

# 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。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が分化・進化を遂げ、しだいに宿主域を広げていったものと考えられる。Cavalier-Smithの6界説によれば本門は bikonta の中でも植物に近縁の chroalveolata に属する単系統生物である。我々はこれまで種々の寄生原虫から全長 cDNA ライブラリを作製し多数のクローンの5' 端ワンパスシークエンスを解読してきた。これらを利用して比較ゲノム解析を行う。

一方、媒介節足動物のゲノム解読も疾病対策の目的で急速に進行中である。我々はこれまでにアフリカ眠り病を媒介するツエツエハエから全長 cDNA ライブラリを作製し、解析を進めて来た。その成果を比較ゲノム解析に活用するため、マラリア原虫を媒介するハマダラカについても同様の解析を行ない、より高度な体制を有する節足動物についても解析する基盤整備を行う。

## <2008年度の研究の当初計画>

国内外の共同研究者の協力を得て、アピコンプレクサ原虫のさまざまなステージからサンプルを調整し、oligo-cap法で全長 cDNA ライブラリを作成（過半は作成済み）し、各1万個のランダムクローンの5' 端、3' 端のワンパスシークエンスを ABI3730 シークエンサーで、また、代表クローンの全長シークエンスを Solexa シークエンサーで決定する。それぞれのゲノムシークエンスを公開データベース、あるいは、共同研究者から入手し、cDNA シークエンズと比較し、比較表示するゲノムブラウザーを作成する。正確な遺伝子構造に基づいて相同遺伝子を同定、転写開始点の上流に位置するプロモータ配列を同定する。遺伝子構造、および、プロモータ配列について、同属異種、異属、さらに、自由生活原虫との比較を行う。種特異性、属特異性、アピコンプレクサ特異性の解析から、本原虫のゲノム進化と分化の過程を解析する。

ステージ特異的遺伝子の発現制御機構を系統進化の観点から解析する。また、同属異種のゲノム解析から宿主特異性の解明を目指す。自由生活原虫との比較から、寄生現象の本質を探る。

## <2008年度の成果>

1) 4種のマラリア原虫（熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum*、三日熱マラリア原虫 *P. vivax*、ネズミマラリア原虫 *P. yoelii*、*P. berghei*）、トキソプラズマ原虫 (*Toxoplasma gondii*)、クリプトスポリジウム原虫 (*Cryptosporidium parvum*) の全長 cDNA ライブラリのクローン合計14,818個（10,501領域）についてソ

レクサシークエンサーを用いてショットガンシークエンズを行ない、ゲノム参照によるアセンブルの結果、3,959クローン（3,320領域）で全長を決定、6,651クローン（5,222領域）で100アミノ酸以上のORFを同定した。

- 2) 帯広畜産大学との共同研究によりハマダラカ (*Anopheles stephensi*) の幼虫と成虫を調整し、それぞれから、oligo-cap法で全長 cDNA ライブラリを作製した。幼虫ライブラリについて ABI3730 シークエンサーで両端の塩基配列を決定した。
- 3) ツエツエハエ (*Glossina morsitans morsitans*) の幼虫と蛹から oligo-cap法で作製した全長 cDNA ライブラリについてソレクサシークエンサーを用いてショットガンシークエンズを行った。ゲノム解読が進行中のため ab initio のアセンブルを行った。
- 4) 東京大学の鈴木稜らから新たに開発した oligo-cap法とソレクサシークエンサーを併用して発現遺伝子の5'端を超大量解読する方法を利用してトキソプラズマ原虫の発現解析を行った。従来のマイクロアレー法よりもはるかに正確に発現量を測定可能と考えられ、今後、幅広い応用が期待される。
- 5) 以上の成果をデータベース化し、Full-Malaria/Parasitesと Full-Arthropodsとして公開した（論文1、データベース1）。
- 6) イタリア衛生研究所との共同研究で、熱帯熱マラリア原虫の転写開始点をゲノムの物理化学的性質から予測するプログラム MAPP (Malaria promoter predictor: ) を開発し、公開した (<http://www.mappredictor.info/cgi-bin/index.cgi>)（論文3）。
- 7) 帯広畜産大学との共同研究で、トキソプラズマ原虫の全長 cDNA クローンを利用して原虫による宿主細胞（非寄生細胞）のアポトーシスに関与すると考えられる遺伝子の局在と機能解析を行った。

## <国内外での成果の位置づけ>

寄生虫、および、衛生害虫について全長 cDNA ライブラリを用いた発現遺伝子解析を系統的に行っているのは我々のグループだけであり、ゲノム解析を補完するものとして期待されている。

## <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

ソレクサシークエンサーによる解読が急速に進み始めたが、ゲノムが参照できない場合、成績は不良である。また、ゲノム参照可能な場合もよりよいアセンブル用パイプラインが求められている。シークエンズ長の短さが主たる原因であると考えられるので、技術の発展に伴い改善するものと期待される。

ライブラリ作製についても、人的資源が制約となって進行が遅れがちである。

比較ゲノム解析の進行は遅々としている。課題の本来的な困難性に加えて、我が国のバイオインフォマティクス研究者の層が

薄く、共同研究体制が組みにくいことが一因と思われる。

#### <今後の課題>

RNA sequencing との競争、または、協調が重要課題になると思われており、国内外との情報交換が重要である。

ソレクサシークエンサーの有効利用と、得られた膨大なデータの解析、特にデータマイニングの重要性が高まるものと思われる。バイオインフォマティクス研究者との協力体制を構築し、密接に意見交換しながら解析することが必要である。

一方、医学的貢献という観点からは、実験室で維持されている標準株の解析だけでなく、臨床分離株の解析と疫学的観点からの比較ゲノム解析が重要になって来る。病原性の強弱や、薬剤耐性の機序解明にはこのような方向への展開が不可欠である。

このような研究は国際的共同チームによって行う必要があるが、途上国との間でゲノム研究を実施するには多大な困難が存在する。長期的展望に基づいた地道な努力の継続と人材育成がかかせない。

#### <成果公表リスト>

##### 1) 論文

##### 1. 0901141826

Hiroyuki Wakaguri, Yutaka Suzuki, Toshiaki Katayama, Shuichi Kawashima, Eri Kibukawa, Kazushi Hiranuka, Masahide Sasaki, Sumio Sugano, Junichi Watanabe. Full-Malaria/Parasites and Full-Arthropods: Databases of Full-length cDNAs of Parasites and Arthropods, update 2009. *Nucleic Acids Res* D520-D525 (37) 2009 doi: 10.1093/nar/gkn856

##### 2. 0901152336

Bannai H, Nishikawa Y, Matsuo T, Kawase O, Watanabe J, Sugimoto C, Xuan X. Programmed Cell Death 5 from *Toxoplasma gondii*: A secreted molecule that exerts a proapoptotic effect on host cells. *Mol. Biochem. Parasitol.* 159, 112-120, 2008 doi:10.1016/j.molbiopara.2008.02.012

##### 3. 0901152351

Brick K, Watanabe J, Pizzi E. Core promoters are predicted by their distinct physicochemical properties in the genome of *Plasmodium falciparum*. *Genome Biology* 2008, 9: R178

##### 2) データベース

##### 1. 0901141703

Full-Malaria/Parasites and Full-Arthropods  
<http://fullmal.hgc.jp>