

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07462

研究課題名（和文）転写因子を手掛かりとしたマラリア原虫ガメトサイト形成機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of triggering malaria gametocytogenesis by AP2-G.

研究代表者

金子 伊澄（Kaneko, Izumi）

三重大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20515720

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：転写因子AP2-Gの標的遺伝子及びcis配列を同定した。その標的遺伝子中に新規雌ガメトサイトの転写因子AP2-FG2を見出した。AP2-FG2は雌ガメトサイトの核に局在し雌特異的遺伝子の upstream へ結合しその遺伝子発現を制御する事を明らかにした。さらに雄ガメトサイトの分化に関与するSNF2-like chromatin remodeling ATPase、gSNF2を見出した。gSNF2欠損原虫では正常な雄ガメトサイトを形成することができず蚊への伝播能が完全に失われていた。gSNF2は雌雄ガメトサイト遺伝子群の upstream に存在する特異的配列に結合し、その遺伝子発現制御に関与する事を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果はマラリア原虫の複雑なライフサイクル成立の根本原理の解明の一端を担うものであり、世界的に問題となっているマラリア感染症の予防・治療に繋がると考える。

研究成果の概要（英文）：The target gene and cis-acting element of the transcription factor AP2-G were identified. We found a novel female gametocyte transcription factor AP2-FG2 in the target gene. We found that AP2-FG2 is localized in the nucleus of female gametocytes and binds to the upstream regions of female-specific genes to regulate their gene expression. Furthermore, we found an SNF2-like chromatin remodeling ATPase, gSNF2, which is involved in the differentiation of male gametocytes. The gSNF2-deficient parasites were unable to form normal male gametocytes and completely lost the ability to infection to mosquitoes. We clarified that gSNF2 binds to a specific sequence existing in the upstream region of the male and female gametocyte genes and participates in the gene expression regulation.

研究分野：寄生虫

キーワード：マラリア 転写因子

1. 研究開始当初の背景

マラリア原虫のライフサイクルは無性生殖により増殖する血液ステージの原虫の一部が有性生殖へとコミットすることによって始まる。有性生殖にコミットした原虫は初期ガメトサイトとなり、さらに雌雄ガメトサイトへと分化成熟する。蚊の吸血により取り込まれた成熟雌雄ガメトサイトは、蚊中腸で雌雄生殖体(ガメート)となり接合し蚊中腸細胞へ侵入する。ガメトサイトはマラリア原虫の蚊への伝播に最重要のステージであるにもかかわらず、その分化機構はわかっていなかった。一方最近の転写因子研究の進捗によりマラリア原虫の複雑なライフサイクルは少数のステージ特異的なマスター転写因子によって制御されていることが明らかになってきた。これらの転写因子は全体で 27 個に過ぎず、すべて AP2 ファミリーという転写因子のファミリーに属している。このうち少なくとも 3 つの AP2 ファミリー転写因子 AP2-G, AP2-G2, および AP2-FG がガメトサイト形成に関わっていることがわかってきた。AP2-G はガメトサイト形成の起点となる転写因子で、この転写因子を破壊した原虫ではガメトサイトがまったく観察されなくなる。AP2-G2 はリプレッサーであり無性殖期の遺伝子を抑制し生殖母体への転換を促進している (Yuda et al., 2015)。さらに最近申請者らは雌性ガメトサイトの分化に必須の転写因子 AP2-FG を同定した (Yuda et al., 2019)。AP2-FG を欠損した原虫では雄性ガメトサイトの形成は正常であったが成熟した雌性ガメトサイトが形成されなかった。これら 3 つの転写因子の発現時期を解析したところ、AP2-G の発現は AP2-G2 及び AP2-FG の発現より約 2 時間早く始まること分かった。このことは AP2-G がこれら転写因子を直接誘導していることを強く示唆した。以上の結果から申請者は AP2-G の標的遺伝子を出発点としたガメトサイト形成の全過程を解明する本研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究は転写因子を手がかりとして、初期ガメトサイトの形成から雌雄ガメトサイトの分化へと至るガメトサイト形成機構を解明することを目的とした。ガメトサイトの性特異的な遺伝子発現の制御機構はほとんど解明されておらず、本研究で試みる雄性マスター転写因子の同定が成功すれば、この分野の研究にとり大きなブレークスルーとなる。さらにマラリア原虫のステージ形成における転写因子の役割をガメトサイト形成過程の研究を通じて明らかにすることを目的とした。この目的を実現するため本研究では ChIP-seq 法で各転写因子の標的遺伝子の総体を捉え、ステージ形成過程をこれら転写因子によるトランスクリプトーム誘導の連鎖として再構成することを目指した。

3. 研究の方法

本研究はすべてネズミマラリア原虫 *Plasmodium berghei* を用いて実施した。まず転写因子 AP2-G の全標的遺伝子を同定し、その情報をもとに下流にある転写因子及び転写制御関連因子を同定しそのガメトサイト形成における役割を解明する。この目的のため GFP 融合蛋白発現原虫による局在解析、遺伝子ノックアウトによる表現型解析、ChIP-seq による標的遺伝子同定及び複合体形成解析等の手法を用いた。これらの遺伝子操作には最近申請者らのグループが開発したマラリア原虫 CRISPR/Cas9 システムを利用した。

4. 研究成果

AP2-G の ChIP-seq 解析を行った (図 1A)。ChIP-seq には GFP 融合 AP2-G 発現原虫 (AP2-G の発現ピークである赤血球感染後約 18 時間の原虫) および抗 GFP 抗体を用いた。これにより標的遺伝子を同定すると共にピーク位置から統計学的に結合配列を予測した。その結果 AP2-G の結合配列として特異的な 6 塩基配列 GTACNY を同定した (図 1B)。ChIP-seq は独立して 2 回実施し再現性を確認した (図 1D)。さらに AP2-G の有する AP2 domain の結合配列の in vitro 解析を DNA immunoprecipitation sequencing (DIP-seq) により行った (図 1C)。

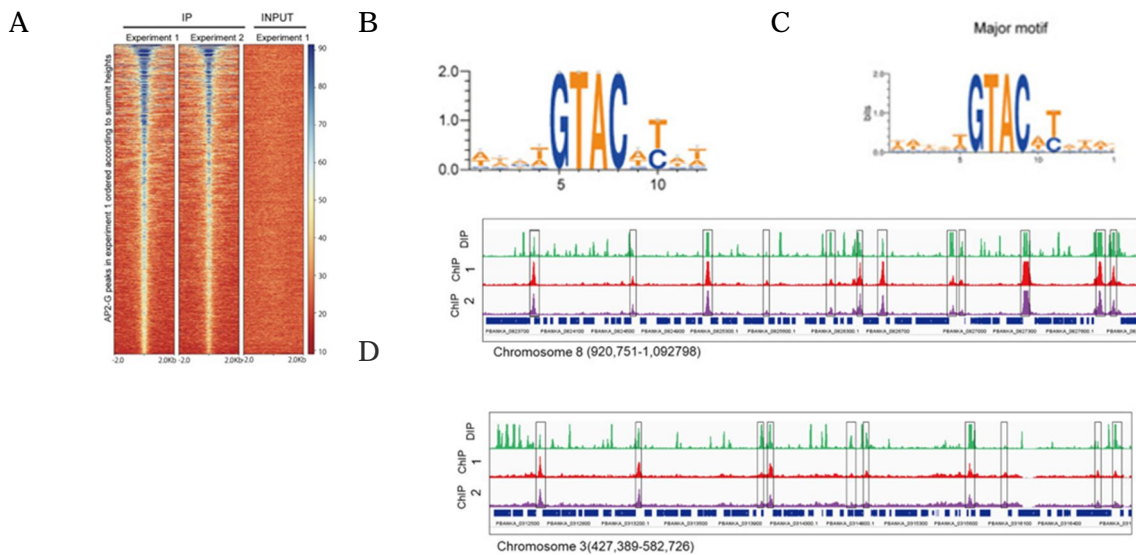


図1 AP2-G の ChIP-seq 解析および DIP-seq 解析結果

- A) 2 回の ChIP-seq の coverage map
- B) ChIP-seq 解析により予測した AP2-G 結合配列
- C) DIP-seq 解析により予測した AP2-G 結合配列
- D) ChIP-seq および DIP-seq 解析により得られた peak の一例

2 回の ChIP-seq 解析により、それぞれ 873 および 661 個の標的遺伝子を同定した。これまでの ChIP-seq 解析から得た条件 ; First methionine codon から 1200bp 以内にピークが存在することを criteria とした。それぞれ同定した遺伝子のうち 90% の遺伝子は共通しており、これら標的遺伝子の機能分類を行った (図 2)。

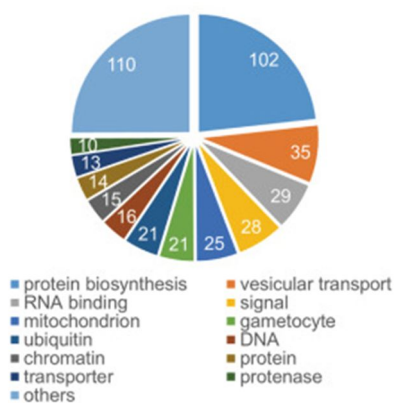
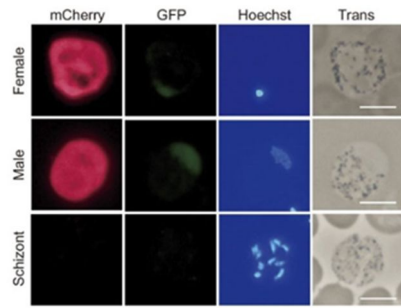


図 2 AP2-G 標的遺伝子の機能分類結果

AP2-G 標的遺伝子中に SWI/SNF family (SNF2 ATPase) の ATPase subunit をコードする遺伝子を見出し詳細な解析を行った。GFP 融合 gSNF2 発現原虫および mNEON 融合 gSNF2 発現原虫を作製し発現解析を行った結果、gSNF2 はガメトサイト期の核に発現していることが確認された (図 3A、B)。また gSNF2 欠損原虫を作製し gSNF2 遺伝子の機能解析を行った結果、gSNF2 欠損原虫は正常な雄ガメトサイトを形成することができず、蚊への伝播能は完全に失われていた (図 4A-D)。

A



B

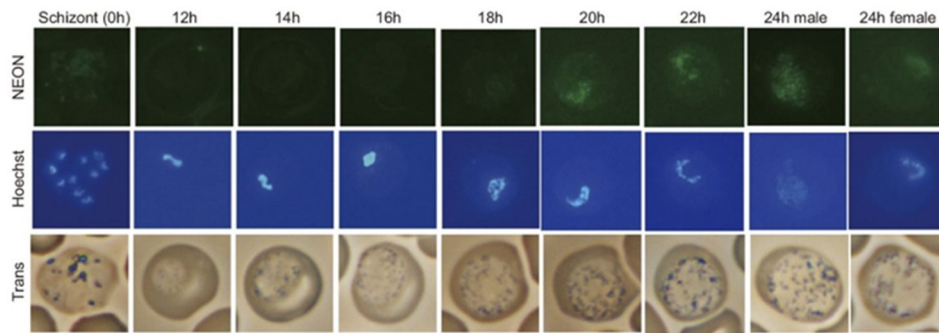
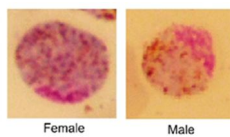


図 3 gSNF2 はガメトサイト期の核に局在する

A) gSNF2::GFP 原虫を作製し発現解析を行った結果

B) gSNF2::mNEON 原虫を作製し経時的に発現解析を行った結果

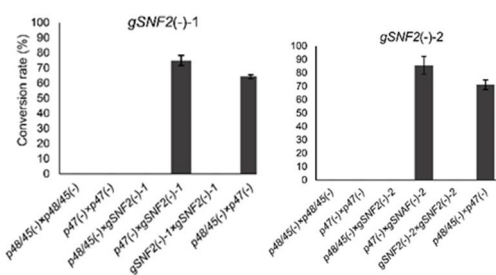
A



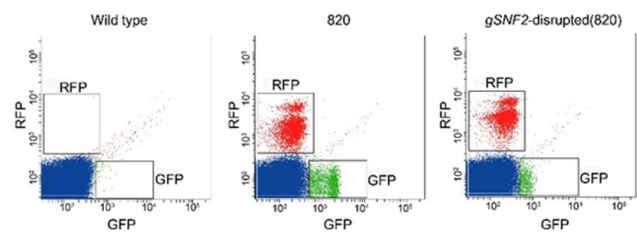
B

Parasite populations	Exflagellation	Number of oocysts per mosquito (mean ± SE)	Number of oocyst sporozoites per mosquito
<i>gSNF2(-)-1</i>	0	0	0
<i>gSNF2(-)-2</i>	0	0	0
Wild type	15	77.0 ± 31.2	57500

C



D



D

図 4 gSNF2 の機能解析結果

A) gSNF2 欠損原虫の雌雄ガメトサイト (ギムザ染色)

B) gSNF2 欠損原虫の exflagellation および蚊への感染能の解析結果

C) gSNF2 欠損原虫のかけ合わせ実験による雌雄ガメトサイトの機能解析結果

D) transgenic 820cl1m1cl1 原虫およびその gSNF2 欠損原虫を用いた flow cytometric 解析結果

次いで gSNF2 の ChIP-seq 解析を行った。ChIP-seq は独立して 2 回行い再現性のある結果を得た。それぞれの解析で 1536 および 1562 個の peak を検出しその 90%は共通してい

た(図 5A)。gSNF2 peak の統計学的解析により、summit 領域において 10 塩基および 5 塩基の 2 種類の塩基配列、TGTA YRTACA および YGTCT が高度に存在することが分かった(図 5B)。gSNF2 は 10 塩基配列を介して雌ガメトサイト遺伝子上流域に、6 塩基配列を介して雄ガメトサイト遺伝子上流域に結合していることが分かった(図 5C-D)。gSNF2 ChIP-seq により同定した標的遺伝子の機能分類を行った(図 5E)。その結果 gSNF2 は雄ガメトサイトにおいて flagella 形成や DNA 複製に関与する一連の遺伝子群の発現制御に関与することが分かった(図 5F)。

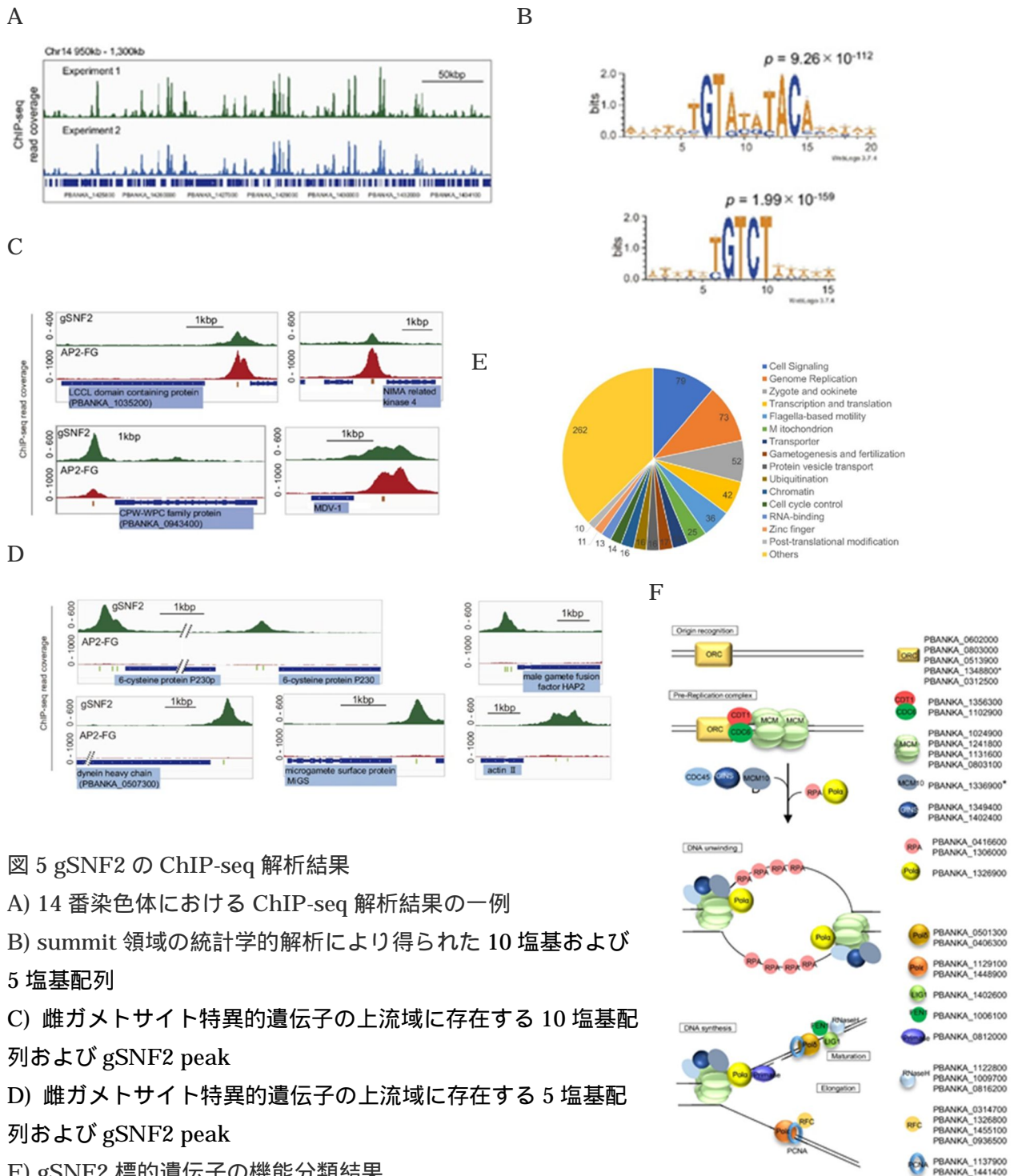


図 5 gSNF2 の ChIP-seq 解析結果

- A) 14 番染色体における ChIP-seq 解析結果の一例
- B) summit 領域の統計学的解析により得られた 10 塩基および 5 塩基配列
- C) 雌ガメトサイト特異的遺伝子上流域に存在する 10 塩基配列および gSNF2 peak
- D) 雌ガメトサイト特異的遺伝子上流域に存在する 5 塩基配列および gSNF2 peak
- E) gSNF2 標的遺伝子の機能分類結果
- F) origin recognition から DNA 合成まで一連の genome replication に関与する遺伝子群の上流域に gSNF2 は結合している

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yuda Masao, Kaneko Izumi, Murata Yuho, Iwanaga Shiroh, Nishi Tsubasa	4. 巻 84
2. 論文標題 Mechanisms of triggering malaria gametocytogenesis by AP2-G	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102403 ~ 102403
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.parint.2021.102403	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kaneko Izumi, Nishi Tsubasa, Iwanaga Shiroh, Yuda Masao	4. 巻 120
2. 論文標題 Differentiation of Plasmodium male gametocytes is initiated by the recruitment of a chromatin remodeler to a male-specific cis-element	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2303432120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2303432120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------