

課題番号	LS057
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成24年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	マラリア原虫人工染色体を用いた革新的耐性遺伝子同定法の確立と応用
研究機関・ 部局・職名	三重大学医学系研究科・准教授
氏名	岩永 史朗

1. 当該年度の研究目的

本プロジェクトでは熱帯熱マラリア人工染色体を用い、耐性原虫由来遺伝子ライブラリーを直接、原虫内に構築し、これをスクリーニングすることによって迅速かつ正確に薬剤耐性遺伝子を同定することを目指している。H24年度はまず薬剤耐性マラリア原虫より遺伝子ライブラリーを構築する。続いてライブラリーのゲノム被覆度、インサート DNA の平均長を調べ、その完成度を検討する。また昨年度に引き続き、タイに設置したフィールドサイトにおいて患者由来感染血液から薬剤耐性熱帯熱マラリア原虫株(クロロキン・メフロキン耐性原虫等)を分離する。

2. 研究の実施状況

①:薬剤耐性原虫からの遺伝子ライブラリー構築
 クロロキン耐性熱帯熱マラリア原虫株より約 10~50kb のゲノム DNA 断片を調製し、これらをマラリア原虫人工染色体へ組み込んだ後、野生型(薬剤感受性)原虫内に直接導入して遺伝子ライブラリーを構築した。ライブラリーから原虫をクローン化し、導入されたインサート DNA について CHEF 電気泳動により解析した結果、その平均長は約 16kb であることが明らかとなった。マラリア原虫の遺伝子の平均長は約 5kb であることから各インサート DNA は少なくとも 1~3 個の遺伝子を含むことが推定された。またクローン化した原虫についてインサート DNA の配列をゲノムウォーク法により決定した結果、これら全てが独立したクローンであることが示された。更に Flow cytometer 並びに限界希釈法による解析からライブラリーに含まれる独立したクローンの総数は 2000~2500 であるが見積もられた。これらの結果と原虫のゲノムサイズ(約 25Mb)に基づき、ライブラリーのゲノム被覆度は 1.28~1.60 カバーであると算出された。以上のことから構築したラブラリーは原虫の全遺伝子を網羅していると示唆され、薬剤耐性遺伝子のスクリーニングに使用可能であると考えられた。

②患者由来薬剤耐性原虫株の分離
 タイ-ミャンマー国境地域に設置したフィールドサイトにおいてマラリア患者より血液を採取し、H24 年度に新たに約 50 株の安定培養株を得ることができ、昨年度と合計で約 150 株の安定培養株を樹立した。更にこれらの中からクロロキン耐性及びピリメサミン耐性株を合計 38 株、単離することにも成功した。また新たにメフロキン耐性について検討した結果、8 株の単離に成功した。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 5 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 5 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Experimental cerebral malaria is suppressed by disruption of nucleoside transporter 1 but not purine nucleoside phosphorylase. Niikura M, Inoue S, Mineo S, Yamada Y, Kaneko I, <u>Iwanaga S</u>, Yuda M, Kobayashi F. <i>Biochem Biophys Res Commun.</i>, 15; 432(3): 504–8. (2013). 2. Transgenic fluorescent Plasmodium cynomolgi liver stages enable live imaging and purification of Malaria hypnozoite-forms. Voorberg-van der Wel A, Zeeman AM, van Amsterdam SM, van den Berg A, Klooster EJ, <u>Iwanaga S</u>, Janse CJ, van Gemert GJ, Sauerwein R, Beenhakker N, Koopman G, Thomas AW, Kocken CH. <i>PLoS One.</i>, 8(1):e54888. (2013). 3. Liver-specific protein 2: a Plasmodium protein exported to the hepatocyte cytoplasm and required for merozoite formation. Orito Y, Ishino T, <u>Iwanaga S</u>, Kaneko I, Kato T, Menard R, Chinzei Y, Yuda M. <i>Mol Microbiol.</i>, 87(1):66–79. (2012). 4. Identification of an AP2-family protein that is critical for malaria liver stage development. <u>Iwanaga S</u>, Kaneko I, Kato T, Yuda M. <i>PLoS One.</i>, 7(11):e47557. (2012) 5. A high-coverage artificial chromosome library for the genome-wide screening of drug-resistance genes in malaria parasites. <u>Iwanaga S</u>, Kaneko I, Yuda M. <i>Genome Res.</i>, 22(5):985–92. (2012) <p>(掲載済み一査読無し) 計 0 件</p> <p>無し</p> <p>(未掲載) 計 0 件</p> <p>無し</p>
<p>会議発表 計 6 件</p>	<p>専門家向け 計 6 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. A high-coverage artificial chromosome library for the genome-wide screening of drug-resistance genes in malaria parasites Iwanaga S., The 13th FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Bangkok, Thailand, 25th–29th of November, 2012 (<u>invited speaker</u>) 2. A high-coverage artificial chromosome library for the genome-wide screening of drug-resistance genes in malaria parasites. Iwanaga S. Heidelberg, Germany, 13th–16th of May, 2012, BioMalPar 2012 (<u>selected speaker</u>) 3. A high-coverage artificial chromosome library for the genome-wide screening of drug-resistance genes in malaria parasites Iwanaga S. Awaji, Japan, 11th–14th of September, 2012 The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity (<u>invited speaker</u>) 4. 第 82 回日本寄生虫学会大会, 金子伊澄, 加藤知美, 岩永史朗, 油田正夫, マラリア原虫転写因子 AP2-O のオーキネート形成に果たす役割, 東京都, 2013 年 3 月 29 日-31 日, 日本寄生虫学会 5. 第 82 回日本寄生虫学会大会, 岩永史朗, 加藤知美, 金子伊澄, 油田正夫, 熱帯熱マラリア原虫セントロメアプラスミドの開発, 東京都, 2013 年 3 月 29 日-31 日, 日本寄生虫学会 6. 分子寄生虫ワークショップ 2012, 岩永史朗 (世話人), マラリア原虫人工染色体を用いた薬剤耐性遺伝子の同定法, 神戸市, 2012 年 8 月 26 日-29 日, 分子寄生虫ワークショップ委員会

様式19 別紙1

	一般向け 計0件 無し
図書 計0件	無し
産業財産権 出願・取得状況 計1件	(取得済み) 計0件 無し (出願中) 計1件 名称: マラリア原虫人工染色体を用いた薬剤耐性遺伝子の迅速同定法および組換えマラリア原虫作製法, 発明者: 岩永史朗、油田正夫、金子伊澄、権利者: 国立大学法人三重大学、出願日: 2011年3月25日 (PCT 出願日) (2013年3月28日、米国へ審査請求開始) 国際公開番号: 2013/0078635
Webページ (URL)	http://www.medic.mie-u.ac.jp/idoubutsu/ http://jikei-tropmed.jp/nextindex.html
国民との科学・技術対話の実施状況	帯広畜産大学・オープンキャンパス: 2012年7月29日、帯広畜産大学オープンキャンパスに参加し、高校生(30名程度)を対象とし、寄生虫系3課題採択者(岩永史朗・嘉糠洋陸・西川義文)によってそれぞれの専門領域に関する講義を実施し、採択者らの研究の紹介と質疑応答を行った。
新聞・一般雑誌等掲載 計4件	平成24年5月26日 1. 伊勢新聞(朝刊): マラリア治療の新手法開発 2. 読売新聞(朝刊): 耐性遺伝子特定法を開発 3. 毎日新聞(朝刊): マラリア治療薬の効き目阻害: 原因遺伝子短期間で特定 平成24年7月4日 4. 朝日新聞(朝刊): マラリア治療へ一歩
その他	1. 平成24年5月25日: NHK(ニュース): (内容) マラリア 耐性遺伝子の特定法 2. 平成24年5月25日: 三重TV(ニュース): (内容) マラリア 耐性遺伝子の特定法 3. 平成24年7月26日: 三重大学エックス(大学一般向け広報誌): 2012年夏号: マラリア 耐性遺伝子の同定法に関する研究内容紹介

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成24年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

1. 助成金の受領状況(累計) (単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	126,000,000	65,840,000	9,800,000	50,360,000	0
間接経費	37,800,000	19,752,000	2,940,000	15,108,000	0
合計	163,800,000	85,592,000	12,740,000	65,468,000	0

2. 当該年度の収支状況 (単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	19,974,206	9,800,000	0	29,774,206	24,403,435	5,370,771	0
間接経費	5,992,262	2,940,000	0	8,932,262	7,321,030	1,611,232	0
合計	25,966,468	12,740,000	0	38,706,468	31,724,465	6,982,003	0

3. 当該年度の執行額内訳 (単位:円)

	金額	備考
物品費	15,741,823	顕微鏡デジタルカメラ,薬用冷蔵ショーケース
旅費	661,593	研究打合せ、学会出席等
謝金・人件費等	5,908,140	技術補佐員人件費
その他	2,091,879	DNAシーケンサ保守,REVCO超低温槽 修理
直接経費計	24,403,435	
間接経費計	7,321,030	
合計	31,724,465	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
顕微鏡デジタルカメラ	DP73-SET-A	1	1,419,600	1,419,600	2013/3/15	三重大学
微量高速遠心機 他	CF16RX II	1	771,750	771,750	2013/1/28	三重大学
アルブマックス		1	972,825	972,825	2012/11/27	三重大学