

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 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：26670200

研究課題名(和文) 転写因子を用いた人工誘導法によるスポロゾイト大量生産技術の開発

研究課題名(英文) Improvement of in vitro malaria sporozoite culture technique using a malaria transcription factor

研究代表者

油田 正夫 (yuda, masao)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90293779

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)：転写因子発現コンストラクトを野生型原虫に導入し遺伝子組み換え原虫を作製した。つぎに本原虫を用いオオシストの培養を実施し、オオシスト形成に及ぼす転写因子誘導の効果を評価した。組み換え原虫オオシストの直径は野生型より増大したが核の分裂の進行は、野生型同様不十分なままであった。そこで実際この転写因子がオオシスト期にどのような遺伝子群を活性化しているかをChIP-seq法で解析した。その結果、標的遺伝子は数百個同定されたがゲノムDNAの複製やmitosisに關与する遺伝子を誘導している証拠は得られなかった。このことからスポロゾイトの形成には本転写因子に加え他の転写因子が必要である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We generated transgenic parasites expressing a transcription factor under control of the promoter highly active in the early oocyst stage and examined if the induction promotes development of oocysts in vitro. In the culture of the transgenic parasites significant enlargement of oocysts diameter was observed compared to wild-type parasites, but effects of the induction on the progress of nuclear division were not clear. ChIP-seq analysis of the target genes of this transcription factor in the early oocyst stage showed that this transcription factor regulates numbers of genes related to protein synthesis but few genes required for nuclear division. The results suggested that effects of induction of the transcription factor are not sufficient for promoting sporozoite production and that induction of another transcription factor may be necessary to promote oocyst development and sporozoite production in vitro.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア スポロゾイト

1. 研究開始当初の背景

マラリアは現在でも年間数億人にのぼる感染者がでる、もっとも重要な感染症である。多くの人々がワクチンを必要としているが、いまだ実用的なワクチンの開発は実現していない。こうした状況のなか、弱毒化したマラリア原虫スポロゾイトを用いた生ワクチンは、スポロゾイトの保存技術、免疫法の改良により近年再び脚光を浴びている。しかしながらスポロゾイト自体はいまだハマダラ蚊から採取せざるをえず免疫に利用できる数は限られている。このことがスポロゾイトワクチンの実用化への最大のボトルネックとなっている。マラリア原虫の昆虫内ステージをハマダラ蚊でなく培養系で増殖させることがこの問題を解決するための唯一の手段であるが、培養系でのスポロゾイト生産の効率は極めて低く、動物実験レベルでも培養したスポロゾイトを使った免疫には成功していない。

一方申請者はこれまでのマラリア原虫転写因子の研究において、オオシストの成熟に必須である転写因子の同定に成功した。本研究はこの成果に基づき着想されたものである。

2. 研究の目的

本研究は実用的なスポロゾイト培養系確立のための基礎研究として、オオシスト成熟に必須の転写因子を用いて培養系でのスポロゾイト作製効率を飛躍的に改善することを目的とする。本研究の成功は弱毒性スポロゾイトを用いた生ワクチン実用化への第一歩であり、その波及効果は極めて大きい。

3. 研究の方法

本課題では遺伝子組み換え技術により、オオシストの成熟を促進する転写因子 AP2-OC (AP2 in oocysts) の発現を誘導し、培養系でのスポロゾイト作製効率を飛躍的に改善することを試みた。これまでの研究で、オオシストの初期に発現が誘導されるオオシスト capsule 蛋白 *Cap380* 遺伝子は、オオキネート期にはその mRNA が翻訳抑制を受けているが、オオシスト形成直後に大量に蛋白質として発現されることを見出した。そこでこの遺伝子のプロモーターを利用することで転写因子 AP2-OC を初期オオシストに強制発現させオオシストの発育を促すことを着想した。まず遺伝子発現コンストラクトを作製するため予備実験として *Cap380* 遺伝子のプロモーター領域の解析を実施した。*Cap380* 遺伝子の 5' 領域と 3' 領域を GFP 遺伝子の前後に連結した発現コンストラクトを作製し人工染色体に組み込んだ。この人工染色体を血液ステージの原虫に導入し *in vitro* でオオシストの培養を行い、オオシストへのステージ転換直後から GFP が発現していることを確認した。発現を確認後、*Cap380* 遺伝子の上流配列に AP2-OC 遺伝子を連結した発現コンストラクトを作製し、人工染色体に組み込んだ。この AP2-OC 発現人工染色体コンストラクトを血液ステージで野生型原虫に導入し、限界希釈法でクローン化し、遺伝子組み換え原虫を作製した。

4. 研究成果

作製した原虫からオオキネートステージを精製しオオシストの培養を実施し、オオシスト形成に及ぼす転写因子誘導の効果を評価

した。 対照としては野生型原虫を用いた。 培養した組み換え原虫を顕微鏡下で観察したところ、組み換え原虫オオシストはその直径が野生型より大きくなっていた。しかしながら転写因子誘導の効果の重要な指標と考えていた核の分裂の進行は、野生型同様不十分なままであった。そこで実際 AP2-OC がオオシスト期にどのような遺伝子群を活性化しているかを確認する必要があると考え、ChIP-seq 法で全標的遺伝子の同定を試みた。ChIP-seq は GFP 融合 AP2-OC 発現原虫を用いて実施した。原虫をハマダラ蚊に感染させ、感染した蚊中腸をパラホルムアルデヒドで固定した。解析の結果、AP2-OC はおよそ 500 の遺伝子を直接制御していることがわかった。同定された標的遺伝子中には蛋白合成にかかわる遺伝子が多数同定された。一方ゲノム DNA の複製や mitosis に関与する遺伝子の数は少なく、本転写因子が核の分裂を誘導している証拠は得られなかった。これらの結果はオオシストスポロゾイトの形成には AP2-OC に加え別の転写因子が関与している可能性を示唆していた。今後 GFP 融合蛋白発現原虫を用いて他の転写因子のオオシストでの発現を確認する予定である。オオシストでの転写因子の発現が確認できた場合、ChIP-seq 等を実施してその機能を推定した後、今回作製した組み換え原虫内で強制発現させることで本技術を完成に近づけたい。

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 6 件)

1. Zhang M, Kaneko I, Tsao T, Mitchell R, Nardin EH, Iwanaga S, Yuda M, Tsuji M. (2016) A highly infectious Plasmodium yoelii parasite, bearing Plasmodium falciparum circumsporozoite protein Malar J. *in press* 査読有
2. Yuda M, Iwanaga S, Kaneko I, Kato T. (2015) Global transcriptional repression: An initial and essential step for Plasmodium sexual development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 13;112(41):12824-12829 査読有
3. Kaneko I, Iwanaga S, Kato T, Kobayashi I, Yuda M. (2015) Genome-Wide Identification of the Target Genes of AP2-0, a Plasmodium AP2-Family Transcription Factor. *PLoS Pathog*. 27;11(5):e1004905. 査読有
4. Zhao H, Aoshi T, Kawai S, Mori Y, Konishi A, Ozkan M, Fujita Y, Haseda Y, Shimizu M, Kohyama M, Kobiyama K, Eto K, Nabekura J, Horii T, Ishino T, Yuda M, Hemmi H, Kaisho T, Akira S, Kinoshita M, Tohyama K, Yoshioka Y, Ishii KJ, Coban C. (2014) Olfactory plays a key role in spatiotemporal pathogenesis of cerebral malaria. *Cell Host Microbe*. 14;15(5):551-563. 査読有
5. Iwanaga S, Isawa H, Yuda M. (2014) Horizontal gene transfer of a vertebrate vasodilatory hormone into ticks. *Nat Commun*. 5:3373. 査読有
6. Chang J, Oikawa S, Iwahashi H, Kitagawa E, Takeuchi I, Yuda M, Aoki C, Yamada

Y, Ichihara G, Kato M, Ichihara S.
(2014) Expression of proteins
associated with adipocyte lipolysis
was significantly changed in the
adipose tissues of the obese
spontaneously hypertensive/NDmcr-cp
rat. *Diabetol Metab Syndr.*
27;6(1):8. 査読有

〔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)

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

油田正夫(YUDA, MASAO)

三重大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 90293779

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: