

ストの検出限界は19個となった。非標識プライマーかつ単一病原体プライマーの反応系では1個のオーシストを検出可能であった。したがってプライマーの標識と多種プライマーの混合は様々な相互作用のもと、反応系において何らかの抑制的作用を発現することが明らかとなった。この抑制効果は限定的で、実際のフィールドでベクター昆虫が保持する病原体数を勘案すると十分に実用的な範囲内の検出限界低下ではあったが、今後の研究課題として、反応系における負の相互作用を改善することが望まれる。

本研究では等温遺伝子増幅法における蛍光プライマーの有用性を明らかにした。本年度の分担研究者の研究においては、電気泳動と蛍光検出器による解析を行ったため、簡便性という観点からは問題が生じた。しかしながら、蛍光検出法には様々な方法があり、他の分担研究者が開発に成功した簡便な標識検出法と組み合わせられることで、極めて簡便に多種の病原体を検出することが可能になることが期待される。

#### E. 結論

本研究成果によって、蛍光標識プライマーを用いた等温遺伝子増幅法が媒介蚊からの病原体検出に有効であることが明らかとなった。今後、マラリアや、西ナイル熱などの実際の汚染地域での疫学調査、日本における水際での侵入防除に際して、高い有用性を持ち、更なる利便性を付与可能であることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文

Shinzawa, N., Nelson, B., Aonuma, H., Okado, K., Fukumoto, S., Miura, M. & Kanuka, H. (2009) p38 MAPK -dependent phagocytic encapsulation confers infection tolerance in *Drosophila*, *Cell Host Microbe*. 6, 244-52.

Fukumoto, S., Tamaki, Y., Igarashi, I., Suzuki, H. & Xuan, X. (2009) Immunogenicity and growth inhibitory efficacy of the prime-boost immunization regime with DNA followed by recombinant vaccinia virus carrying the P29 gene of *Babesia gibsoni* in dogs, *Exp Parasitol*. 123, 296-301.

Thekiso, O. M., Rodriguez, C. V., Rivas, F., Coronel-Servian, A. M., Fukumoto, S., Sugimoto, C., Kawazu, S. & Inoue, N. (2010) Detection of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* Infections from *Rhodnius pallescens* Bugs by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP), *Am J Trop Med Hyg*. 82, 855-60.

Herbas, M. S., Ueta, Y. Y., Ichikawa, C., Chiba, M., Ishibashi, K., Shichiri, M., Fukumoto, S., Yokoyama, N., Takeya, M., Xuan, X., Arai, H. & Suzuki, H. (2010) Alpha-tocopherol transfer protein disruption confers resistance to malarial infection in mice, *Malar J*. 9, 101.

Aonuma, H., Yoshimura, A., Kobayashi, T., Okado, K., Badolo, A., Nelson, B., Kanuka, H. & Fukumoto, S. (2010) A single fluorescence-based LAMP reaction for identifying multiple parasites in mosquitoes, *Exp Parasitol*. 125, 179-83.

##### 2. 学会発表

新澤直明、青沼宏佳、岡戸清、福本晋也、三浦正幸、嘉糠洋陸 p38 MAPK-dependent phagocytic encapsulation confers infection tolerance in *Drosophila*. Jacques Monod Conference "Insect immunity in action: from fundamental mechanisms of host defense to resistance against infections in nature" 2009. 5. 25

新澤直明、青沼宏佳、岡戸清、Bryce Nelson、福本晋也、三浦正幸、嘉糠洋陸 p38 MAPK-dependent phagocytic encapsulation confers infection tolerance in *Drosophila* 第9回ショウジョウバエ研究会 2009. 7. 6

伴戸寛徳、青沼宏佳、岡戸清、新澤直明、Guelbeogo Moussa, N' Fale Sagnon、福本晋也、嘉糠洋陸 *Serratia marcescens* regulates *Plasmodium* development in mosquito midgut EMBO WORKSHOP "Molecular and Population Biology of Mosquitoes and Other Disease Vectors" 2009. 7. 22

土井裕子、小林朋美、福本晋也、岡野栄之、嘉糠洋陸 マラリア原虫の細胞骨格システム トランジション 第15回分子寄生虫学ワー

クシヨップ 2009. 8. 7

吉村文、福本晋也、嘉糠洋陸 フィラリアの脱皮システムトランジション 第 15 回分子寄生虫学ワークショップ 2009. 8. 7

吉村文、岡戸清、波田一誠、丹羽隆介、福本晋也、嘉糠洋陸 Transcription-linked developmental transition in filarial parasites during a bridge between vector and host 9th Awaji International Forum of Infection and Immunity 2009. 9. 9

新澤直明、Bryce Nelson 青沼宏佳、岡戸清、福本晋也、三浦正幸、嘉糠洋陸 p38 MAPK-dependent phagocytic encapsulation confers infection tolerance in Drosophila 9th Awaji International Forum of Infection and Immunity 2009. 9. 9

伴戸寛徳、青沼宏佳、岡戸清、新澤直明、福本晋也、嘉糠洋陸 蚊・マラリア原虫・腸内細菌の三者の相互作用 第 148 回日本獣医学会学術集会 2009. 9. 25

新澤直明、青沼宏佳、岡戸清、福本晋也、三浦正幸、嘉糠洋陸 細菌感染に対する宿主側トレランス機能の解明 第 148 回日本獣医学会学術集会 2009. 9. 25

岡戸清、新澤直明、福本晋也、嘉糠洋陸 ハエ類の自然免疫と病原体伝播メカニズム 第 55 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会 2009. 10. 3

吉村文、福本晋也、嘉糠洋陸 フィラリアの環境応答性トランジション機構の解明 第 55 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会 2009. 10. 3

新澤直明、Bryce Nelson 青沼宏佳、岡戸清、福本晋也、三浦正幸、嘉糠洋陸 貪食性囲い込みは細菌感染に対するトレランス機能を制御する 第 55 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会 2009. 10. 3

土井裕子、小林朋美、福本晋也、岡野栄之、嘉糠洋陸 マラリア原虫における二温度域性アクチン動態制御メカニズム 第 55 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会 2009. 10. 3

伴戸寛徳、青沼宏佳、福本晋也、嘉糠洋陸 蚊・マラリア原虫・腸内細菌の三者の相互作用 第 55 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会 2009. 10. 3

前川絵美、長田宏二、徳永史生、柿本辰男、福本晋也、嘉糠洋陸 蚊の標的認識における熱アンテナの探索 第 8 回分子寄生虫マラリアフォーラム 2009. 10. 8

岡戸清、新澤直明、福本晋也、嘉糠洋陸 機械的な病原体伝播と自然免疫の相互作用 第 32 回日本分子生物学会年会 2009. 12. 12

吉村文、岡戸清、波田一誠、丹羽隆介、福本晋也、嘉糠洋陸 Filarial parasites: Developmental transition mechanism mediated by environmental stimuli during a bridge between vector and host 第 32 回日本分子生物学会年会 2009. 12. 12

鹿島千紗子、新澤直明、高橋慧、福本晋也、下島昌幸、河岡義裕、嘉糠洋陸 トランスジェニック蚊を用いたウイルス生ワクチン産生の試み 第 32 回日本分子生物学会年会 2009. 12. 12

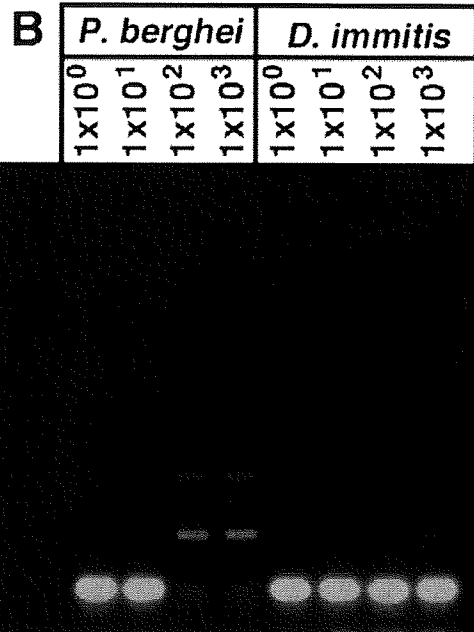
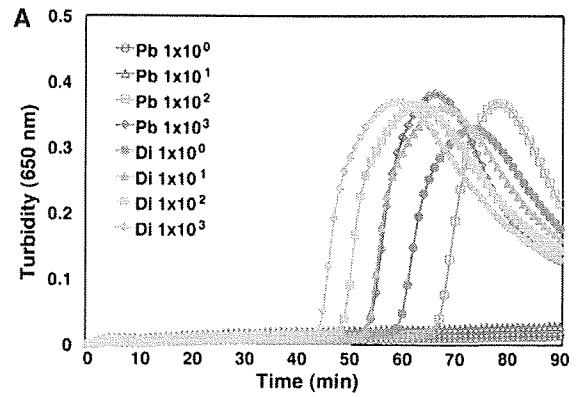
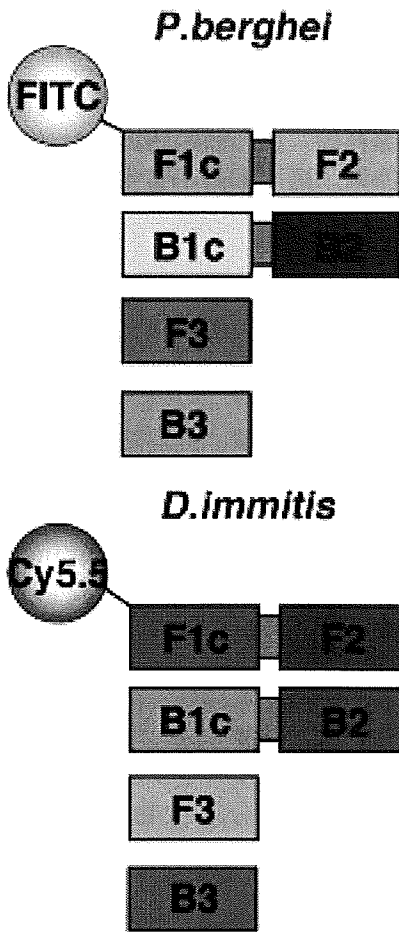
小林朋美、土井裕子、福本晋也、嘉糠洋陸 マラリア原虫における細胞骨格構築による極性形成メカニズム 第 32 回日本分子生物学会年会 2009. 12. 12

新澤直明、Bryce Nelson 青沼宏佳、岡戸清、福本晋也、三浦正幸、嘉糠洋陸 ハエ不顕性感染モデル～貪食性囲い込みは細菌感染に対するトレランス機能を制御する～ 第 32 回日本分子生物学会年会 2009. 12. 12

土井裕子、小林朋美、福本晋也、岡野栄之、嘉糠洋陸 マラリア原虫の細胞骨格再編成における二温度域性メカニズム 第 32 回日本分子生物学会年会 2009. 12. 12

H. 知的財産権の出願・登録情報  
なし

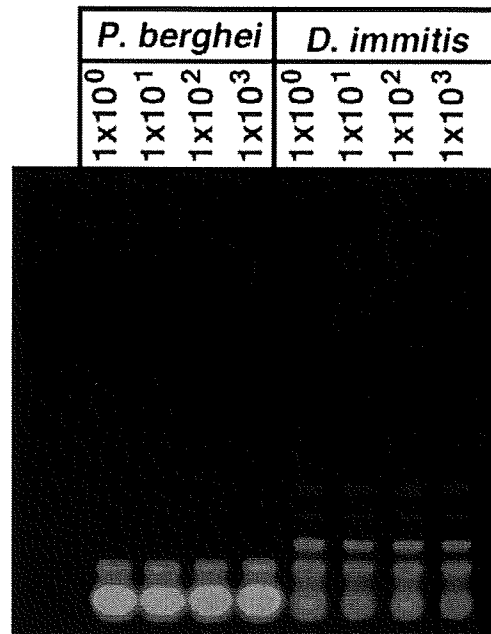
A



**B**

Primer	Sequence (5'→3')
<b><i>P. berghei</i></b>	
F3	ATGGGAAACTCAAACGACAA
B3	GGTGATTTACGTATGGCTG
FITC-FIP(F1c-F2)	CTGCACCATGGAAATCATCTTTTGCTACCTTGTGTGTGTGATGC
BIP(B1c-B2)	GACGGGAATTAGTCTAAGTTGCCGTTTCCCTGTAAATCCAGTT
<b><i>D. immitis</i></b>	
F3	CCTGTTTGGCTGGTCTT
B3	AGCAAAAGTCATACTAGTCTGG
Cy5.5-FIP(F1c-F2)	ACCTCAGGATGTCGAAAAACCAAAATGATGCTAATAAGGGGGTAA
BIP(B1c-B2)	TACCGGTGTTGGATTGTAGTGCCAAACAAACGATCCTTATCAGTC

図 1. マラリア原虫 *Plasmodium berghei* *SPECT2* 遺伝子に対する LAMP プライマーとイヌフィラリア *Dirofilaria immitis* チトクロームオキシダーゼサブユニット I 遺伝子のプライマーデザイン (A) 蛍光標識プライマーのシェーマ。FIP プライマーに蛍光標識を行った。マラリア検出プライマーに FITC 標識、フィラリア検出プライマーに Cy5.5 標識をおこなった。(B) 用いたプライマーの塩基配列



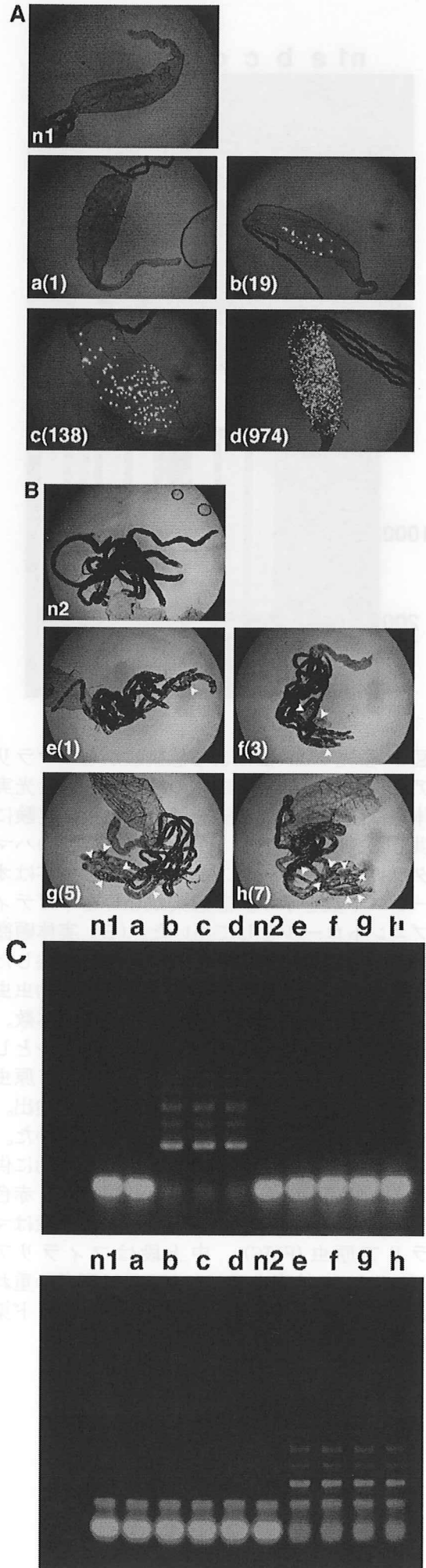
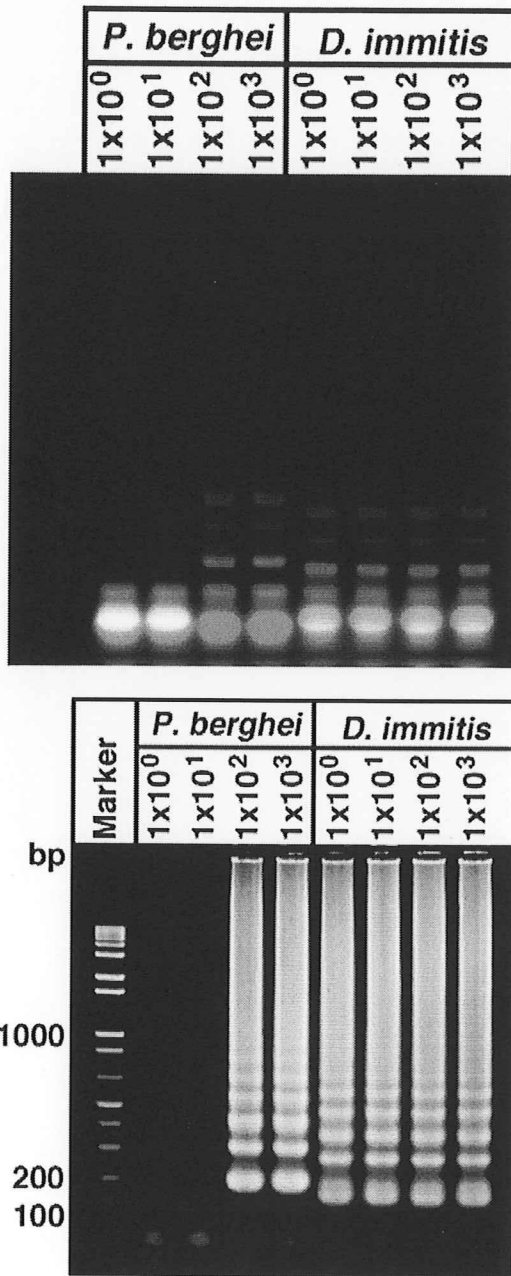


図2. 蛍光等温遺伝子増幅法 (LAMP 法) によるマラリア原虫およびフィラリアの検出限界 (A) リアルタイム濁度計による標的遺伝子増幅反応曲線。マラリア原虫 DNA ( $1 \times 10^0$ ,  $1 \times 10^1$ ,  $1 \times 10^2$ , or  $1 \times 10^3$  感染赤血球) またはフィラリア DNA ( $1 \times 10^0$ ,  $1 \times 10^1$ ,  $1 \times 10^2$ , and  $1 \times 10^3$  ミクロフィラリア) を LAMP 反応のテンプレートとして供した。(B) A の反応産物のアガロースゲル電気泳動像。緑色蛍光 (FITC) はマラリア原虫 DNA の増幅を示し、赤色蛍光 (Cy5.5) はフィラリア DNA の増幅を示す。最上段: FITC、中上段: Cy5.5、中下段: FITC と Cy5.5 の重ね合わせ像、最下段: エチジウムブロマイド染色像。

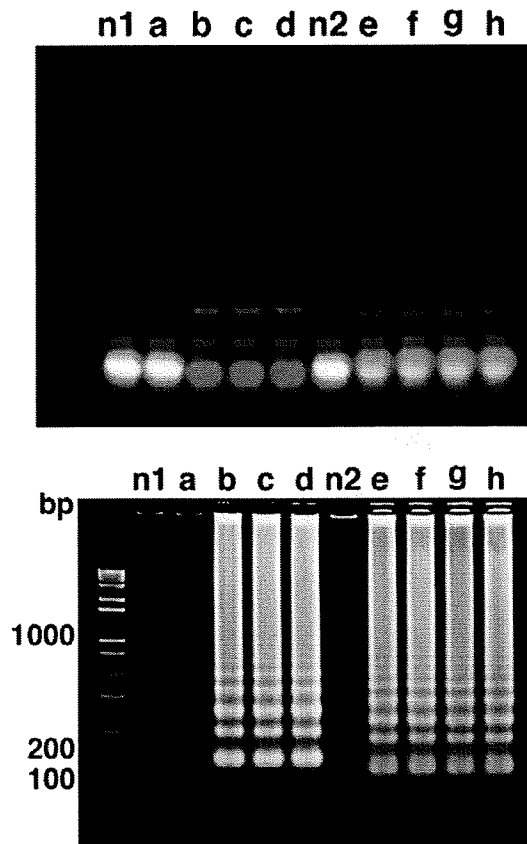


図3 蛍光 LAMP 法による感染蚊からのマラリア原虫とフィラリア虫体の検出 (A) 蛍光実体顕微鏡下で感染状態を解析した後に実験に供した。緑色のドットがマラリア原虫のハマダラカ中腸内オーシスト。括弧内の数字はオーシスト数を示す。悲感染蚊 (n1) をネガティブコントロールとして用いた。(B) 実体顕微鏡下で感染状態を解析した後に実験に供した。アローヘッド部分がフィラリア第 2 期幼虫虫体を示す。括弧内の数字がフィラリア虫体数。悲感染蚊 (n2) をネガティブコントロールとして用いた。(C) LAMP 法によるマラリア原虫オーシストとフィラリア第 2 期幼虫の検出。(A) (B) 由来の DNA サンプルを解析に用いた。LAMP 増幅産物をアガロースゲル電気泳動に供した。緑色蛍光 (FITC) はマラリア原虫、赤色蛍光 (Cy5.5) はフィラリアを示す。最上段はマラリア原虫 (FITC)、中上段はフィラリア (Cy5.5) の検出を示し、中下段は両者の重ね合わせ像。最下段はエチジウムブロマイド染色像。

等温遺伝子増幅法テンプレート用病原体の作製

分担研究者 下島 昌幸 東京大学医科学研究所ウイルス感染分野 助教

**研究要旨** マラリアや西ナイル熱などの蚊媒介性感染症を検出するための単一温度遺伝子増幅法の確立には、病原体の蚊感染モデルの構築が必要である。昨年度は扱いが安全で感染の検出が容易な西ナイルウイルス様粒子を作製し、当温遺伝子増幅法の確立における有用なテンプレートとなったとともに、西ナイルウイルスの感染に関与すると考えられる宿主細胞側の新規因子を複数同定した。今年度はこの新規因子の作用機序の解明を試みた。また別のウイルステンプレート作製として、インフルエンザウイルスの変異体作製を行った。

**A. 研究目的**

マラリア、西ナイル熱、デング熱等の蚊媒介性感染症の本邦への侵入防除に寄与するため、迅速・簡便な病原体検出法の確立を目的としている。検出法の確立には確かな感染モデルの構築が必要なため、ウイルスの調製や組換えウイルスの作製を分担した。

本研究の最終目的である当温遺伝子増幅法による病原体検出は遺伝子を検出するものであるが、その確立に必要な感染モデルの構築においては別の検出法による感染の有無の判定が望まれる。ウイルスの検出法としてはPCR等によるウイルス遺伝子の検出、培養細胞を用いたプラークアッセイ等での感染価の測定、ELISA等によるウイルス抗原の検出などが考えられるが、遺伝子操作技術によりマーカー遺伝子を持たせた組換えウイルスの作製が可能であるので、本モデル構築においては蛍光蛋白質（GFPなど）の遺伝子を持たせたウイルスの使用がモデル構築を容易にできるのではないかと考えた。

感染検出マーカーとしての蛍光蛋白質の有用性は水疱性口内炎ウイルス—ショウジョウバエ実験系で確認した（前々年度）。そして懸念される蚊媒介性ウイルスの一つ、西ナイルウイルスのゲノムへの蛍光蛋白質遺伝子の組み込み（レプリコン）も完了している（前々年度）。昨年度はこのレプリコンを基に、感染性を有し、且つ感染を蛍光蛋白質で検出可能な西ナイルウイルス様粒子の作製を行い、カルシウム依存性レクチン（C型レクチン）グループに属する複数の分子（DC-SIGN、

DC-SIGNR、ASGPR、MGL）が本ウイルスの宿主細胞への感染を増強する分子であることを見出した。DC-SIGN、ASGPR、MGLの3分子に関しては、西ナイルウイルス感染増強作用は現在のところ報告はなく、西ナイルウイルスの高い病原性の解明に新たな知見を与えると考えられる。

本年度は、西ナイルウイルスの感染を増強する上記4レクチン分子の増強メカニズムを調べた。またインフルエンザウイルスが当温遺伝子増幅法の確立のためのテンプレートにならないか検討した。インフルエンザウイルスは本来は蚊を含む昆虫（の細胞）に感染することは出来ないが、遺伝子操作が容易で、蛍光蛋白質遺伝子を持ち且つ昆虫細胞に感染しうる変異体を作製できる見込みがあったため本ウイルスを用いた。

**B. 研究方法**

**1. 細胞培養**

ヒト胎児腎由来 293 T細胞およびハムスター腎由来 BHK 細胞は DMEM 培地に非働化ウシ胎児血清及び抗生物質を加えたものを用いて 37°C・5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。ヒト T 細胞由来 Jurkat 細胞は RPMI1640 培地に非働化ウシ胎児血清及び抗生物質を加えたものを用いて 37°C・5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。一部の実験においては BHK 細胞を 29-33°C・CO<sub>2</sub> 非存在下で培養した。

**2. 感染性西ナイルウイルス様粒子の作製**

感染性ウイルス粒子は、前年度までの報告

にあるように調製した。つまり西ナイルウイルス (New York 99 株) のゲノムの構造蛋白質コード領域を黄色蛍光蛋白質変異体 Venus の遺伝子と置き換えたレプリコンを発現する 293T 細胞に、更に西ナイルウイルスの構造蛋白質 (C, prM および E) を発現するプラスミドを導入し、その培養上清を 0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターを通すことによって得た。

### 3. 構造蛋白質 E 変異体の作製

西ナイルウイルス NY99 株の構造蛋白質 E (エンベロープ蛋白質) には N 型糖鎖付加部位が 1 か所ある (154 番目のアスパラギン残基)。E 蛋白質発現用のプラスミドを遺伝子操作し、154 番目のアミノ酸をアラニン残基に置換したプラスミドを作製した。感染性西ナイルウイルス様粒子の作製にはこの変異 E プラスミドも用いた。

### 4. C 型レクチン発現 Jurkat 細胞の作製

各分子の安定発現細胞の作製にはレンチウイルスベクターを用いた。すなわち目的とする分子の cDNA (コントロール分子も含む) をレンチウイルスゲノム発現用プラスミド (pS) に挿入し、このプラスミドをエンベロープ蛋白質 VSVG 発現用プラスミド (pCVSVG) およびレンチウイルス蛋白質発現用プラスミド pLike とともに 293T 細胞に導入した。48 時間培養後の上清を 0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターを通しレンチウイルスベクターとした。培養細胞にレンチウイルスベクターを接種し、48 時間以上 4 週間以内培養したものを安定発現細胞として用いた。

### 5. インフルエンザウイルスの低温馴化

昆虫細胞は哺乳類細胞と異なり、細胞表面の蛋白質や脂質はシアル酸による修飾を受けず (昆虫細胞はシアル酸転移酵素を持たない)、そのためインフルエンザウイルスは昆虫細胞に感染することが出来ない。インフルエンザウイルスは複数のプラスミドを細胞に導入して作製することができる (リバーシジェネティクス)。プラスミドに変異を導入しておけば、その変異を持ったインフルエンザウイルスを得ることが可能になる。

昆虫である蚊への感染を成立させるため、まずインフルエンザウイルスのリバーシジェネティクス法において、細胞への感染を担う蛋白質 HA (ヘマグルチニン) の遺伝子部分を、リン脂質膜を感染標的とし昆虫細胞への感染も可能にすると考えられる VSV-G (水疱

性口炎ウイルスの G 蛋白質) の遺伝子に置き換えたものを用いた。Watanabe et al., 2003, J. Virol. を参考に、VSV-G 蛋白質はその細胞内領域を 13 アミノ酸分欠損させたものを用いた。HA 蛋白質を用いないことによりインフルエンザウイルスの NA 蛋白質 (ノイラミニダーゼ蛋白質) はウイルスの増殖には不要になるので、代わりに黄色蛍光蛋白質変異体 Venus の遺伝子を挿入したものを用いた。その他のウイルス蛋白質には、実験室継代株 WSN 株もしくは低温馴化生ワクチンとして知られている FluMist に由来するものを用いた。

### (倫理面への配慮)

本研究に関わる遺伝子組換え実験は当該研究機関にて承認あるいは文部科学大臣により確認されている。

### C. 研究結果

#### 1. C 型レクチンによる感染性西ナイルウイルス様粒子の感染増強作用の機序

感染性西ナイルウイルス様粒子の感染は、昨年度報告したように (あるいは図 1 参照)、C 型レクチンである DC-SIGN (Dendritic cell intracellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin)、DC-SIGNR (Dendritic cell intracellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin-related protein)、ASGPR (asialoglycoprotein receptor) および MGL (macrophage galactose-type C-type lectin) によって 10 倍から 100 倍ほど増強される。DC-SIGNR については既に他のグループからの報告と一致する (Davis et al., 2006, J. Virol.)。C 型レクチンは本来糖鎖を認識して病原体の排除等に関わる分子であるため、C 型レクチンによる感染性西ナイルウイルス様粒子の感染増強に西ナイルウイルス E 蛋白質の糖鎖が関わることを予想される。E 蛋白質の 154 番目のアミノ酸アスパラギン (N154) は N 型糖鎖修飾を受けるので、このアミノ酸をアラニンにして N 型糖鎖修飾を受けないようにした E 蛋白質変異体 (N154A) を作製し、野生型のものと同様に感染性西ナイルウイルス様粒子を作製した。N154A 変異体のウイルス様粒子は C 型レクチンを発現していない Jurkat 細胞では野生型ウイルス様粒子と同程度の感染性を示した (図 1)。このことは N154A の変異がウイルス様粒子の形成性や C 型レクチンを介さない感染には影響しないことを示すと考えられる。しかし C 型レクチン発現細胞への感染は、N154A 変異体ウイルス様粒子の場合

合には全く増強されなかった(図1)。西ナイルウイルスE蛋白質の154番目アミノ酸の糖鎖付加がC型レクチンによる感染増強に関わることが示された。

## 2. 組換えインフルエンザウイルスの作製

インフルエンザウイルス(感染昆虫細胞が蛍光蛋白質を発現するようになるもの)の低温馴化にあたり、まず低温馴化株FluMistのウイルス各遺伝子を用いた方が後の低温馴化が行いやすいと考えた。そこでVSVG(HA)(インフルエンザウイルスWSN株のHA分節にVSVG遺伝子を入れたもの)とVenus(NA)(WSN株NA分節にVenus)以外の6分節をすべてFluMist由来のものにしてリバーシジェネティクスを行ったが、増殖性のあるウイルスは得られなかった。そこで5分節をWSN株由来、1つのみFluMist由来としてウイルス回収を試みたところ、PB1, NP, PA, NS分節をFluMist由来にした場合に増殖性のウイルスを得ることができた(図2)。M, PB2分節をFluMistにした場合には増殖性ウイルスは得られなかった。その他いくつかの組み合わせで検討を行なったところ、図3に示す8種の分節組み合わせ(#3-#21)で増殖性のあるウイルスが得られた。

## 3. 組換えインフルエンザウイルスの低温馴化

得られたウイルスは33°Cで作製したものであるが、この温度では蚊は生存できない。そこで、図3に示した8種のウイルスのうち、PA分節がWSN株ではなくFluMist由来の方が高い増殖性がみられた(データ示さず)#18, #19, #20, #21と、8分節すべてがWSN株由来の#1の5種のウイルスについて、低温馴化を行った。ハムスター由来BHK細胞にmoi = 0.0005で接種し、まず33°Cで増殖させてウイルスを回収した(CO<sub>2</sub>は無し)。Titerを測定し、再度同moiで接種して31°Cで増殖させた。更に同様に繰り返して29°Cでウイルスを回収したところ、6種のウイルスの中で増殖できなくなるものが2つあり、また他のウイルスも増殖性はかなり悪くなった(図4)。29°Cは高めの温度ではあるが蚊は生存可能であるので、この温度でのウイルス増殖を繰り返したところ、図4に示すように#1, #5, #18のウイルスの増殖性は向上した。

## D. 考察

1999年にアメリカの東海岸に上陸した西ナ

イルウイルスは、それまでアフリカやヨーロッパで流行していた西ナイルウイルスと比べ病原性が高い。この病原性の差の原因は現在も解明されていないが、本実験でも用いたニューヨーク分離株(New York 99, NY99)など北アメリカ分離株のE蛋白質にN型糖鎖付加部位が出来ているという違いがあり、病原性との関連が示唆される。C型レクチンの1つDC-SIGNRがこの糖鎖修飾により西ナイルウイルスの増殖を高めることが報告されていた(Davis et al., 2006, J. Virol.)が、他のC型レクチンについては不明であった。今回の研究により、西ナイルウイルスNY99株がDC-SIGNR以外にも複数のC型レクチンの発現細胞に効率よく感染すること、またその感染増強にはE蛋白質の154Nの糖鎖が関わっていることが考えられた。C型レクチンは様々な分化ステージのマクロファージや樹状細胞、肝細胞に発現しており、今後はこれらの細胞への感染効率もしくは感染能力と病原性の関連を調べる必要がある。

これまでの年度で、蚊などからの当温遺伝子増幅法の確立に有効と考えられるウイルス系のテンプレート、つまり蛍光蛋白質を発現する水疱性口炎ウイルスと西ナイルウイルス様感染性粒子を作製した。今回新たに作製したテンプレートは、哺乳類細胞に29°Cで感染・増殖し蛍光蛋白質を発現するインフルエンザウイルスベースのものである。昆虫由来の細胞への感染性や増殖性は検討していないが、感染するのであれば、当温遺伝子増幅法の確立において、特に有用なコントロールとしてのテンプレートになると考えられる。

## E. 結論

西ナイルウイルスについては高い病原性の一端が解かれたと言える。インフルエンザウイルスについては実験系確立のテンプレートの1つとなる寸前の段階である。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

村上晋、堀本泰介、桂廣亮、下島昌幸、河岡義裕 「Vero細胞における高増殖性インフルエンザワクチンシードウイルス開発のための基礎研究」 第57回日本ウイルス学会 2009年10月26日 千代田区

小澤真、下島昌幸、五藤秀男、渡邊真治、八田寧子、堀本泰介、河岡義裕 「A型イン



フルエンザウイルス vRNP の安定発現細胞株を用いた vRNA 転写・複製阻害物質の探索」第 57 回日本ウイルス学会 2009 年 10 月 27 日 千代田区

Matsuno K, Kishida N, Usami K, Igarashi M, Yoshida R, Nakayama E, Shimajima M, Feldmann H, Irimura T, Kawaoka Y, Takada A. Different potential of C-type lectin-mediated entry between Marburg virus strains. *J Virol* 84:5140-7, 2010.

Nishimura Y, Shimajima M, Tano Y, Miyamura T, Wakita T, Shimizu H. Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71. *Nat Med* 15:794-7, 2009.

Itoh Y, Itoh Y, Shinya K, Kiso M, Watanabe T, Sakoda Y, Hatta M, Muramoto Y, Tamura D, Sakai-Tagawa Y, Noda T, Sakabe S, Imai M, Hatta Y, Watanabe S, Li C, Yamada S, Fujii K, Murakami S, Imai H, Kakugawa S, Ito M, Takano R, Iwatsuki-Horimoto K, Shimajima M, Horimoto T, Goto H, Takahashi K, Makino A, Ishigaki H, Nakayama M, Okamatsu M, Takahashi K, Warshauer D, Shult PA, Saito R, Suzuki H, Furuta Y, Yamashita M, Mitamura K, Nakano K, Nakamura M, Brockman-Schneider R, Mitamura H, Yamazaki M, Sugaya N, Suresh M, Ozawa M, Neumann G, Gern J, Kida H, Ogasawara K, Kawaoka Y. In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature* 460:1021-5, 2009.

Kakugawa S, Shimajima M, Neumann G, Goto H, Kawaoka Y. RuvB-like protein 2 is a suppressor of influenza A virus polymerases. *J Virol* 83:6429-34, 2009.

Kobayashi K, Kato K, Sugi T, Yamane D, Shimajima M, Tohya Y, Akashi H. Application of retrovirus-mediated expression cloning for receptor screening of a parasite. *Anal Biochem* 389:80-2, 2009.

Li Z, Watanabe T, Hatta M, Watanabe S, Nanbo A, Ozawa M, Kakugawa S, Shimajima M, Yamada S, Neumann G, Kawaoka Y. Mutational analysis of conserved amino acids in the influenza A virus nucleoprotein. *J Virol* 83:4153-62, 2009.

Kakugawa S, Shimajima M, Goto H, Horimoto T, Oshimori N, Neumann G, Yamamoto T, Kawaoka Y. Mitogen-activated protein

kinase-activated kinase RSK2 plays a role in innate immune responses to influenza virus infection. *J Virol* 83:2510-7, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録情報なし。

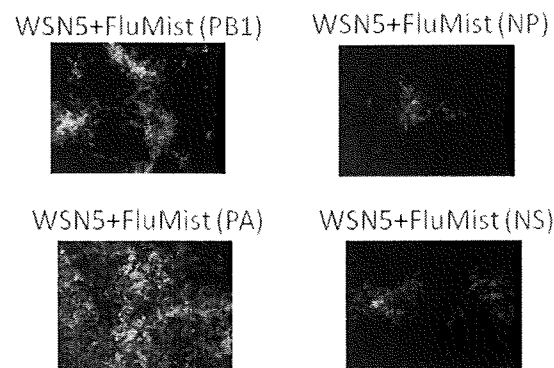


図 1 : 感染性西ナイルウイルス様粒子の C 型レクチンによる感染増強と E 蛋白質の糖鎖の有無

コントロール (Normal) Jurkat 細胞、およびその DC-SIGN, DC-SIGNR, ASGPR, MGL 発現細胞における感染性西ナイルウイルス様粒子の感染性。

(濃) 野生型 E 蛋白質の場合

(薄) E 蛋白質の N154A 変異体の場合

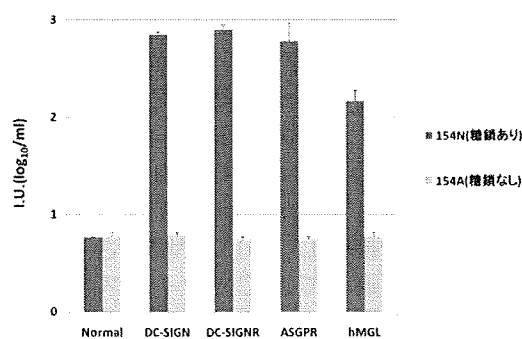


図 2 : インフルエンザウイルスの低温馴化株 FluMist の分節を 1 つ含んだ WSN 株の感染性 (HA, NA 遺伝子はそれぞれ VSV-G, Venus と入れ替えてある)

FluMist 由来の PB1, NP, PA, NS 分節を用いた場合にはウイルスの増殖が認められたが、M, PB2 分節を用いた場合には認められなかった。BHK 細胞、33°C 培養。

HA	NA	M	PB2	PB1	PA	NS	NP	
WSN(VSVG)	WSN(Venus)	WSN	WSN	WSN	WSN	WSN	WSN	#1
WSN(VSVG)	WSN(Venus)	WSN	WSN	FluMist	WSN	WSN	WSN	#3
WSN(VSVG)	WSN(Venus)	WSN	WSN	WSN	FluMist	WSN	WSN	#5
WSN(VSVG)	WSN(Venus)	WSN	WSN	WSN	WSN	FluMist	WSN	#6
WSN(VSVG)	WSN(Venus)	WSN	WSN	WSN	WSN	WSN	FluMist	#7
WSN(VSVG)	WSN(Venus)	WSN	WSN	FluMist	FluMist	WSN	WSN	#18
WSN(VSVG)	WSN(Venus)	WSN	WSN	WSN	FluMist	FluMist	WSN	#19
WSN(VSVG)	WSN(Venus)	WSN	WSN	WSN	FluMist	WSN	FluMist	#20
WSN(VSVG)	WSN(Venus)	WSN	WSN	WSN	FluMist	FluMist	FluMist	#21

図3：増殖性が認められた組換えインフルエンザウイルス

図2に示した結果に基づき、様々な組み合わせを行いFluMist由来の分節数を増やした。そのうち増殖が認められたものをまとめて示した。BHK細胞、33℃培養。

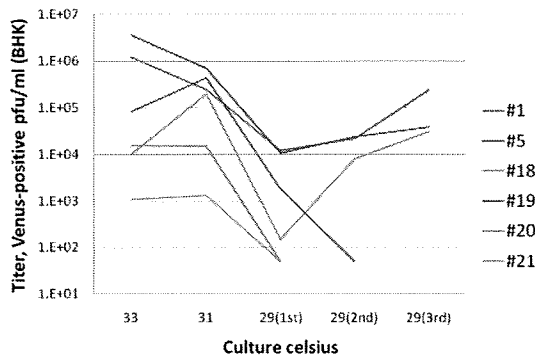


図4：低温馴化

図3に示したウイルスのうち、#1、#5、#18-#21について、BHK細胞、moi = 0.0005 (CO<sub>2</sub>無し)の条件で少しずつ培養温度を下げてウイルスの継代を行った。29℃以降は同じ温度で継代を続けた。

等温遺伝子増幅産物の検出に向けたイムノクロマト・ストリップ作成法の確立

研究分担者 平田 晴之 酪農学園大学獣医学部 獣医学科 実験動物学教室 准教授

研究要旨 マラリア、西ナイル熱、デング熱などの蚊媒介性の感染症の本邦への侵入防除に寄与するため、LAMP などの等温遺伝子増幅法による迅速・簡便病原体検出法の確立を目的とした。分担研究者は等温遺伝子増幅法により増幅された増幅産物を目視により判定が可能であるイムノクロマト法開発のため、既存の病原体の遺伝子増幅産物を用いてイムノクロマト・ストリップの作製、目視による判定などの検討を行った。本研究により、病原体遺伝子増幅産物を抗原としたストリップを作製することに成功し、増幅遺伝子を用いた病原体検出法の応用への基礎データを得ることができた。

A. 研究目的

現在、PCR を代表とする遺伝子診断法の多くは野外での利用は特殊な設備の必要性など容易なことではない。病原体流行地においては大量のサンプル、及び広大なエリアを診断するために、迅速かつ簡便な病原体検出法が必要である。最近の研究において、迅速・簡便な診断法として、イムノクロマト・ストリップを用いてマラリア原虫、クリプトスポリディウム、あるいはリーシュマニアの診断法の開発が報告されている。これらの報告は病原体を予め固相化したストリップに感染血清を用いて病原体を検出する免疫血清学的手法であるがサンプルの量、反応条件、感染血清中の抗体価によって判定が非常困難となることが短所である。従って、LAMP 法などの等温遺伝子増幅法により増幅された増幅産物を目視により判定可能であるイムノクロマト法開発をすることは、病原体を直接的に検出することが可能であり、さらに増幅産物のコピー数が少なくても検出可能である。また、増幅遺伝子は長期保存可能であり本イムノクロマト・ストリップの開発は感染症の早期発見、本邦への侵入防除に寄与するものと考えられる。

そこで、研究分担者は準備基盤の確立を目的としてイムノクロマト・ストリップ開発に向けた抗原である遺伝子候補の選定と作製、さらにそれらを用いたイムノクロマト・ストリップの作成、目視による判定および検討を行った。

B. 研究方法

1. *Babesia gibsoni* p50 遺伝子の PCR 法による増幅

既に報告されているイヌバベシア症の病原体である *Babesia gibsoni*(*B. gibsoni*) の p50 遺伝子 (S. Fukumoto et. al., Journal of Clinical Microbiology, 2001) を用いて、*B. gibsoni* に特異的なプライマー配列を設計した。プライマーの設計は 5'末端をそれぞれ FITC-と Biotin-ラベルした特異的プライマーで PCR 反応を行い増幅した。

2. FITC-Biotin 標識 *B. gibsoni* P50 遺伝子増幅産物を検出のための最適なイムノクロマト・ストリップの作製

前年度の結果を踏まえて、より最適なイムノクロマト・ストリップを作製した【図 1】。FITC-Biotin 標識 *B. gibsoni* P50 遺伝子増幅産物を検出するためのイムノクロマト・ストリップを用いて検出する最適な HF180MC100 のメンブレン（ミリポア）、No. 8984（ミリポア）のコンジュゲートパット、及びストレプトアビジン標識金コロイド粒子と抗 FITC 抗体の最適 pH を pH7.2 の緩衝液として作製した。

ストリップは以下の図に示したように作成した。

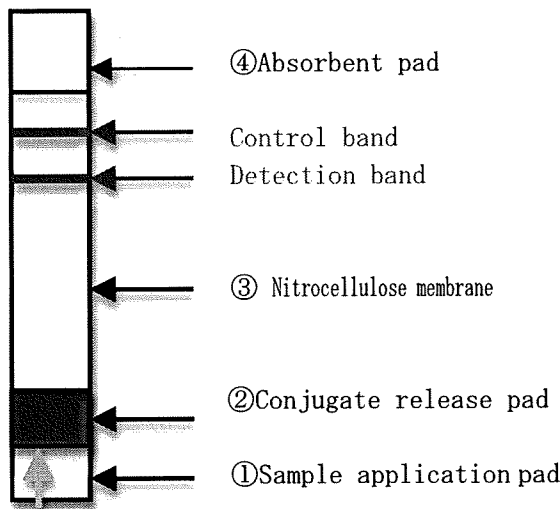


図1 [上図の説明]

- ① サンプルを入れるフィルターでサンプル中に含まれる大きい分子を取り除く役割がある、
- ② 上記方法2の最適 pH で作製したストレプトアビジン標識金コロイド粒子をガラスファイバーパッド (Schleicher & Schuell) に染みこませて乾燥させ作製した。
- ③ ニトロセルロースメンブレン (Schleicher & Schuell) に抗 FITC 抗体 (BETHYL) 500 $\mu$ l (1mg/ml) を BioDot's BioJet 3050 quanti dispenser (BioDot Inc.) を用いて検出バンド (Detection band) として、また、ビオチン (BETHYL) をコントロール検出バンドライン (Control band) とし、それぞれ最適 pH に調整し 1mm 固相化を行った。これら、検出バンドとコントロールバンドを固相化させたニトロセルロースメンブレンは 0.5 % カゼイン含 50 mM ホウ酸緩衝液により 30 分 50 $^{\circ}$ C でブロッキングを行い、さらに洗浄液 (0.5% sucrose、50 mM Tris-HCl (pH7.4)、0.05% cholanic acids) で 3 回洗浄を行った。
- ④ ① でアプライしたサンプルの残液を吸収するパッド (Schleicher & Schuell)

以上、①から④のパッドをプラスチックプレートにそれぞれテープで貼り付け 5 mm 幅にカットした。作製したイムノクロマト・ストリップは使用するまで乾燥剤をいれて室温にて保存した。

#### (倫理面への配慮)

本研究は病原体検出法の確立を目指すものであり、特段の倫理上の配慮事項を含まない。

#### C. 研究結果

##### 1. *B. gibsoni* P50 遺伝子の PCR による増幅の確認

5'末端をそれぞれ FITC-と Biotin-ラベルした特異的プライマーで PCR 反応を行い増幅し、増幅バンドを確認した。

##### 2. FITC-Biotin 標識 *B. gibsoni* P50 遺伝子増幅産物を検出のための最適なイムノクロマト・ストリップの作製

ニトロセルロースメンブレン HF180MC100, ストレプトアビジン標識金コロイド粒子をコンジュゲートパッドに浸漬させ乾燥させたコンジュゲートパッド (No. 8964: ミリポア) を用いて、イムノクロマト・ストリップを作製した。

作製したイムノクロマト・ストリップの Sample application pad に 1 で増幅させた FITC-と Biotin-でラベルした *B. gibsoni* P50 遺伝子の PCR 増幅産物を用いて評価した (図 2)。

その結果、原虫感染の明瞭な検出バンドが認められた (Detection band)、しかしながら、コントロールバンドには認められなかった (図 2)。

##### 3. イムノクロマト・ストリップの保存性についての検討

イムノクロマト・ストリップを半年間室温に保存し、PCR により得られた *B. gibsoni* P50 遺伝子増幅産物を用いて検討を行った。その結果、半年前と同様の検出バンドが確認された。

以上の結果より、本イムノクロマト・ストリップにおける *B. gibsoni* の検出は少なくとも半年は使用可能であることを確認した。

#### D. 考察

研究分担者は準備基盤の確立を目的として既存の病原体遺伝子を用いたイムノクロマト・ストリップの作製、目視による判定および検討を行った。本研究において作製したイムノクロマト・ストリップはイヌバベシア感染症において高感度に検出することが可能であり、遺伝子診断に有用であることが示唆された。しかしながら、今回検討したコントロ

ールラインは検出できなかった。この原因としてストリップに何らかの理由で biotin が固相化できなかったため、ストレプトアビジン標識金コロイド粒子がトラップされずに流れていったことが考えられる。これからの検討課題として、コントロールラインに固相化するタンパク質の選定と条件検討、さらに複数の病原体遺伝子を用いたイムノクロマト・ストリップの作製及びその検出感度の検討が必要である。その際、複数の病原体遺伝子に対して、それぞれの特異性、感度を上げるために抗原及び抗体の選定が重要な鍵になると考えられ、今後の検討事項である。

#### E. 結論

本研究により、イムノクロマト・ストリップ法を利用した増幅遺伝子を用いた病原体検出法の応用への基礎データを得ることができた。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

##### 2. 学会発表

陳内理生、倉田貴子、辻正義、中嶋瑠衣、平田晴之、藤澤幸平、白木裕美、浅川満彦、那須野豊彦、石原智明 野生ヒグマから検出された新型ピロプラズマ原虫 第 148 回日本獣医学会学術集会 2009.09.25

#### H. 知的財産権の出願・登録情報

なし

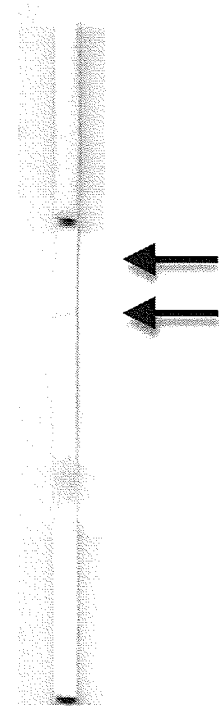


図2 *B. gibsoni* P50 遺伝子増幅産物を用いたイムノクロマト・ストリップの評価(最適条件の検討)

ニトロセルロースメンブレン HF180MC100、コンジュゲートパット No. 8964 を用いて、イムノクロマト・ストリップを作製した。

さらに、ストレプトアビジン標識金コロイド粒子及び抗 FITC 抗体を pH7.2 に調整し作製したイムノクロマト・ストリップに、FITC-Biotin 標識 *B. gibsoni* P50 遺伝子増幅産物を用いて評価した。上の矢印はコントロールライン、下の矢印は検出バンドラインを示す。

ネズミマラリア原虫を用いたヒトマラリア原虫感染モデルの構築

研究分担者 油田 正夫 三重大学大学院医学系研究科病態解明医学講座 教授

本研究はネズミマラリア原虫を用いてヒトマラリア原虫感染モデルの開発を行い、LAMP などの等温遺伝子増幅法を用いたヒトマラリア原虫の検出法開発に寄与することを目的とする。前年度我々は環状ネズミマラリア人工染色体を用い、蛍光タンパク質を外来遺伝子として導入したネズミマラリア原虫を作成した。本年度は環状ネズミマラリア人工染色体を改良し、テロメアを有する直鎖状人工染色体を開発した。また、直鎖状人工染色体を用い外来遺伝子をネズミマラリア原虫に導入することを試みた。直鎖型人工染色体は環状人工染色体に比して、約100倍の遺伝子導入効率を有し、蚊のステージであるオオキネート、オオシスト、スポロゾイトを含むマラリア原虫のライフサイクル全体に亘り安定的に保持された。以上の結果よりネズミマラリア原虫 *Plasmodium berghei* にヒトマラリア原虫の遺伝子を直鎖状の疑似染色体に外来遺伝子として導入し、ヒトマラリア原虫と全く同一の条件下で等温遺伝子増幅法が遂行できる完全なモデル系を確立することが出来た。

A. 研究の背景と目的

研究は LAMP などの等温遺伝子増幅法を用いた、ヒトマラリア原虫の蚊媒介性病原体検出法の有効性を検証するため、ネズミマラリア原虫を用いた感染モデルを開発することを目的とする。

熱帯熱マラリア原虫などのヒトマラリア原虫に感染した蚊を実験に用いることは、研究者の安全、維持管理する設備等を考慮すると障害があまりにも大きく、国内では事実上不可能である。これに対しネズミマラリア原虫は人には絶対に感染せず、感染モデルとしても古くから用いられ、そのモデルとしての有用性は確認されている。しかしながら増幅に用いられるプライマー等の条件をヒトマラリア原虫に用いるものと完全に一致させることはネズミマラリア原虫では不可能であり、最終的に等温遺伝子増幅法の有効性を確認するた最終的に等温遺伝子増幅法の有効性を確認するためには、実際にヒトマラリア原虫に感染した蚊を用いることが是非とも必要である。

分担研究者はこの目的を実現するために、ネズミマラリア原虫 *Plasmodium berghei* にヒトマラリア原虫の遺伝子を外来遺伝子として導入し、ヒトマラリア原虫と全く同一の条件下で等温遺伝子増幅法が遂行できるモデル系を確立することを着想した。

マラリア原虫 (*Plasmodium spp.*) の遺伝子操作は 1993 年の鳥マラリア原虫 (*P. gallinaceum*) のザイゴートとガメートへの遺伝子導入の成功によって始まり、1995 年の熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*) 及びネズミマラリア原虫 (*P. berghei*) の赤血球ステージの原虫への遺伝子導入の成功によって、その応用性が示された。更に翌年、熱帯熱マラリア原虫とネズミマラリア原虫において、外来遺伝子と原虫染色体間での相同組換えによる遺伝子導入法が報告され、安定的に外来遺伝子を発現する遺伝子組換え原虫が作出できる技術として確立した。現在、熱帯熱マラリア原虫を初めとし、複数の原虫ゲノムプロジェクトが終了しており、それに伴い、遺伝

子操作技術の重要性は高まり、この技術を基に感染・寄生に関わる分子基盤の解明、新規ワクチン開発等が精力的に進められている。

一方で、この技術には未だ複数の技術的な問題点がある。第一に遺伝子導入効率の低さが挙げられる。通常の細胞と異なり、赤血球ステージの原虫の核まで遺伝子を導入するためには赤血球膜、寄生胞膜、原虫細胞膜、核膜の四重膜を通過する必要がある、遺伝子導入の最大の障害となっている。第二として操作の煩雑さが挙げられる。相同組換えによって外来遺伝子を導入する場合、最終的に確実に遺伝子が挿入された原虫を選択する必要がある。この作業には通常、数週間から数ヶ月程度かかることから、多大な労力と時間を要する。第三に環状プラスミドを用いて、染色体外 DNA として遺伝子を導入する場合、導入遺伝子の安定性が薬剤に依存する点が挙げられる。このため、薬剤処理可能な赤血球ステージの原虫には適しているが、薬剤処理が不可能な蚊・肝臓ステージの原虫では安定的に遺伝子が維持されず、この方法は利用できない。また細胞内で複数コピーとして維持され、モデル系として利用する際には定量性が問題となる。以上のことより、マラリア原虫の遺伝子操作は未だ改良する必要があると考えられる。

我々はマラリア原虫人工染色体を用いた遺伝子導入によって、この問題を解決することができるのではないかと考えた。すなわちマラリア人工染色体を用いてヒトマラリア遺伝子を *Plasmodium berghei* に導入し、ヒトマラリア遺伝子を染色体中と同じ条件で保持するネズミマラリア原虫を作成し、等温遺伝子増幅法の条件検討を行う。人工染色体とは細胞内で人工的に構築した極小の染色体で宿主の細胞染色体とは独立に存在できる染色体であり、①染色体 DNA の複製を開始させる「複製起点」、②細胞分裂期における染色体の均等分配に重要である「セントロメア」、③染色体の末端構造の維持に必要な「テロメア」の三領域で構成される。これまでに、細菌人工染色体 (BAC)、酵母人工染色体 (YAC: Yeast artificial Chromosome) が開発され広く利用

されている。人工染色体は宿主毎に、必要とされる三領域配列が異なるため、生物種単位で開発を行う必要があるが、マラリア原虫を宿主とする人工染色体はこれまで確立されていない。

これまでの研究で分担者はネズミマラリア原虫 (*Plasmodium berghei*) の染色体からセントロメア領域を同定し、このセントロメア領域のヌクレオチド配列をプラスミドに組み込んで、マラリア原虫に適用可能な環状人工染色体を作製した。作製した人工染色体を用いて遺伝子組み換えを行うと、娘細胞への分配効率の上昇により、遺伝子導入後の人工染色体の保持率が向上した。また、相同組換えを抑制する効果により、宿主であるマラリア原虫の染色体に影響を与えずに外来遺伝子を組み入れることが可能となった。さらに、通常のプラスミドで見られる異常な複製が起こらないことも確認できた。

以上の結果より使用したセントロメア領域が *in vivo* で正常に機能することが確認された。一方、上記したように実際の人工染色体は直鎖状であり、その両末端にはそれを保護するためのテロメア配列を有している。そこで本年度は環状ネズミマラリア人工染色体を改良し、テロメアを有する直鎖状人工染色体 (linear *Plasmodium Artificial Chromosome*, L-PAC) の開発を試みた。また、直鎖状人工染色体を用い外来遺伝子をネズミマラリア原虫に導入しその機能を評価した。

## B. 本年度の計画

以上の目的を達成するため、平成 21 年度において分担研究者は以下に記す 4 つの課題を設定し研究を遂行した。

### 研究課題 1. ネズミマラリア原虫テロメア配列のクローニング

前年度に作製した環状人工染色体を直鎖化することを目的として、ネズミマラリアゲノムよりそのテロメア配列をクローニングする。

### 研究課題 2. 直鎖型人工染色体コンストラクトの構築

人工染色体を環状より本来の染色体に近い直鎖状に改良するために、クローニングしたテロメアと直鎖化のための制限酵素部位を環状染色体内部に挿入する。

### 研究課題 3. 血液感染ステージへの導入と安定性の評価

作成した人工染色体を実際にネズミマラリア原虫に導入し、その導入効率及び血液ステージでの安定性を評価する。このステップにおいて、血液感染ステージにおける分配効率を計算し実用的な人工染色体として機能することを評価する。

### 研究課題 4 ベクター感染ステージでの導入染色体の安定性の評価

直鎖状人工染色体を導入したネズミマラリア原虫を実際にハマダラ蚊に感染させて、導入した人工染色体が蚊の中のステージでも安定的にマラリア原虫に保持されるかを、GFP をマーカーとして用いて評価する。蚊の内部でマラリア原虫はオオキネート、オオシストとなり、さらに無性生殖で増殖しスポロゾイトとなる。これらのステージでも導入した人工染色体が安定的に各原虫に分配されることを確認する必要がある。

## C. 研究方法

### 1. ネズミマラリア原虫テロメア配列のクローニング

マラリア原虫のテロメアに関しては 1985 年、Ponzi M. らによってネズミマラリア原虫 (*P. berghei*) において報告された。この報告によると、ネズミマラリア原虫のテロメアは 5' -TT(T/C)AGGG-3' という 7 塩基の配列モチーフが高度に反復したものであるとされている。ゲノムプロジェクトの成果により、熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*)、サルマラリア原虫 (*P. knowlesi*) においても同様の配列がテロメア配列モチーフとして示され、マラリア原虫で高度に保存されていることが、明らかとなった。更にこの配列モチーフをその他の生物 (ヒト (5' -TTAGGG-3'), テトラヒメナ (5' -TTGGG-3')) と比較した結果、類似

していることが示された。以上の報告を参考に primer を作製し PCR にてネズミマラリア原虫ゲノムよりテロメアのクローニングを試みた。PCR で増幅されたセントロメア候補領域を pCR2.1-TOPO (Invitrogen 社製) にクローニングし、配列を決定した。

2. 直鎖状人工染色体コンストラクトの構築  
クローニングしたセントロメアおよびテロメアを用いてマラリア原虫人工染色体の構築を行った。人工染色体にはセントロメアおよびテロメアに加え、環状人工染色体状人工染色体と同様に薬剤耐性遺伝子、GFP 遺伝子を組み込み、まず、環状のプラスミドを構築した。プラスミド上ではテロメアは向かい合うようにクローニングし、二つのテロメアの間には約 500bp のスペーサー配列を挿入して、制限酵素 (*PmeI*) で切断することにより直鎖化できるようにした (図 2 参照)。

### 3. ネズミマラリア原虫血液感染ステージへの人工染色体の導入と安定性の評価

構築した人工染色体をネズミマラリア原虫に導入し、GFP を指標にして分配効率を評価した (図 1)。人工染色体のネズミマラリア原虫への導入にはエレクトロポレーション法を使用した。まず、各 DNA を 5  $\mu$ g 調製し、ネズミマラリア原虫へエレクトロポレーションにより導入した。遺伝子導入後の原虫は直ちにラット (Wister 3 週齢) へ接種した。遺伝子導入後、20 時間経過した段階で薬剤をラットへ投与した。24 時間ごとにラット尾静脈を採取して塗末標本を作製し、原虫寄生率を計測した。コントロールプラスミド (pbGFP con)、環状人工染色体 (C-PAC)、直鎖状人工染色体 (L-PAC) をそれぞれ有する組換え原虫をマウス (Balb/c 8 週齢) に接種し、薬剤を投与した。その後、寄生率が 5~10% になるまで維持した。次に、組換え原虫を感染させたマウスから赤血球 (感染赤血球) を採取し、マウス (Balb/c 8 週齢) へ接種した。これより薬剤非存在下で原虫を維持し、原虫寄生率をモニターした。原虫寄生率が 5~10% になった時点で尾静脈より血液 (約 10



ml) を採取し、1 ml の RPMI 1640 (10% FCS) へ入れ、Hoechst 33258 (1  $\mu$ M) で原虫核を染色した。その後、Hoechst 染色された原虫中の GFP 発現原虫の割合を蛍光顕微鏡で測定、分配効率を算出した。

#### 4. ベクター感染ステージでの導入染色体の安定性の評価

コントロールプラスミド (pbGFPcon)、環状人工染色体 (C-PAC)、直鎖状人工染色体 (L-PAC) をそれぞれ有する組換え原虫をマウス (Balb/c 8週齢) に接種し、薬剤を投与した。マウスを蚊の吸血に供した。その後、吸血した蚊を約 20 ~ 25 日間維持した。なお、この期間中に原虫は受精、生育し、最終的に蚊唾液腺内スポロゾイトとなっている。蚊より唾液腺を摘出し、それに含まれるスポロゾイトを、medium 199 を用いて調製した。全スポロゾイトに対する GFP 発現スポロゾイトの占める割合を、蛍光顕微鏡を用いて測定、分配効率を算出した。

### D. 研究結果

#### 1. ネズミマラリア原虫テロメア配列のクローニング

PCR にてネズミマラリア原虫ゲノムよりテロメアのクローニングを試みたところ 200 ~ 300 bp の DNA 断片が増幅された。増幅した断片をプラスミドにクローニングし配列を確認した。その結果、Ponzi M. らと同様の 5' -TT(T/C)AGGG-3' 配列が反復した約 200bp のテロメア配列をクローニングすることに成功した。これを用いて人工染色体構築を試みた。

#### 2. 構成的 GFP 発現コンストラクトを含む人工染色体の構築

構築した人工染色体の概略図 (図 1) を示す。最終的に得られる直鎖状の人工染色体は (Linear Plasmodium Artificial chromosome: L-PAC) と名づけた。

#### 2. ネズミマラリア原虫血液感染ステージへの人工染色体の導入と安定性の評価

構築した PAC をネズミマラリア原虫へと導入した。その結果、導入後の寄生率 (全赤血球に対する感染赤血球の割合 (%)) の上昇は明らかに L-PAC の方が環状人工染色体やコントロールプラスミドより速いことが示された (図 3)。寄生率の差から導入効率を予測し、比較すると、L-PAC は環状人工染色体と比べ、約 100 倍、コントロールプラスミドとは約 1000 倍以上、遺伝子導入効率が上昇した結果となった。

#### 3. ベクター感染ステージでの導入染色体の安定性の評価

続いて PAC の原虫内での安定性を評価した。その結果、PAC は環状人工染色体と同程度の安定性を持つことが明らかとなり (図 4A)、テロメアの付加と直鎖化が人工染色体の分配到に影響を与えないことが示された。蚊ステージについても検討した結果、唾液腺スポロゾイトの約 90% が L-PAC を安定的に維持していることが明らかとなった (図 4B)。更に肝臓ステージを通過した原虫での安定性を評価した結果、約 65% の原虫が L-PAC を維持しており、環状人工染色体と比較して、約 2.5 倍程度、安定性が向上することが示された (図 4C)。この結果よりセントロメアに加え、テロメアが肝臓ステージでの染色体分配において役割を果たすことが推定された。また、L-PAC は原虫の生活環を通じ、常に直鎖状を維持していることも明らかとなり、加えて原虫染色体とは相同組換えを起こさないことも示された (図 5)。

### E. 考察

今年度の研究では人工染色体を用いることによって蚊感染ステージを通じて外来遺伝子が安定に保持されることが確認された。今回の人工染色体は直鎖状タイプのもので、両末端にテロメア配列を持つ。この人工染色体はほとんど 100% に近い原虫で唾液腺内のスポロゾイトに至るまで安定に遺伝子は維持された。また導入された人工染色体の原虫内でのコピー数は原虫 1 匹あたり約 1 ~ 1.5 コピーと推定された。この数は人工染色体を用

いず環状 DNA(プラスミド)を導入した場合に予想されるコピー数(数十コピー)に比べ明らかに少なく、等温遺伝子増幅法の検討に適していると考えられる。また通常、遺伝子導入の際には環状の DNA のほうが直鎖状 DNA よりも立体障害等の理由により、効率が良いことが知られている。しかし、今回得られた結果は、L-PAC は環状人工染色体と比べ、約100倍導入効率が高いという全く正反対の結果であり、非常に興味深い。現在のところ、この遺伝子導入の改善が如何なる原因によるものか不明ではあるが、少なくとも直鎖化し、実際の染色体様の構造としたことが原因のひとつであると考えられる。

人工染色体を用いた遺伝子導入法は、相同組換えにより外来遺伝子をネズミマラリア原虫のゲノムに組み込む方法に比べ手技も簡便である。またゲノムに組み込まないため原虫自身の表現型に影響を及ぼす可能性が低く、さらにクローン化する必要もないため、原虫自身の株の多様性を維持しながら、フィールドに近い状態で等温遺伝子増幅法の条件検討を行うことができるだろう。

#### F. 結論

本年度の研究によって、感染モデルの樹立のための基本技術を確立することができた。

#### G. 健康危険情報

特になし。

#### H. 研究発表

##### I. 論文

1. Functional Identification of the *Plasmodium* Centromere and Generation of a *Plasmodium* Artificial Chromosome. Iwanaga S, Khan SM, Kaneko I, Christodoulou Z, Newbold C, Yuda M, Janse CJ, Waters AP. Cell, Host & Microbe. 7, 3, 245 (2010)

2. Yuda M, Iwanaga S, Shigenobu S, Kato T, Kaneko I. : Transcription Factor AP2-Sp and its Target Genes in Malarial Sporozoites. Mol Microbiol. 2009, 75, 4, 854 - 863

3. Yuda M, Iwanaga S, Shigenobu S, Mair GR, Janse CJ, Waters AP, Kato T, Kaneko I. : Identification of a transcription factor in the mosquito-invasive stage of malaria parasites. Mol Microbiol. 2009, 71, 6, 1402 - 1414

4. Miyazaki K, Yamaguchi M, Imai H, Kobayashi T, Tamaru S, Nishii K, Yuda M, Shiku H, Katayama N. Gene expression profiling of peripheral T-cell lymphoma including gammadelta T-cell lymphoma. Blood 113(5) 1071-1074, 2009

##### II. 学会発表

Functional Characterization of the plasmodium centromere and generation of a plasmodium artificial chromosome. S. Iwanaga, M. Yuda, I. Kaneko, C.J. Janse, and A.P. Waters Washington, D.C. USA (2009, Nov 18-22) American Society of Tropical Medicine and Hygiene 58<sup>th</sup> Annual Meeting

Generation of a Plasmodium Artificial Chromosome S. Iwanaga Awaji, Japan (2009, Sep 8<sup>th</sup>-11<sup>th</sup>) The 9<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity

##### 第7回感染症沖縄フォーラム

2009.2 ChIP-seq 法を用いたマラリア原虫転写因子結合部位の genome wide な解析

第79回日本寄生虫学会大会 2009 3月 ChIP-seq 法を用いたマラリア原虫転写因子結合部位の genome wide な解析

第16回分子寄生虫学ワークショップ 2009 8月 ChIP-seq 法により同定したマラリア原虫転写因子 AP2-0 の新規標的遺伝子の解析

##### I. 知的財産権の出願・登録情報

1. マラリア原虫人工染色体 (特願 2009-051454) 05/03/09  
特許出願人: 国立大学三重大学 (90%)・国立

大学鳥取大学 (10%)、発明者：岩永史朗・油田正夫

耐性遺伝子の迅速同定法 特許出願人：国立大学三重大学、発明者：岩永史朗・油田正夫(特願 2010-071688) 26/03/10

2. マラリア原虫人工染色体を用いた薬剤

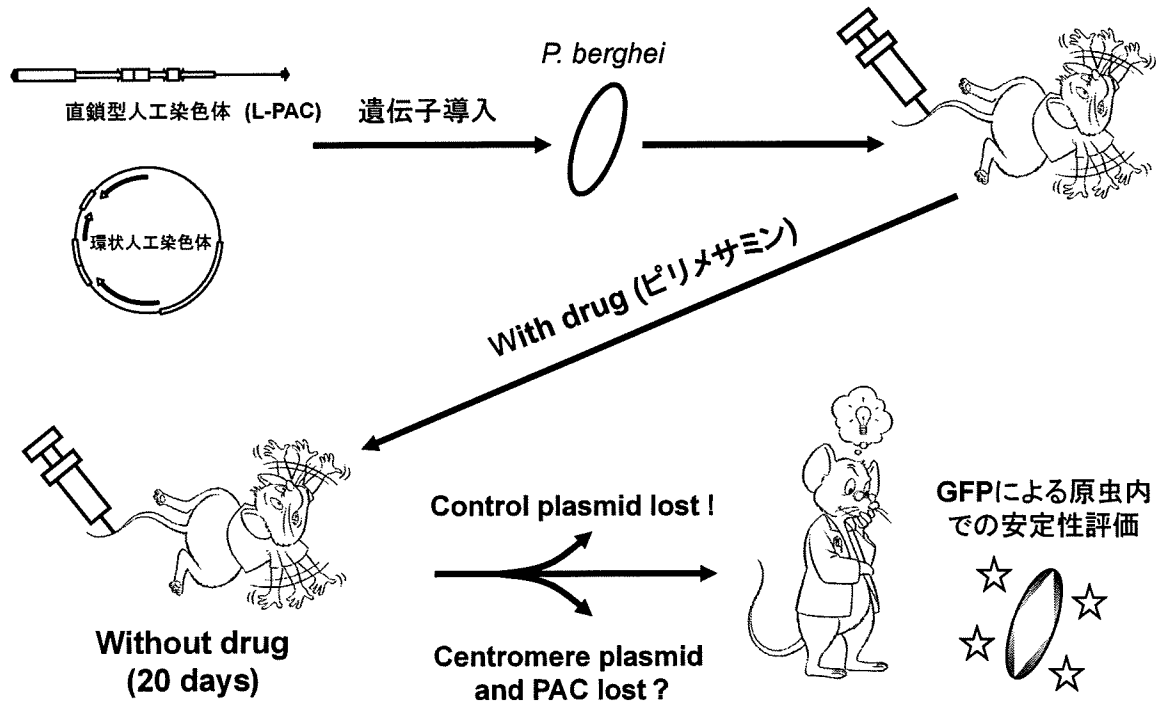
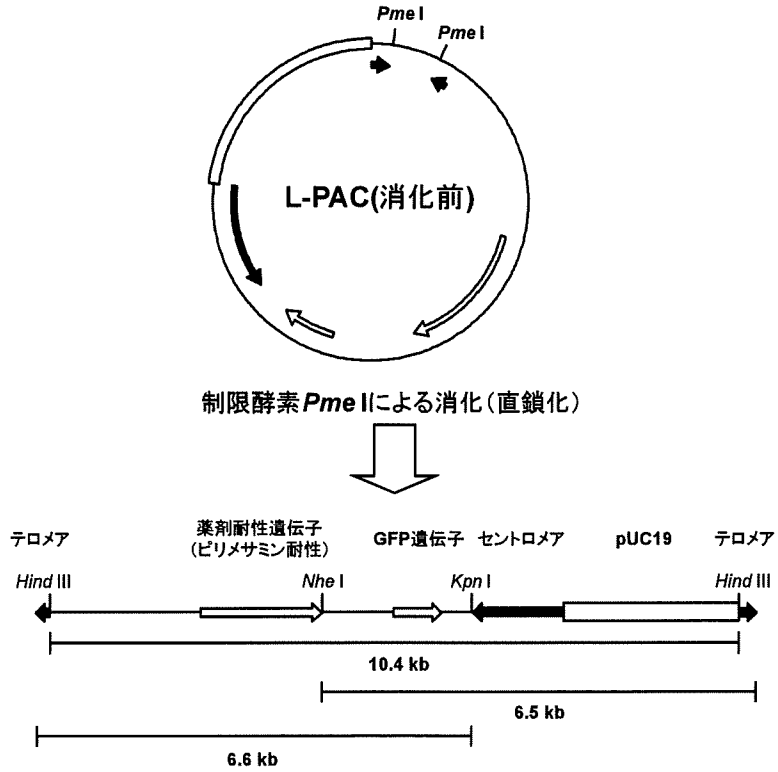


図1 PAC及びセントロメアプラスミドの原虫内(赤血球ステージ)での安定性評価実験  
構築したL-PAC及び環状人工染色体をネズミマラリア原虫へ導入し、ラットに接種する。その後、薬剤を投与し、原虫に確実にL-PAC及び環状人工染色体を保持させる。続いて、原虫を新たなラットへ感染させ、薬剤非存在下で維持する。通常のプラスミド(コントロールプラスミド)は非均等に娘細胞に分配されるため、同条件下では、原虫から消失する。一方、L-PAC及び環状人工染色体は均等に分配され、原虫内で安定的に保持されることが考えられる。原虫内でのプラスミドの保持はGFPの蛍光を指標に評価する。



### Linear Plasmodium Artificial Chromosome (L-PAC) (10888bp)

図2 直鎖型PACの遺伝子マップ

図中の下線は図5において検出した各DNA断片とそのサイズを示す。

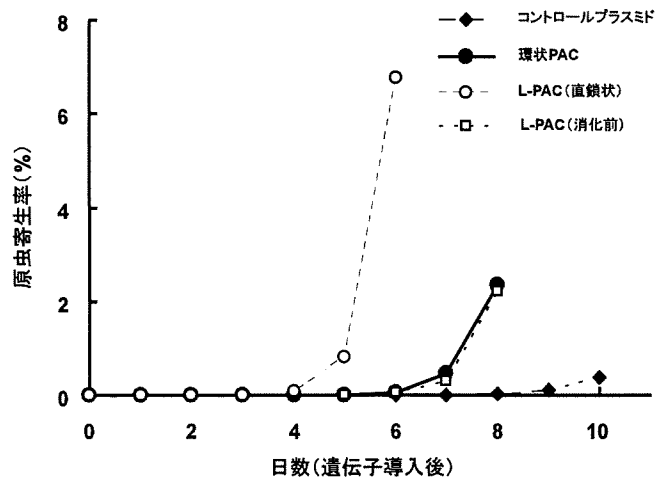


図3 PAC導入後の原虫寄生率の変化

各DNAサンプルを5μg使用し、エレクトロポレーション法により、ネズミマラリア原虫へ導入した。原虫寄生率は感染赤血球をギムザ染色し、計測した。全てのサンプルについて3回、実験を繰り返した結果、いずれの場合においても同様の結果が得られた。