

大規模ゲノム解析による熱帯感染症制圧

実施予定期間：平成 20 年度～平成 22 年度

代表機関：北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター国際協力・教育部門

代表者：杉本 千尋

国内参画機関：東京大学医科学研究所基礎医科学部門

代表者：渡辺 純一

国内参画機関：帯広畜産大学原虫病研究センター遺伝生化学分野

代表者：玄 学南

国外参画機関：タイ・チェンマイ大学医学部

代表者：Wej Choochote

国外参画機関：マレーシア・マレーシアゲノム研究所

代表者：Kiew-Lian Wan

国外参画機関：インドネシア・サムラランギ大学医学部

代表者：Josef Tuda

国外参画機関：ザンビア・ザンビア大学獣医学部

代表者：Boniface Namangala

国外参画機関：南アフリカ共和国プレトリア大学獣医学部

代表者：Frans Jongejan

国外参画機関：ガンビア・国際トリパノソーマ抵抗性研究所

代表者：Bonto Faburay

I. 概要

熱帯に分布する病原体と媒介節足動物を研究対象として、高速 DNA 解析で得られる大量のゲノム、発現遺伝子情報を利用して遺伝子多型解析法を開発し、薬剤耐性解析や分子疫学研究に利用する。これらの情報に基づきアジア・アフリカ地域における節足動物媒介性感染症対策を立案する。

1. 研究の目的

マラリア原虫や、タイレリア原虫などの寄生虫、および、ハマダラカや、マダニなどの媒介節足動物は、国際感染症の原因として世界的に重要であるだけでなく、近年の地球温暖化によるマラリアやデング熱の温帯地方への拡大懸念により、我が国にとっても喫緊の課題となっている。本課題では、超高速 DNA シークエンス技術により得られる大量のゲノムとトランスクリプトームの情報基盤を強化し、マラリアやタイレリア症など熱帯諸国に分布する節足動物媒介性感染症の制圧を目的に実施する。これを達成する

ため、日本を中心とした節足動物媒介性病原体ならびに媒介動物の生物学、ゲノム研究に実績を有するアジア、アフリカの研究機関が共同研究体制を組み上げる。

マラリア原虫やタイレリア原虫など熱帯・亜熱帯地域で猛威を振る節足動物媒介性原虫について分離株を多数収集し、それぞれのゲノム解読と参照株との比較（リシーケンス）を行う。SNP（single nucleotide polymorphism）を含む遺伝子多型情報をゲノムワイドに収集し、その情報を利用して野外株、臨床分離株等の遺伝子多型を解析する。また、発現遺伝子の網羅的解析を実施し株間での発現遺伝子プロファイルを比較する。以上のゲノム・トランスクリプトーム情報をマラリア原虫では薬剤耐性や感染伝播様式の解析など、タイレリア原虫等では野生動物・牛間での伝播と遺伝子交雑、ワクチン株の選定などに利用し、疾病の正確なモニタリングに基づいた感染対策を策定する。

2. 研究内容

a. ダニ媒介性病原体ゲノム解析に関する研究

(1) タイレリア (*Theileria parva*)、エーリキア (*Ehrlichia ruminantium*) 株の収集

アフリカの共同研究機関と連携し、実験室株、野外株の収集を行う。

(2) ゲノム DNA 精製とゲノムリシーケンス

上記で得られた標品からゲノム DNA を精製、そのシーケンス解析を行う。すなわち、代表的な株についてシーケンス解析を実施、解析条件の最適化を図るとともに基準株ゲノム上に断片配列情報をマッピングし、シーケンス精度、カバー率などについて検討する

(3) ゲノム比較解析と遺伝子多型検出

多くの株についてゲノム解析を実施し、ゲノム構造の比較、遺伝子多型の検出を行う。検出された SNP 等遺伝子多型情報については株の遺伝子型別に有効かどうかを検証し、野外株の分析を行う。

b. マラリア原虫 SNP 解析に関する研究

(1) マラリア原虫株の収集

アジアの共同研究機関の協力の下に *Plasmodium falciparum* 株の野外株、臨床株、実験室継代株を収集しゲノム DNA の素材とする。必要な場合には細胞から原虫を精製し、これをゲノム DNA 精製用素材とする。

(2) 収集株のゲノム DNA 精製とゲノムリシーケンス

上記で得られた標品からゲノム DNA を精製、そのシーケンスの予備的解析を a-(2) と同様に行う。また発

現遺伝子の網羅的解析を実施し、株間での遺伝子発現を比較する。

(3) 国際共同研究によるシーケンス解析

マレーシアゲノム研究所との共同研究によりアジア地域で重要なアピコンプレクサ病原性原虫種のゲノム、完全長 cDNA 解析を行う。

(4) 完全長 cDNA クローンの全長解析

三日熱マラリア原虫の完全長 cDNA クローンの全長解析を実施する。また、節足動物のライブラリーの整備と解析も帯広畜産大学と共同で実施する。

c. 媒介節足動物のトランスクリプトーム解析

(1) 媒介節足動物（ハマダラカ、ツェツェバエ）の飼育・収集

アジア・アフリカにおける主要原虫媒介節足動物（蚊、マダニ、ツェツェバエ）に関する情報収集、現地調査を各国の共同研究者の協力の下で行う。ハマダラカ、ツェツェバエについては実験室コロニーを維持しつつ、研究に必要な試料供給を行う。

(2) 完全長 cDNA ライブラリー整備とクローンの全長解析

東京大学と共同で、節足動物の各種素材からオリゴキャップ法により完全長 cDNA を合成し、ライブラリーを構築、得られたクローンの 5' 端シーケンスを実施する。

(3) 完全長 cDNA データベース構築とクローンバンクの整備

完全長 cDNA データベースを整備し公開する。また、節足動物、原虫の完全長 cDNA クローンの保管・管理システムを整備し、バンクとして提供できる体制を構築する。

3. 国外参画機関の参画

インドネシアのサムラトランギ大学、タイのチェンマイ大学は、マラリアあるいは衛生害虫の研究では同国のトップレベルを行っていることから共同研究に参加する。マレーシアのゲノム研究所は、マレーシア大学との連携のもとにゲノム研究の目的で国を挙げて設立したもので、アメリリア原虫などのゲノム解読を国家プロジェクトとして推進しており、アピコンプレクサ原虫のゲノム、cDNA 解析を共同で行う。ザンビア大学は、北海道大学人獣共通感染症リサーチセンターの海外拠点が設置され、各種人獣共通感染症についての共同研究を進めている。南ア・プレトリア大学熱帯獣医学部はアフリカに分布する病原性原虫、リケッチアの株を系統的に収集して研究を進めている。ガンビア・国際トリパノソーマ抵抗性研究所は、トリパノソーマ抵抗性品種の解析を主目的に設立された機関であるが、西アフリカで問題となっている家畜の感染症についても研究対象としており、ICTTD の一員として杉本とも連携を

取り合っている。これらアフリカの 3 研究機関とはタイレリア、エーリキア、ツェツェバエに関する共同研究を行う。

4. 政策的ニーズ

アフリカにおける感染症制圧は平成 19 年 4 月の総合科学技術会議「科学技術外交の強化に向けて」でも議論されたように最重要課題として位置づけられている。アフリカでは HIV 感染症、結核と並んでマラリアは重要疾病の一つに数え上げられているのに加えて、熱帯、亜熱帯アジア諸国でも重要な感染症である。特に薬剤耐性株の感染拡大により、患者数は増加しているのに加えて、地球温暖化に伴い、蚊など媒介節足動物生息域拡大が現実のこととなり、我が国にとっても節足動物媒介性疾患の研究は喫緊の課題となっている。また、タイレリア感染症、リケッチアなどダニ媒介性病原体による急性感染症が牛、小型反芻動物など家畜に与えている被害は世界的にも甚大であり、特にアジア、アフリカ諸国での畜産資源活用と安定供給にとって、これらの感染症対策は最重要課題の一つである。

近年、急速に発展したゲノム研究の成果を疾病対策に活用することは、技術立国を指向する我が国にとって政策的優先度の高いものである。特に、ゲノム解読が欧米を中心に進行しているのに対し、トランスクリプトーム解析は、完全長 cDNA ライブラリー技術を開発した我が国の主導により研究が進展し、ヒトやマウスでは大きな成果を上げている。本分野における国際的優位性を寄生虫学の領域でも確立することは政策的にも望ましい。

5. 共同研究内容の先端性

我々は、米英においてゲノム解読がまさに進行しつつある時期から、獣医学、および、医学の領域において寄生原虫のゲノムと発現遺伝子の解析に取り組んで来た。*Theileria orientalis* のゲノムを、寄生原虫として我が国主導で始めて完全解読しただけでなく、オリゴキャップ法を用いて種々の寄生虫、さらに、媒介節足動物から完全 cDNA ライブラリーを作成して発現遺伝子の網羅的解析を行い、この分野において世界最先端の技術とノウハウを蓄積してきた。特に、当研究グループでは発現遺伝子の転写開始点網羅的解析と、完全 cDNA クローンの全長塩基配列解読を効率的に行う方法を確立し、寄生虫学の領域だけでなくゲノム学一般からも注目を集めている。実験室内で確立された方法を、実地臨床に応用し、患者や野外から採取したサンプルに適応することは医学研究にとって必須の過程である。SNP 解析についても最近開発された新型シーケンサーで、ゲノムサイズの比較的小さな原虫では、数～数十株についての SNP をゲノム全領域で直接かつ効率よく検出解析することが可能になる。

6. 制度の付加価値

熱帯諸国の感染症研究については治療、予防薬開発は開発コストに比較して金額ベースの市場規模が小さく企業の直接的利益に結びつかず、産業界が主導的に行う研究開発ではない。また民間ベースの技術協力、ODAによる技術供与で本提案のような大規模ゲノムサイエンスの推進をおこなうことは資金、人材の両面で不可能である。さらに研究開発する分野は基礎ゲノムサイエンス、バイオインフォマティクスなど基礎分野での研究者の協力が不可欠であること、熱帯感染症の多くはわが国に存在せず、海外機関との大規模な協力が必要なことから、本プロジェクトの目的は、既存のいかなる研究開発プログラムにも適合しない。また、ゲノム研究は、医学・獣医学への応用のための基礎データの収集であり、産業界主導では行い得ない。また、患者サンプルの収集には倫理的規制があり民間ベースの技術協力やODAによる技術供与などでは対応不能である。

現在、わが国では「新興・再興感染症研究拠点形成プログラム」により、アジア・アフリカでの感染症制圧に向けて研究を推進している。北海道大学人獣共通感染症リサーチセンターでは、主にザンビアに研究拠点を据えて、人獣共通感染症の研究を行っているが、本提案にある内容はその事業目的に包含されていない。本制度により、特にゲノムサイエンスについて国際的な共同研究体制を拡大、強化することで、アジア・アフリカ地域での病原体ゲノムサイエンスの分野でのわが国の貢献をさらに拡大しうる。

7. 過去の蓄積

チェンマイ大学は、平成19年2月以来共同研究を実施しており、現在、医科学研究所との間で共同研究協定の締結を進めている。サムラトランギ大学とは、学術振興会2国間共同研究によるマラリア原虫の研究を実施中である。ザンビア大学獣医学部は、1985年に国際協力事業団の無償援助で整備され、北海道大学獣医学研究科を中心に中～長期の専門家派遣、日本での人材育成が続けられてきており、アフリカでもっとも密接かつ良好な協力関係を築いてきている。その基盤に立って、北海道大学人獣共通感染症リサーチセンターはザンビア大学獣医学部に研究拠点を設置、2名の日本人教員を常駐させ、同大学スタッフとの共同研究を実施している。プレトリア大学Jonge Jan教授がリーダーとなっているIntegrated Consortium for Tick and Tick-borne Diseases (EU資金) では、世界的ネットワーク構築と共同研究を実施している。

8. 研究の背景等

a. 国内外の研究状況

オリゴキャップ法による完全長 cDNA 合成技術は

鈴木らが開発したものであり、全長率の高い高品質のライブラリーを作製しうる技術として世界的にも注目されている。さらに本法で得られたクローンを、超高速シーケンシング技術により塩基配列を解析することで、1回の解析あたり約 1000 クローンの完全配列を得る手法も確立しており、ハイスループットな遺伝子解析法としては世界に類を見ない方法となっている。

病原性原虫の代表的な種について、米国ゲノム研究所、英国サンガーセンターなどで既に解読されている。本プロジェクトで対象とするマラリア原虫、タイレリア原虫（2種）についても両機関が中心となり実施され代表株の全ゲノムが解読され公開されている。3番目のタイレリアゲノム解読として *Theileria orientalis* ゲノム解読がわが国主導で進められており、比較ゲノムの観点から注目されている。

これらのゲノム解読が完了した現在、さらに多数の分離株をシーケンシングゲノム構造を比較解析するシーケンシングに研究の焦点は移りつつある。本プロジェクトの目的とする原虫の大規模な SNP 探索と解析はようやく取り組みが始まった段階であり、これから急速に情報が集積すると考えられ、わが国でも早急に研究体制を整備する必要がある。

今回、共同研究を予定している各国機関では、対象とする病原体ならびに媒介節足動物の研究においては、それぞれの国の中心的機関の一つとして研究活動を続けてきており、臨床・野外株の収集、蓄積は既に行われてきている。しかしながらそれらの集積を活かしたゲノム研究については着手されていない段階で国際的な共同研究体制の構築と資金獲得が切望されている。今回、ゲノム、cDNA 解析で国際的にも先行しているわが国研究機関と、アジア・アフリカ諸国の研究拠点の共同体制を構築することにより、熱帯感染症研究においてわが国が世界的にも重要な位置を占めることが可能となる。

b. 提案にいたる準備・調査等

科学研究費補助金基盤研究 A (H17-19: 研究代表者 杉本千尋) により *Theileria orientalis* ゲノム完全解読を行っている。既に4染色体(計8メガベース)の解析を終了しており、予想遺伝子のアノテーションを実施している。他の2種のタイレリア種のゲノム解読を進めた米国ゲノム研究所、英国サンガーセンターとも比較ゲノム研究を共同で進めている。さらに北海道大学人獣共通感染症リサーチセンターではザンビア大学獣医学部を海外拠点とした人獣共通感染症に関する調査研究活動を実施している。

遺伝子データベース構築のため、アピコンプレックス原虫を幅広く収集、完全長 cDNA ライブラリーを作製し一部情報を公開しており、同時に媒介節足動物について

もライブラリー構築中である。また WHO-TDR からの国際的研究資金を得て、米国エール大学 Aksoy 教授と共同でツェツェバエ (*Glossina morsitans*) の発育段階の異なる試料から完全長 cDNA を得て解析を進めている。

委員会の承認、必要に応じて大臣確認を得て実施する。一部の実験では試料調製に動物実験を伴うため、各機関で定める動物取り扱い倫理規定を遵守して実施する。人臨床材料採取については各国機関の定める倫理規定を遵守し実施する。病原体由来試料の輸入については、感染症法、家畜伝染病予防法で定める手続きを経て輸入する。

9. 生命倫理・安全面への配慮について

遺伝子組換え実験については、学内組換え DNA 実験安全

10. 実施体制

氏名	所属部局・職名	提案課題における役割
◎杉本 千尋	北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター・教授	研究代表者、アフリカでの共同研究推進 (株の収集、解析)、完全長 cDNA クローンバンク整備
伊藤 公人	北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター・准教授	cDNA 比較解析
渡邊 日出海	北海道大学大学院情報科学研究科・教授	比較ゲノム解析による系統進化解析
○渡辺 純一	東京大学医科学研究所・助教	アジアでの共同研究推進 (株の収集、解析)、完全長 cDNA データベース構築とクローンバンク整備
鈴木 穰	東京大学大学院新領域創成科学研究科・准教授	ゲノム配列解析
片山 俊明	東京大学医科学研究所・助教	ゲノム配列比較による SNP 検出
川島 秀一	東京大学医科学研究所・助教	マラリア原虫 SNP 解析
○玄 学南	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授	節足動物完全長 cDNA ライブラリー作製・解析、完全長 cDNA データベース構築とクローンバンク整備
前田 龍一郎	帯広畜産大学畜産学部・教授	節足動物完全長 cDNA ライブラリー作製
井上 昇	帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授	節足動物完全長 cDNA ライブラリー作製・解析
Wej Choochote	タイ・チェンマイ大学医学部・教授	タイにおけるマラリア原虫の収集、薬剤耐性解析、臨床分離株 SNP 解析
Kiew-Lian Wan	マレーシア・マレーシアゲノム研究所・所長	マレーシアにおけるマラリア原虫の収集、薬剤耐性解析、臨床分離株 SNP 解析
Josef Tuda	インドネシア・サムラトランギ大学医学部・講師	インドネシアにおけるマラリア原虫の収集、薬剤耐性解析、臨床分離株 SNP 解析
Boniface Namangala	ザンビア・ザンビア大学獣医学部・副学部長	ザンビアにおけるマラリア原虫、タイレリア原虫の収集
Frans Jongejan	南アフリカ共和国・プレトリア大学獣医学部・教授	南部アフリカにおけるタイレリア原虫の収集 (牛、野生動物)、野外分離株 SNP 解析
Bonto Faburay	ガンビア・国際トリパノソーマ抵抗性研究所・研究員	西部アフリカにおけるリケッチアの収集、ワクチン・野外株の SNP 解析

11. 各年度の計画と実績

a. 平成 20 年度

(1) ダニ媒介性病原体 SNP 解析に関する研究

タイレリア (*Theileria parva*)、エーリキア (*Ehrlichia ruminantium*) 株の収集を行う。代表的な株について

resequence を実施し、参照株とのゲノム構造、SNP 比較を行う。

(2) マラリア原虫 SNP 解析に関する研究

Plasmodium falciparum 株の野外株、臨床株、実験室継代株を収集する。代表的な株についてリシーケンスを実施

し、参照株とのゲノム構造、SNP 比較を行う。

(3) 媒介節足動物のトランスクリプトーム解析

ハマダラカ、ツェツェバエの実験室飼育コロニーを維持し、mRNA 素材とする。完全長 cDNA ライブラリーを作製し解析を行う。

<実績>

(1) ダニ媒介性病原体 SNP 解析に関する研究

Theileria parva および *Ehrlichia ruminantium* について、アフリカ各国の分離株を培養、精製しゲノム解析に必要な純度を有する標品を得て、リシークエンスを開始した。

(2) マラリア原虫 SNP 解析に関する研究

インドネシアにおいてマラリア患者から検体を収集すべく倫理委員会への申請を開始した。媒介蚊の分布状況についての調査を実施した。三日熱マラリア原虫の完全長 cDNA クローンのハイスループット解析を実施し、予測遺伝子との構造比較を行った。

(3) 媒介節足動物のトランスクリプトーム解析

ハマダラカの飼育を行い、それを出発材料にして完全長 cDNA ライブラリーを作製、解析を行いデータベース公開を行った。ツェツェバエ完全長 cDNA についても既存ライブラリー解析を実施し、データベースの改訂、充実を行った。

b. 平成 21 年度

(1) ダニ媒介性病原体 SNP 解析に関する研究

タイレリア、エーリキア株の収集を継続して行う。さらに複数株の resequence を実施し、参照株とのゲノム構造、

SNP 比較を行う。検出された SNP については遺伝子型別への有効性を検証する。

(2) マラリア原虫 SNP 解析に関する研究

Plasmodium falciparum 株の野外株、臨床株、実験室継代株の収集を継続して行う。代表的な株についてリシークエンスを実施し、参照株とのゲノム構造、SNP 比較を行う。また発現遺伝子の網羅的解析を実施する。

(3) 媒介節足動物のトランスクリプトーム解析

ハマダラカ、ツェツェバエの実験室飼育コロニーを維持、完全長 cDNA ライブラリー作製と解析を継続する。完全長クローンの全長解析を実施し、データベースの整備と充実を図る。

c. 平成 22 年度

(1) ダニ媒介性病原体 SNP 解析に関する研究

検出された SNP については遺伝子型別への有効性をさらに検証し、地域性、表現型（病原性等）との関連解析を実施する。

(2) マラリア原虫 SNP 解析に関する研究

SNP あるいは発現遺伝子プロフィールと地域性、表現型（病原性等）との関連解析を実施する。

(3) 媒介節足動物のトランスクリプトーム解析

完全長クローンの全長解析を継続して実施し、データベースの充実を図る。またクローンの保管、管理体制を整備し、バンクとして提供できる体制を構築する。

12. 年次計画

研究項目	1年度目	2年度目	3年度目
ダニ媒介性病原体 SNP 解析に関する研究			
(1) タイレリア、エーリキア株の収集		→	
(2)ゲノム DNA 精製とゲノムリシークエンス			→
マラリア原虫 SNP 解析に関する研究			
(1) マラリア原虫株の収集		→	
(2)ゲノム DNA 精製とゲノムリシークエンス			→
(3) 国際共同研究によるシークエンス解析		→	→
(4) 完全長 cDNA クローンの全長解析			→
媒介節足動物のトランスクリプトーム解析			
(1) 媒介節足動物の飼育・収集			→
(2) 完全長 cDNA ライブラリー整備・クローン全長解析			→
(3) 完全長 cDNA データベース構築とクローンバンク整備		→	→