

全長cDNAライブラリを用いたアピコンプレクサ原虫の発現遺伝子の解析

渡辺 純一¹, 鈴木 穰², 若栗 浩幸² (東京大学¹医科学研究所, ²新領域)

Analysis of expressed genes of apicomplexan parasites using full-length cDNA libraries

Junichi WATANABE¹, Yutaka SUZUKI², Hiroyuki WAKAGURI²¹Institute of Medical Science, ²Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo

SUMMARY

Apicomplexan protozoa are obligatory parasites that cause various diseases including malaria. Recent studies revealed that they belong to the superkingdom Alveolata which also contains Ciliata and Dinoflagellata. Using oligo-capping methods, we have produced full-length cDNA libraries from various apicomplexa, including *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. yoelii*, *P. berghei*, *Toxoplasma gondii* and *Cryptosporidium parvum*. Large scale determination of 5'-end one-pass sequences and comparisons with the genome sequences revealed that 80–90% contain the entire ORF (open reading frame) and these were considered to represent full length clones. The database, Full-malaria, was produced and published on the internet (<http://fullmal.ims.u-tokyo.ac.jp>). Determination of the entire sequences of these clones should elucidate the exact gene structures and transcriptional start sites. The latter defines the regions that control gene expression upstream. Comparative analysis of these libraries will help elucidate the process of evolution of apicomplexan parasites. Similar studies involving Ciliata and Dinoflagellata are expected to unravel the mechanisms behind the parasitism. The clones will also be used for various experiments.

【目的】 アピコンプレクサ原虫は、偏性寄生性の原虫で、マラリアやトキソプラズマなどの疾病の原因となるため、医学・獣医学領域で研究が行われてきた。早くからゲノム解読の対象となり、2002年の熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*)の全ゲノム23Mbが解読を嚆矢として、つぎつぎにゲノムが公開されている。

また、最近の分子生物学的研究・微細形態学的解析から、本原虫が、繊毛虫や、渦鞭毛虫と近縁のアルベオラータ超門を形成することが明らかになり、原虫の進化、寄生進化の観点から興味もたれている。

我々は、独自に開発したoligo-cap法を用いてこれらの原虫から全長cDNAライブラリを作成し、発現遺伝子の解析を行った。oligo-cap法は、真核生物のmRNAの5'端に存在するcap構造を利用してmRNAの全長をクローニングするもので、発現遺伝子を効率よく解析する技術である。これまでに、複数の原

虫種からライブラリを作成し解析した(表1)。

【材料と方法】 原虫の調整は、標準的方法で行った。ヒト赤血球を用いて培養(Pf), 患者から採血(Pv), マウスの腹腔内に投与させ感染増殖させたものを全血として回収(Py, Pb), 同様に感染させ腹腔内から回収(Tg), SCIDマウスに経口投与させ感染増殖, 糞便中に回収(Cp)。原虫は適当な方法で精製したのち, TrizolでRNAを抽出し, oligo-cap法で全長cDNAライブラリを作成した。それぞれ, 1万個のランダムクローンの5'端ワンパスシーケンスを決定した。ゲノム塩基配列とBLATで比較, ゲノム上にマップした。結果をデータベース化し, ゲノムビューワーを作成して, インターネットで公開した(Full-malaria, <http://fullmal.ims.u-tokyo.ac.jp>)。

【結果】 80–90%のクローンでORF (open reading frame) の全長を含むクローンが得られた。300

0-6000個と想像される原虫遺伝子のうち1000-2000遺伝子について全長クローンが得られた。

[考察] ゲノム解読時代において、発現遺伝子の全長を解析できる全長cDNAライブラリの研究は時宜を得たものである。共通の祖先に由来する種々の原虫が、進化の過程で、しだいに感染する宿主域を広げ、多様な生活環を有するようになった経過を、ゲノムサイズや、GC含量の変化と関係づけて解析することはきわめて興味深い。また、アピコンプレクサ原虫だけでなく、近縁の繊毛虫(*Tetrahymena*)や渦鞭

毛虫を含めた比較解析は、原虫の進化分化、寄生進化の解明に貢献するものと期待される。

[文献]

Watanabe J, Suzuki Y, Sasaki M, Sugano S. Full-malaria 2004: an enlarged database for comparative studies of full-length cDNAs of malaria parasites, *Plasmodium* species. *Nucleic Acids Res.* 2004 Jan 1;32(Database issue):D334-8.

Suzuki et al. Construction and characterization of a full length-enriched and a 5'-end-enriched cDNA library. *Gene* 1997 200: 149-156.

表1

species	症状	ゲノムサイズ	GC含量	ステージ
<i>Plasmodium falciparum</i>	熱帯熱マラリア	2.3 Mb	1.9%	赤内型・生殖母体
<i>Plasmodium vivax</i>	三日熱マラリア	3.0 Mb	3.0%	赤内型・生殖母体
<i>Plasmodium yoelii</i>	ネズミマラリア	2.3 Mb	2.3%	赤内型・生殖母体
<i>Plasmodium berghei</i>	ネズミマラリア	2.3 Mb	2.3%	赤内型・生殖母体
<i>Toxoplasma gondii</i>	水頭症	6.5 Mb	6.5%	タキゾイト
<i>Cryptosporidium parvum</i>	下痢症	9 Mb	3.0%	スポロゾイト