

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 17 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24800031

研究課題名(和文) マウスを用いたマラリア原虫の増殖性に関する主要な宿主遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of major host genes involved in the malaria parasite proliferation using mice.

研究代表者

海野 明広 (UNNO, AKIHIRO)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50628592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マウスの9番染色体の約1.68Mbの領域(Pymr1領域)内に存在するマラリア原虫の増殖性に関する主要な宿主遺伝子を解析した。(1)リアルタイムPCRを用いた遺伝子発現解析の結果、Pymr1領域に存在する遺伝子の中からマラリア抵抗性系統よりも感受性系統間で共通して発現量の上昇を示す遺伝子を見いだした。(2)BACクローンを用いて、これらの候補遺伝子の発現量を増加させたTGマウスの作製を試みた。現在、作製したTGマウスにおけるマラリア原虫の感受性を解析するために必要な個体数を得るために交配を行っている。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to examine host genes conferring resistance to infection with the malaria parasite in the Pymr1 locus on mouse Chr.9. (1) Using real-time PCR analysis, we detected that several mRNA levels were higher in malaria-susceptible mice than in malaria-resistant mice. (2) To examine the effects of the gene overexpression on resistance to infection with the parasite, we tried to generate TG mouse lines using mouse BAC clone. Susceptibility analyses using these TG mice are still in preparation.

研究分野：実験動物学

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：マラリア 宿主遺伝子 順行性遺伝学

1. 研究開始当初の背景

マラリアは年間 200 万人程度の人間を死に至らしめる寄生虫感染症で、エイズ、結核と並ぶ三大感染症のひとつである。その治療法や予防法の開発は世界的に極めて重要な課題である。マラリアの病態には様々な因子が影響するが、重要な因子として宿主の遺伝的要因がある。申請者の所属する研究室では、ネズミマラリア原虫感染に対して、抵抗性を示すマウス系統と感受性を示すマウス系統の交配群を用いた連鎖解析から、感染初期の原虫増殖性に極めて大きな影響を与える遺伝子 (*Pymr1: Plasmodium yoelii* malaria resistant locus 1) がマウス第 9 番染色体に存在することを明らかにした。*Pymr1* 領域にはマウスのマラリア原虫増殖性に関与する主要な遺伝子が存在しており、この宿主遺伝子を特定することはマラリア原虫感染に対する宿主抵抗性機構を理解する上で極めて重要である。

2. 研究の目的

順行性遺伝学的手法により、マウスの 9 番染色体の約 1.68Mb の領域 (*Pymr1* 領域) 内にマラリア原虫の増殖性に極めて強力な作用を有する宿主遺伝子が存在することを見出している。本研究によりマラリア原虫の増殖性に関与する主要な宿主遺伝子を同定することが出来れば、その作用機序をモデルとして新たな治療薬・予防法の開発につながる革新的な知見を得る事が期待できる。そこで本研究では、*Pymr1* 領域内の宿主遺伝子を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

9 番染色体の *Pymr1* 領域内に存在している遺伝子の中から、宿主のマラリア原虫の増殖に関与する宿主遺伝子を同定する。有

力な候補遺伝子について、更に詳細な遺伝子発現解析、塩基配列の解析を行い原虫増殖性に関与する宿主遺伝子としての検討を進める。確証が得られたらその遺伝子の組換えマウスを用いて目的とする宿主遺伝子としての最終検証を行う。

(1) 候補遺伝子の検討

塩基配列の解析：候補遺伝子について感受性系統と抵抗性系統の塩基配列をサンガー法で解析し比較する。感受性系統と抵抗性系統間でアミノ酸置換などの明確な差が認められた遺伝子を有力な候補遺伝子とする。

遺伝子発現量の解析：上述の遺伝子について感受性系統と抵抗性系統の遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法で測定し比較する。感受性系統と抵抗性系統の間で明らかに異なる発現パターンを示した遺伝子を有力な候補遺伝子とする。

(2) 候補遺伝子の KO マウスあるいは TG マウスの作製

International Mouse Strain Resource より候補遺伝子を相同組換えにより KO した ES 細胞を入手し、その ES 細胞由来の KO マウスを作製する。何らかの理由により、KO マウスが得られない場合には、抵抗性系統に感受性系統由来の BAC を導入した TG マウスを作製する。候補遺伝子を含むマウス BAC クローンは理研パイオリソースセンターより入手する。必要に応じて候補遺伝子のサブクローニングを行ってから、その DNA をマイクロインジェクションにより導入した受精卵を仮親に移植することによって TG マウスを得る。

(3) 作製した遺伝子改変マウスの表現型解析

KO・TG マウスと野生型マウスについて、

ネズミマラリア原虫に感染した赤血球を腹腔内に投与する。感染後2日間隔で、尾端より採取した血液から作製した薄層塗沫標本にギムザ染色を施す。この標本を顕微鏡で観察し、血虫率(感染赤血球数/全赤血球数)を測定する。また、4週間にわたり死亡率の確認も行う。KO-TGマウスにおいて、原虫の増殖性や死亡率が明確に抑制されていれば、その遺伝子がマラリア原虫の増殖性に関与する宿主遺伝子を確認する。

4. 研究成果

本研究の目的は、マウスの9番染色体の約1.68Mbの領域(Pymr1領域)内に存在するマラリア原虫の増殖性に関与する主要な宿主遺伝子を同定することである。1年目は、Pymr1領域に存在する遺伝子の中から、プロテオーム解析のデータやゲノム情報を手がかりとした検討を行い、マラリアの増殖性に関連していると考えられる遺伝子の絞り込みを行った。マウス・ゲノム・データベースを用いて感受性系統と抵抗性系統間のアミノ酸置換を伴う多型を解析したところ、複数の遺伝子に有力な変異を見出した。また遺伝子発現量をリアルタイムPCR法にて解析した結果、マラリア抵抗性系統よりも感受性系統間で共通して発現量の上昇を示す遺伝子を見いだした。そこで2年目は、これらの遺伝子が実際にマラリア原虫の増殖性に関与しているか否か検討をするため、遺伝子欠損マウスを用いた実験を計画した。しかしながら、これらの遺伝子欠損マウスの入手が困難であったため、候補遺伝子の発現量を増加させたTGマウスを作製し、マラリア感受性が変化するか否か検証を行うことにした。RIKEN BRCより候補遺伝子領域を含むBACクローンを入手し、そのDNAをマイクロインジェクションにより導入した受精卵を仮親に移植することによってTG

マウスを得た。現在、作製したTGマウスにおけるマラリア原虫の感受性を解析するために必要な個体数を得るために交配を行っている。今後、TGマウスを用いた表現型解析が必要であると考えられる。

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 1件)

Hayashi T, Unno A, Baba M, Ohno T, Kitoh K, Takashima Y. (2014) CD44 mediated hyaluronan adhesion of *Toxoplasma gondii*-infected leukocytes. *Parasitology International* 63(2) 479-484. 査読有

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical/6272/6333/jikkendoubutsukagaku.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

海野 明広 (UNNO, Akihiro)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・
助教

研究者番号：50628592

(2)研究分担者 なし

研究者番号：

(3)連携研究者 なし

研究者番号：