

7)。等温遺伝子増幅法によるフィールドヤブカサンプルからのフィラリアの検出：LAMP法がフィールドサンプルからの病原体検出にも適用可能かを検討するため、沖縄県にてフィールドサンプルを採集し、LAMP法に供した。その結果、*Aedes albopictus* 72匹、*Armigeres subalbatus* 43匹、*Culex pipiens* 2匹、*Culex vishunui comp* 2匹、*Aedes aureostriatus* 1匹を採集し、LAMP法に供した。その結果11匹の蚊サンプルからフィラリアを検出可能であり、本法のフィールドでの有効性がしめされた (Fig. 8)。

D. 考察

蚊媒介性感染症の日本への侵入防除のため、検疫所などの実際の水際防除の現場でも実施可能な簡便かつ迅速な病原体検出システムの開発が望まれる。そこで我々はPCR法のように特別な機器を用いることなく遺伝子診断が可能な等温遺伝子増幅法に着目して研究を展開した。本年度は実験室レベルで、カ-寄生虫感染モデルを用いた実験系より得られたサンプルを用いて、等温遺伝子増幅法の有用性を検証した。マラリアのモデルとして、齧歯類マラリアとハマダラカを用いた感染モデル、寄生虫のモデルとして、フィラリアとヤブカを用いた感染モデルを使用した。

齧歯類マラリア-ハマダラカ感染モデルを用いた、等温遺伝子増幅法の解析の結果、精製した病原体を用いた場合、哺乳動物宿主および蚊の双方の病原体ステージから、100マラリア原虫が検出限界であった。この結果は既存の遺伝子診断法と比較して、優れた数値であり、本法の信頼性の高さが示されたと考えられる。また、本研究による本来の対象とは異なるが、哺乳動物宿主ステージのマラリア原虫の場合、特段DNAを抽出することなく、血液の煮沸サンプルを等温遺伝子増幅法に供しても精製DNAと同等の検出限界を示した。このことは、本法のヒトマラリアでの迅速スクリーニング検査への応用性を示す物であった。マラリア感染ハマダラカサンプルを等温遺伝子増幅法に供した場合、一個体のオーシストを検出可能であった。この結果はハマダラカにおけるマラリア感染において、等温遺伝子増幅法によって一感染ユニットを検出可能であることを示し、これはヒトにマラリアを媒介する能力を持つ蚊の検出に対して必要十分な感度を持つことを示す結果であった。以上のように、本研究で開発した等温遺伝子

増幅法はハマダラカからのマラリア原虫検出に対して高い有用性を持つことを明らかにした。

フィラリア-ヤブカ感染モデルを用いた等温遺伝子増幅法の解析の結果、精製病原体からDNAを抽出し試験に供したところ、一個体の病原体を検出可能であった。フィラリアは多細胞生物であるため、更なる検出限界の検定を実施したところ、0.1個のフィラリア由来サンプルより、フィラリアDNAを検出可能であり、本等温遺伝子増幅法が優れた検出性能を有することが、示された。実際のヤブカ感染サンプルを本法に供した場合においても、一個体のフィラリア感染を検出可能であることが示され、本法はヤブカサンプルからのフィラリア検出法として高い有用性を持つことが確認された。また、実際のフィラリア汚染地帯において本等温遺伝子増幅法の検定をおこなったところ、フィールド由来ヤブカサンプルから高感度にフィラリアを検出可能であり、本研究において開発された等温遺伝子増幅法は高い実用性を持つことが示された。

E. 結論

本研究成果によって、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示され、今後マラリアや、ウエスト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、高い有用性を持つことが期待される結果が得られた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文

Aonuma, H., Suzuki, M., Iseki, H., Perera, N., Nelson, B., Igarashi, I., Yagi, T., Kanuka, H., Fukumoto, S. Rapid Identification of *Plasmodium*-carrying mosquitoes using loop-mediated isothermal amplification. *Biochem Biophys Res Commun.* 376(671-6) 2008

Okado, K., Shinzawa, N., Aonuma, H., Nelson, B., Fukumoto, S., Fujisaki, K., Kawazu, S., Kanuka, H. Rapid recruitment of innate immunity regulates variation of intracellular pathogen resistance in *Drosophila*. 379(6-10) 2009

Perera, N., Aonuma, H., Yoshimura, A., Teramoto, T., Iseki, H., Nelson, B., Igarashi, I., Yagi, T., Fukumoto, S., Kanuka, H. Rapid identification of virus-carrying mosquitoes using reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. J Virol Methods. 156(32-6) 2009

Aonuma, H., Yoshimura, A., Perera, N., Shinzawa, N., Bando, H., Oshiro, S., Nelson, B., Fukumoto, S., Kanuka, H. Loop-mediated isothermal amplification applied to filarial parasites detection in the mosquito vectors: *Dirofilaria immitis* as a study model. Parasit Vectors 2(15) 2009

2. 学会発表

吉村文、福本晋也、嘉糠洋陸 フィラリアはどのようにして宿主体内への移行を理解するのか？ 第 77 回日本寄生虫学会 2008. 4. 2

伴戸寛徳、青沼宏佳、福本晋也、嘉糠洋陸 ハマダラカ中腸に存在する細菌がマラリア原虫の発育に与える影響 第 77 回日本寄生虫学会 2008. 4. 2

岡戸清、新澤直明、青沼宏佳、福本晋也、嘉糠洋陸 Innate immune response activity correlates to diversity of *Drosophila* susceptibility to bacterial infection. 49th Annual Drosophila Research Conference 2008. 4. 4

岡戸清、新澤直明、青沼宏佳、福本晋也、河津信一郎、嘉糠洋陸 細菌感染における感受性の多様性と認識シグナル伝達メカニズム 日本分子生物学会第 8 回春季シンポジウム 2008. 5. 26

吉村文、福本晋也、嘉糠洋陸 フィラリア感染幼虫における環境依存的な脱皮関連遺伝子の探索 日本分子生物学会第 8 回春季シンポジウム 2008. 5. 26

寺本時靖、吉村文、福本晋也、嘉糠洋陸 ウイルス媒介蚊における抗ウイルス反応メカニズムの解析 日本分子生物学会第 8 回春季シンポジウム 2008. 5. 26

新澤直明、青沼宏佳、福本晋也、三浦正幸、

嘉糠洋陸 細菌感染におけるトレランス機能による新規感染防御メカニズム 日本分子生物学会第 8 回春季シンポジウム 2008. 5. 26

青沼宏佳、鈴木萌美、井関博、土井裕子、五十嵐郁男、嘉糠洋陸、福本晋也 等温遺伝子増幅法 (LAMP 法) のマラリア原虫媒介蚊への応用 日本分子生物学会第 8 回春季シンポジウム 2008. 5. 26

土井裕子、福本晋也、岡野栄之、嘉糠洋陸 ロバストネスによるマラリア原虫温度適応メカニズム 日本分子生物学会第 8 回春季シンポジウム 2008. 5. 26

伴戸寛徳、青沼宏佳、福本晋也、嘉糠洋陸 マラリア媒介蚊における腸内細菌と病原体のインターフェース 日本分子生物学会第 8 回春季シンポジウム 2008. 5. 26

小林朋美、土井裕子、福本晋也、岡野栄之、嘉糠洋陸 マラリア原虫の極性形成メカニズムとその意義は何か？ 第 15 回分子寄生虫学ワークショップ 2008. 8. 4

伴戸寛徳、青沼宏佳、福本晋也、嘉糠洋陸 マラリア媒介蚊における腸内細菌と病原体のインターフェース 第 15 回分子寄生虫学ワークショップ 2008. 8. 4

新澤直明、青沼宏佳、福本晋也、三浦正幸、嘉糠洋陸 トレランス機能は細菌感染における病原性を左右する新規感染防御機構か？ 第 2 回細菌学若手コロッセウム 2008. 8. 5

岡戸清、新澤直明、青沼宏佳、福本晋也、河津信一郎、嘉糠洋陸 細菌感染における宿主抵抗性の多様性とそれを支えるメカニズム 第 2 回細菌学若手コロッセウム 2008. 8. 5

伴戸寛徳、青沼宏佳、福本晋也、嘉糠洋陸 Impact of midgut bacteria on *Plasmodium* development in mosquito 8th Awaji International Forum of Infection and Immunity 2008. 9. 10

新澤直明、青沼宏佳、福本晋也、三浦正幸、嘉糠洋陸 Cellular encapsulation-based host tolerance in bacterial infection 8th Awaji International Forum of Infection and Immunity 2008. 9. 10

伴戸寛徳、青沼宏佳、福本晋也、嘉糠洋陸 感染症媒介蚊・腸内細菌・病原体の間に存在するインターフェース 第8回昆虫病理研究会シンポジウム 2008. 9. 11

青沼宏佳、鈴木萌美、吉村文、井関博、土井裕子、五十嵐郁男、平田晴之、嘉糠洋陸、福本晋也 等温遺伝子増幅法 (LAMP 法) の蚊媒介性感染症への応用 第146回日本獣医学会 2009. 9. 25

新澤直明、青沼宏佳、福本晋也、三浦正幸、嘉糠洋陸 食細胞による囲い込みは細菌感染に対する tolerance 機能を宿主に付与する 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 2008. 12. 10

土井裕子、福本晋也、小林朋美、岡野栄之、嘉糠洋陸 マラリア原虫における温度ロバストネス機構 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 2008. 12. 10

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31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 2008. 12. 10

木村亜希子、福本晋也、野村伸彦、満山順一、井上昇、河津信一郎、五十嵐郁男 In vitro and In vivo Antimalarial activity of T-2037, a novel Arylamidine 第42回日米医学協力・寄生虫疾患部会合同会議 2009. 1. 7

吉村文、福本晋也、嘉糠洋陸 フィラリアの生活環における環境応答性トランジション機構 第78回日本寄生虫学会 2009. 3. 28

木村亜希子、福本晋也、野村伸彦、満山順一、井上昇、河津信一郎 新規アリアルアミジン系化合物 T-2307 の抗マラリア活性 第78回日本寄生虫学会 2009. 3. 28

H. 知的財産権の出願・登録情報なし

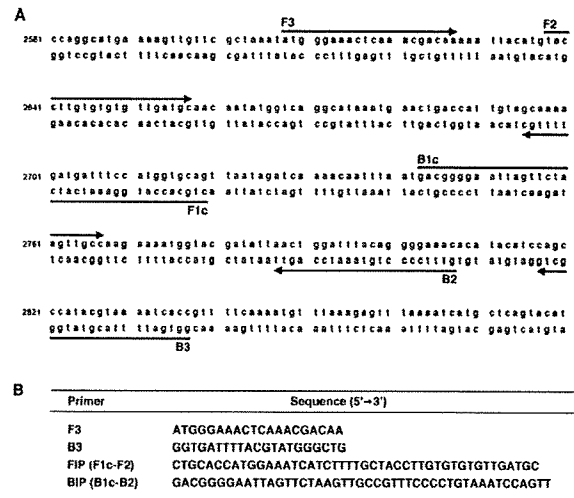


Fig. 1. *Plasmodium berghei* SPECT2 遺伝子に対する LAMP プライマーの設計。(A) プライマー設計領域の部分的 SPECT2 遺伝子の塩基配列。矢印がそれぞれのプライマー位置を示す。(B) 用いたプライマーの塩基配列。

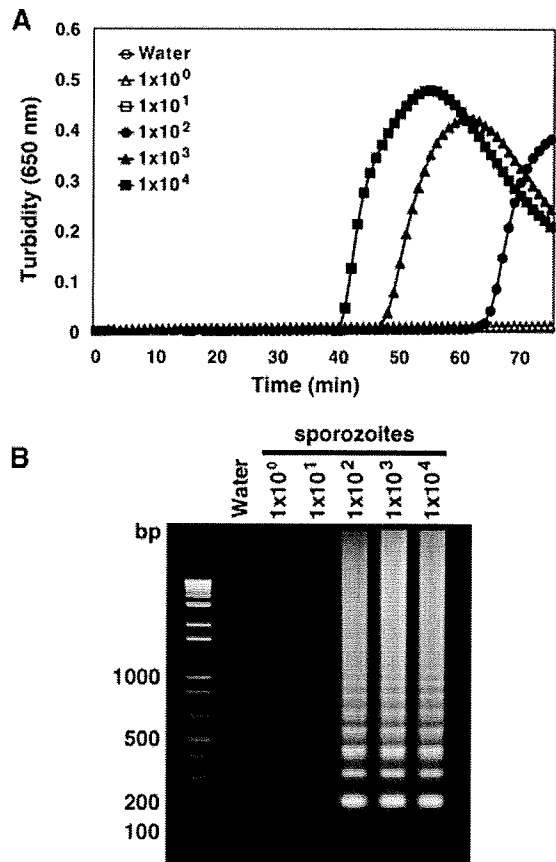


Fig. 2. 等温遺伝子増幅法によるマラリア原虫の検出限界。(A) 等温遺伝子増幅法による反応のリアルタイム濁度計を用いた解析。(B) 反応産物のアガロースゲル電気泳動法による解析。

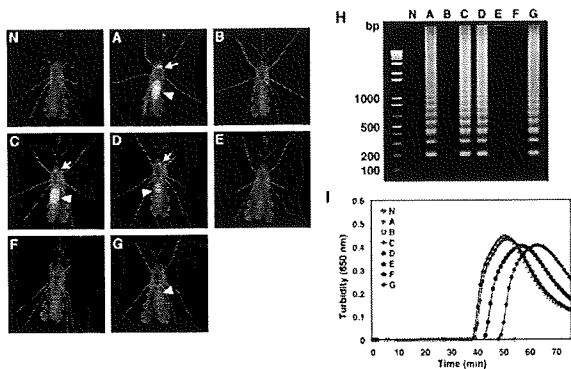


Fig. 3. 等温遺伝子増幅法によるハマダラカからのマラリア原虫の検出。アローヘッドおよび矢印で示す蛍光がマラリア原虫。(A-G) 無作為に抽出されたマラリア原虫感染血液吸血蚊。(H) A-G のハマダラカ由来サンプルの等温遺伝子増幅法反応産物のアガロースゲル電気泳動による解析。(I) A-G のハマダラカ由来サンプルの等温遺伝子増幅法反応のリアルタイム濁度計による解析。

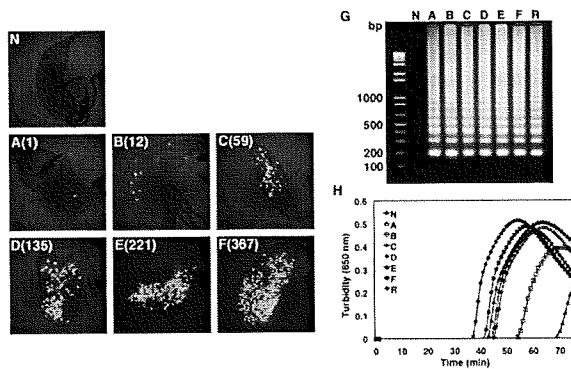


Fig. 4. 等温遺伝子増幅法による、ハマダラカからのマラリア原虫オーシストの検出。それぞれの緑色蛍光ドットが一つのマラリア原虫オーシストを示す。(G) A-F のハマダラカ由来サンプルの等温遺伝子増幅法反応産物のアガロースゲル電気泳動による解析。(H) A-F のハマダラカ由来サンプルの等温遺伝子増幅法反応のリアルタイム濁度計による解析。

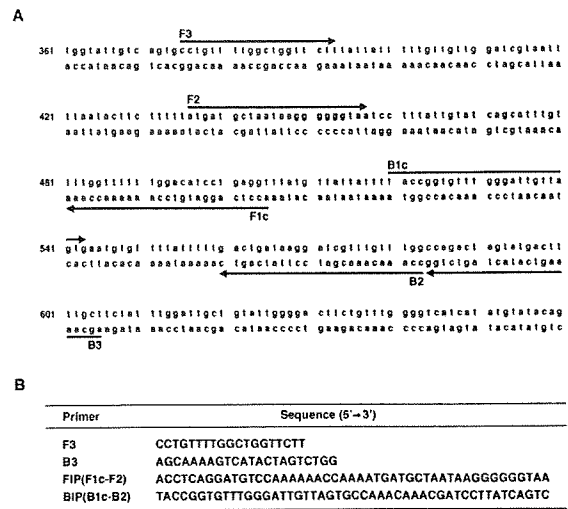


Fig. 5. *Dirofilaria immitis* チトクロームオキシダーゼサブユニット I 遺伝子に対する LAMP プライマーの設計。(A) プライマー設計領域の部分的チトクロームオキシダーゼサブユニット I 遺伝子塩基配列。矢印がそれぞれのプライマー位置を示す。(B) 用いたプライマーの塩基配列。

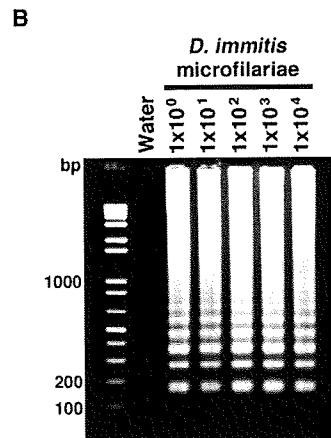
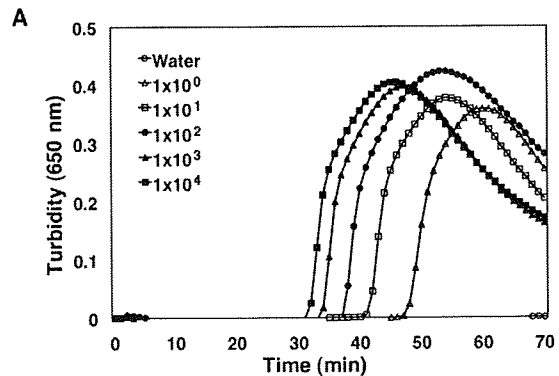


Fig. 6. 等温遺伝子増幅法によるフィラリアの検出限界。(A) 等温遺伝子増幅法による反応のリアルタイム濁度計を用いた解析。(B) 反応産物のアガロースゲル電気泳動法による解析。

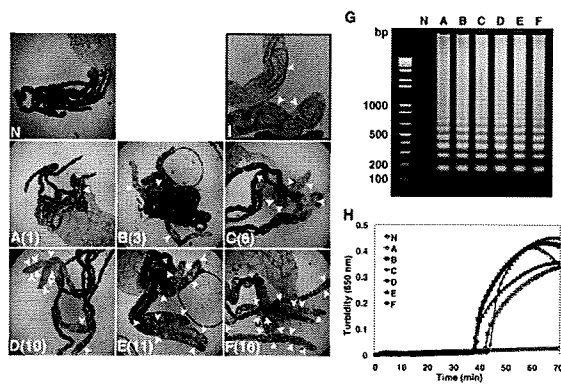


Fig. 7. 等温遺伝子増幅法によるヤブカからのフィラリアの検出。アローヘッドで示するのがフィラリア。(A-F) 1~16個体のフィラリアが感染しているヤブカマルピーギ管 (G) A-F のヤブカ由来サンプルの等温遺伝子増幅法反応産物のアガロースゲル電気泳動による解析。(H) A-F のヤブカ由来サンプルの等温遺伝子増幅法反応のリアルタイム濁度計による解析。

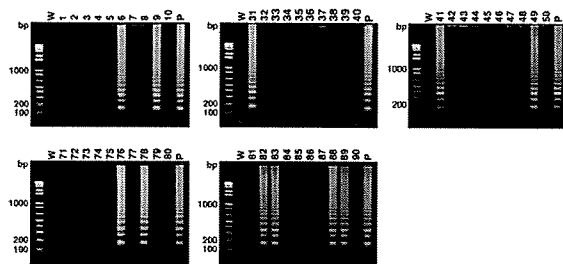


Fig. 8. フィールド由来ヤブカサンプルからの等温遺伝子増幅法によるフィラリアの検出。120匹のヤブカサンプルよりそれぞれDNAを抽出し等温遺伝子増幅法に供した。ラダーバンドが認められるのがフィラリア感染個体。

等温遺伝子増幅法テンプレート用病原体の作成

研究分担者 下島 昌幸 東京大学医科学研究所ウイルス感染分野 助教

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。これまでに作製した西ナイルウイルスのレプリコンを用い、感染の検出を容易かつ安全に行える西ナイルウイルス様粒子の作出に成功した。蚊感染モデルの構築基盤が整った。

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であり、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単一温度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（前年度）。今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の作製を行った。ただし実験の安全性を考慮し、増殖性は有さないウイルス様粒子とした。

B. 研究方法

1. 細胞培養

ヒト胎児腎由来 293 T細胞、ハムスター腎由来 BHK 細胞およびアフリカミドリザル腎由来 Vero E6 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% CO₂ 存在下で培養した。ヒト T 細胞由来 Jurkat 細胞、ヒト B 細胞由来 Daudi 細胞、ヒト T 細胞由来 CEM 細胞およびヒト単球由来 THP-1 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% CO₂ 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

黄色蛍光蛋白質変異体 Venus の遺伝子を組み込んだ西ナイルウイルスレプリコンは前年度に作製済みである（図 1 参照）。このレプリコンはウイルスゲノムの複製や蛋白質発現に必要な遺伝子領域を含むが、ウイルス粒子を構成するウイルス構造蛋白質（C, prM および E）の遺伝子を持たない。そのため感染性や増殖性を有するウイルスを産生することができない。

レプリコンを有する細胞から感染性のあるウイルスを産生させるため、欠損させている構造蛋白質（C, prM, E の 3 種）を発現するプラスミドの作製を行った。本来、西ナイルウイルスの構造および非構造蛋白質は巨大な 1 つのポリペプチドとして産生され、後に細胞あるいはウイルスに由来する酵素によって切断される（図 1 上）。そこで西ナイルウイルス構造蛋白質のプラスミドによる発現は図 2 に示すように 4 つのパターンで行った。

感染性西ナイルウイルス様粒子の産生は、レプリコン発現 293T 細胞に構造蛋白質発現

プラスミドを導入することによって得た。プラスミドの導入後、24時間培養して得られた培養上清を0.45 μmのフィルターを通したものをウイルス様粒子として用いた。

構造蛋白質Eのコントロールとして、水疱性口内炎ウイルス Vesicular stomatitis virus のG蛋白質 (VSVG) を用いた。

3. 感染性西ナイルウイルス様粒子の感染

各種培養細胞に段階希釈した西ナイルウイルス様粒子を細胞濃度 1×10^5 個/ml となるように接種した。48時間培養後、蛍光顕微鏡を用いて黄色蛍光蛋白質変異体 Venus 発現細胞数を数えた。

4. 安定発現細胞の作製

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 μmのフィルターを通したものを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。

(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. 感染性西ナイルウイルス様粒子の産生

図2に示すいずれの構造蛋白質の発現パターンにおいても西ナイルウイルス様粒子は $9.7 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^6$ infectious units (IU)/ml の感染価をBHK細胞に示した(図3)。構造蛋白質を発現させなかった場合の感染価は認められなかった。

最も高い感染価は、構造蛋白質CおよびprMを1つのプラスミドから、Eを別のプラスミドから産生させた場合に見られた(C-prM+E)。よって以下の実験にはこの構造蛋白質の発現のパターンで得られた西ナイルウイルス様粒子を用いた。

2. ウイルス様粒子の感染指向性

西ナイルウイルスはBHK細胞やVero E6細胞

等の上皮系細胞でよく増殖し、Jurkat細胞等の血球系細胞では殆ど増殖しないことが知られている。そこでこれらの細胞におけるウイルス様粒子の感染価を調べた。BHK細胞、Vero E6細胞では 1×10^6 IU/ml 弱の感染価が見られたが、Jurkat細胞、CEM細胞、Daudi細胞、THP-1細胞で(いずれも血球系細胞)は 1×10^1 IU/ml 以下の感染価しか示さなかった(図4)。構造蛋白質EをVSVGにした場合の血球系細胞における感染価は 1×10^4 IU/ml 以上であることから(図4)、レプリコンの複製はいずれの細胞においても十分起こるものであり、西ナイルウイルス様粒子は血球系細胞へは感染しにくいと考えられた。

また、西ナイルウイルスの感染はカルシウム依存性レクチン(C型レクチン)であるDendritic cell intracellular adhesion molecule3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) やDendritic cell intracellular adhesion molecule3-grabbing non-integrin-related protein (DC-SIGNR) によって高められることが知られている。そこで、Jurkat細胞にこれらC型レクチンを安定的に発現させたものを作製し、ウイルス様粒子の感染価の測定に用いた。その結果、DC-SIGNおよびDC-SIGNRを発現させたJurkat細胞での感染価はそうでない細胞(Normal)での場合と比べ10倍~100倍程度ウイルス様粒子の感染価が高いことが分かった(図5)。構造蛋白質Eの変わりにVSVGを用いて作製したウイルス様粒子の感染価は殆ど変化しなかった。DC-SIGN、DC-SIGNRは西ナイルウイルス様粒子の感染を増強していると考えられた。

すなわち、作製した西ナイルウイルス様粒子は本来の野生型西ナイルウイルスの感染指向性を保持していることが判明した。

3. 新たな西ナイルウイルス感染増強分子の探索

DC-SIGN、DC-SIGNRとは異なる糖鎖特異性を有する別のC型レクチン asialoglycoprotein receptor (ASGPR) および macrophage galactose-type C-type lectin (MGL) がJurkat細胞における感染価に影響するか否かを調べた。いずれの分子も西ナイルウイルス様粒子の感染価を高めた(図6)。C型レクチンではないが他のウイルスの感染増強に関わるACE2(SARSコロナウイルスの受容体)やAxl(エボラウイルスの細胞侵入に関わると示唆される分子)はJurkat細胞における感染価に影響しなかった(図6)。

D. 考察

マーカー遺伝子を持った西ナイルウイルス様粒子が作製できたことにより、西ナイルウイルス-蚊感染モデルの確実な構築基盤ができた。感染細胞は蛍光蛋白質を発現するようになるので、感染成立の有無が極めて容易に判断できる。また増殖性を持たないため、その扱いは比較的安全である（本来の西ナイルウイルスの扱いはBSL3）。単一温度遺伝子増幅法の確立におけるプライマー設計や感度の検定、特異性の検定に役立つはずである。

西ナイルウイルス以外の蚊媒介性感染症の原因ウイルスであるデングウイルス・黄熱ウイルスも西ナイルウイルスと類似のゲノム構造をしているため、本研究と同じ戦略でウイルス様粒子を作製することができるはずである。それらの蚊感染モデルの構築も確実視される。

作製した西ナイルウイルス様粒子の感染指向性は本来のウイルスのものを保持していた。よって、このウイルス様粒子は危険な西ナイルウイルス自体を用いずとも中和抗体価測定や感染指向性の解析に用いることができ、実験の安全面そして操作効率性も良い。実際我々は、このウイルス様粒子を用いて解析を行い、ASGPR および MGL という2つのC型レクチンが西ナイルウイルス様粒子の感染を高めうる新規分子であることを見出した。本来のウイルスを用いての確認実験が必要であることは否めないが、更なる感染指向性解析に有用であることは間違いない。

E. 結論

本研究成果により、西ナイルウイルス-蚊感染モデルの構築基盤が築かれた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文

Murakami S, Horimoto T, Maile Q, Nidom CA, Chen H, Muramoto Y, Yamada S, Iwasa A, Iwatsuki-Horimoto K, Shimajima M, Iwata A, Kawaoka Y. Growth determinants for H5N1 influenza vaccine seed viruses in MDCK cells. J Virol 82(21): 10502-10509, 2008

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(6): 2510-2517, 2009

H. 知的財産権の出願・登録情報

なし。

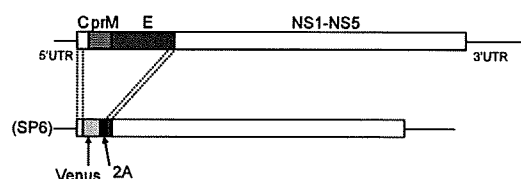


図1：西ナイルウイルスのゲノムの模式図

(上) 野生型の西ナイルウイルスのゲノム構造。プラス鎖のRNAであり、構造蛋白質(C、prM、E)および非構造蛋白質(NS1-NS5)をコードしている。UTRは非翻訳領域(un-translated region)を示す。

(下) 蛍光蛋白質Venusの遺伝子を組み込んだレプリコン。2AはFoot-Mouse disease virusの2Aプロテアーゼの遺伝子。このレプリコンはmRNAとして機能し、Venus蛋白質を他のウイルス蛋白質とともに産生させる。またこのゲノムはNS1-NS5蛋白質の作用により自己複製される。

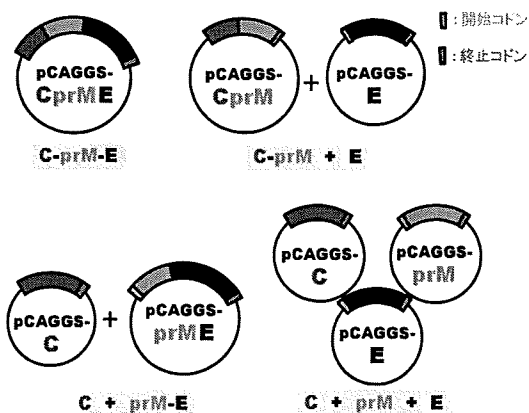


図2：構造蛋白質の発現パターン

西ナイルウイルスの3つの構造蛋白質(C、prM、E)の発現は、そのまま(左上)、2つと1つに分けて(右上および左下)、あるいはそれぞれ(右下)のcDNAを蛋白質発現用プラスミドpCAGGSに挿入し、それぞれを同時に細胞に導入することによって行った。開始コドン(ピンク)および終止コドン(緑)は必要に応じて付加した。

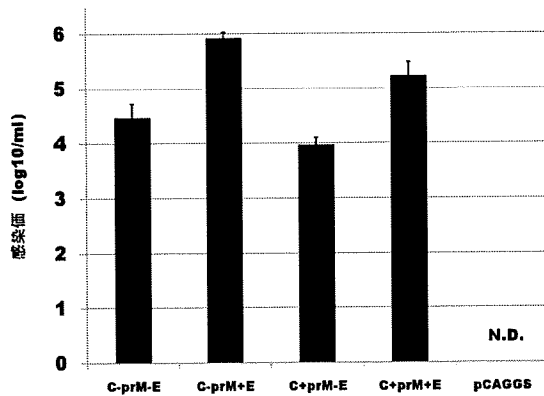


図3：感染性西ナイルウイルス様粒子の産生
レプリコン (図1の下) を発現させた 293T 細胞に、西ナイルウイルスの構造蛋白質発現用プラスミド (図2) を導入し、その培養上清をウイルス様粒子とみなして BHK 細胞に感染させた。感染は蛍光蛋白質 Venus 発現細胞数を数えて算出した。pCAGGS は空のプラスミドを用いた場合であり、感染価は N.D. (non-detectable) であった。検出限界は 4 IU/ml。

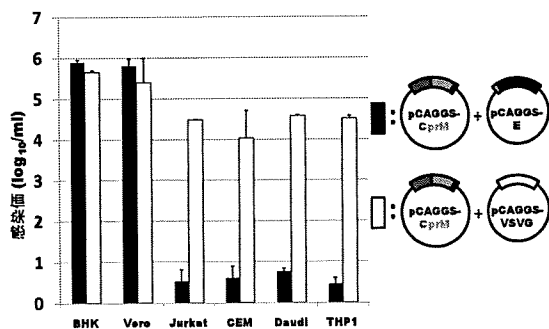


図4：各種培養細胞における感染価
黒棒は構造蛋白質がいずれも西ナイルウイルス由来の場合の感染価を示す。白棒は構造たんぱく質 E のみを VSVO (水疱性口内炎ウイルス G 蛋白質) にした場合の感染価を示す。

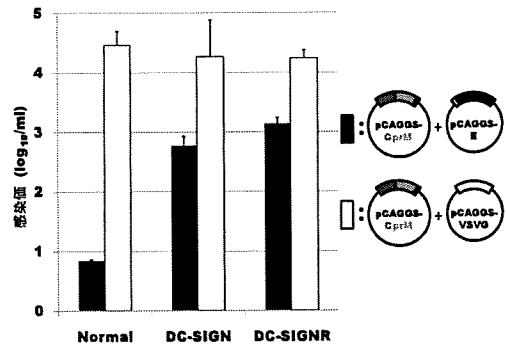


図5：C型レクチンの発現と感染価
Normal はコントロールの Jurkat 細胞における感染価を示す。DC-SIGN および DC-SIGNR はそれぞれ DC-SIGN 発現、DC-SIGNR 発現 Jurkat 細胞における感染価を示す。黒棒、白棒は図4と同じである。

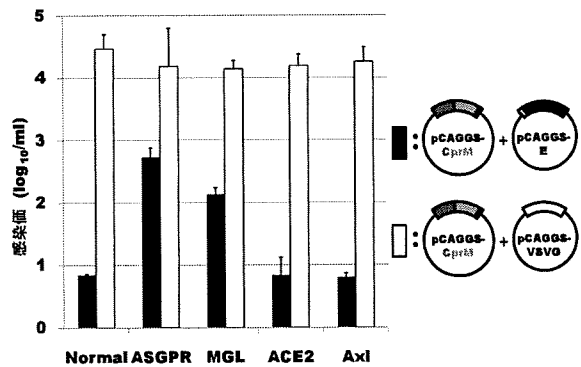


図6：新規感染増強分子の探索
Normal はコントロールの Jurkat 細胞における感染価を示す。その他は各分子を発現させた Jurkat 細胞における感染価を示す。黒棒、白棒は図4と同じである。

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、病原体遺伝子増副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、クリプトスポリジウム、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。本研究における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によって、病原体を直接的に検出することを意味しており、増幅産物のコピー数が少なくても検出可能である。また、増幅遺伝子の長期保存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既存の遺伝子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・ストリップの作製とその評価

メンブレンの流動速度が異なる 3 種類 (HF180MC100, HF135MC100, HF120MC100: ミリポア) と金コロイド溶液を浸すコンジュゲートパットを 3 種類 (No. 6613, No. 1281, No. 8964) をそれぞれ用意し検出に最適なイムノクロマト・ストリップの検討を行った。さらに、ストレプトアビジン標識金コロイド粒子 (British BioCell International) (赤色) と FITC-Biotin 標識 *B. gibsoni* P50 遺伝子増幅産物の最適 pH の検討を行った。本遺伝子増幅産物が pH 7.2、及び pH 7.4 に調整した金コロイド標識ストレプトアビジン (Biotin と結合する性質がある) と抗 FITC 抗体によりイムノクロマト法により検出できるかを検討した。

3. *B. gibsoni* P50 遺伝子増幅産物の検出限界の検討

PCRにより得られた *B. gibsoni* P50 遺伝子増幅産物が最適条件下でのイムノクロマト法による検出限界を検討した。本遺伝子増幅産物を 2, 10, 20, 30, 50 及び 100 倍希釈し、それぞれをイムノクロマト法により検討を行った。

4. イムノクロマト・ストリップの作成

ストリップは以下の図に示したように作成した。

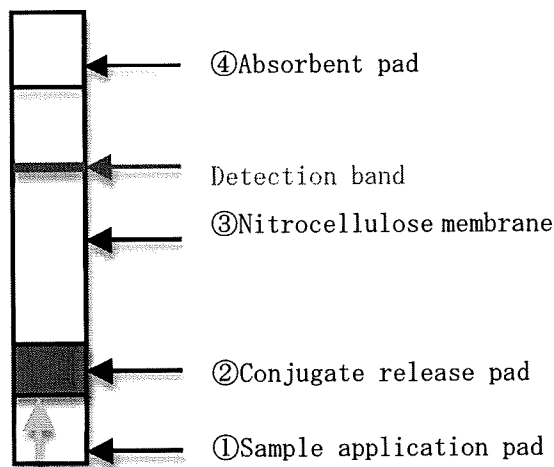


図1 [上図の説明]

- 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グ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 μ l (1mg/ml) を BioDot's BioJet 3050 quanti dispenser (BioDot Inc.) を用いて検出バンドとして最適 pH に調整し 1mm 固相化を行った。検出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でアブライしたサンプルの残液を吸収するパット (Schleicher & Schuell)

以上、①から④のパット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・ストリップの作製とその最適条件の決定

ニトロセルロースメンブレン HF180MC100, HF135MC100, 及び HF120MC100 にそれぞれコンジュゲートパット (No. 6613, No. 1281, 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。

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 及び pH7.4 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 (図2)。

その結果、メンブレンの流動速度が速い HF180MC100 は速度の遅い HF135MC100 と HF120MC100 に比べて検出感度が高く、しかも検出時間が 5 分程度であったことから、最適なメンブレンは HF180MC100 にすることに決定した。

また、3 種類のコンジュゲートパットは HF180MC100 のメンブレンを用いた結果、コンジュゲートパットの吸収性、検出感度を評価した結果、No. 8964 が最適であった (図2)。さらに、pH7.2 及び pH7.4 で調整したイムノクロマト・ストリップの検出感度を比較した結果、pH7.2 で作製したイムノクロマト・ストリップにおいて明瞭な検出バンドが認められた (図2)。

以上の結果より、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条件は HF180MC100 のメンブレン、No. 8984 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 は pH7.2 の緩衝液を利用することにそれぞれ決定した。

3. *B. gibsoni* P50 遺伝子増幅産物のイムノクロマト法による検出限界の検討

PCR により得られた *B. gibsoni* P50 遺伝子増幅産物が最適条件下でのイムノクロマト法による検出限界を検討した。本遺伝子増幅産物を 2, 10, 20, 30, 50 及び 100 倍希釈し、それぞれをイムノクロマト法により検討を行った。その結果、すべての希釈倍率において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* の検出感度は 100 倍以上であることを確認した (図 3)。

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。これからの検討課題として、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

Sasaki M, Omobowale O, Ohta K, Tozuka M, Matsuu A, Hirata H, Nottidge H0, Ikadai H,

Oyamada T. A PCR-based epidemiological survey of *Hepatozoon canis* in dogs in Nigeria. *J Vet Med Sci* 70(7):743-745, 2008.

Sasaki, M., Omobowale, O., Tozuka, M., Ohta, K., Matsuu, A., Nottidge, H.O., Hirata, H., Ikadai, H. & Oyamada, T. Molecular Survey of *Babesia canis* in Dog in Nigeria, *J Vet Med Sci* 69: 1191-1193, 2007.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録情報

なし

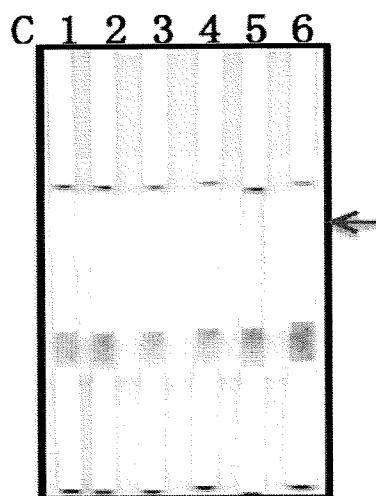
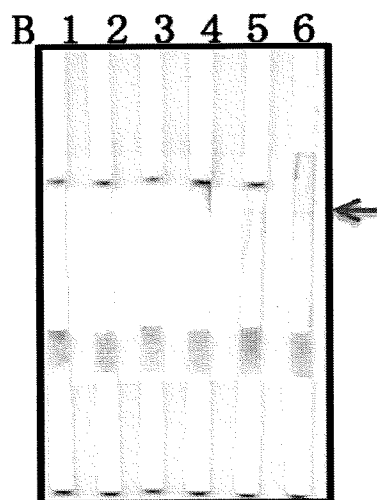
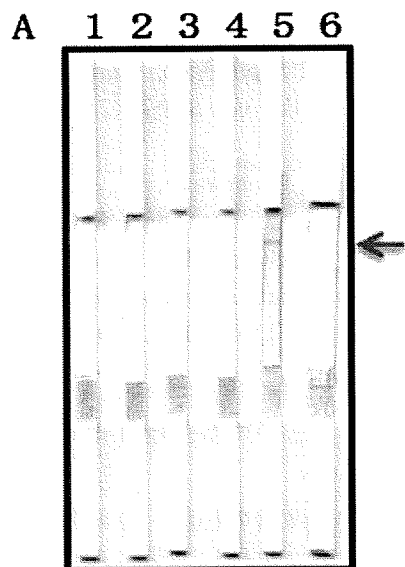


図2 *B. gibsoni* P50 遺伝子増幅産物を用いたイムノクロマト・ストリップの評価 (最適条件の検討)

ニトロセルロースメンブレン HF180MC100(A), HF135MC100(B), 及び HF120MC100(C) にそれぞれコンジュゲートパット (No. 6613 (Lane1 と

Lane2), No. 1281 (Lane3 と Lane4), No. 8964 (Lane5 と Lane6): 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。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 (A, B, C の Lane1, Lane 3, と Lane 5) 及び pH7.4 (A, B, C の Lane2, Lane 4, と Lane 6) 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。矢印は検出バンドラインを示す。

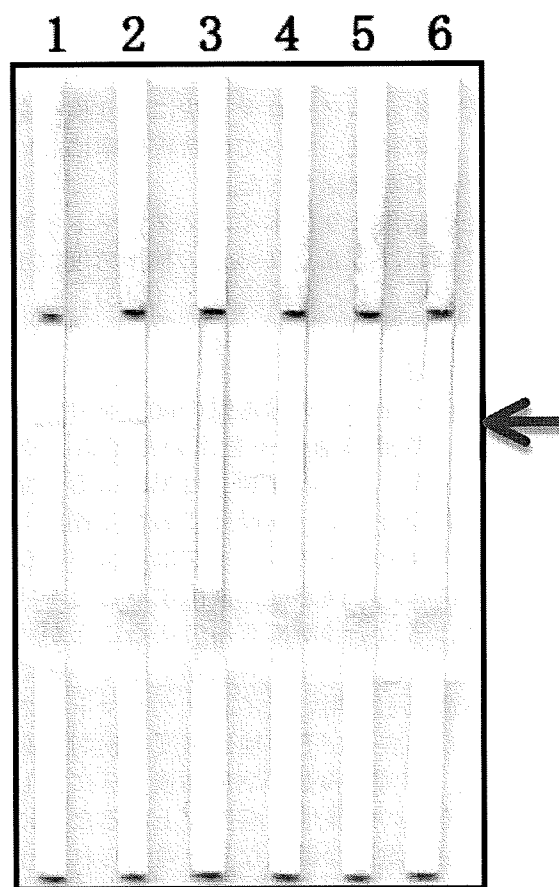


図3 *B. gibsoni* P50 遺伝子増幅産物のイムノクロマト法による検出限界の評価 (検出限界の評価)

PCR により得られた *B. gibsoni* P50 遺伝子増幅産物が最適条件下でのイムノクロマト法による検出限界を検討した。*B. gibsoni* P50 遺伝子増幅産物を 2 倍希釈 (Lane1)、10 倍希釈 (Lane2)、20 倍希釈 (Lane3)、30 倍希釈 (Lane4)、50 倍希釈 (Lane5) 及び 100 倍希釈 (Lane6) してイムノクロマト法による検出限界の評価を行った。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

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目的で、感染モデルの開発を行った。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が最終的な到達目標である。今年度は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。また実際に導入された遺伝子がベクター感染ステージのネズミマラリア原虫で安定的に保持されることを実証した。

A. 研究目的

本研究は 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。具体的にはマラ

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かった。また、マラリア原虫に対する遺伝子操作技術にはプラスミド・ベクターを利用する方法も存在するが、本法では遺伝子組み換え原虫を獲得するまでに 4~6 ヶ月の時間を要しており、迅速かつ簡便な遺伝子組み換えを行う方法として「マラリア原虫に適用可能な人工染色体」の確立が切望されていた。

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人工染色体を作製した。マラリア原虫人工染色体を用いてマラリア原虫の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する。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を可能とする。さらに、マラリア原虫人工染色体を用いると、マラリア原虫において通常のプラスミドで見られる異常な複製が起こらず、実験上の障害を回避することができる。また薬剤選択なしでも原虫により維持されるため、等温遺伝子増幅法の鋳型となるヒトマラリア遺伝子を蚊の中のステージでも内在性遺伝子とほとんど同じ状態で保持させることができる。

以上のことより、このモデル原虫に感染した蚊を用いることで、ヒトマラリア原虫に感染した蚊を用いる場合とほぼ同一の条件で等温遺伝子増幅法の条件検討等の実験が出来るはずである。

また遺伝子導入においても、人工染色体は従来の方法に比して組み換え体を作成する作業が簡便であり、異なる鋳型遺伝子間の比較、異なるヒトマラリア原虫に対するモデル原虫の作成等を短時間で行うことができる。

この目的を達成するため、平成19年度において分担研究者は以下に記す3つの課題を設定し研究を遂行した。

研究課題1. セントロメアの最小機能単位の同定を目的とした、構成的 GFP 発現コンストラクトを含む人工染色体の構築

GFP を構成的に発現するコンストラクトを用いて人工染色体を構築する。GFP をマーカー遺伝子として組み込まれた人工染色体を用いることで、遺伝子導入の効率、各感染ステージでの導入した遺伝子の安定性を定量的に評価することが可能になる。このプラスミド上に異なる長さのセントロメア候補領域を組み

込み、セントロメアとして機能する最小単位を同定する。この工程は、余分な配列を排除し、後にさらにヒトマラリア遺伝子などの外来遺伝子を挿入するための十分な領域を確保するために必要である。

研究課題2. 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セントロメアとして機能する最小単位を同定するとともに、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かを評価する。これらの過程は蚊感染ステージへ進むための実験の前段階として必要である。

研究課題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

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無性生殖で増殖し、スポロゾイトとなる。この場合にも導入した人工染色体が安定的に各原虫に分配されるかを確認する必要がある。

B. 研究方法

1. セントロメアの最小機能単位の同定と、構成的 GFP 発現コンストラクトを含む人工染色体の構築

宿主マラリア原虫のセントロメア候補領域をPCRにより増幅し、プラスミドに組み込む材料とした。ネズミマラリア原虫については決定した配列のAT含量が96%以上であることを指標にして、セントロメア配列が増幅されていることを確認した。

さらに制御領域の配列および GFP 遺伝子の配列をPCRにより増幅し、それらの産物を、pBlue script に組み込んだ。制御

領域としては *ef-1* のプロモーターを使用した。最後に、制御領域の配列および GFP 遺伝子を組み込んだプラスミドに、同定した宿主マラリア原虫由来セントロメア候補配列（複数）を組み込み、人工染色体を構築した。

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

最もサイズの小さいセントロメア領域を同定するために、構築した各人工染色体をネズミマラリア原虫に導入した。GFP を指標にして、各人工染色体について分配効率を評価した。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 $5 \mu\text{g}$ 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 (*p bGFP con*)、環状の人工染色体 (*C-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* ($1 \mu\text{M}$) 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。

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

コントロールプラスミド (*p bGFP con*)、環状の人工染色体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。

C. 研究結果

1. 構成的 GFP 発現コンストラクトを含む人工染色体の構築

PCR で増幅されたセントロメア候補領域を *PCR 2.1-TOPO* (*Invitrogen* 社製) にクローニングし、配列を決定した。その後、決定した配列の AT 含量が 96% 以上であること、すなわち目的とするセントロメア領域を増幅できたことを確認した。得られたセントロメア候補配列の概略図 (図 1) を示す。

これを用いて人工染色体を作成した。構築した人工染色体の概略図 (図 2) を示す。

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

図 3 に示す通り、薬剤非存在下で 20 日間経過後も、*C-PAC* は、コントロールプラスミドに比べ、原虫内で有意に維持されていた。この結果から、本人工染色体は、血液ステージ原虫内で安定に維持されることがわかった。算出された各人工染色体の分配効率を以下に示す。*pGFPcon*; 94.9020854(%), *pPBCEN5*; 99.9366227(%), *pPBCEN5A/T*; 99.9507901(%)。従って第 5 番染色体より得られた約 1.4kb のセントロメア推定領域を最小機能領域として得ることができた。

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

pPBCEN5A/T を導入した原虫では、その蚊ステージの原虫の 85% 以上が人工染色体を保持しており、蚊ステージにおいて人工染色体

は安定的に維持されていることが分かった
(図4および図5)。

D. 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
の人工染色体は環状タイプのもので、テロメ
アは使用しなかった。しかしながらほとんど
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。

また遺伝子導入の効率も極めて高く、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。

E. 結論

本年度の研究によって、感染モデルの樹
立ための基本技術を確立することができた。
本技術を応用することで本研究課題の進展に
寄与することができると思う。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文

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* 71(6) 1402-1414,
2009

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

Menard R, Heussler V, Yuda M, Nussenzweig
V. Plasmodium pre-erythrocytic stages:
what's new? *Trends Parasitol* 24(12)
564-569, 2008

Miyakoda M, Kimura D, Yuda M, Chinzei Y,
Shibata Y, Honma K, Yui K. Malaria-specific
and nonspecific activation of CD8+ T cells
during blood stage of Plasmodium berghei
infection. *J Immunol* 181(2) 1420-1428,
2008

Amino R, Giovannini D, Thiberge S, Gueirard
P, Boisson B, Dubremetz JF, Prévost MC,
Ishino T, Yuda M, Ménard R. Host cell
traversal is important for progression of
the malaria parasite through the dermis to
the liver. *Cell Host Microbe* 3(2) 88-96,
2008

2. 学会発表

Molecular approach to Malaria 2008.2
Identification of a master transcription
factor that controls gene expression in the
mosquito-invasive stage of malaria
parasites. Masao Yuda

Identification of a Plasmodium
transcription factor that activates genes
required for mosquito infection. Izumi
Kaneko, Shuji Shigenobu, Shiroh Iwanaga,
Tomomi Kato, Andrew P. Waters, Masao Yuda

Functional identification of the
(syntenic) conserved centromere of
Plasmodium S. Iwanaga, M. Yuda, C. J.

第16回分子寄生虫学ワークショップ

2008.8 マラリア原虫オオキネートの転写因子 AP2-0 の発現は翻訳レベルで制御されている 金子伊澄・加藤知美・油田正夫

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 金子伊澄 岩永史朗 加藤知美 油田正夫

第78回日本寄生虫学会大会 2009.3

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 金子伊澄 岩永史朗 加藤知美 油田正夫

第78回日本寄生虫学会大会 2009.3 ネズミ

マラリア原虫人工染色体の開発 横山菜穂美 金子伊澄 福本宗嗣 油田正夫 岩永史朗

H. 知的財産権の出願・登録情報なし

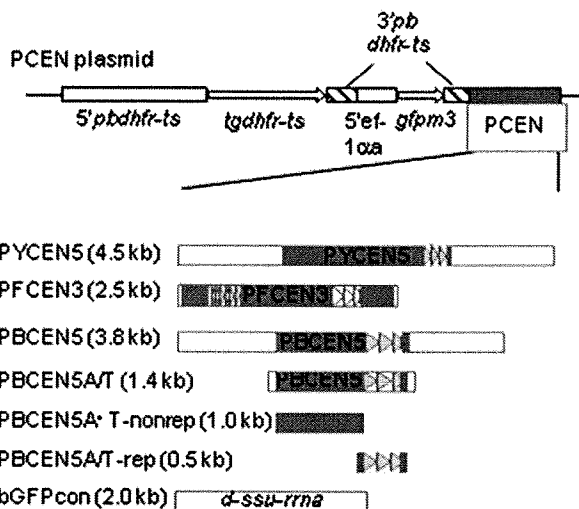


図1 セントロメア候補領域と人工染色体の概略図

6種類のセントロメア候補領域をクローニングし、人工染色体を作成した。セントロメア候補領域は A/T rich region 及び repeat reasion の両方または各一方から構成される。これらの中から最小長で人工染色体として機能するものを選択した。pPBCen5A/T (1.4 kb) がセントロメアとして機能するために最小限必要な領域であることがわかった (図2参照)。

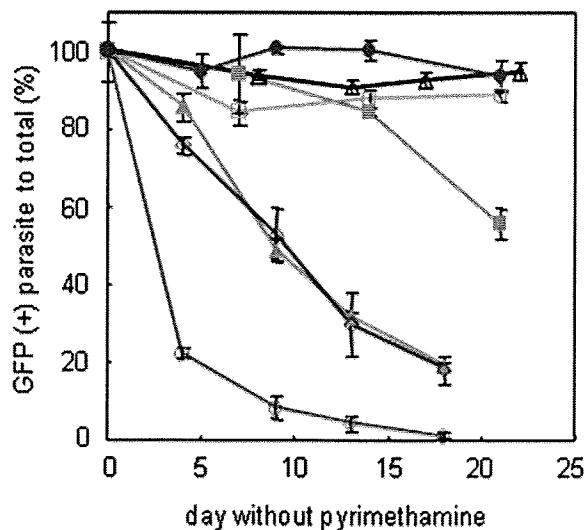


図2 ネズミマラリア原虫血液感染ステージへの人工染色体の導入と安定性の評価

6種類のセントロメア候補領域とコントロール配列から作成した人工染色体をそれぞれネズミマラリア原虫血液感染ステージへ導入した。人工染色体を導入した血液感染ステージ

の原虫をラットに感染させ、最初にピリメサミン存在下で人工染色体を保持した原虫のみを選択した。その後ピリメサミン非存在下で20日目まで人工染色体を保持している原虫の割合 (GFP positive の原虫の割合) を調べた。pPBCEN5 (青), pPBCEN5A/T (黒), PYCEN5 (緑) が人工染色体として機能しえることが分かった。

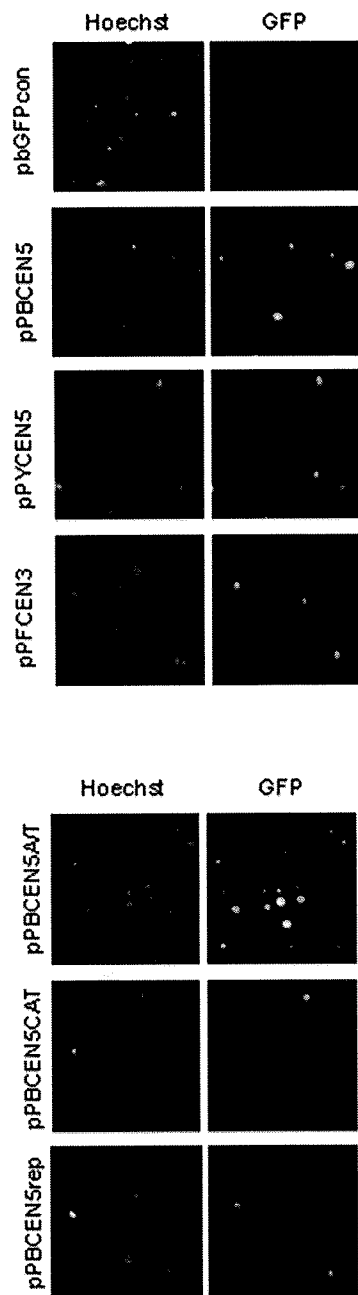


図3 ピリメサミン非存在下で20日目のラットの血液
人工染色体を保持している原虫は GFP の蛍光

を発している。原虫は核染色で同定した (Hoechst)。pPBCEN5, pPBCEN5A/T, PYCEN5 は20日後でも80%以上の原虫が人工染色体を保持していた。pPBGFpcon は negative control。

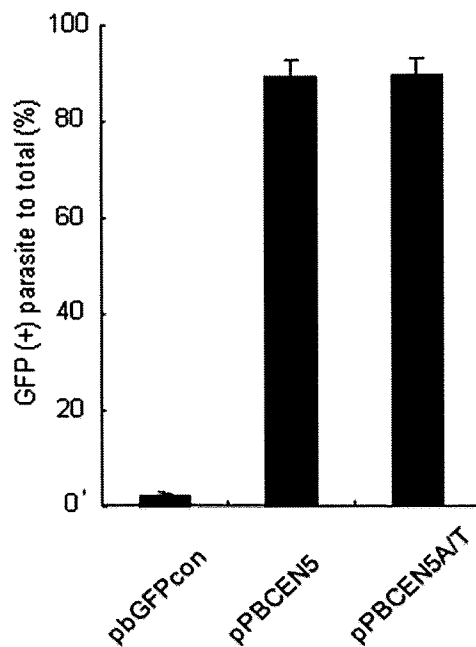


図4 ハマダラ蚊唾液腺内で人工染色体を保持しているスポロゾイトの割合
pPBCEN5, pPBCEN5A/T の各人工染色体を導入した原虫に感染させたマウスからハマダラ蚊を吸血させ、蚊の中のステージで人工染色体を保持している原虫の割合 (GFP positive の原虫の割合) を調べた。蚊の中のステージの最後である唾液腺スポロゾイトにおける保持率 (%) を表に示す。pPBCEN5, pPBCEN5A/T の各人工染色体を導入した原虫では吸血後3週間後でも約90%の保持率が確認された。pPBGFpcon は negative control。

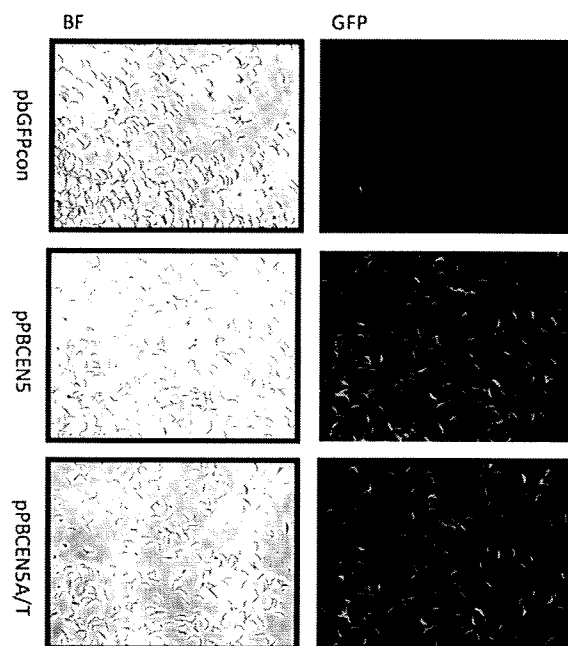


図5 pPBCEN5, pPBCEN5A/T の各人工染色体を導入した原虫の唾液腺スポロゾイト GFP 発現コンストラクトを組み込んだ人工染色体を保持することにより唾液腺スポロゾイトは蛍光を発する。pPBCEN5, pPBCEN5A/T の各人工染色体を導入した原虫では大部分のスポロゾイトが GFP positive であることが分かる。左側は位相差顕微鏡像。pBGFpcon は negative control。