

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292167

研究課題名(和文)メタサイクロジェネシスを司る発育時期特異的遺伝子転写翻訳制御に関する基礎研究

研究課題名(英文)Studies on developmental stage specific gene expression regulation and metacyclogenesis in African trypanosomes

研究代表者

井上 昇 (Inoue, Noboru)

帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授

研究者番号：10271751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では世界の家畜に被害を及ぼしているトリパノソーマ原虫の発育ステージ特異的遺伝子発現制御メカニズム解明に焦点を絞って研究を実施した。その結果、トリパノソーマ原虫がツェツェバエ体内で哺乳動物感染型に発育分化するために重要なステージ特異的遺伝子(cesp)の発現調節機構の一端を明らかにすることができた。加えて、トリパノソーマ原虫制御法(治療薬・ワクチン開発)に利用可能な新規遺伝子、TcEpHbRを発見した。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we have investigated in detail mechanisms of stage-specific gene expression regulation in African trypanosomes, which cause animal trypanosomoses, such as animal African trypanosomoses, Surra and Dourine. As a result, we have found that gene expression of congolense epimastigote specific protein (cesp) was regulated by cis-elements located in the 3'UTR. In addition we found a novel epimastigote stage-specific hemoglobin receptor (TcEpHbR), which could be a novel target gene for development of trypanocidal drugs and vaccines against animal trypanosomoses.

研究分野：原虫病学

キーワード：アフリカトリパノソーマ ライフサイクル 細胞分化 遺伝子 転写翻訳制御 ツェツェバエ

1. 研究開始当初の背景

Trypanosoma congolense (以下 Tc) は家畜への病原性が強く、流行するアフリカ諸国では家畜トリパノソーマ病対策において最も重要なトリパノソーマ種である。しかしながら Tc に関する研究は疫学調査を除いて殆ど行われていなかった。一方、熱帯医学上重要なヒト睡眠病トリパノソーマ (*T. brucei*) に関しては、いち早く全ゲノムが解読され、最新の分子生物学的手法を駆使した研究が活発に実施されていた。このように研究開発当初、家畜トリパノソーマに関する研究は立ち遅れていたが、Tc と *T. brucei* ではツェツェバエ体内でメタサイクロジェネシスを行う場所が全く異なっており (Tc は下咽頭内壁、*T. brucei* は唾液腺腔内で行う) *T. brucei* で得られた研究成果が Tc に当てはまるとは考えられなかった。したがって Tc のベクター体内での発育と、それに伴う発育時期特異的遺伝子の転写翻訳制御メカニズムを本研究プロジェクトで詳細に研究することで、これまで *T. brucei* 主体で進められてきたアフリカトリパノソーマ研究に獣医寄生虫学領域から新たな知見を加え、伝播阻止ワクチンのような全く新しいコンセプトのワクチン開発に突破口を開く研究基盤が形成できると考えられた。なお、本研究計画は平成 16 ~ 17 年度に獲得した挑戦的萌芽研究と平成 21 ~ 23 年度に獲得した基盤研究 (B) (一般) の研究成果をさらに発展させたもので、ツェツェバエ体内型アフリカトリパノソーマのうち、下咽頭内壁で細胞接着依存性に動物感染性 MCF 型虫体へと分化する EMF 型虫体から平成 20 年 (2008 年) に我々が世界で初めてクローニングして論文発表した発育時期特異的 GPI 結合型表面抗原「CESP」の転写翻訳制御メカニズムを分子レベルで明らかにする基礎研究であった。本研究で得られた成果は未だ安全な特効薬やワクチンがないトリパノソーマ病の薬剤標的分子同定や伝播阻止ワクチン開発において極めて重要な研究基盤となり得る。

2. 研究の目的

トリパノソーマのほとんどの遺伝子にはプロモータが無い。原虫発育時期に関係なくいったんすべての遺伝子がポリシストロンとして転写されるが、mRNA の 3' 側非翻訳領域 (3' UTR) にあるコア配列に未知の RNA 結合蛋白質が結合してそれぞれの mRNA が特定の原虫発育時期に翻訳されるか、分解されるか、運命づけられる。しかしこの制御メカニズムがどのようにメタサイクロジェネシス (用語解説) に代表される原虫の細胞分化を調節しているかについては全くわかっていなかった。

そこで本研究はメタサイクロジェネシスを司る発育時期特異的遺伝子転写翻訳制御メカニズムの解明を目的として、3 年間で下記の項目を明らかにすることを目標とした。

目的 cesp 3' UTR 中に存在し、同遺伝子の EMF 時期特異性を司るコア配列を同定する。

目的 cesp コア配列に結合して EMF 時期特異性を司る蛋白因子を同定する。

目的 EMF がメタサイクロジェネシスを開始する際に cesp mRNA が不安定化するメカニズムを明らかにする。

目的 既知の MCF 特異的遺伝子に VSG があるが、メタサイクロジェネシスの過程で起こる cesp mRNA の不安定化と VSG の安定化メカニズムの連携を調節因子に着目して明らかにする。

(用語解説) メタサイクロジェネシス

Tc のエピマスティゴート虫体 (EMF) はツェツェバエの下咽頭内壁に強く接着し、コロニー形成して分裂増殖する。その過程で一部の EMF は非接着性で哺乳動物感染性のメタサイクリック虫体 (MCF) へと分化し、唾液中で遊泳しながら感染の機会を待っている。EMF から MCF への原虫細胞分化の過程をメタサイクロジェネシスと言う。

3. 研究の方法

【EMF 時期特異性を司るコア配列の同定】

過去に我々は cesp 3' UTR 中にはその上流にある遺伝子を EMF 時期特異的に発現させる機能があることを明らかにしていた。この研究成果から考察すると、cesp 3' UTR の作用は遺伝子転写の亢進というよりは、転写後の mRNA 安定化によると考えられた。そこでコアとなる部分を同定するため、さらに cesp 3' UTR を細分化して同様の実験を実施し、EMF 時期特異性に必須な最短配列 (コア配列) を決定した。具体的なコア配列同定の方法は以下のとおりであった。まず、cesp 3' UTR を A/T リッチな ARE 領域とそれ以外の Front 領域に分割し、それらを欠損させた cesp 3' UTR、またはいずれかを付加した actin 3' UTR をレポーター遺伝子 (egfp) に結合してトリパノソーマのゲノムに挿入し、カラーコード原虫を作製して EGFP の発現量をフローサイトメトリーやリアルタイム RT-PCR で定量した。ここで用いた actin は原虫の全ステージで発現量が一定であるため、cesp 3' UTR 断片の作用を検証するコントロールとして利用した。

【EMF 時期特異性を司る蛋白因子の同定】

コア配列が同定できた時点で、cesp 3' UTR 全長、コア配列、actin 3' UTR など、様々な UTR RNA 断片をベイトとして用いて、蛋白因子 (RNA 結合蛋白質) を同定した。EMF トリパノソーマはグラム単位の純粋な原虫細胞が大量培養系で調製可能であるため、蛋白因子同定で実施するアフィニティ クロマト

グラフィーなどの生化学実験に使用する細胞質サンプルの確保は容易である。cesp 3' UTR やそのコア配列に結合する蛋白因子の存在は上述した分離精製実験を実施すると同時に、RNA ゲルシフトアッセイによってその存在を証明し、RNA-RNA 結合蛋白複合体の RNA 分解酵素抵抗性を利用したタンパク因子結合コア配列の同定を試みた。得られた RNA 結合蛋白質は複数種であった。それぞれの蛋白因子について遺伝子クローニング等を実施し、我々が過去に発表した Tc 全発育期 EST データベースとプロテオームデータベース(引用文献、)を参照してそれぞれの蛋白因子をコードする遺伝子を in silico クローニングした。さらにオルソログを BLAST 検索によって見つけ出して mRNA の安定化や不安定化において同定したそれぞれの蛋白因子がどのような役割(機能)を果たしているか明らかにするためのヒントを得た。

4. 研究成果

目的 cesp 3' UTR 中に存在し、同遺伝子の EMF 時期特異性を司るコア配列を同定する。

成果

cesp 3' UTR 中に A/T リッチな ARE 領域を見出し、各種の遺伝子挿入・欠損トリパノソーマを作製して ARE 領域の遺伝子発現調節機能を解析した結果、EMF 時期特異的遺伝子発現に極めて重要な役割を果たしているコア配列の最短領域を明らかにした。

目的 cesp コア配列に結合して EMF 時期特異性を司る蛋白因子を同定する。

成果

Tc 全発育ステージにおける遺伝子の網羅的かつ定量的な発現解析を RNA-seq 法によって実施した結果、約 10,000 遺伝子の各発育ステージにおける mRNA 発現動態の遺伝子情報を得ることができた。この遺伝子発現動態情報から RNA 結合タンパク質と推測された約 300 遺伝子の発現動態をさらに詳しく解析した結果、EMF ステージ特異的に mRNA 発現量が上昇する複数の RNA 結合タンパク質の同定に成功した。

網羅的な mRNA 発現動態の解析を実施する中で、EMF 特異的に発現するヘモグロビンレセプターを同定し、その組換えタンパク質作成とヘモグロビン結合に関する機能解析に成功した。アフリカトリパノソーマの EMF 発育時期特異的なヘモグロビンレセプターの発見は世界で初めてである。

目的 EMF がメタサイクロジェネシスを開始する際に cesp mRNA が不安定化するメカ

ニズムを明らかにする。

成果

成果 で同定した EMF ステージ特異的 RNA 結合タンパク質群および、すでにトリパノソーマの発育ステージ分化への関与が報告されていた既知遺伝子(TcRBP6)の EMF ステージ特異的発現動態、細胞内局在などを解析した。その結果、TcRBP6 が mRNA およびタンパク質レベルの両方で EMF ステージ特異的に発現上昇しており、EMF 原虫細胞の細胞質に散在性に局在していることも明らかにした。加えて、TcRBP6 が成果 で同定に成功した cesp 3' UTR のコア配列に特異的に結合していることを示唆する結果も得ることができた。

目的 既知の MCF 特異的遺伝子に VSG があるが、メタサイクロジェネシスの過程でおこる cesp mRNA の不安定化と VSG の安定化メカニズムの連携を調節因子に着目して明らかにする。

成果

成果 で述べた通り、TcRBP6 が成果 で同定に成功した cesp 3' UTR のコア配列に特異的に結合していることを示唆する結果を得たことから、TcRBP6 が cesp mRNA の不安定化や安定化に関与していることが考察できるが、その証明については引き続き研究を続けている。

以上 ~ の成果をさらに発展させ、研究を展開していくことで、世界に先駆けてアフリカトリパノソーマ EMF ステージ特異的遺伝子発現調節メカニズムを明らかにできるのみならず、伝播阻止ワクチン開発や治療薬開発につながる重要な研究成果を得ることができると期待される。

<引用文献>

Eyford, B. A., Sakurai, T., Smith, D., Loveless, B. C., Hertz-Fowler, C., Donelson, J. E., Inoue, N. and Pearson, T. W. (2011) Differential protein expression throughout the life cycle of *Trypanosoma congolense*, a major parasite of cattle in Africa. *Molecular and Biochemical Parasitology* 177 (2) 116-125. 査読有

Helm, J. R., Hertz-Fowler, C., Aslett, M., Berriman, M., Sanders, M., Quail, M. A., Soares, M. B., Bonaldo, M. F., Sakurai, T., Inoue, N. and Donelson, J. E. (2009) Analysis of expressed sequence tags from the four main developmental stages of *Trypanosoma congolense*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 168 (1) 34-42. 査読有

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計11件)

Yamasaki Shino, Inoue Noboru 他5名7
番目、Characterization of an
epimastigote-stage-specific hemoglobin
receptor of *Trypanosoma congolense*.
Parasites & Vectors、査読有、9巻、20
16、299
DOI: 10.1186/s13071-016-1563-9

井上 昇、アフリカ睡眠病の疫学、医学
のあゆみ、査読無、253巻、2015、1
24 - 129

菅沼 啓輔、井上 昇、アフリカトリパ
ノソーマ症対策の現在、そして未来、査読無、
66巻、2015、339 - 342

Nguyen Thu-Thuy, Inoue Noboru 他4名
6番目、A TeGM6-4r antigen-based
immunochromatographic test (ICT) for
animal trypanosomiasis. *Parasitology
Research*、査読有、114巻、2015、4
319 - 4325
DOI: 10.1007/s00436-015-4672-z

Nguyen Thu-Thuy, Inoue Noboru 他6名
8番目、Application of crude and
recombinant ELISAs and
immunochromatographic test for
serodiagnosis of animal trypanosomiasis in
the Umkhanyakude district of
KwaZulu-Natal province, South Africa. *The
Journal of Veterinary Medical Science*、
査読有、77巻、2015、217 - 220
DOI: 10.1292/jvms.14-0330

Laohasinnarong Dusit, Inoue Noboru 他
8名9番目、Studies of trypanosomiasis in
the Luangwa valley, north-eastern Zambia.
Parasites & Vectors、査読有、8巻、20
15、497
DOI: 10.1186/s13071-015-1112y

Zhou Mo, Inoue Noboru 他7名9番目、
Identification and characterization of a
Trypanosoma congolense 46 kDa protein as
a candidate serodiagnostic antigen. *The
Journal of Veterinary Medical Science*、
査読有、76巻、2014、799 - 806
DOI: 10.1292/jvms.13-0462

Watanabe Junichi, Inoue Noboru 他17
8名23番目、Genome sequence of the
tsetse fly (*Glossina morsitans*): Vector of
African trypanosomiasis. *Science*、査読有、
344巻、2014、380 - 386
DOI: 10.1126/science.1249656

Suganuma Keisuke, Inoue Noboru 他5名
7番目、Establishment of ATP-based

luciferase viability assay in 96-well
plate for *Trypanosoma congolense*. *The
Journal of Veterinary Medical Science*、
査読有、76巻、2014、1437 - 14
41
DOI: 10.1292/jvms.14-0273

Suganuma Keisuke, Inoue Noboru 他6名
8番目、Adenosine-uridine-rich element is
one of the required *cis*-elements for
epimastigote form stage-specific gene
expression of the *congolense* epimastigote
specific protein. *Molecular and
Biochemical Parasitology*、査読有、191
巻、2013、36 - 43
DOI: 10.1016/j.molbiopara.2013.09.001

Mochabo K. Miyoro, Inoue Noboru 他4
名6番目、Expression, immunolocalization
and serodiagnostic value of Tc38630
protein from *Trypanosoma congolense*.
Parasitology Research、査読有、112巻、
2013、3357 - 3363
DOI: 10.1007/s00436-013-3515-z

〔学会発表〕(計10件)

山崎 詩乃、*Trypanosoma congolense* に
おけるヘモグロビン取込みに関する研究、第
84回日本寄生虫学会大会、2015年3月
21日～22日、杏林大学三鷹キャンパス
(東京都・三鷹市)

菅沼 啓輔、ミコフェノール酸およびそ
の誘導体の抗トリパノソーマ活性評価、第
84回日本寄生虫学会大会、2015年3月2
1日～22日、杏林大学三鷹キャンパス(東
京都・三鷹市)

Yamasaki Shino, Analysis of the
hemoglobin uptake in *Trypanosoma
congolense*、18th Japanese-German
Cooperative Symposium on Protozoan
Diseases、2014年9月30日～10月3
日、Technische Universität Dresden
(Germany)

Suganuma Keisuke, Expression
regulation mechanisms of epimastigote
stage-specific genes in African
trypanosome、18th Japanese-German
Cooperative Symposium on Protozoan
Diseases、2014年9月30日～10月3
日、Technische Universität Dresden
(Germany)

山崎 詩乃、*Trypanosoma congolense* は
ベクター内ステージでヘモグロビンを取込
む、第157回日本獣医学会学術集会、20
14年9月9日～12日、北海道大学(北海
道・札幌市)

菅沼 啓輔、ルシフェラーゼを利用した *T. congolense* HTS 系の確立と道産木材樹皮からの新規抗トリパノソーマ化合物探索、第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9 日～12 日、北海道大学（北海道・札幌市）

菅沼 啓輔、*Trypanosoma congolense* EMF 特異的発現遺伝子 *cesp* の発現調節機構、第 83 回日本寄生虫学会、2014 年 3 月 27 日～28 日、愛媛大学城北キャンパス（愛媛県・松山市）

Inoue Noboru、Expression regulation mechanisms of epimastigote stage-specific genes in African trypanosome、6th ASEAN Congress of Tropical Medicine and Parasitology、2014 年 3 月 4 日～7 日、Kuala Lumpur (Malaysia)

Suganuma Keisuke、Identification and characterization of an RNA binding protein, *Trypanosoma congolense* uridine binding protein-1、6th ASEAN Congress of Tropical Medicine and Parasitology、2014 年 3 月 4 日～7 日、Kuala Lumpur (Malaysia)

Suganuma Keisuke、Analysis of the *cis*-element for gene expression regulation in *congolense* epimastigote specific protein (CESP)、24th International Conference of the World Association for the Advanced of Veterinary Parasitology、2013 年 8 月 25 日～29 日、Perth (Australia)

〔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.obihiro.ac.jp/~protozoa/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 昇 (INOUE, Noboru)

帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授

研究者番号：10271751