーターライブラリーからスクリーニングする。具体的には、野生型 (WT) およびミューテーター (Mut) をそれぞれマウスに接種し、感染率が 1% 前後に達した日よりそれぞれの薬剤を 4 日間腹腔投与する。その後、再燃した原虫を新たなマウスに接種し、薬剤の投与を繰り返し、薬剤耐性原虫をスクリーニングする。



安定した耐性を持つ原虫集団を確認した時点で、複数個の原虫クローンを得る。各クローンが薬剤耐性をもつことを最終確認する。

単離した薬剤耐性原虫について、最低 4 クローンを次世代シーケンサー Illumina HiSeq 2000 により全ゲノムリシーケンシングする。原虫 1 クローンあたり、1 ギガ塩基の配列をペアエンド法 (両端 100 塩基の配列決定) によって得る。*P. berghei* のゲノムサイズは約 23 メガ塩基なので、冗長度約 40 倍のシーケンスデータが得られる。突然変異の確認にあたっては、英国サンガー研究所から入手する *P. berghei* ANKA 株の全ゲノムを参照とする他、コントロール原虫 (不均衡変異導入していない野生型 DNA polymerase δ を挿入した原虫) 2 クローン からも別個にゲノム解析する。スーパーコンピューターにより大規模ゲノムデータを処理し、コントロール原虫には存在せず、薬剤耐性原虫クローンすべてに共通する突然変異を探索 (CLC Genomic

Working Bench を使用) し、その遺伝子と変異の位置を同定する。

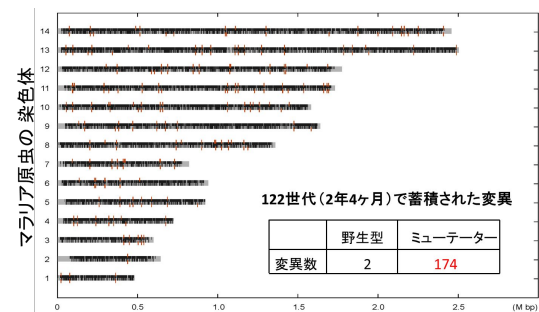
4. 研究成果

(1) ミューテーターマラリアの作成

DNA polymerase δ の校正機能に必須な 2 つのアミノ酸をアラニンに置換した変異型遺伝子で内因性遺伝子を置き換えた組み換え原虫を作成した。作成した組み換え原虫における当該遺伝子の塩基配列解析およびザンブロット法による検証を行なった結果、目的とした原虫を作成できたことを確認した。

(2) ミューテーターの変異率を測定

野生型原虫とミューテーターをそれぞれマウスに接種し、一週間後に感染赤血球 10^3 個を新しいマウスへ摂取することを繰り返した。122 週間の継代感染を行なった後、野生型とミューテーターそれぞれ 2 クローンを単離し NGS によるゲノムワイド変異解析を行なった。その結果、野生型では新たに 2 個、一方ミューテーターでは 174 個の変異がゲノムワイドに分散していることを見出した。以上のことから、本研究で創出したミューテーターは、野生型原虫の 80 倍以上の変異率を持つことを明らかにした。



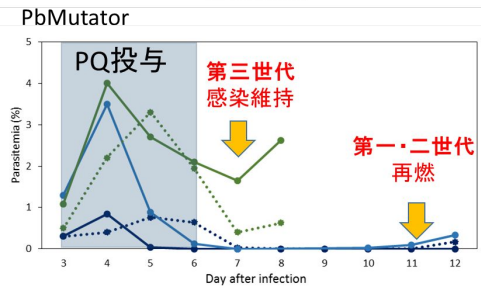
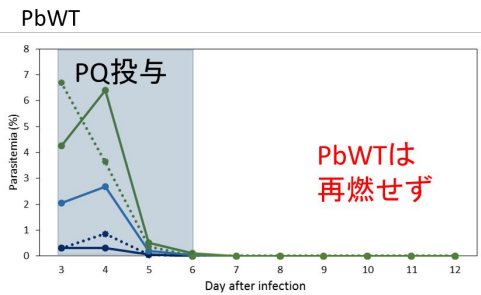
(3) 薬剤耐性原虫の単離

Dihydroartemisinin (DH) 耐性原虫の単離 ミューテーター感染マウスに対して DH を投与し、再燃した原虫を新たなマウスへ感染を行なったが、再燃の時期は早まるものの、DH 投与期間中においても生存する表現型を示す耐性原虫を単離することはできなかった。スクリーニングを継続する必要があると考える。

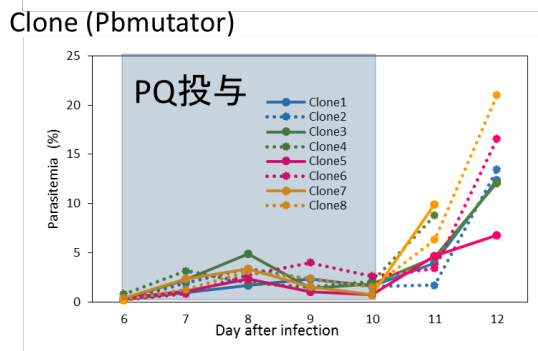
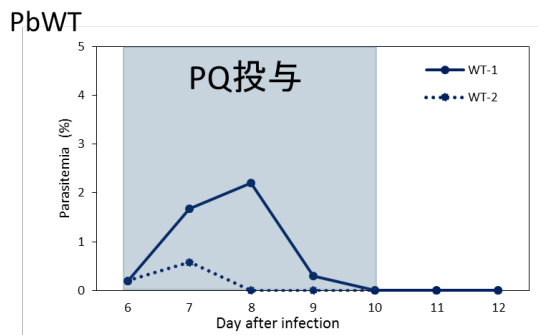
Piperazine (PQ) 耐性原虫の単離

PQ 投与量を 5mg から 15mg、最終的には 20mg/kg の高い投与量でも生存する、非常に高い耐性を示す原虫集団を得た。耐性原虫はスクリーニング 1 回目からその存在を確認し、3 回目ではその耐性は強度を増した。最終的には 20mg/kg で 13 回スクリーニングを行ない、安定した耐性を保持する原虫集団を得、この集団から任意の 4 クローンを単離し、NGS によるゲノムワイド変異解析を行なった。その結果、4 クローンすべてに共通する変異が合計 6 つ検出された。現在、これら 6 つのいずれの遺伝子変異が耐性を決定づけているかを検証する実験を行なっている。

第三世代目までのスクリーニングの結果 (下図)

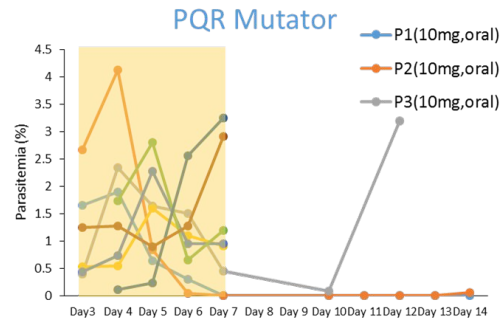


PQ 耐性はクローンにおいても保持されていることを確認した (下図)



さらに野生型原虫と PQ 耐性原虫の ED50 を調べた結果、耐性原虫の ED50 は 2 倍に上昇していることを明らかにした。

Lumefantrine (LM) 耐性原虫の単離
LM 耐性原虫をミューテーターからスクリーニングした。スクリーニング 3 回目から LM 耐性原虫が出現し、さらに薬剤投与を 20mg/kg まで増加してスクリーニングを行ない、より強い耐性を保持する原虫を単離することに成功した。
スクリーニング 3 回目で LM 耐性原虫が出現 (下図)



LM 耐性を保持するクローンを複数個単離し、SNP 解析を行った結果、全てに耐性クローンに共通する 8 つの遺伝子変異を検出した。これらの遺伝子のどれが耐性を決定づけているかを検証する実験を行なっている。

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 15 件)

Toshihiro Mita, Shinichiro Tahibana, Makoto Hirai: Plasmodium falciparum Kelch13: A potential molecular marker for tackling artemisinin-resistant malaria parasites. **Expert Review of Anti-infective Therapy** 2016;14(1):125-35. doi: 10.1586/14787210.2016.1106938. 査読あり

Tomoyo Taniguchi, Eiji Miyauchi, Shota Nakamura, Makoto Hirai, Kazutomo Suzue, Takashi Imai, Takahiro Nomura, Tadashi Handa, Hiroko Okada, Chikako Shimokawa, Risa Onishi, Alex Olia, Jun Hirata, Haruyoshi Tomita, Hiroshi Ohno, Toshihiro Horii, and Hajime Hisaeda: Plasmodium berghei ANKA causes intestinal malaria associated with dysbiosis. **Sci. Reports** 2015 Oct 27;5:15699. doi: 10.1038/srep15699. 査読あり

Hikosaka K, Hirai M, Komatsuya K, Ono Y, Kita K: Lactate retards the development of erythrocytic stages of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. **Parasitol Int.** 2015 Jun;64(3):301-3. doi: 10.1016/j.parint.2014.08.003. 査読あり

Honma H, Hirai M, Nakamura S, Hakimi H, Kawazu S, Palacpac NM, Hisaeda H, Matsuoka H, Kawai S, Endo H, Yasunaga T, Ohashi J, Mita T, Horii T, Furusawa M, Tanabe K: Generation of rodent malaria parasites with a high mutation rate by destructing

proofreading activity of DNA polymerase δ .
DNA Res. 2014 Aug;21(4):439-46. doi:
10.1093/dnares/dsu009. 査読あり

Siregar JE, Kurisu G, Kobayashi T,
Matsuzaki M, Sakamoto K, Mi-ichi F,
Watanabe Y, Hirai M, Matsuoka H, Syafruddin
D, Marzuki S, Kita K. Parasitol Int. 2015
Jun;64(3):295-300. doi:
10.1016/j.parint.2014.09.011. 査読あり

〔学会発表〕(計 3件)

平井誠・池田美恵・橘真一郎・美田敏
「ミューテーターマラリア原虫ライブラリーから薬剤耐性原虫の単離」
第 85 回日本寄生虫学会大会、3月20日、宮崎市民プラザ 2016 年

平井誠・池田美恵・橘真一郎・美田敏
「高頻度突然変異マラリア原虫を活用した薬剤耐性機構解明への挑戦」第 75 回日本寄生虫学会東日本支部会、2015 年 9 月 26 日、LEN貸し会議室「御茶ノ水ニコライ堂前」
本間一、平井誠、新倉保、美田敏宏、小林富美恵、堀井俊宏、遠藤弘良

「ミューテーターマラリア原虫を用いた突然変異蓄積パターンの解析」第 84 回日本寄生虫学会大会、東京 杏林大学 三鷹キャンパス 2015 年 3 月 21 日-22 日

〔図書〕(計 2件)

森稔幸、平井誠 第二章 [配偶子融合] 動植物の受精 共通機構と多様性 (DOJIN BIOSCIENCE SERIES 13th) 澤田均 編 化学同人 332 (32-42) 2014 年

Hirai M: Fertilization mechanisms of the rodent malarial parasite *Plasmodium berghei*.
In “*Sexual Reproduction in Animals and Plants*”, Sawada, H. *et al.* eds. Springer. Japan
480 (337-344) 2014 doi:
10.1007/978-4-431-54589-7

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平井 誠 (HIRAI, Makoto)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：50326849