

全長 cDNA ライブラリを用いたアピコンプレクサ原虫の比較ゲノム研究

●渡辺 純一

東京大学医科学研究所

<研究の目的と進め方>

比較ゲノム研究では対象の選択がなによりも重要である。マラリア原虫に代表されるアピコンプレクサ門原虫はすべて寄生性の原虫で、医学・獣医学的重要性のために早くからゲノム研究が進んでいる。最近、細胞の微細構造の研究と分子性生物学的解析から、この門が、繊毛虫、渦鞭毛藻とともに Super Kingdom alveolata を構成することが明らかにされた。本門の原虫は、太古の昔、自由生活を営んでいた原虫のなかで寄生に成功した祖先から分化して、しだいに宿主域を広げていったものと考えられる。本門には、マラリア、トキソプラズマ、クリプトスポリジウム、タイレリア、アイメリアの原虫が存在し、ゲノム解読が進んでいる。

我々は、これまでに oligo-capping 法によって熱帯熱マラリア原虫、ネズミマラリア原虫、三日熱マラリア原虫、トキソプラズマ原虫、タイレリア原虫の全長 cDNA ライブラリを作成し、多数の 5' 端ワンパスシークエンスを決定し、ゲノムと比較、データベース化して公開してきた。

本研究では、これらのリソースを利用して発現遺伝子の全長塩基配列を解読し、正確な遺伝子構造を解明するとともに、ゲノムシークエンスとの比較から発現制御領域を同定し、それらの比較解析を行うことを目的とする。共通祖先から分化した原虫は、寄生適応の結果ゲノム構造の著しい多様性を示すようになった。ゲノムサイズは、タイレリアの 8Mb からトキソプラズマの 65 Mb、GC 比は、熱帯熱マラリア原虫の 19% からトキソプラズマの 52% と大きく異なる。このような多様性を背景として保存されている遺伝子構造の網羅的解析から、寄生進化の本質が明らかになると期待される。

また、寄生原虫は、熱帯・亜熱帯地方を中心に人間に病気を引き起こし甚大な健康被害を生じるだけでなく、家畜に影響して甚大な経済的被害をもたらしている。その研究・対策は我が国の科学研究に与えられた喫緊の課題であってゲノム科学の人類への貢献としてこれにすぎるものはない。

<2007 年度の研究の当初計画>

種々のアピコンプレクサ原虫のさまざまなステージから新たな全長 cDNA ライブラリを作成するとともに、これまでに作成したライブラリについても多数のクローンの 5' と 3' 端のワンパス塩基配列を決定する。クラスタリングによって、代表クローンを選択、全長塩基配列を決定する。これから正確な遺伝子構造を決定し、ホモログを同定する。発現遺伝子のシークエンスをゲノムと比較し、promoter 領域を同定、塩基配列を切り出す。遺伝子発現制御領域の塩基配列解析から比較ゲノム解析を行う。

<2007 年度の成果>

全長 cDNA ライブラリの作成とシークエンス

ニワトリの消化管の寄生原虫として養鶏上重要性の高い *Eimeria tenella* について、merozoite から、oligo-cap 法で全長 cDNA ライブラリを作成した（英国動物衛生研究所との共同研究）。

トキソプラズマ原虫に近縁で、ウシの習慣性流産の原因として獣医学的に重要な *Neospora caninum* について、tachyzoite から全長 cDNA ライブラリを作成し、1 万クローンの両端ワンパスシークエンスを決定した（帯広畜産大学原虫病研究センター、ゲノム特定支援班との共同研究、）。

アピコンプレクサ原虫の比較ゲノム解析において寄生原虫の外部対象として有用で、熱帯地方で多数の患者を擁し医学的に重要性の高い赤痢アメーバ *Entamoeba histolytica* と、赤痢アメーバのシスト形成の研究に用いられるヘビアアメーバ *E. invadens* について、trophozoite（栄養体）から全長 cDNA ライブラリを作成し、1 万クローンの両端ワンパスシークエンスを決定した（慈恵医大、理化学研究所との共同研究）。

同様にぜん虫として比較ゲノム解析に有用で我が国に患者を抱える *Echinococcus multilocularis* について、幼虫から作成した全長 cDNA ライブラリの 1 万クローンの両端ワンパスシークエンスを決定した（北海道大学獣医学部、理化学研究所との共同研究）。

同様に有鉤条虫 *Taenia solium* の larva から全長 cDNA ライブラリを作成、1 万クローンの 5' 端ワンパスシークエンスを決定した（メキシコ大学との共同研究）。

さらに、寄生虫学が研究対象としてきた媒介性節足動物のなかで WHO が研究対象としておりトリパノソーマ原虫の媒介ハエとして重要なツエツエハエ *Glossina morsitans* の幼虫、および、さなぎから全長 cDNA ライブラリを作成、それぞれ 1 万クローンの両端ワンパスシークエンスを決定した（Yale 大学医学部、北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター、理化学研究所との共同研究）。

バイオインフォマティクスチームの形成

世界各国の寄生虫研究者との共同研究ネットワーク、サンプルの輸送などのロジスティックス、全長 cDNA ライブラリ作成、クローン両端の大量シークエンス、ソレクサを用いた全長シークエンスなど、全長 cDNA ライブラリを用いた寄生虫の比較ゲノム解析のための基盤は一応確立することができたと考えられる。今後研究の重点は得られたシークエンスデータの解析に移ると思われる。そこで、バイオインフォマティクスの解析チームの形成に努めた。

<国内外での成果の位置づけ>

アピコンプレクサ原虫を対象とした全長 cDNA クローンの解

析は、世界的に我々のグループの独擅場となっており、最近では、各国の研究者と共同研究を行う機会が増えている。ゲノム塩基配列の解読が進み、また、全長クローンの全長シーケンスが効率よく解読可能になったことから、本格的に比較ゲノム解析を行う基盤が整ってきた。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

比較ゲノム解析は難航している。既存のソフトウェアでは対応できない課題が多く、独自のプログラム開発が求められているが、個人的努力では限界があり、体系的取り組みを戦略的に展開することが求められている。

また、寄生虫や媒介節足動物の比較ゲノム解析は、国際感染症対策にますます重要性を増している。疾病の常在地であるアジア、アフリカ、中南米との共同研究の推進には、新たな枠組みが必要である。

<今後の課題>

全長 cDNA クローンの全長シーケンスは、今後、ますます、需要が高まるものと予想される。

1997年、佐々木全英・鈴木穰によって熱帯熱マラリア原虫から全長 cDNA ライブラリが世界で初めて作成された。ここからスタートした我々の研究は、10年間の歳月を経て、次第に国際的認知を得るようになった。この間に作成した多数のライブラリ、クローン、シーケンス、さらに、国際ネットワークによって作成中のライブラリは、新型シーケンサーの登場によって面目を一新し、正確な遺伝子構造の決定、転写開始点の同定、プロモーター領域の同定など、比較ゲノム解析に有用なリソースとして国際的に高い評価を受けている。しかしながら、データ解析にはバイオインフォマティクスの発展と協力が鍵となる。我が国独自の技術でもたらされたデータを解析には、独自技術に基づいたソフトウェアの開発が求められている。

<成果公表リスト>

- 1) Josef Tuda, Mihoko Imada, Junichi Watanabe and Boetje Moningka. Expert Commentary: Novel Scheme for International Academic Collaboration in Malaria Research Trends. Ed. Devin A. Flanigan. Nova Publishers. 2007. ISBN: 1-60021-589-0
- 2) データベース
0612221733 Comparasite/Full-malaria
<http://fullmal.ims.u-tokyo.ac.jp>