

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2023年6月7日

採択番号	2022-共同-15		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	福本 晋也
研究課題名	オス生殖細胞発達障害を持つ熱帯熱マラリア原虫株の原因遺伝因子の同定と機能解析		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	ふるや てつや 古谷 哲也	東京農工大学農学部共同獣医学科獣医伝染病学研究室・教授	
研究分担者			
	ふくもと しんや 福本 晋也	帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授	
研究期間	2022年4月1日 ～ 2023年3月31日		
目的・趣旨	<p>熱帯熱マラリア原虫 (<i>Plasmodium falciparum</i>) はヒトに感染するマラリア原虫の中で最も病原性が高く、現在も、世界で年間40万人以上の感染死亡者が報告されている。複雑なマラリア原虫の生活環において、生殖細胞(ガメートサイト)は感染蚊によってヒトから摂取され、蚊の腸内で生殖するステージだが、蚊の吸血時にヒトに感染するスポロゾイトと共に、生活環の中で最も原虫の数が減少する(ボトルネック)であることが知られているため、伝播阻止ワクチンのターゲットとして非常に重要である。これらの背景を踏まえ、本共同研究では、先行研究以降に利用可能となった次世代シーケンサーを用い、オス生殖細胞に発達障害を持つ Dd2 株に対し、その直接の親株であるがオス生殖細胞が正常に発達する W2 株における染色体 12 ゲノム配列を解読し、ゲノム配列がデータベースに公開されている Dd2 株配列との比較により、Dd2 株のオス生殖細胞発達障害の原因となる遺伝子変異の同定と、遺伝子ノックアウトおよび遺伝子スワップにより遺伝子機能の証明を行う。さらに、同定遺伝子、あるいはそれに関与して発現している遺伝子の産物に対する抗体を作製し、それが、ガメートサイトを摂取した蚊の体内で、<i>P. falciparum</i> の生殖に及ぼす影響を判定し、媒介阻止ワクチン開発における可能性を検証する。</p>		
研究経過の概要	<p>本共同研究では、まず、<i>P. falciparum</i> Dd2 株のオスガメートサイト発達障害の原因遺伝子の同定のため、データベース上の Dd2 株ゲノム配列との比較を行うため、次世代シーケンサーにより親株である W2 株のゲノム配列の解読を行った。ゲノム配列は、本学工学部の養王田正文教授との共同研究により、Pacific Bioscience 社と Illumina 社のシーケンサーにより、高解像度の W2 ゲノム配列を取得した。コンティグ配列は、最長約 250kb の配列によって構成されていたため、申請者による先行研究において報告された 82 kb を含む染色体 12 上の約 800 kb の領域をカバーする W2 コンティグをマップして、W2 と Dd2 の比較を行った。その結果、まず、82kb の領域(Furuya T et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 102(46):16813-8.)について、Dd2 と W2 に存在する</p>		

	<p>変異を探したところ、非翻訳領域以外に、顕著な変異が見つからなかった。そのため、更に以前の報告 (Vaidya AB et al., Mol Biochem Parasitol. 1995 69(1):65-71.) を参照し、報告された染色体 12 上の遺伝子マーカーを参照として、対象となる遺伝子領域の同定を試みた。その結果、当時、800kb と報告されていた染色体 12 の領域が、最もアップデートした遺伝子マーカーのゲノム上の塩基配列位置によって、367kb の領域となる事が明らかになった。そこで、改めて、この領域に存在する遺伝子群(100 遺伝子程度)について、その翻訳領域における Dd2 株と W2 株の塩基配列の比較を試みた。その結果、2 つの遺伝子において、明らかな遺伝子多型が発見された。一つは、転写因子に相同性を持つ遺伝子で、翻訳領域の前半およそ 1/3 の箇所に存在する点変異による終止コドンにより偽遺伝子となっていた。もう一つの遺伝子は、ヒストン修飾遺伝子であり、翻訳領域の 2/3 の箇所に 27 塩基の配列が挿入されていた。</p> <p>現在、本研究室では上記のゲノム配列解析により同定された Dd2 株のオスガメートサイト発達障害候補遺伝子について、機能の証明をするため、先ず、人血清を用いた熱帯熱マラリア培養系により、ガメートサイトの産生を開始している。ガメートサイトを比較的多く産生する HB3 株を用いてガメートサイトの培養を開始しており、ガメートサイトステージの産生を確認できたため、今後、先ずは、親株の W2 株における遺伝子改変によるオス生殖細胞の機能性を評価するため、上記の候補遺伝子のノックアウト株の作製を行い、成熟ガメートサイト細胞の鞭毛放出数の測定を行う。さらに、Dd2 株の遺伝子改変により、偽遺伝子を野生型の発現遺伝子にスワップを行い、表現型の回復を試みる。これらの実験には、既に確立している CRISPR-Cas9 を用いた遺伝子改変システムを活用する。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>上記のように、本研究の成果として、遺伝的に直系でありながら、オス生殖ステージの発達機能が明らかに異なる熱帯熱マラリア寄生虫株 W2 と Dd2 における、染色体 12 上の遺伝子配列比較において、2 つの遺伝子に明らかな多型を発見した。一つは、転写遺伝子における変異による機能的遺伝子の翻訳停止であり、もう一つは、ヒストン修飾遺伝子における明らかな配列挿入であった。これらの遺伝子は、マラリア寄生虫に限らず、真核細胞の分化における遺伝子の転写活性化と、染色体タンパク質修飾による転写制御において、非常に重要な遺伝子であり、上記の熱帯熱マラリア株における生殖細胞の分化と機能発達において、大きな役割が予想される。今後は、この発見をもとに、これらの遺伝子変異が及ぼす生物学的な影響について、遺伝子操作による機能的な実験によって、これら遺伝子の実際の機能を明らかにしていく。そして、更には、ネズミマラリアにおける相同遺伝子の同定により、In vivo 実験においても、最新の CRISPR-Cas9 を用いた遺伝子改変システムにより、これらの生物学的な研究を進める予定である。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>現在まで、本研究についての学会発表や論文発表は行われていない。本研究成果については、発見のポテンシャルを鑑み、学会発表、投稿論文発表について、慎重な検討を必要とすると考える。今後、共同研究者と検討の上、発表形式と内容について決定する。</p>