

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590515

研究課題名(和文) マラリア原虫転写調節領域に特異的に結合する原虫独自の因子の作用機序

研究課題名(英文) a

研究代表者

安田 加奈子(駒木加奈子)(Kanakano, Komaki-Yasuda)

独立行政法人国立国際医療研究センター・熱帯医学・マラリア研究部・室長

研究者番号：50415551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本申請研究では熱帯熱マラリア原虫独自の新規転写因子候補PREBPが原虫細胞内で転写活性化能を持ち、実際にPREBPが染色体上の転写制御領域に結合する事を証明した。さらにPREBPが制御する遺伝子の網羅的探索をおこない、複数の候補遺伝子を見出した。またPREBPタンパクのPREBPの4つのKHドメインのうち、最もN末側のもの付近に重要な活性ドメインの存在が示唆された。PREBPの一過性過剰発現をおこなった結果、増殖速度の抑制、細胞周期の延長が観察され、転写バランスの変化による影響と考えられた。一連の結果はPREBPの原虫生理における重要性、また、分子作用機序の独自性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：In this study, the transcriptional regulatory activity of the PREBP protein, a newly identified and unique protein of Plasmodium falciparum, was verified in the parasite cells. Actual binding of the PREBP to the cis-element in the parasite chromosome was indicated. A comprehensive search for the target genes of regulation by PREBP had detected several candidate genes. The PREBP protein has four putative KH domains. It had been suggested that the one of KH domains, which is the nearest to the N-terminus, might be important for transcriptional regulatory activity. In addition, the over-expression of PREBP suppressed the growth rate of parasite and prolonged the duration of parasite cell cycle. The over-expression of PREBP might disordered the balance of total gene transcription and affected on the parasite growth. These results suggested the unique functional mechanisms and physiological importance of PREBP protein.

研究分野：分子寄生虫学

キーワード：マラリア 転写因子 転写制御 ChIP-Seq KHドメイン

1. 研究開始当初の背景

熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*)の転写制御機構の分子メカニズムには未知の点が非常に多い。マラリア原虫ゲノム上には、基本転写複合体の形成に必要な基本転写因子群、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が、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のホモログは、ほとんど存在しない。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。一方、最近のバイオインフォマティクス解析によって、原虫には植物の転写因子AP-2ファミリーに類似した構造を持つタンパク群があることが見出され、これが原虫における独自の転写因子ではないか、とも考えられていた(Baraji S et al, *Nucleic Acids Res.* 33:3994-4006, 2005; Yuda M et al. *Mol. Microbiol.*, 71:1402-1414., 2009)。このような状況のもと、申請者は赤血球内寄生期の *house keeping gene* のモデルとして、抗酸化タンパク質 *pfl-cys-prx* 遺伝子の転写制御機構を解析してきた。その結果、(i) *pfl-cys-prx* 遺伝子の5'領域にエンハンサーとして作用する *cis-element* が存在し、そこに特異的に結合する核内因子が存在すること、(ii) *pfl-cys-prx* 遺伝子の5'領域はヒストンア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おり、その時 *pfl-cys-prx* 遺伝子の *cis-element* には、ヒストンアセチル基転移酵素 PfGCN5 がリクルートされていることがわかった (Komaki-Yasuda K et al, *Mol. Biochem. Parasitol* 162: 40-45, 2008)。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、*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た。

続けて申請者は *pfl-cys-prx* 遺伝子の *cis-element* に特異的に結合する核内因子の同定をおこなった。培養原虫の核抽出物よりから5段階のクロマトグラフィーを経て目的の因子を精製、LC/MS/MSによる質量解析をおこなった結果、*cis-element* の配列に特異的な結合活性を認めるタンパクを同定した。この因子はデータベース上では "hypothetical protein" として登録されていた (PlasmoDB:PF10_0115; 以下、Prx regulatory element binding protein: PREBP とする)。PREBP は既知の原虫の転写因子候補である AP-2 ファミリーには属さない新規のタンパクであり、新しい原虫独自の転写因子である可能性が高い。PREBP の構造上の特徴としては KH ドメインと呼ばれる RNA あるいは single strand DNA に結合することが報

告されているドメインが4箇所あることがあげられ、PREBP はこのドメインを介して *cis-element* を認識している可能性がある。

2. 研究の目的

以上の背景を受けて本申請研究では、これまでの研究によって同定された、*prx* 遺伝子の *cis-element* に特異的に結合する DNA 結合因子 PREBP の転写制御における作用機序を更に詳細に解析することによって原虫の転写制御の独自性を解明することを目指した。具体的には i) PREBP の転写活性化能を明らかにする。ii) PREBP 過剰発現あるいは遺伝子欠損原虫を用いて原虫の転写制御における役割を評価する。iii) PREBP が *pfl-cys-prx* 以外に制御する遺伝子群を明らかにすることによって、PREBP の原虫生理における役割を明らかにする。vi) さらに PREBP がどのように AT 含量の高いプロモーター領域中の *cis-element* を認識するのかについての構造学的解析の準備段階として、PREBP タンパク中の活性に重要な機能ドメインを明らかにする。以上の研究から原虫転写制御の独自性を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) PREBP の転写活性化能の確認

PREBP の transient な過剰発現系を利用して、PREBP の転写活性化能を証明する目的でレポーターアッセイをおこなった。レポーターアッセイに用いたプラスミド上には *pfl-cys-prx* の 5' 領域のコントロール下にホタルルシフェラーゼ (F-luc) を発現させる発現カセットと、PREBP を過剰発現させる発現カセットが両方存在するように設計した (図1)。このプラスミドおよびプラスミド導入効率コントロールとして、レニラ由来のルシフェラーゼ (R-luc) を過剰発現させるためのプラスミドを同時にエレクトロポレーションによって培養熱帯熱マラリア原虫に導入し、24 時間後にデュアルルシフェラーゼアッセイ (プロメガ) をおこない、ルシフェラーゼの発現を定量的に測定した。

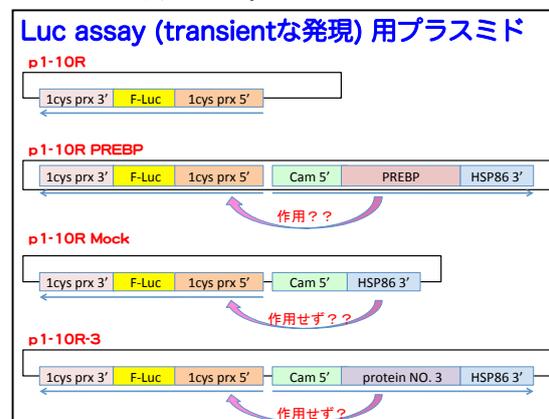


図1: PREBP の転写活性能評価のためのルシフェラーゼアッセイに用いたプラスミドの構造

(2)PREBP タンパクの細胞内局在の確認

熱帯熱マラリア原虫を同調培養し、リング期、およびトロホゾイト期-シズント期に調製した原虫をそれぞれ細胞質画分と核画分に分け、それぞれに対して抗 PREBP 抗体を用いた免疫沈降をおこない、沈降画分を SDS-PAGE によって展開、ウエスタンブロット解析をおこなった。ウエスタンブロットの検出には抗 PREBP 抗体を用いた。

(3)PREBP の染色体上の局在の確認

トロホゾイト期-シズント期に同調培養をした熱帯熱マラリア原虫を材料に、抗 PREBP 抗体によるクロマチン免疫沈降(ChIP)をおこなった。沈降産物を材料に、PREBP のターゲットと考えられる *pfl-cys-prx* 遺伝子付近に設計した PCR プライマーを用いて、リアルタイム PCR をおこない、沈降産物量を定量的に評価した。

(4)PREBP による制御を受ける遺伝子群の探索

項目(3)で得た抗 PREBP 抗体による ChIP 産物より、Illumina 社の TruSeq ChIP Sample Prep Kit を用いて次世代シーケンサー解析用のライブラリを作成し、Illumina 社の次世代シーケンサー-MiSeq によって解析した。得られたリードのデータについて CLC genomics workbench ソフトウェアの ChIP-Seq 解析プログラムによって解析し、PREBP が特異的に結合している領域の候補を絞り込んだ。

(5)PREBP タンパクの機能ドメインの探索

PREBP タンパクのどの部分が転写活性化に重要かを探索する為に、項目(1)で作成したルシフェラーゼアッセイ用のプラスミドの PREBP 過剰発現カセット部分の PREBP の ORF に相当する部分を N 末側から削っていったプラスミドのシリーズを作成、これらのプラスミドを用いて項目(1)と同様のデュアルルシフェラーゼアッセイをおこなった。

(6)PREBP 時期特異的過剰発現マラリア原虫の作成

PREBP 過剰発現が、原虫に与える影響を解析する目的で、Clontech 社の ProteoTuner Shield システムを用いて PREBP 過剰発現原虫を作成した。このシステムでは、標的タンパク質は不安定化ドメイン (DD) と融合された状態で発現され、これは速やかに分解される。そこに低分子リガンド Shield1 を添加すると、DD を介した分解が抑制され、標的タンパク質が発現される。PREBP 遺伝子に DD に相当する配列を付加したものを過剰発現用ベクターに挿入し、これを原虫に導入した。プラスミドを安定的に保持する原虫をピリメタミンによって選択し、限界希釈によって原虫株をクローン化した。この原虫の培養中に 0.5 μ M Shield1 を添加し、非添加時と比較した増殖率の差異を観察した。

4. 研究成果

(1)PREBP の転写活性化能の確認

方法の(1)で作成したプラスミドを原虫に導入し、ルシフェラーゼアッセイをおこなった結果、PREBP を発現しているプラスミドの導入は、ネガティブコントロール (過剰発現カセットに遺伝子を持たないプラスミドおよび、無関係なタンパク (protein No. 3) を過剰発現するプラスミド) と比較して、20 倍以上のルシフェラーゼの発現増強が認められた。以上の結果から PREBP が *pfl-cys-prx* の 5'領域に作用して転写の活性化を促すことが示され、PREBP が転写活性化能を持つ、原虫の新規転写因子であることが証明された (図 2)。PREBP は他種の生物で既知の転写因子とは全く相同性を持たない全く新規の転写因子である。PREBP は *Plasmodium* 属、および一部のアピコンプレクサ門の寄生原虫にのみ保存されている原虫独自の因子でもあった。

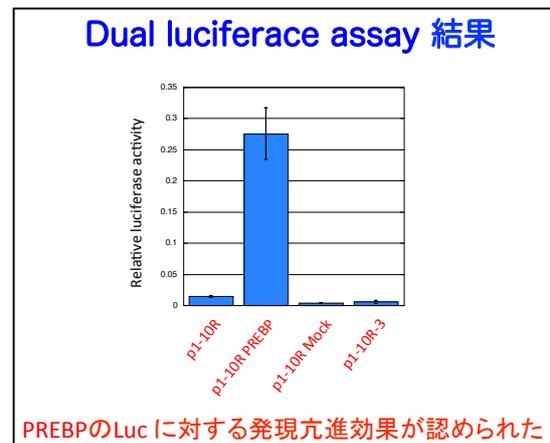


図 2 : PREBP の転写活性能を評価するためのルシフェラーゼアッセイの結果

(2)PREBP タンパクの細胞内局在の確認

リング期および、トロホゾイト-シズント期に調製した熱帯熱マラリア原虫の細胞質画分および、核画分を材料に抗 PREBP 抗体を用いた免疫沈降-ウエスタンブロット解析をおこなった。その結果、トロホゾイト-シズント期の原虫由来の核抽出物を材料とした時に、PREBP の予測分子量と一致する 130 kDa 付近に明瞭な二本のバンドが検出され、この結果から PREBP タンパクはトロホゾイト-シズント期の核内に局在することが明らかとなった (図 3)。これは PREBP がトロホゾイト-シズント期に特異的に発現する遺伝子である *pfl-cys-prx* の 5'領域に作用して転写の活性化をおこなう、という結果とよく一致するものであった。また、バンドが二本みとめられたのは PREBP タンパクが何らかの修飾による制御を受けるため、と考えられた。

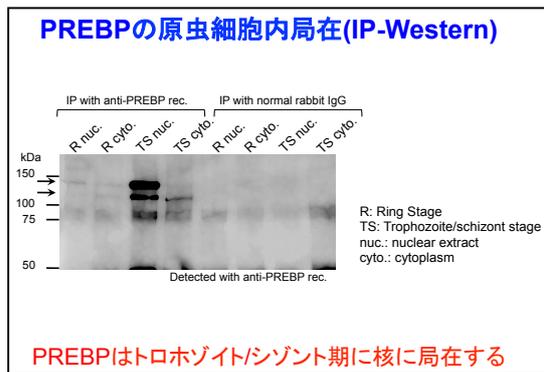


図 3 : PREBP の細胞内局在の免疫沈降/ウエスタンブロットによる解析

(3)PREBP の染色体上の局在の確認

PREBP に対する特異的抗体を用いたクロマチン免疫沈降(ChIP)をおこない、リアルタイム定量 PCR で解析した結果、トロホゾイト-シズント期原虫の核内の染色体上で PREBP が *pf1-cys-prx* 遺伝子の *cis*-element と結合していることが示された(図 4)。この結果によって、実際の染色体上で PREBP が *pf1-cys-prx* の発現を調節していることが示唆された。

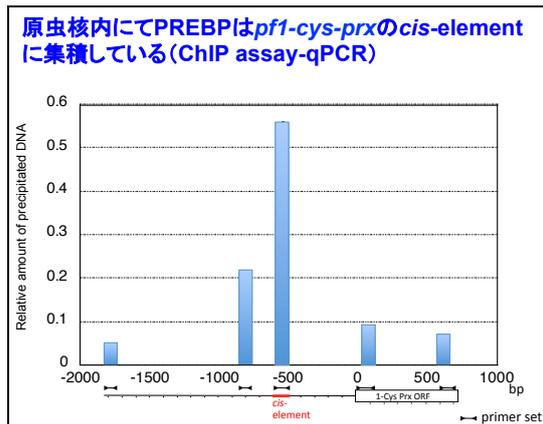


図 4 : PREBP タンパクの *pf1-cys-prx* 遺伝子付近への集積のクロマチン免疫沈降による解析

(4)PREBP による制御を受ける遺伝子群の探索

さらに、ChIP によって得られた DNA を次世代シーケンサーによって網羅的に解析(ChIP-Seq)した。その結果いくつかの遺伝子の 5'領域に PREBP の結合の結果と考えられるリードの集積を認めた。これらの遺伝子は PREBP によって制御される、*pf1-cys-prx* 以外の遺伝子の候補と考えられる。現在までに PF3D7_0818900 heat shock protein 70 (HSP70)、PF3D7_0818300 dynactin subunit 6, putative、PF3D7_0819700 conserved Plasmodium protein, unknown function、PF3D7_0821100 protein kinase 1 (PK1) の 4 つの遺伝子の 5'領域が PREBP が結合する領域の候補として見出さ

れている。現在、これらの遺伝子の発現が実際に PREBP による制御を受けているのか検討を進めている。

(5)PREBP タンパクの機能ドメインの探索

PREBP は構造上の特徴として、4 つの推定 K homology (KH) domain を持つ。これらの domain を N 末側から順番に欠損させた PREBP 変異体の原虫細胞内での転写活性化能を、項目(1)と同様のルシフェラーゼアッセイによって解析したところ、PREBP の転写活性化能には C 末側から 1 つ目の KH domain のみが重要であることが示唆された(図 5)。この部分は典型的な KH domain とのホモロジーが低く、原虫における新規 DNA 結合 domain である可能性がある。今後この部分の構造学的解析により、原虫転写因子が極端に AT 含量の高いプロモーター領域から特異的にエンハンサーを認識する独自の機構が解明される可能性がある。

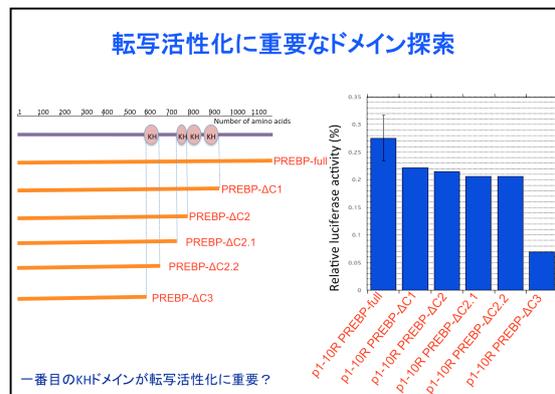


図 5 : PREBP タンパクの N 末端からの欠損変異体を用いた転写活性化能の解析

(6)PREBP 時期特異的過剰発現マラリア原虫の作成

PREBP の細胞内における機能解析を目的に PREBP の過剰発現原虫作成を試みた。まず、通常のマラリア原虫で汎用されている過剰発現用ベクターの遺伝子発現カセット部位に PREBP 遺伝子の ORF を挿入したプラスミドを作成し、原虫に導入し、薬剤によってプラスミド導入原虫の選択を試みたが複数回の試行によっても安定発現株が樹立できなかった。このことによって PREBP の過剰発現が原虫の生育に抑制的な影響をもたらす可能性が考えられた。

そこで Clontech 社の ProteoTuner Shield システムを用いて PREBP の一過性過剰発現原虫を作成した。この系の原虫培養中に低分子リガンド Shield1 を添加して PREBP の過剰発現を誘導し、原虫増殖率を 7 日間にわたって観測した結果、原虫増殖速度抑制が認められた(図 6)。

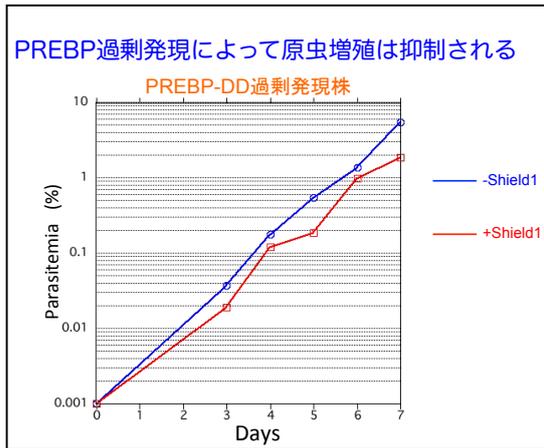


図6：PREBP一過性過剰発現株においてShield1添加時（過剰発現時）と非添加時の増殖率の比較

さらに詳しく原虫増殖抑制の実態を調べる目的で、赤血球侵入後4時間以内に同調した一過性過剰発現原虫の培養中にShield1を加え、細胞周期が一周して次のリング期が現れるタイミングについて観察をおこなったところ、非添加時と比較して、2~3時間の細胞周期の延長が観察された(図7)。今後、この細胞周期の延長がPREBPの過剰発現による遺伝子発現バランスの変化によるものなのか、トランスクリプトームによる解析をおこなう。

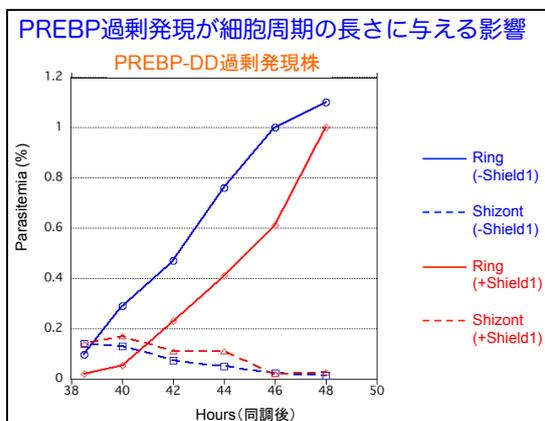


図7：PREBP一過性過剰発現株においてShield1添加時（過剰発現時）と非添加時での、シizont期からリング期への発育のタイミングの比較

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 2 件)

- Komaki-Yasuda K., Okuwaki M., Nagata K., Kawazu S., Kano S.: Identification of a Novel and Unique Transcription Factor in

the Intraerythrocytic Stage of *Plasmodium falciparum*. **PLOS One** 8:e74701, 2013.

- Kimura R., Komaki-Yasuda K., Kawazu S., Kano S.: 2-Cys peroxiredoxin of *Plasmodium falciparum* is involved in resistance to heat stress of the parasite. **Parasitology International** 62:137-143, 2013.

[学会発表] (計 4 件)

- 駒木-安田加奈子, 狩野繁之: マラリア原虫新規転写因子 PREBP による制御を受ける遺伝子群の探索 第84回日本寄生虫学会、2015年3月22日、杏林大学
- 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の新規転写因子 PREBP の性状 第83回日本寄生虫学会、2014年3月27日、愛媛大学
- 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の新規転写因子 PREBP (Prx regulatory element binding protein)の活性の解析 第82回日本寄生虫学会、2013年3月30日、東京医科歯科大学
- 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の *pfl-cys-prx* 遺伝子の 5'領域 cis-element に結合する新規核内因子は転写の活性化に關与する 第72回日本寄生虫学会東日本支部大会・第7回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会、2012年10月13日、群馬大学

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.rincgm.jp/department/lab/01/>

<http://www.rincgm.jp/?release=熱帯熱マラリア原虫の赤血球内ステージで作用す>

<http://www.rincgm.jp/?youth=若手研究者の声1>

6. 研究組織

(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