

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670199

研究課題名(和文) ENU変異熱帯熱マラリア原虫コレクションの構築と変異原因遺伝子同定法の開発

研究課題名(英文) Random mutagenesis of *P. falciparum* by ENU

研究代表者

岩永 史朗 (IWANAGA, SHIROH)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20314510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では熱帯熱マラリア原虫を約70%の原虫が死滅する条件においてENUで処理し、遺伝子変異を誘発した原虫集団を作成した。次にENU変異原虫集団をメフロキンで処理し、新たにメフロキン耐性を獲得した原虫を選択した。この原虫における遺伝子変異を同定するために全ゲノム解析及びSNPs解析を行った。その結果、約2000個の変異が同定された。次に耐性の責任遺伝子を同定するために耐性原虫由来人工染色体ライブラリーを構築し、メフロキンによるスクリーニングを行った。その結果、メフロキン耐性遺伝子が組み込まれたと推定される原虫クローンを3種得ることに成功した。現在、この耐性遺伝子の同定を試みている。

研究成果の概要(英文)：N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) is a potent mutagen and is widely used for random mutagenesis. In the present study, we utilized it for generating the parasite population, whose genomic sequence were randomly mutated, and selected the mefloquine-resistant parasites from them. The obtained mefloquine-resistant parasites exhibited 3 folds stronger resistance than the wild-type parasite. Genomic sequence analysis showed that approximately 2,000 mutations were introduced by ENU treatment. To identify the drug resistant gene, genomic DNA library of mefloquine-resistant parasite was directly generated in drug sensitive parasites using *P. falciparum* centromere plasmid and the generated library was treated with mefloquine. After three rounds of treatments, three independent parasite clones, which acquired newly mefloquine resistance, were obtained. The centromere plasmids are being recovered from those selected parasites and the drug resistant gene is being identified now.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア ENU

1. 研究開始当初の背景

ENUは強力な変異源であり、1塩基置換(点突然変異)を誘発することから様々なモデル生物において突然変異体コレクションの作製に用いられている。突然変異体コレクションは、特定の表現型を有する変異体から原因遺伝子を探索する順遺伝学的な遺伝子機能解析のリソースとなる。しかしENU変異体を用いた順遺伝学的方法論は一部の生物種に限られている。即ち、この方法では変異体を野生型由来の遺伝子ライブラリーで相補し、表現型が野生型に復元した変異体を選択して目的遺伝子を同定するが、ゲノム上の遺伝子全体をカバーできるような遺伝子導入技術はモデル生物を初めとする一部の生物でしか確立されていないことから汎用されるに至っていない。

一方、これまでに申請者は熱帯熱マラリア原虫において新規遺伝子操作ツールであるセントロメアプラスミドと直接遺伝子導入法を開発し、同原虫においてゲノム全体をカバーする遺伝子ライブラリーの構築に成功している。そこで本研究ではセントロメアプラスミドを用いたマラリア原虫遺伝子ライブラリー構築法とENUを用いた突然変異体作成技術を組み合わせ、マラリア原虫において革新的な遺伝子機能解析システムを構築できると着想した。

2. 研究の目的

本研究では熱帯熱マラリア原虫をENU処理し、突然変異原虫コレクションを構築する。次にこのコレクションから表現型が変化した原虫の選択を試みる。今回はモデル実験として抗マラリア薬に対する耐性を獲得した変異原虫を選択する。更にセントロメアプラスミドを用いて変異原虫ゲノムから遺伝子ライブラリー作製し、これを選択した野生型原虫に導入して、表現型に対する責任遺伝子を同定する。

3. 研究の方法

(1) ENU処理による変異原虫集団の獲得:

熱帯熱マラリア原虫を様々な濃度のENUにて処理し約70%の原虫が生存可能な条件を検討する。

(2) メフロキン耐性原虫の選抜:

前述の(1)で得られたENU変異原虫コレクションをメフロキンにより処理し、新たにメフロキン耐性を獲得した原虫集団を選抜する。選択した集団から原虫をクローン化し、次世代シーケンサーにより全ゲノム配列を決定する。更に得られた配列を野生型原虫ゲノム配列と比較し、SNPsを決定する。

(3) メフロキン耐性遺伝子の人工染色体ライブラリーからの同定:

得られたメフロキン耐性原虫よりゲノムDNAを限定分解後、巨大DNA断片を得、これらをセントロメアプラスミドに組み込む。続いて、これを野生型原虫に導入し、変異原虫

遺伝子ライブラリーを構築する。更に薬剤選択を行って、耐性遺伝子(表現型に対する責任遺伝子)を同定することを試みる。

4. 研究成果

(1) ENU処理による変異原虫集団の獲得及びメフロキン耐性原虫の選抜:

熱帯熱マラリア原虫を同調培養し、ENU存在下で培養して生存率が約30%となるような条件を決定した。続いて得られたENU変異原虫集団を20mMのメフロキンで4日間処理後、薬剤を除去して培養を継続し、生存した原虫集団を回収した。このメフロキン処理を計3回繰り返す、最終的にメフロキンに明確な耐性を示す原虫集団を得た。生存した原虫集団から限界希釈法により変異原虫をクローン化してENU変異メフロキン耐性原虫株を樹立した。得られた原虫株についてIC50値を検討した結果、約35nMであることが判明した。ENUによる変異導入前は約12nMであったことから約3倍程度耐性能が上昇していることが示された。更に患者由来のメフロキン耐性株と比較した結果、ほぼ同等の耐性を示したことからENU処理により得られた耐性株は臨床においても耐性を示すことが示唆された。

(2) メフロキン耐性原虫のゲノム解析

獲得したメフロキン耐性原虫株について全ゲノム配列及び遺伝子変異の決定を試みた。具体的にはSOLiD5500 system (ABI社製)とION PROTON system (ABI社製)を用い、得られた配列情報を熱帯熱マラリア原虫3D7株のゲノム配列と比較して変異を同定した。SOLiD5500 systemを用いて配列決定した場合はLife scopeプログラムを用いてMappingし、同プログラムを用いて変異(SNPs)をコールした。一方、ION PROTON systemにより配列決定した場合はProton TorrentサーバーにてMapping及びSNPsのコールを行った。その結果、SOLiD5500 systemを用いた場合は約2000個のSNPsが同定されたのに対し、ION PROTONにより配列決定した場合は約20000個のSNPsが同定され、両手法間には約10倍の違いがあることが判明した。更にSNPsコールのプログラムによる差を検討するために両方のSystemにより得られたMapping dataを基にCLC Genomic Workbenchを用いて解析した結果、検出されたSNPs数は変化せず、SNPsコールの問題ではなく配列決定手法自体の問題であることが判明した。そこでSOLiD5500 systemとION PROTONで検出に違いがあったSNPsを複数選択し、Sanger法により実際に配列を調べた結果、SOLiD5500 systemの結果が正確であることが確認された。以上のことよりSOLiD5500 systemによる結果を以降の研究に使用した。またこの結果は本研究で使用したENU処理条件ではクローン当り約2000個の遺伝子変異を誘発することを示唆した。

続いて決定したゲノム配列及び変異情報

を基に過去、報告されたメフロキン耐性に関与すると推定される Multidrug resistant protein1(MDR1)の変異等について検討した。その結果、ENU 変異メフロキン耐性株の MDR1 には変異は無く、またコピー数の増加も無いことからメフロキン耐性には関与していないことが示唆された。また MDR1 と同じ ATP binding cassette (ABC) Transporter family に属し、薬剤排出ポンプとして機能する可能性のある 12 種の遺伝子についても変異とコピー数の変化を検討したが、野生型との違いは無く、これらの遺伝子もメフロキン耐性に関与しないと考えられた。以上の結果より、マラリア原虫のメフロキン耐性は従来考えられてきた機構とは異なる機構によって引き起こされていると示唆された。

(3) メフロキン耐性遺伝子の人工染色体ライブラリーからの同定:

ENU 変異メフロキン耐性株より責任遺伝子(薬剤耐性遺伝子)を同定するために図1に示すように同株よりセントロメアプラスミドを用いて遺伝子ライブラリーを作製した。セントロメアプラスミドとは原虫のセントロメアを組込んだ環状プラスミド DNA であり、原虫内で染色体と同様の挙動を示す。

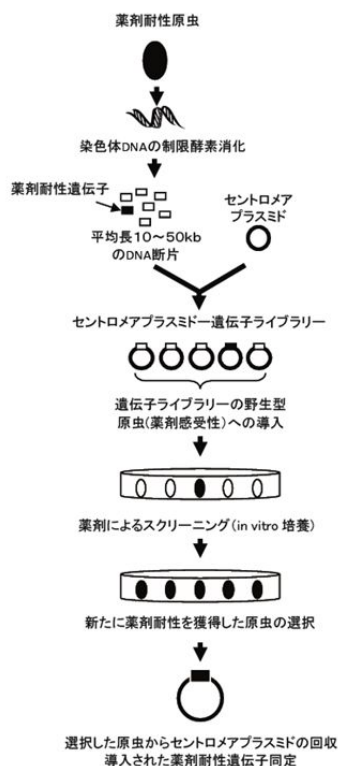


図1: 人工染色体ライブラリーを用いた責任遺伝子同定法

まず耐性株よりゲノム DNA を抽出後、制限酵素による限定分解を行い、20kbp 以上の DNA 断片を精製後、セントロメアプラスミドに組み込んだ。続いてこれを野生型株に導入し、セントロメアプラスミド(人工染色体)ライブラリーを構築した。次に構築したライブラ

リーのゲノム被覆度を検討した。まず、ライブラリーより任意に原虫をクローン化し、CHEF 解析した結果、インサート DNA の平均長は約 25kbp であることが明らかとなった。更に原虫の増殖率と寄生率の関係から 1 回の実験で約 500 匹の原虫に遺伝子導入することが可能であることが示された。最終的にこれらの値と熱帯熱マラリア原虫のゲノム長(25 Mbp)を基にゲノム被覆度は 0.5 であると算出された。この結果を基にライブラリー構築実験を繰り返し、最終的にゲノム被覆度が >10 を超える人工染色体ライブラリーを構築した。以上の結果より薬剤耐性遺伝子を同定可能な遺伝子ライブラリーを構築することができたと判断した。

続いて遺伝子ライブラリーをメフロキンによりスクリーニングした。具体的にはライブラリーを 5 つのグループに分け、それぞれを 20 nM のメフロキンで 4 日間処理し、その後薬剤を除去し、生存した原虫を回収した。その結果、薬剤除去後 8 日目に 3 つのグループにおいて原虫の生存を確認し、この原虫集団を回収した。得られた原虫集団についてセントロメアプラスミドに組み込んだ gfp 遺伝子の発現を調べたところ全ての原虫が GFP を発現しており、セントロメアプラスミドの存在が確認された。一方、残る 2 つのグループでは原虫の生存を確認することはできず、このグループ内の原虫には薬剤耐性遺伝子が組み込まれたものは存在していないと考えられた。3 つのグループより得た原虫集団を更に 2 回、20 nM のメフロキンで 4 日間処理したところ、何れのグループにおいても原虫の生存が確認された。そこでこれらの生存した各原虫集団から限界希釈法によりクローンを得、メフロキン耐性を調べた。その結果、20 nM のメフロキンで 6 日間処理した場合において何れのクローンも増殖・生存した。この結果より遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることで目的とする表現型(メフロキン耐性)に対する責任遺伝子が組み込まれた原虫クローンを選択することが可能であることが証明された。現在、この 3 種の原虫クローンよりセントロメアプラスミドを回収し、組み込まれたインサート DNA の配列を決定して責任遺伝子の同定を試みている。

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3件:全て査読有り)

1. Global transcriptional repression: An initial and essential step for Plasmodium sexual development. Yuda M, Iwanaga S, Kaneko I, Kato T. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Oct 13;112(41):12824-9. (2015) doi: 10.1073/pnas.1504389112.

2. Genome-Wide Identification of the Target Genes of AP2-0, a Plasmodium AP2-Family Transcription Factor. Kaneko I, Iwanaga S, Kato T, Kobayashi I, Yuda M. PLoS Pathog. 11(5):e1004905. (2015) doi: 10.1371/journal.ppat.1004905.
3. 岩永史朗：マラリア原虫人工染色体による薬剤耐性遺伝子の同定法, 化学療法の領域(医薬ジャーナル社) 8月号 2015年

なし()

〔学会発表〕(計4件)

1. 第85回日本寄生虫学会大会:岩永史朗、金子伊澄、加藤知美、油田正夫、マラリア原虫の生殖母体への分化に関わるゲノムワイドな転写抑制 2016年3月20日, 宮崎大学(宮崎県・宮崎市)
2. 第85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 ChIP-Seq法を用いたマラリア原虫スポロゾイト期の転写因子AP2-SPの全標的遺伝子の同定 2016年3月20日, 宮崎大学(宮崎県・宮崎市)
3. 第158回日本獣医学会:マラリア原虫の遺伝子発現制御機構 岩永史朗、金子伊澄、加藤知美、油田正夫 2015年9月7-9日, 北里大学(青森県・十和田市)
4. 分子寄生虫ワークショップ 2015:岩永史朗、金子伊澄、加藤知美、油田正夫 マラリア原虫の遺伝子発現制御機構, 2015年8月30日 9月2日, 帯広畜産大学(北海道・帯広市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩永 史朗 (IWANAGA Shiroh)
三重大学・医学(系)研究科(研究院)・
准教授
研究者番号: 20314510

(2)研究分担者

なし()

研究者番号:

(3)連携研究者