

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25253027

研究課題名(和文) セクレトームに基づくマラリア肝臓ステージの宿主寄生虫間相互作用の解明

研究課題名(英文) secretome analysis of liver stage malaria parasites

研究代表者

油田 正夫 (yuda, masao)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：90293779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,200,000円

研究成果の概要(和文)：マラリア原虫は宿主である肝細胞の機能を巧みに制御し自身の生存に有利な環境を構築していると考えられる。この制御を分子レベルで理解することはマラリア原虫の感染を阻止する新たな戦略につながる。とりわけ肝細胞内に輸送される原虫タンパク質はこの制御の中心になっている可能性が高く重要である。本研究では、肝細胞内に輸送される原虫タンパク質群(セクレトーム)を同定することを目的として、NGSを用いた遺伝子大量解析を実施した。

研究成果の概要(英文)：Liver stage malaria parasites establish environments suitable for their survival by manipulating the host hepatocyte. To understand molecular mechanisms of this control may lead to development of strategies to prevent malaria infection of humans. Parasite proteins exported to the host hepatocyte would have a central role in this control. In this study we performed mass sequencing analysis in this stage in order to identify whole proteins exported to the host hepatocyte (secretome).

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア 肝臓感染

1. 研究開始当初の背景

マラリア原虫肝臓ステージの宿主である肝実質細胞(肝細胞)は免疫や代謝など多様な機能を有する。マラリア原虫はこれらの機能を巧みに制御し自身の生存・増殖に有利な環境を構築し感染を確立していると考えられる。この制御を分子レベルで理解することはマラリア原虫の感染を阻止する新たな戦略につながる。しかしながらその研究はほとんど進んでいない。

肝臓ステージの研究が進まない原因は、遺伝子発現解析に必要な数の原虫が得られないことに尽きる。肝臓内には圧倒的多数の非感染肝細胞が存在しており感染細胞のみを精製することは極めて困難である。加えて原虫は肝細胞に比してあまりに小さく、試料に大量の宿主細胞由来 RNA が混入することは避けがたい。

これまでの研究で研究代表者は、感染肝細胞をセルソーターで精製するという手法で肝臓ステージの EST データベース(感染後 31 時間、約 3000 ESTs)を世界に先駆けて構築した。またこのデータベースを用いて肝臓への寄生に関与する原虫遺伝子を探索し LISP1(Liver-specific Protein 1)、LISP2 と命名した肝臓ステージ特異的蛋白質(Orito, Y et al. 2012; Ishino, T et al. 2009)及びこれらの遺伝子の発現に関わると推測される肝臓ステージ特異的転写因子 AP2-L(Iwanaga, S et al. 2012)の同定に成功した。しかしながらこの EST データベースも未だトランスクリプトームと呼ぶには程遠く、本ステージの全体像を捉えるには至らなかった。また最初期の肝臓ステージの精製は極めて困難であり、研究を進めるためには新たな手段が必要となった。

そこで研究代表者は次世代シーケンサー(NGS)を用いた cDNA 大量解析法(RNA-Seq 法)を肝臓ステージに応用すればこの壁が克服出来るのではないかと考えた(方法の項参照)。一方研究代表者は上に述べた LISP2 研究の過程で感染初期の肝細胞内へ大量の原虫蛋白質が輸送されること、またこれらの蛋白質を宿主細胞内に輸送する小胞による大量輸送システムが存在することを見出した(Orito, Y et al. 2012)。さらに LISP2 ノックアウト原虫を用いた解析から、LISP2 が欠損するとメロゾイト産生数が野生型の数十分の一に低下することがわかった。これらの結果から肝臓ステージのマラリア原虫が(赤血球ステージと同様に)多数の原虫蛋白質を宿主細胞内に送り込んで宿主細胞を制御していることが明らかになった。研究代表者は以上の知見に基づき、NGS を用い肝臓ステージのトランスクリプトームを解析することができると確信した。またそれを手掛かりとしてマラリア原虫のセクレトームを解明し、マラリア原虫と宿主肝細胞の分子レベルでの相互作用に迫ることが出来ると考えた。

2. 研究の目的

肝臓ステージはワクチンなどマラリア感染阻止の標的として最重要なステージであるが、その寄生の分子機構はほとんど解明されていない。一方研究代表者らの最近の研究により初期肝臓ステージの産生する多数の蛋白質が宿主肝細胞内に輸送されること、さらにこれらの蛋白質がマラリア原虫の肝細胞寄生に極めて重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。本研究はこれらの発見に基づき、肝臓細胞内に輸送される原虫タンパク質群(肝臓ステージ secretome: セクレトーム)を同定すること、輸送された個々の原虫蛋白質と相互作用する宿主側分子を網羅的に探索し肝臓寄生の分子基盤を解明することを目的とする。NGS を用いた遺伝子大量解析法は様々な研究分野でブレイクスルーをもたらしている。本研究は NGS による遺伝子大量解析技術をマラリア原虫の肝臓感染ステージに応用しこれまで最も大きな研究の壁であった“精製”の問題を克服することが第一の独創的な点である。本研究は世界で初めての本格的な肝臓ステージ遺伝子発現解析の試みであり、この研究データの公開は肝臓ステージの研究環境を劇的に改善するだろう。また本ステージは強力な感染阻止免疫が誘導されることが知られており、セクレトーム解明はワクチン開発者にとって極めて重要な抗原情報となる。本研究がワクチン開発に繋がればその波及効果は極めて大きい。以上のように、本研究は基礎研究、応用研究双方にインパクトを与えるに違いない。

3. 研究の方法

RNA-Seq 法によるトランスクリプトーム解析

100 万から 500 万の唾液腺由来スポロゾイトをラットに静注し、静注後 24 時間、36 時間、48 時間、58 時間の各時間に肝臓を PBS で還流し摘出した。感染肝組織から total RNA を抽出し ribosomal RNA 除去試薬(RiboZERO)でラット由来 ribosomal RNA を除去した。調製した RNA よりライブラリーを作成し SOLID 5500 system で配列を解析した。得られた配列データからマラリア原虫及びラットの rRNA, tRNA をフィルタリングして除いた後、マラリア原虫ゲノム配列とラットゲノム配列を合わせた仮想ゲノム上にマッピングした。マラリアゲノム上に 60 塩基完全マッチでマップされたリードのみを最終的に解析に使用した。

ChIP-seq 法による AP2-L 標的遺伝子の同定

ChIP-seq は GFP 融合蛋白を発現する組み換え原虫を用いて行った。感染細胞をパラフォルムアルデヒド(最終濃度 1%)で 1 時間固定した。固定した細胞を lysis buffer に溶解し、さらに Bioruptor を用いて超音波によりクロマチンを可溶化・破砕した。上清に抗 GFP 抗

体を結合させた磁性粒子を加え overnight で incubation した後、磁性粒子に結合したクロマチンを洗淨後し、DNA を回収した。DNA の末端にアダプターを付加し PCR で増幅しライブラリーとした。配列は ABI SOLID システムまたは illumina Next-seq システムで解析した。得られたリード配列は P. berghei ゲノム上に Bowtie を用いてマッピングした。マッピングしたデータから MACS2 を用いてピークを検出した。標的遺伝子の同定は独自に作成したスクリプトを使用して実施した。

人工染色体によるセクレトーム解析

マラリア原虫人工染色体を用いて各遺伝子を蛍光蛋白融合蛋白質として発現させ実際に宿主細胞に輸送されることを確認した。本研究では感染細胞の特定を容易にし、また原虫細胞内と細胞外の区別を付けやすくする為、マラリア原虫は GFP 発現原虫株 P. berghei ANKA 507c11 株を用い、目的蛋白質は赤色蛍光蛋白 mCherry との融合蛋白質(C末端側)として発現させた。上流 1-1.5kbp 程度の制御領域配列と蛋白コーディング部分を含めた全体を PCR でゲノムから一度に増幅し、人工染色体ベクター Pcen-mCherry にサブクローニングし、mCherry 融合蛋白質の発現コンストラクトを作成した。次に血液ステージの原虫に人工染色体コンストラクトを導入し蚊に感染させスポロゾイトを作成した。肝臓ステージを HepG2 細胞で培養し共焦点レーザー顕微鏡で局在を観察した。

4. 研究成果

RNA-seq によるトランスクリプトーム解析

感染後 24 時間の原虫の遺伝子発現解析では、1 ランで 36 万リードのマラリア原虫由来配列が得られた。表 1 に感染後 24 時間の発現遺伝子のうち発現量の多い 20 遺伝子の ID とそれらの遺伝子における分泌シグナルの有無を示した。その他のステージでは 1 ランで 100 万リードに達した。そこで全体のリード数をそろえるため、感染後 24 時間では 3 ランの解析を実施した。24 時間は trophozoite から初期 schizont, 36 時間は中期 schizont, 48 時間は後期 schizont から cytomere, 58 時間は成熟 merozoite にそれぞれ相当する。得られたリード数のステージによる違いはこの間の原虫細胞の成長とシゾゴニーによる細胞数の増加を反映していると考えられる。

これまでの肝臓ステージのトランスクリプトームは我々が数年前に実施した EST 解析のみであった。この EST データは感染後 31 時間で取得されたものでありまた約 3000 のリードからなっていた。これに対し今回のデータは 100 万以上のリードからなり、かつより早期の感染後 24 時間のステージでも取得に成功している。また今回のトランスクリプトームはマウスの肝臓を直ちに固定したサンプルから得られたものであり、セルソーテ

ィングなどの操作を加えておらず、実際の感染時の遺伝子発現を正確に反映していると考えられる。加えてトランスクリプトームをステージごとに取得したことで、遺伝子のプロファイリングを可能にした。今回の研究により得られたデータからは肝臓ステージで初めての本格的なトランスクリプトームデータベースが構築可能である。このデータベースはマラリアワクチンの重要な標的ステージでもある肝臓ステージの研究にとって貴重なリソースとなることが期待される。

表 1

PBANKA_132640	
PBANKA_080570	
PBANKA_031450	
PBANKA_134930	signal+
PBANKA_132090	
PBANKA_094360	
PBANKA_121430	
PBANKA_091810	
PBANKA_140680	
PBANKA_050120	signal+
PBANKA_091800	
PBANKA_061910	
PBANKA_145610	
PBANKA_135450	
PBANKA_133190	
PBANKA_070910	
PBANKA_094150	
PBANKA_134010	signal+
PBANKA_031560	
PBANKA_132500	

構造解析とプロファイリング

得られた全体のリード数と各遺伝子 ORF の長さからステージごとに RPKM 値(Reads Per Kilobase of exon model per Million mapped reads) を算出し、データを標準化した。さらに遺伝子を発現パターンに従いクラスタリング(グループ分け)し分類した。解析が正しく行えたか確認するため 36 時間後から 58 時間にかけて発現が上昇する遺伝子の種類を調べた。この時期にはメロゴニーが進行し最終的に数千個のメロゾイトが一個の肝臓

ステージの内部で形成される。このグループの遺伝子の中には既知のメロゾイト表面タンパクやロプトリープロテイン、滑走運動関連タンパク、運動ステージに特有の構造蛋白等メロゾイト期に発現される遺伝子が含まれていた。従ってこの結果は遺伝子発現のデータが正しく取得され解析されていることを示唆した。

一方これより早期のステージでは肝臓ステージ特異的に発現されていることが知られている遺伝子、LISP1, LISP2, UIS3, UIS4などが大量に検出された。意外なことにこれまでスポロゾイト期に発現後さらに肝臓ステージでも引き続き発現されると考えられていたタンパク質である *circumsporozoite protein* の遺伝子はその発現が全く観察されなかった。この結果はこの分子はすべてスポロゾイトステージで発現され、その後は転写されないということの意味した。*circumsporozoite protein* は肝臓ステージの有望なワクチン抗原として知られている。この結果は1. スポロゾイトのタンパク質も肝臓ステージに一部は持ち越され肝臓ステージで抗原として提示される、2. この分子の抗原としての働きはほとんどがスポロゾイトステージに由来する。という2つの可能性を示唆している。

分泌蛋白候補の同定

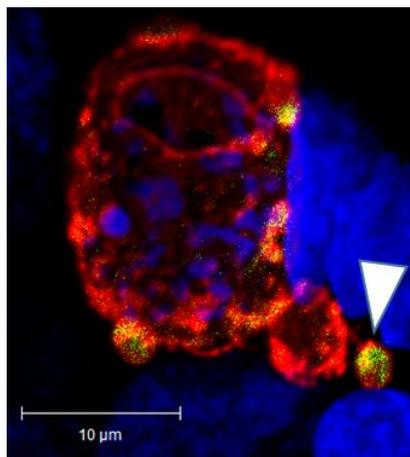
これまでに LISP2 などの遺伝子で qPCR を行い定量した結果では分泌蛋白質は感染後 24 時間と 36 時間で発現ピークを形成し発現はその後急激に減少する。この発現プロファイルは肝臓ステージ内での分泌小胞の存在時期とよく一致している。そこで、この時期に発現がピークに達する遺伝子をプロファイリングにより同定し、さらに構造解析によりシグナル配列を持つ分子をその中から選別し分泌タンパク質候補とした。またシグナル配列に加えて膜貫通領域を持つ分子も宿主細胞膜上に輸送される可能性を持つためセクレトームの候補として選択した。24 時間と 36 時間を中心に発現ピークを有する遺伝子は合計約 100 個同定され、そのうちでシグナル配列を持つ分子を分泌タンパク質候補とした。この中には上記の既知の肝細胞ステージ遺伝子 LISP1, LISP2, UIS3, UIS4 も含まれていた。

人工染色体によるセクレトーム解析

同定された分泌タンパク質の候補遺伝子を人工染色体に組み込み組み換え原虫を作製した。スポロゾイトを HepG2 細胞に感染させ感染後 36 時間から 48 時間で局在を観察した。その結果原虫細胞外に輸送される複数のタンパク質の遺伝子を同定した。共焦点レーザー顕微鏡により得られた観察像からこれらの分子はいったん寄生胞上に輸送され、さらに寄生胞から連続して形成された何らかの構造上に移送されることが分かった。図 1

に遺伝子 A の解析によって得られた画像を示す。矢印は寄生胞から連続して形成された構造を示す。一方これらの遺伝子のうちには LISP2 の様に大量に発現され宿主細胞質内に直接輸送されるものは現時点では見つからない。LISP2 以外にも同様の挙動を示す遺伝子は存在すると考えており、現在さらにトランスクリプトームの解析を進めている。同定された遺伝子については現在その機能解析を実施している。

図 1



ChIP-seq 法を用いたマラリア原虫転写因子の標的遺伝子の同定法の開発

これまでの研究でマラリア原虫の転写因子がステージ特異的に発現していること、また各ステージで発現される転写因子の数は極めて少数ではがって1個の転写因子の標的遺伝子はそのステージのトランスクリプトームのほとんどを反映している可能性があることが明らかになってきた。我々はまず調製できる細胞数が多く解析が比較的容易と考えられる生殖母体及びオオキネートステージの転写因子 AP2-0 と AP2-G2 において ChIP-seq を実施し、標的遺伝子の同定を試みた。

オオキネートの転写因子 AP2-0 では 18 時間培養したオオキネートを用いて ChIP-seq を実施した。約 1000 万のリードが *P. berghei* ゲノム上にマップされ、これをもとに約 650 の標的遺伝子が同定された。これらの標的遺伝子には既知のオオキネートステージの遺伝子のほぼすべてが含まれており、1 個の転写因子がそのステージ全体の遺伝子発現パターンを決定するというマラリア原虫に特有の転写制御の仕組みが初めて明らかになった。この結果はステージ特異的な転写因子の ChIP-seq により当該ステージにおける遺伝子発現を解明することができる可能性を示し、のちに記述する肝臓ステージ特異的転写因子 AP2-L の標的遺伝子の ChIP-seq 解析につながった。

生殖母体ステージでは sulfadiazine で処理し asexual ステージの原虫を除去したマウ

スの血液を出発材料として AP2-G2 の ChIP-seq を実施した。本ステージでは予想外に多数の遺伝子が標的遺伝子として同定された。さらにこれらの標的遺伝子は生殖母体ステージ特異的遺伝子をほとんど含まなかった。これらの結果は予想された結果とは大きく異なるものであった。しかしながらマイクロアレイによる発現解析などから最終的に AP2-G2 がリプレッサーであることが分かり矛盾は解消された。すなわちこの転写因子が asexual ステージで発現される遺伝子を抑制することで生殖細胞への正常な移行が完了することが分かった。この結果は生殖母体形成における遺伝子発現調節機構の一端を解明した。

ChIP-seq 法による AP2-L 標的遺伝子の同定

我々はすでに肝臓ステージの転写因子 AP2-L を同定していた。そこで肝臓ステージでの遺伝子発現を解析することを目的として ChIP-seq 法で AP2-L の標的遺伝子を同定することを試みた。生殖母体及びオオキネートステージで実施した ChIP-seq では 1 億前後の原虫を出発材料としていた。肝臓ステージは肝臓内では極めて少数でこれを材料として ChIP-seq を実施することは不可能であった。従って HepG2 細胞を用いて培養条件下で肝臓ステージを作製し出発材料とした。P. berghei では培養下でも半数近くがメロゾイトまで develop する条件が近年確立された。従ってこの条件を用い実験を実施した。得られたリードをゲノム上にマッピングした結果約 1000 万のリードが P. berghei のゲノムにマッチした。これらのリードからピークを検出したところ約 1200 のピークが得られた。このピークから転写因子の結合配列を統計解析により推定したところ 5 塩基の結合配列が推定された。次にピークの位置から標的遺伝子を同定した。上流 1200 塩基内に AP2-L が結合している遺伝子を標的遺伝子とした場合約 600 遺伝子が標的遺伝子として同定された。これらの遺伝子の中には LIS1, LIS2 などの既知の肝臓ステージの遺伝子がすべて含まれこの転写因子が肝臓ステージのマスター転写因子として機能していることを示唆した。またこの結果は本転写因子がアクチベーターとして機能していることも証明した。ターゲットには UIS3, UIS4 等スポロゾイトですでに転写されている遺伝子も含まれており、これらの遺伝子の転写は引き続き行われていることが分かった。現在 RNA-seq のトランスクリプトームデータとの比較を実施しているが、感染後 24 時間と比較する限り感染初期に大量に発現されている遺伝子のほとんどが AP2-L のターゲットであった。また感染後期の RNA-seq データのうち、少なくともメロゾイト期特異的な遺伝子に関しては一部の例外を除きターゲットには含まれず、AP2-L がステージ特異的な転写に関わっていることが証明できた。以上の様

に標的遺伝子とトランスクリプトームから得られる情報はそれぞれ異なっている。従って両者の比較から本ステージにおける転写機構の詳細が今後明らかになると期待できる。

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 11 件)

1. Li X, Huang J, Kaneko I, Zhang M, Iwanaga S, Yuda M, Tsuji M. (2017) A potent adjuvant effect of a CD1d-binding NKT cell ligand in human immune system mice. *Expert Rev Vaccines*. 査読有
2. Zhang M, Kaneko I, Tsao T, Mitchell R, Nardin EH, Iwanaga S, Yuda M, Tsuji M. (2016) A highly infectious Plasmodium yoelii parasite, bearing Plasmodium falciparum circumsporozoite protein. *Malar J.* : 15(1):201. 査読有
3. Yuda M, Iwanaga S, Kaneko I, Kato T. (2015) Global transcriptional repression: An initial and essential step for Plasmodium sexual development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 13;112(41):12824-12829. 査読有
4. Kaneko I, Iwanaga S, Kato T, Kobayashi I, Yuda M. (2015) Genome-Wide Identification of the Target Genes of AP2-O, a Plasmodium AP2-Family Transcription Factor. *PLoS Pathog*. 27;11(5):e1004905. 査読有
5. Zhao H, Aoshi T, Kawai S, Mori Y, Konishi A, Ozkan M, Fujita Y, Haseda Y, Shimizu M, Kohyama M, Kobiyama K, Eto K, Nabekura J, Horii T, Ishino T, Yuda M, Hemmi H, Kaisho T, Akira S, Kinoshita M, Tohyama K, Yoshioka Y, Ishii KJ, Coban C. (2014) Olfactory plays a key role in spatiotemporal pathogenesis of cerebral malaria. *Cell Host Microbe*. 14;15(5):551-563. 査読有

6. Iwanaga S, Isawa H, Yuda M. (2014) Horizontal gene transfer of a vertebrate vasodilatory hormone into ticks. *Nat Commun.* 5:3373. 査読有
7. Chang J, Oikawa S, Iwahashi H, Kitagawa E, Takeuchi I, Yuda M., Aoki C, Yamada Y, Ichihara G, Kato M, Ichihara S. (2014) Expression of proteins associated with adipocyte lipolysis was significantly changed in the adipose tissues of the obese spontaneously hypertensive/NDmcr-cp rat. *Diabetol Metab Syndr.* 27;6(1):8. 査読有
8. Kimura K, Kimura D, Matsushima Y, Miyakoda M, Honma K, Yuda M., Yui K. (2013) CD8+ T cells specific for a malaria cytoplasmic antigen form clusters around infected hepatocytes and are protective at the liver stage of infection. *Infect Immun.* 81(10):3825-3834. 査読有
9. Niikura M, Inoue S, Mineo S, Yamada Y, Kaneko I, Iwanaga S, Yuda M., Kobayashi F. (2013) Experimental cerebral malaria is suppressed by disruption of nucleoside transporter 1 but not purine nucleoside phosphorylase. *Biochem Biophys Res Commun.* 15;432(3):504-508. 査読有
10. Orito, Y, T. Ishino, S. Iwanaga, T. Kato, I. Kaneko & M. Yuda. (2013) Liver-specific protein 2: a Plasmodium protein exported to the hepatocyte cytoplasm and required for merozoite formation. *Molecular microbiology* 87(1):66-79. 査読有
11. Sumitani M, Kasashima K, Yamamoto DS, Yagi K, Yuda M., Matsuoka H, Yoshida S. (2013) Reduction of malaria transmission by transgenic mosquitoes expressing an antiparasite antibody in their salivary glands. *Insect Mol Biol.* 22(1):41-51. 査読有

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕.

出願状況(計 3件)

名称：特許：マラリア原虫のアルテミシニン耐性迅速検出法

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

種類：特許

番号：特願 2016-151355

出願年月日：2016年8月1日

国内外の別：国内

名称：ヒトパラインフルエンザ2型ウイルスベクター及びワクチン

発明者：野阪 哲哉, 鶴留 雅人, 油田 正夫,

岩永 史朗, 福村 正之, 大塚 順平

権利者：国立大学法人三重大学、バイオコモ株式会社

種類：特許

番号：PCT/JP2016/067516

出願年月日：2016年6月13日

国内外の別：国際

名称：ヒトパラインフルエンザ2型ウイルスベクター及びワクチン

発明者：野阪 哲哉, 鶴留 雅人, 油田 正夫,

岩永 史朗, 福村 正之, 大塚 順平

権利者：国立大学法人三重大学、バイオコモ株式会社

種類：特許

番号：特願 2016-063315

出願年月日：2016年3月28日

国内外の別：国内

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.medic.mie-u.ac.jp/idoubutsu/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

油田正夫 (YUDA, Masao)

三重大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90293779