



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Title	Studies on the Development of the High Efficacy Methods for Generating Transgenic Parasites in Rodent Malaria Model(内容 と審査の要旨(Summary))
Author(s)	曾賀, 晃
Report No.(Doctoral Degree)	博士(獣医学) 甲第508号
Issue Date	2018-09-21
Type	博士論文
Version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/77269

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

氏名(本(国)籍)	曾 賀 晃(兵庫県)
主指導教員氏名	帯広畜産大学 准教授 福 本 晋 也
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	獣医博甲第508号
学位授与年月日	平成30年9月21日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	帯広畜産大学
学位論文題目	Studies on the Development of the High Efficacy Methods for Generating Transgenic Parasites in Rodent Malaria Model (齧歯類マラリアモデルにおける効率的遺伝子組換え原虫作製法の開発に関する研究)
審査委員	主査 帯広畜産大学 教授 河 津 信一郎 副査 帯広畜産大学 准教授 福 本 晋 也 副査 岩 手 大 学 教 授 板 垣 匡 副査 東京農工大学 准教授 古 谷 哲 也 副査 岐 阜 大 学 准教授 高 島 康 弘

学位論文の内容の要旨

マラリアは蚊によって媒介される感染症であり、世界人口の約40%が感染のリスクに曝されている。年間の感染者が約2億人、死者が約50万人にのぼることから、公衆衛生上最も重要な感染症の一つとなっている。現行のマラリアの対策では、抗原虫薬による予防・治療と殺虫剤による蚊の駆除が主体となるが、薬剤耐性マラリア原虫、殺虫剤耐性蚊の出現などが問題となっている。したがって、マラリアに対する新たな感染制御法の提唱が望まれている。そこで、基礎研究に基づくマラリア原虫の生物学的知見の集積とそれを活用した応用研究の更なる進展が望まれる。

マラリアの基礎研究では、ヒトへの病原性がないこと、また蚊体内の発育ステージを含めた全生活環を実験室内で再現できることから、齧歯類マラリア原虫 *Plasmodium berghei* (*P. berghei*) による *in vivo* 実験感染モデルが広く利用されている。一方、逆遺伝学的手法は *P. berghei* 実験感染モデルを用いたマラリアの基礎研究においても汎用されている必須の実験手技である。しかしながら、遺伝子組換え *P. berghei* 原虫の作製手技には様々な制約があり、その改良が喫緊の課題となっている。例えば、遺伝子組換えマラリア原虫の作製では薬剤耐性遺伝子をマーカーとして導入して目的変異体を分離する手法が一般的であるが、*P. berghei* では薬剤選択を *in vivo* で行う必要がある。即ち、薬剤耐性マーカー遺伝子を導入した組換え体原虫をマウスに感染させ、このマウスに薬剤を投与することで目的変異体を分離することから、マウスに毒性を示す薬剤が使用できない。したがって、使用可能な薬剤耐性マーカー遺伝子が極めて限定的であり、他の生物種で一般的な複数マーカーによる多重変異体作製が現実的に困難である。また、他の問題点として、*in vivo*

での薬剤の投与で選択（濃縮）できる遺伝子組換え原虫の割合（濃縮効率）が 10-20%程度と、他の生物種での *in vitro* 薬剤選択のそれに比較して、著しく低いことが挙げられる。このため、目的変異体を単離する目的で、マウスを用いた限界希釈法によるクローニングが必要になる。この操作では、一定の費用と時間さらには多数の実験動物を消費することが必要で、実験の効率化と動物福祉の観点から、*P. berghei* 実験感染モデルを応用したマラリア研究の進展を著しく妨げている。そこで本研究では、これらの技術的問題点を解決することで、*P. berghei* 実験感染モデルにおいて、より自由度の高い遺伝子操作基盤を構築することを目的とした。

第一章では、*in vitro* での薬剤選択法の開発を試みた。*P. berghei* は *in vitro* での連続培養が困難なため、遺伝子組換え体原虫をマウスに接種して一旦 *in vivo* で増殖させた後 *in vitro* 培養系に移して、赤血球内での発育ステージが *in vivo* で一周する間に薬剤選択を行う手法を開発した。この手法を用いて、哺乳動物毒性を持つピューロマイシンによる薬剤選択を試みた。耐性遺伝子として *puromycin-N-acetyltransferase* (*pac*) を導入した遺伝子組換え体原虫を一旦マウス体内で増殖させた後に *in vitro* 培養系に移して薬剤で選択した。このサイクルを 2 回繰り返したところ、目的変異体の濃縮効率が 90%以上に達し、その後の限界希釈法による変異体の単離に要したマウスの数を、既存の手法に比べて著しく減らすことができた。また *pac* は *P. berghei* における古典的マーカーである *dihydrofolate reductase-thymidylate synthase* (*dhfr-ts*) と併用できることも確認できた。即ち、*dhfr-ts* を導入済みの遺伝子組換え体原虫に *pac* を再導入して、今回開発した手法で薬剤選択を行ったところ、これら 2 種類のマーカー遺伝子を同時にゲノム内に保持する、2 重変異体原虫を *P. berghei* で作製することに成功した。

第二章では、新規 *in vitro* 薬剤選択法の新たなマーカー系への応用を試みた。哺乳動物毒性を持つブラストサイジンとその耐性遺伝子である *blasticidin S deaminase* (*bsd*) を新規 *in vitro* 薬剤選択法に応用したところ、このマーカー系を用いて *P. berghei* 組換え体原虫を作製することに成功した。また、*bsd* は *pac* および *dhfr-ts* との併用が可能であることも確認できた。即ち、*pac* と *dhfr-ts* を導入済みの遺伝子組換え体原虫に *bsd* を再導入して、今回開発した手法で薬剤選択を行ったところ、これら 3 種類のマーカー遺伝子を同時にゲノム内に保持する、3 重変異体原虫を *P. berghei* で作製することに成功した。

第三章では新規 *in vitro* 薬剤選択法の改良を試みた。薬剤耐性マーカー遺伝子の発現によって原虫細胞は十分な薬剤耐性を賦与される必要があるが、その一方で、予期せぬ生物学的表現型の出現も懸念される。このため、マーカー遺伝子の発現レベルを上流のプロモーター配列を交換することで調節できれば理想的である。第一章および第二章では、下流の遺伝子を比較的高レベルで発現することができる *hsp70* プロモーターを使用した。そこでこの章では、*P. berghei* において下流の遺伝子を中等度レベルで発現することができる *elongation factor 1-alpha* (*ef-1 α*) プロモーターを用いて *pac* の発現を試みた。その結果、*pac* のコドン *P. berghei* に至適化することで *ef-1 α* プロモーターを使用した実験系においても目的変異体の単離が可能になった。一方、従来の *in vitro* 培養法では、赤血球内での最終発育型となる分裂体から次期ステージ娘虫体が自発的に遊出できないため、発育ステージが一周で停まってしまい、それ以降の連続培養ができなかった。そこで *in vitro* 培養一周後に、分裂体感染赤血球をフィルターで濾過することで分裂体を機械的に破裂させて、娘虫体を遊出させる手法を考案した。この手法を従来の *in vitro* 培養法と併用することで、赤血球内での発育ステージを二周まで維持できるようになり、その結果、*in vitro* 培養下での薬剤選択を 2 回連続して行うことが可能になった。この技術によって、目的変異体の単離までにかかる時間を更に短縮し、また使用する動物の数もより少なくなってきた。

以上の結果は *P. berghei* の遺伝子操作の自由度を大幅に高めるものであり、マラリア研究の進展に大きく寄与することが期待される。

審査結果の要旨

マラリアは蚊によって媒介される感染症であり、世界人口の約 40% が感染のリスクに曝されている。年間感染者は約 2 億人、死者は約 50 万人にもものぼり、公衆衛生上、最も重要な感染症の一つである。近年、薬剤耐性原虫、殺虫剤耐性蚊の出現等のため、新たな感染制御法の開発が望まれており、基礎研究に基づくマラリア原虫の生物学的知見の集積とそのフィードバックによるマラリア制圧に向けた応用研究の更なる進展が望まれる。

実験室レベルでは齧歯類マラリア原虫 *Plasmodium berghei* (*P. berghei*) が *in vivo* モデルとして汎用されている。*P. berghei* では遺伝子組換え原虫の分離に際し、薬剤選択を *in vivo* で行う必要がある。したがって、哺乳動物毒性を示す薬剤は使用できず遺伝子操作の自由度が低い。また、組換え原虫濃縮効率が低く、研究遂行上の問題となっている。

これらの背景を踏まえ、本研究ではマラリア研究の進展に資するため、上記の技術的問題点を本質的に解決することを検討した。

新規 *in vitro* 薬剤選択法の開発を試み、哺乳動物毒性を示すピューロマイシンとその耐性遺伝子である *puromycin N-acetyltransferase* (*pac*) をマーカーとして使用し、目的変異体を分離することに成功した。さらに濃縮効率も既法に比べ極めて高く 90% 以上となることを示した。この手法は WR99210 による薬剤選択実験系でも有効なこと、また *pac* は *P. berghei* の古典的選択マーカーと併用可能であることを示した。

in vitro 薬剤選択法を水平展開するため、ブラストサイジンとその耐性遺伝子 *blastocidin S deaminase* (*bsd*) を用い、*bsd* が *P. berghei* 組換え原虫作製用マーカーとして有用であることが示した。また、*bsd* は *pac* および *dhfr-ts* との併用が可能であることを示した。

マーカー発現に常用される *elongation factor 1-alpha* (*ef-1 α*) プロモーターをモデルとして用い、*pac* 遺伝子のコドン *P. berghei* に最適化することで、プロモーター変更が可能であることを示した。また、2 細胞周期連続培養法の開発により、1 回の薬剤選択手技により目的変異体の濃縮が可能となることを示した。

以上の結果は、*P. berghei* の遺伝子操作の自由度を大幅に高めるものであり、マラリア研究の進展に大きく寄与することが期待された。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

1) 題 目 : High efficacy *in vitro* selection procedure for generating transgenic parasites of *Plasmodium berghei* using an antibiotic toxic to rodent hosts

著 者 名 : Soga, A., Bando, H., Ko-ketsu, M., Masuda-Suganuma, H., Kawazu, S. and Fukumoto, S.

学術雑誌名 : Scientific Reports

巻・号・頁・発行年 : 7 : 4001, 2017

2) 題 目 : Development of a *bsd*-blastocidin selection system in *Plasmodium*

berghei

著者名 : Soga, A., Ko-ketsu, M. and Fukumoto, S.

学術雑誌名 : FEBS Letters

卷・号・頁・発行年 : 592 (11) : 1847-1855, 2018

既発表学術論文

1) 題 目 : Development of a *Plasmodium berghei* transgenic parasite expressing the full-length *Plasmodium vivax* circumsporozoite VK247 protein for testing vaccine efficacy in a murine model

著者名 : Mizutani, M., Fukumoto, S., Soubeiga, A. P., Soga, A., Iyori, M. and Yoshida, S.

学術雑誌名 : Malaria Journal

卷・号・頁・発行年 : 15 : 251, 2016