

マラリア原虫の全長cDNAデータベース

●渡辺純一

東京大学医科学研究所基礎医科学研究部門

〈研究の目的と進め方〉

微生物ゲノムの研究の重要性が、クローズアップされてきた。生物の本質である多様性と統合性の理解に、多種の生物の比較研究が不可欠であることが認識されたためである。

マラリア原虫は、寄生虫疾患のなかで最も重大なもので、健康被害も大きい。ヒトには4種類のマラリア原虫が感染するが、熱帯熱マラリアは、しばしば致死的で、年間100万人以上の死亡者がでている。マラリアは、熱帯地域を中心に猛威を振るう、結核、エイズとともに緊急に対策が必要な3大疾患のひとつである。一方、サルや、ネズミ、トリ、トカゲに感染するマラリア原虫も知られている。ネズミマラリア原虫は、取り扱いが簡単なため免疫系の実験によく用いられている。これらの原虫は、高い宿主選択性を示し、ネズミマラリア原虫がヒトに感染することはない。

マラリアの生活環は複雑である。ハマダラカの吸血によって、マラリア原虫は、ヒトに感染する。まず、肝細胞に侵入し、そこで増殖する。つぎに、赤血球に感染し、メロゾイト、トロフォゾイト、シズントと成熟する。この間、熱帯熱マラリアでは48時間である。成熟したシズントは、やがて、赤血球膜を破って外部に脱出し、新たな赤血球に感染し、増殖を繰り返す。シズントは20～30個のメロゾイトを含むため、増殖速度はきわめて速い。また、原虫が赤血球の内部に存在するため、宿主の免疫系が働きにくい点でたちの悪い寄生虫である。増殖サイクルの途中で、ときおり、生殖母体と呼ぶ有性生殖世代が出現する。メスとオスの2種類があり、蚊の吸血によって中腸に到達するとそこで、受精する。その直後に減数分裂を行い、蚊の体内で成熟し、やがて、スポロゾイトとなって、唾液腺に移動し、次の吸血を待機する。

そこで、医学的重要性のため、WHOが主導して国際コンソーシウムが立ち上げられ、ゲノム解読がスタートした。対象株としては、オランダで分離された株から、生殖母体を高率に発生する3D7株が選択された。英国のSanger Centre、米国のTIGR、Stanford大学が分担して、14本の染色体（当初30Mbと推定された）のゲノム解読がスタートした。染色体をパルスフィールド電気泳動で分離し、染色体ごとにライブラリを作成してゲノムを解読する方法が用いられた。80%がATでできているという非常にAT richなゲノムのため、繰り返し配列も多く、シーケンスは難航したが、本特定領域の期間に、同時進行型で解読が進み、2002年10月ゲノム配列が解読された。サイズは、当初の予想より小さく23Mbであった。

原核生物から、真核生物、多細胞生物、そして、ヒトにいたる生物進化の階層性を解明するために、原虫は、酵母とともに重要な実験モデルである。

マラリア原虫は、蚊と脊椎動物の2宿主に寄生するが、それぞれ有性生殖と無性生殖によって増殖する。原虫の複雑な生活史は、遺伝子発現制御の研究に格好のモデル

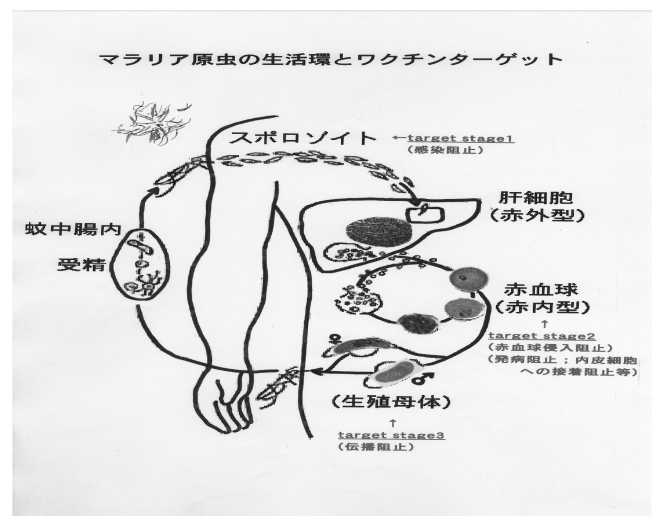
である。我々は、欧米におけるゲノム解読を相補する研究として、菅野純夫博士の全長cDNAライブラリーに注目し、その協力を得て赤血球内で増殖する培養原虫を材料として 全長cDNAライブラリーの作成に成功した。これまでに3000クローンのワンパスシーケンスを行いゲノム塩基配列と比較したところ約1000種の遺伝子の発現を確認した。

1) 本研究では、熱帯熱マラリア原虫、および、ネズミマラリア原虫の赤血球感染型原虫を材料として、全長cDNAライブラリを作成し、それらを用いて、発現遺伝子の解析を行う。

2) 多数のクローンについて5' 端のワンパスシーケンスを行い、ゲノム上にその位置をマップする。

3) 熱帯熱マラリア原虫とネズミマラリア原虫について、ゲノムの比較を行い、それぞれの発現遺伝子の比較を行う。

4) 発現遺伝子の転写開始点の上流には、発現制御に関わる塩基配列が存在すると予想されるので、それを解明する。



〈研究開始時の研究計画〉

研究開始時には、つぎの3項目を目標として掲げた。

1) 熱帯熱マラリア原虫から、新たに全長cDNAライブラリを作成し、より多くの5' 端シーケンスを決定する。まず、既存のライブラリXPFnについて、より多数のクローンのシーケンスを解読した。その結果をXPF2nと名付け、データベースに登録した。また、初回のライブラリの出発材料はキャンドルジャーで培養した赤血球感染型原虫であったので、今回は、混合ガス（酸素1%、炭酸ガス3%、窒素96%）で気層を置換する方法で培養を行い、ふたつのライブラリを作成した。これらのライブラリをXPFm、XPFtと名付けた。それらの5'端のワンパスシーケンスを行った（1、4、5、6、7、9）。

2) ネズミマラリア原虫の生殖母体産生の産生能の高い株と低い株について全長cDNAライブラリを作成し、両者の比較から生殖母体の産生機構を解明を目指す。これは、非常に興味深いテーマであったが、当時進行していたネズミマラリア原虫ゲノムの解読が、*Plasmodium yoelii*について行われたいたため、同一株を使用することに計画変更した。すでに入手済みであった、*P. yoelii*の弱毒株原虫と強毒株原虫をマウスに接種感染させ、心臓採血で回収した原虫を材料にして全長cDNAライブラリを作成した。これらの二つのライブラリについて5' 端のワンパスシークエンスを行った(7)。

3) ネズミマラリア原虫の全長cDNAライブラリを用いてDNAワクチンとして新規マラリアワクチンの探索を行う。ネズミマラリアP. berghei ANKA株から、発現ベクターを利用して作成した全長cDNAライブラリを種々の方法でBALB/cマウスに免疫し、その後、チャレンジ感染を行って原虫感染率と生存期間を観察する方法で、有効なワクチン候補分子を探索する(2、3、4)。

4) 熱帯熱マラリア原虫のTATA-binding proteinに対する抗体を作成し、Chromatin Immunoprecipitationによって、発現遺伝子を同定し、発現転写位置を解明する。

〈研究期間の成果〉

1) 熱帯熱マラリア原虫の新たなライブラリの作成によって、新たなクローンが得られた。また、後のライブラリの方が、一般的に、全長率が高かった。これは、ライブラリ作成の技術が進歩したことにもよるが、それ以上に原虫の状態がよくなったためと考えられた。キャンドルジャーよりも混合ガスの方が酸素濃度が低いことが原因と思われる。XPFmとXPFtのシークエンスもデータベースに登録した。

2) ネズミマラリアP. yoelii 17XL Lethal株とP. yoelii 17XNL non lethal株についても全長cDNAライブラリを作成した。原虫は、ICRマウスの腹腔内に接種し、原虫感染率が20%程度に上昇したところで、マウスに麻酔をかけ、心臓採血、Plasmodipur filterで白血球を除去したものを材料とした。多数の5' 端ワンパスシークエンスを決定した。

3) TATA-binding proteinに対するペプチド抗体の作成はうまくいったが、種々の試行錯誤を行ったにも関わらずChiP (Chromatin Immunoprecipitation)の実験が成功しないため、休止状態である。

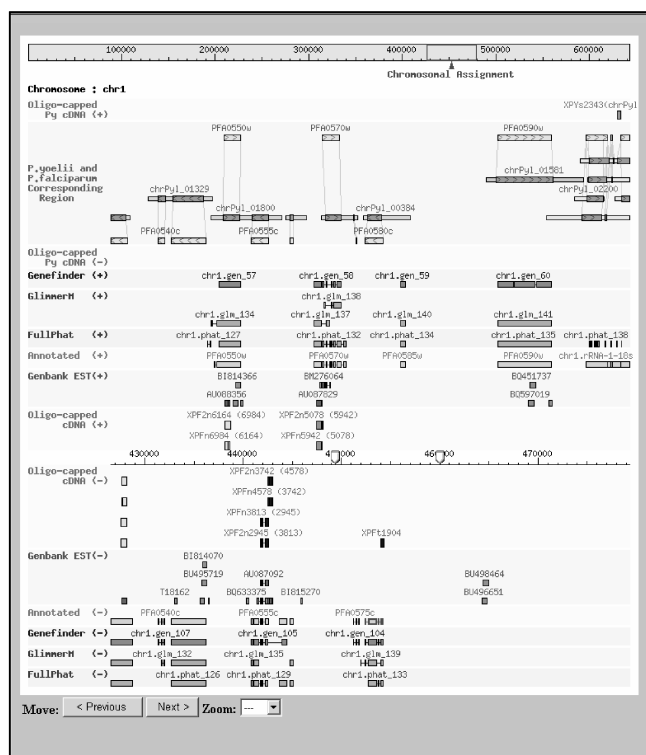
4) 全長cDNAを2000クローンまとめて、脾臓内に免疫後、筋肉内に投与した場合には、チャレンジ感染後の死亡は、むしろ、短縮した。しかし、バイオラッドのGene Gunを用いて皮内に免疫すると生存は有意に延長した。2000クローンの5' 端ワンパスシークエンスを決定したところ、一部に空ベクター、マウスのグロビン遺伝子が含まれていたが、多くは原虫由来のクローンであった。

5) 1)と2)で得られた大量のシークエンスデータについて、Full-malariaというデータベースを作成し、インターネットで公開した(<http://fullmal.ims.u-tokyo.ac.jp>)。これは、当初、シークエンスデータをBLAST検索する機能のみであったが、ゲノムシークエンスが公開された後は、ゲノム上に我々のシークエンスデータをマップしたものを表示するものに進化した。さらに、ネズミマラリア原虫P. yoeliiのドラフトゲノムの公開を受け、ネズミマラリア原虫のcontig塩基配列をヒトの熱帯熱マラリア原虫ゲノム上にアラインして表示し、さらに、そのcontig上に我々のデータをマップするように変更した。

6) 4)によって、まず、解読されたゲノム塩基配列から予測された遺伝子構造が、予測ソフトによって異なること、我々のクローンのシークエンスデータとsplice構造一致しないものがあること、予測ソフトが見逃している遺伝子が存在することが判明した。

7) また、従来、マラリア原虫遺伝子の転写的開始点は1塩基からスタートするとされてきたが、すべての例で、幅広い一定の領域からスタートしていることが確認された。

8) ネズミマラリア原虫のライブラリの全長率はきわめて高く、その理由として、in vivoの原虫はin vitroの原虫よりよい状態であることが考えられた。



〈国内外での成果の位置づけ〉

Full-malariaデータベースは、マラリア原虫のcDNAに関する唯一のデータベースとして全世界で利用されている。年間のヒット数は20万を越えている。クローン提供の依頼にも答えている。マラリアのDNAワクチンについては、開発途上であり、今後の発展に期待が寄せられているものの評価は今後の課題である。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

達成できなかったことは、赤血球感染型以外のステージからの全長cDNAライブラリの作成である。蚊の体内のステージと肝細胞内のステージは、材料となる原虫の調整が困難なため、現時点では、不可能に近い。また、TATA-binding proteinに対する抗体を用いたChiP法は、ChIPの過程が不安定で信頼できるデータが得られないために実施不能であった。

〈今後の課題〉

Full-malariaは、対象をアピコンプレクサ門の他の生物、トキソプラズマ、クリプトスポリジウム、アイメリア、タイレリアに広げて発展中である。アピコンプレクサ門

はすべて寄生性の生物でapical complexという特殊な細胞内小器官を有し、宿主細胞への侵入に役立てている。宿主と生活環は生物によってさまざまである。また、最近、アピコンプレクサ門が、繊毛虫(Ciliata)や渦鞭毛虫(Dinoflagelata)と近縁で、3門合わせてスーパーキングダムを形成することが判明した。これらの生物の比較は、進化の観点からきわめて興味深い。

一方、患者体内から調整した原虫から全長cDNAライブラリを作成することは技術的に可能である。同じ、培養原虫であっても、キャンドルジャーによる培養と混合ガスによる培養では状態が異なり、発現遺伝子も異なっていた。そこで、今後は、患者由来サンプルから全長cDNAライブラリを作成し、解析を行いたい。同時に、調整した末梢白血球における発現遺伝子の解析から、宿主の反応の詳細が解明されるものと期待される。制御領域の解析のために近縁のトキソプラズマ原虫の全長cDNAライブラリを作成し解析中である。両者の比較によって共通配列が得られる可能性があるかと期待している。

また、これまでは、資金的な制約から、各ライブラリあたり1万クローンづつしか解析ができなかった。最近、開発されたシークエンサーを利用すると20万シークエンスが一度に可能になる。また、PCR法を利用せずにライブラリを作成することが可能であるため、発現量の測定も可能となる。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. Junichi Watanabe, Masahide Sasaki, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano. FULL-Malaria: a database for a full-length enriched cDNA library from human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Nucleic Acids Res.* 29(1), 70-71, 2001

2. Junichi Watanabe, Akiko Shibui, Yoshihiro Oomori, Yutaka Suzuki, Masahide Sasaki, Sadao Nogami, Sumio Sugano. Novel DNA vaccine using full-length cDNA library. *Jpn. J. Trop. Med. Hyg.* 29(1), 23-4, 2001

3. Akiko Shibui, Yoshihiro Ohmori, Yutaka Suzuki, Masahide Sasaki, Sadao Nogami, Sumio Sugano, Junichi Watanabe. Effects of DNA vaccine in murine malaria using a full-length cDNA library. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 109(3,4),147-157, 2001

4. Junichi Watanabe, Masahide Sasaki, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano. FULL-Malaria in *The Molecular Biology Database Collection: 2002 update* Andreas D. Baxevanis. *Nucleic Acids Res.* 30, 1-12, 2002

5. Junichi Watanabe, Masahide Sasaki, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano. Analysis of transcriptomes of human malaria parasite *Plasmodium falciparum* using full-length enriched library: identification of novel genes and diverse transcription start sites of mRNAs. *Gene* 291, 105-113, 2002

6. Junichi Watanabe, Masahide Sasaki, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano. FULL-Malaria in *The Molecular Biology Database Collection:2003 update*. *Nucleic Acids Res.* 31:1-12, 2003

7. Junichi Watanabe, Yutaka Suzuki, Masahide Sasaki,

Sumio Sugano. FULL-Malaria 2004: an enlarged database for comparative studies of full-length cDNAs of malaria parasites, *Plasmodium* species. *Nucleic Acids Res.* 32, D334-338, 2004

8. Shumpei Ishikawa, Naonori Uozumi, Takashi Shiibashi, Takashi Izumi, Masashi Fukayama, Takao Shimizu, Junichi Watanabe, Sadao Nogami. Lethal malaria in cytosolic phospholipase A2- and phospholipase A2IIA-deficient mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70 (6) 645-650, 2004

9. Watanabe, J, Xuan, X, Suzuki, Y, Sasaki, M, Wakaguri H, Sugimoto C, Sugano, S
Full-length cDNAs from *Plasmodium* and *Toxoplasma* *Nucleic Acids Research* (<http://www3.oup.co.uk/nar/database/summary/72>) 2005.

10. Akiko Shibui, Takashi Shiibashi, Sadao Nogami, Sumio Sugano, Junichi Watanabe
A novel method for development of malaria vaccines using full-length cDNA libraries
Vaccine. 23, 4359-4366, 2005

Database:

Full-malaria (<http://fullmal.ims.u-tokyo.ac.jp>)