

機関番号 : 82610

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2008 年度~2009 年度

課題番号 : 207-0328

研究課題名 (和文) マラリア原虫の転写制御に関わる因子の同定およびその機能解析

研究課題名 (英文) Detection and Analysis of New Factors Related to Transcriptional Regulation in *Plasmodium falciparum*研究代表者 安田 加奈子 (駒木加奈子)
(Kanakanaka Komaki-Yasuda)

研究者番号 : 50415551

研究成果の概要 (和文) : マラリア原虫の赤血球内寄生ステージにおける転写制御機構の分子論は全くといって良いほど解明されていない。特にマラリア原虫ゲノムデータベースには、他種生物において既知の「転写調節因子」のホモログが殆ど存在しないことから原虫独自の因子の存在が予測される。本研究では、原虫に独自の転写調節因子を同定することを目指し、熱帯熱マラリア原虫 *prx* 遺伝子の *cis*-element に特異的に結合する DNA 結合因子の単離同定を試みた。33 L の培養原虫 (5×10^{11} cells) より核抽出物 110 mLs を調製し、そこから 5 段階のクロマトグラフィーを経て目的の因子を精製した。各精製段階において、*cis*-element の配列をプローブとして用いたゲルシフトアッセイをおこない、因子の活性を確認した。精製の結果、30 μ L の活性を持つフラクションが得られ、これを SDS-PAGE によって展開した結果、目的の因子の候補を 3 本のバンドに絞り込むことができた。これらのバンドを切り出し LC/MS/MS による質量解析をおこなった結果、約 20 種類の候補タンパクが同定された。これらの組換えタンパク質を作製し、*prx* 遺伝子の *cis*-element に対する結合活性を確認した結果、候補のひとつに結合活性が認められた (このタンパクを因子 X とする)。因子 X は既に報告されている原虫の転写因子の候補である AP-2 ファミリーには属さない新奇のタンパクであり、新しい原虫独自の転写因子である可能性が高い。以上の結果はマラリア原虫が独自の DNA 結合タンパクによって遺伝子の発現を制御していることを示唆している。

研究成果の概要 (英文) : The detailed mechanisms of transcriptional regulation in malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, remains almost unknown. Genome-wide analyses of transcription-associated proteins have revealed a paucity of putative regulatory transcription factors, suggesting that this parasite has unique regulatory transcription factors distinct from those of other eukaryotes. To identify unique regulatory transcription factors in *P. falciparum*, we tried purification and identification of nuclear factor which associates specifically with *cis*-acting enhancer region of *pfl-cys-prx* in this study. Nuclear extract (110 mL) was prepared from 33 L of parasite culture (5×10^{11} cells), then, the enhancer binding protein was purified from the extract by 5 steps of liquid chromatography. In each step, the DNA binding activity of each fraction was verified by electrophoresis mobility shift assay (EMSA). As results, 30 μ L of fraction with the specific enhancer-binding activity was obtained. Then, this fraction was separated by SDS-PAGE and 3 bands were detected as possible candidates for the specific DNA binding protein. These bands were excised from the gel and analyzed by LC-MS/MS, then, about 20 parasite proteins were identified. Enhancer-binding activities of the recombinant proteins of these factors were analyzed by EMSA, then, one of these proteins revealed enhancer-binding activity. Recently, new plant-like transcriptional regulatory factors of *Plasmodium*, which termed AP-2 family, had been reported, however the factor detected in this study was not included in the AP-2 family. These results suggested that this factor is novel and unique, and possibly regulates transcriptional mechanism in malaria parasite.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：分子寄生虫学

科研費の分科・細目：寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：マラリア・*Plasmodium*・転写因子・転写制御

1. 研究開始当初の背景

熱帯熱マラリアは年間約5億人が罹患、およそ300万人が死亡する地球規模の感染症である。この疾病は熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) が、媒介蚊の吸血によってヒトに感染、赤血球内に寄生、分裂・増殖することにより、引き起こされる。しかし原虫細胞における基本的な機能である、転写、DNA 修復、シグナル伝達などの詳細な分子機序は殆ど解明されていない。原虫の遺伝子発現については、全生活環を通じた網羅的なトランスクリプトーム解析によって、原虫の生活環および細胞周期と密接に関連した巧妙な転写制御がおこなわれていることが示唆されている (Le Roch KG et al. Science 2003, 301: 1503-1508; Bozdech Z et al. PLoS Biol. 2003,1: 85-100)。しかし *P. falciparum* のゲノム上には、基本転写複合体を形成するのに必要な RNA ポリメラーゼ II および、基本転写因子 (basal transcription factor) 群、またクロマチン修飾因子群のホモログはよく保存されているものの、遺伝子毎の転写調節領域 (*cis*-element) に結合して遺伝子特異的に発現を調節する転写因子 (regulatory transcription factor) のホモログは、ほとんど存在せず、また、転写因子に特徴的なモチーフで検索しても候補となり得るタンパク質は見つかっていない。加えて *P. falciparum* のゲノムは、non-coding-region の AT 含有率が 90%以上という極めて偏った組成となっており、既知の *cis*-element とのホモロジー検索もほぼ不可能となっている。これらのことから「原虫における遺伝子発現調節は他生物と異なり、転写因子の関与しない機構ではないか」と考えられるようになりつつある (Aravind et al. Cell 2003, 115: 771-785; Deistsch et al. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2007, 77: 201-208)。この様な背景の中、私はこれまでの研究で、赤血球内寄生期の house keeping gene のモデルとして、抗酸化

タンパク質 Peroxiredoxin (Prx) 遺伝子の赤血球内ステージにおける転写制御機構を解析してきた。*prx* 遺伝子は、他の多くの赤血球内ステージで発現する遺伝子と同様、原虫の細胞周期に依存した発現パターンを示し、一般的な転写制御のモデルケースとなり得ると考えた。その結果、(i) *prx* 遺伝子の 5' 領域にエンハンサーとして作用する *cis*-element が存在すること、(ii) *prx* 遺伝子の *cis*-element に塩基配列特異的に結合する核内因子が発育ステージ特異的に存在すること、(iii) *prx* 遺伝子の 5' 領域はヒストンAセチル化を介したエピジェネティックな制御のターゲットとなっていること、(iv) またその時 *prx* 遺伝子の *cis*-element には、ヒストンAセチル基転移酵素 PfGCN5 がリクルートされていることがわかった。これらの結果は、*P. falciparum* においてもやはり転写因子が存在して、それが *cis*-element に結合し、またこれとクロマチン修飾を介したエピジェネティックな制御の協調による転写制御が成されていることを強く示唆している。これまでの研究における、ゲルシフトアッセイと、DNA footprint 法によって見出された *prx* 遺伝子の *cis*-element と特異的に結合する核内因子は原虫独自の転写因子であることが強く期待できることから、本研究ではこの因子の単離・同定を試みた。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの *prx* 遺伝子の発現制御機構の結果を受け、同遺伝子の *cis*-element に特異的に結合する DNA 結合因子 (おそらくはマラリア原虫に独自の転写因子) を単離同定することを第一の目的とする (ここで同定することを目的とする因子を、以下「因子 X」とする)。この因子の作用機序の解析から、マラリア原虫における転写制御機構の独自性が明らかとなり、将来的には、抗マラリア薬の新たなターゲット

にもなり得ることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 因子 X の分子量の推定

培養熱帯熱マラリア原虫より精製した核抽出物 200 μ L を、原虫 *prx* 遺伝子の *cis*-element に相当する 102bp の DNA 断片を結合させた磁性ビーズ (Dina Beads : DYNAL 社) を用いて粗精製をおこない、5-20 % SDS-PAGE によって展開した。ゲルを分子量に従って段階的に切り出し、そこからタンパクを抽出、アセトン沈殿によって回収したのち 6 M グアニジン塩酸溶液によって変性、その後透析によってグアニジン塩酸をゆっくり除くことによってタンパクを再生させた。各画分を *prx* 遺伝子 *cis*-element をプローブとするゲルシフトアッセイによってチェックし、どの分子量に相当する画分が、特異的な *cis*-element binding 活性を示すのかを確認した。

(2) 因子 X の精製方法の検討

原虫核抽出物 (3 \times 10⁹ parasite cell 由来、培養 200 mL に相当) に対して、様々な種類のクロマトグラフィーの担体ビーズをバッチ法で作用させ、その上清および、担体ビーズからの抽出画分に目的の核内因子が含まれるかを *cis*-element の配列をプローブとして用いたゲルシフトアッセイによって確認した。

(3) 因子 X の精製

大量の培養熱帯熱マラリア原虫 (5 \times 10¹¹ parasite cells、培養 33 L に相当) の核抽出物 110 mL より、1) 陰イオン交換 (HiTrap Q)、2) 陽イオン交換 (HiTrap CM)、3) 疎水 (RESOURCE Phenyl)、4) 陽イオン交換 (Mono S)、5) DNA アフィニティー (Dina Beads)、の順でクロマトグラフィーによる精製をおこなった (精製条件 : 図 1)。各精製段階において、*cis*-element の配列をプローブとして用いたゲルシフトアッセイをおこない、因子の活性を確認した。

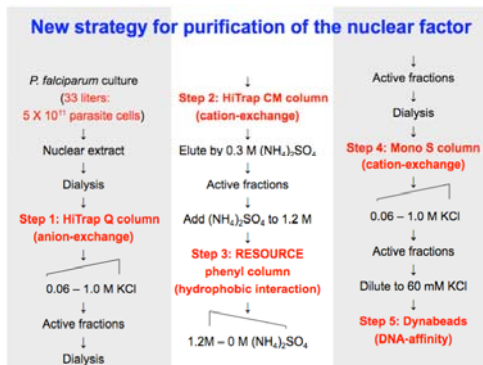


図 1 : 因子の精製条件

(4) 因子 X の同定

cis-element 結合活性の観察されたフラクションを 5-20 % グラディエント SDS-PAGE によって展開し、質量分析用銀染色 (Silverquest: Invitrogen 社) をおこない、因子に相当するバンドを切り出し、LC-MS/MS によって解析をおこなった。

(5) 組換え体の作製

LC-MS/MS によって得られた因子の候補について、無細胞合成系 (TransDirect system: 島津) を用いて組換え体を作製した。各組換え体には N 末に FLAG tag を付加し、合成後には抗 FLAG 抗体付加アガロースビーズ (GE Healthcare 社) を用いた粗精製をおこなった。組換え体の活性の確認には *prx* 遺伝子の *cis*-element 102bp をプローブとして用いたゲルシフトアッセイをおこなった。

4. 研究成果

(1) 因子 X の分子量の推定

因子 X のおよその分子量を推定する目的で、原虫の核抽出物を材料として、原虫 *prx* 遺伝子の *cis*-element に相当する 102bp の DNA 断片を結合させたビーズを用いて粗精製をおこない、SDS-PAGE によって展開、各分子量に従ってゲル片を切り出し、そこからタンパクを抽出し、再生をおこなった。各ゲル片由来の画分を *cis*-element をプローブとするゲルシフトアッセイによってチェックしたところ、分子量 55-70 kDa に相当する画分よりシフトバンドが検出され、因子 X の分子量がおよその範囲に入ることが示された (図 2)。

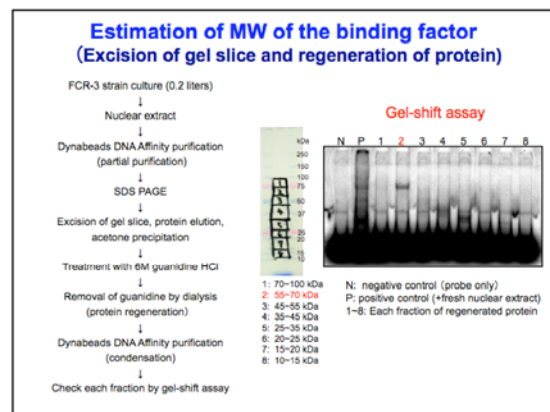


図 2 : 因子の分子量の推定

(2) 因子 X の精製方法の検討

因子 X を核抽出物より直接単離する条件を決定するために、種々のクロマトグラフィー用の担体によって因子が濃縮されるのかを検討した。その結果、CM Sepharose、Q Sepharose、S Sepharose、Phenyl Sepharose (いずれも GE Healthcare 社) については因子 X

に結合し、濃縮可能であるが、Heparin Sepharose (GE Healthcare 社)、ハイドロキシアパタイト (Bio-Rad 社) を用いた時には活性が結合画分とフロースルーに拡散し、精製には適さないことが明らかとなった。

(3) 因子 X の精製および同定

前項で明らかとなった条件に従って精製ストラテジーを組み立て、110 mL の原虫核抽出物を材料に精製をおこなった。5 段階の精製ステップを経て、30 μ L の cis-element 結合活性を持つ画分を得た。この画分を SDS-PAGE によって展開すると、分子量 55-70 kDa 相当の範囲に 3 本のバンドが確認された(図 3)。

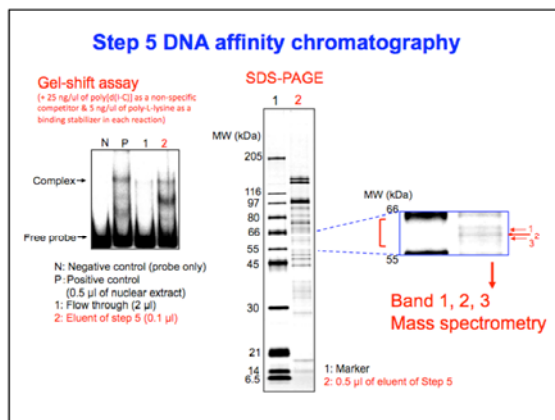


図 3 : 精製された画分の SDS-PAGE

これらを切り出して、LC-MS/MS による質量分析をおこなったところ、約 20 種類の原虫タンパクが同定された (図 4)。

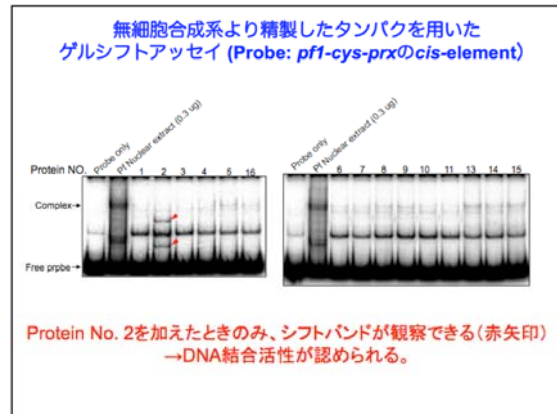
同定されたタンパク (LC/MS/MS analysis)

Protein No.	MW	Number of total spectra	Coverage (%)	Putative function
1	61 kDa	Band 1: 7, Band 2: 24, Band 3: 3	29	protein kinase
2	53 kDa	Band 1: 2, Band 2: 9, Band 3: 36	38	hypothetical protein
3	132 kDa	Band 1: 16, Band 2: 28, Band 3: 24	18	hypothetical protein
4	129 kDa	Band 1: 46, Band 2: 2	23	hypothetical protein
5	81 kDa	Band 1: 9, Band 2: 41, Band 3: 5	40	translation
6	111 kDa	Band 1: 9, Band 2: 5, Band 3: 4	11	chaperone
7	95 kDa	Band 1: 11, Band 2: 5	15	hypothetical protein
8	129 kDa	Band 1: 2, Band 2: 5, Band 3: 15	13	DNA repair
9	84 kDa	Band 1: 6, Band 2: 7, Band 3: 15	18	helicase
10	128 kDa	Band 1: 7, Band 2: 10, Band 3: 17	12	hypothetical protein
11	73 kDa	Band 2: 5	9	hypothetical protein
12	104 kDa	Band 1: 16, Band 2: 13, Band 3: 7	21	protease
13	49 kDa	Band 1: 10, Band 2: 9, Band 3: 11	25	translation
14	48 kDa	Band 1: 4, Band 2: 3, Band 3: 8	20	translation
15	56 kDa	Band 2: 4, Band 3: 6	14	ATP synthesis
16	301 kDa	Band 1: 3, Band 2: 6, Band 3: 21	7	helicase

図 4 : 同定されたタンパク一覧

これらの組換え体を実験系によって作製し、ゲルシフトアッセイによる解析をおこなったところ、そのうちのひとつに cis-element 結合活性が見出された (図 5)。この因子によるゲルシフトアッセイが示すシ

フトバンドの位置は核抽出物の示すそれとは異なるものの、(これについては、実際に原虫細胞中で正しい、折りたたみ、修飾などを経たタンパクであれば、核抽出物が示すシフトバンドと同じ位置のバンドが検出できる可能性がある、と考えている) 今回同定されてきたタンパクのうちで、これが唯一 DNA 結合活性を示した因子であり、これが因子 X である可能性が高いと思われる。この因子は今まで報告されたとの転写因子とも相同性



を持たない新奇の因子である。

図 5 : 同定した因子の cis-element 結合活性

また、近年マラリア原虫における転写因子の候補として、植物の転写因子、AP-2 に類似した因子群が報告されているが (Baraji et al, Nucleic Acids Res. 33:3994-4006, 2005; Yuda M et al. Mol. Microbiol. 2009, 71:1402-1414) 今回同定した因子はこのファミリーにも属さないものであった。今回の結果は、全くの新奇の因子である因子 X によって原虫の転写が制御されていることを示唆している。今後はこの因子の過剰発現株、遺伝子欠損株を作製し、その性質を解析することによって、実際にこの因子がどの様にして、原虫の転写制御に関わっているのかを解析していく計画である。今後の解析結果から、この新奇の因子による原虫転写制御の独自性が見出されていくことが期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Komaki-Yasuda K., Okuwaki M., Kano S., Nagata K., Kawazu S.: 5' sequence- and chromatin modification-dependent gene expression in *Plasmodium falciparum* erythrocytic stage. **Molecular and Biochemical Parasitology** 162:40-45, 2008.

〔学会発表〕(計4件)

駒木-安田加奈子, 奥脇暢, 永田恭介, 河津信一郎, 狩野繁之: 熱帯熱マラリア原虫 *pfl-cys-prx* 遺伝子 *cis-element* に結合する核内因子の精製および同定, 第69回日本寄生虫学会東日本支部大会, 東京, 2009年10月

駒木-安田加奈子, 奥脇暢, 永田恭介, 河津信一郎, 狩野繁之: 熱帯熱マラリア原虫 *pfl-cys-prx* 遺伝子 *cis-element* に結合する核内因子の精製条件の検討, 第78回日本寄生虫学会大会, 東京, 2009年4月

Kanako Komaki-Yasuda, Mitsuru Okuwaki, Kiyosuke Nagata, Shin-ichiro Kawazu, Shigeyuki Kano: Regulatory mechanisms of stage specific gene expression in *Plasmodium falciparum* erythrocytic stage, 43rd Annual U.S.-Japan Joint Conference on Parasitic Diseases, Tokyo, Jan., 2009

駒木-安田加奈子, 奥脇暢, 永田恭介, 狩野繁之, 河津信一郎: 熱帯熱マラリア原虫 1-Cys型ペルオキシレドキシシン(Prx)遺伝子のエンハンサー領域に結合する核内因子の性質, 第77回日本寄生虫学会大会, 長崎, 2008年4月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計◇件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

(1)研究代表者 安田加奈子(駒木加奈子)
(Kanako Komaki-Yasuda)

研究者番号: 50415551

(2)研究分担者
()

研究者番号:

(3)連携研究者
()

研究者番号: