

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01542

研究課題名(和文) ターゲット-ムによるマラリア原虫ライフサイクルの統一的理解

研究課題名(英文) Unified Understanding of the Plasmodium Life Cycle by Targetome Analysis

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) 31,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではマラリア原虫の各転写因子の機能、結合配列、標的遺伝子等の解析を実施した。この成果により、1つの転写因子が遺伝子を直接かつ包括的に制御し各ステージの遺伝子発現レパートリーを決定するというマラリア原虫のユニークな転写制御機構を実証することに成功した。また、マラリア原虫のライフサイクルをターゲットームの連鎖として捉え、各ステージ間の遺伝子発現のダイナミックな連関に光を当てることに成功した

研究成果の学術的意義や社会的意義

転写制御は遺伝子発現制御の中核をなし、その機構を解明することはポストゲノム研究の中心的課題である。マラリア原虫は、1つの転写因子が各ステージを直接制御し遺伝子発現レパートリーを決定するというユニークな転写制御機構を有している。本研究はこの転写制御機構に着目し、ターゲットームから“ステージ形成のマスタープラン”を読み解くことを試みたものである。本研究で得られたターゲットーム情報は感染・寄生の分子機構解明などマラリア原虫のポストゲノム研究を強力にサポートするものである

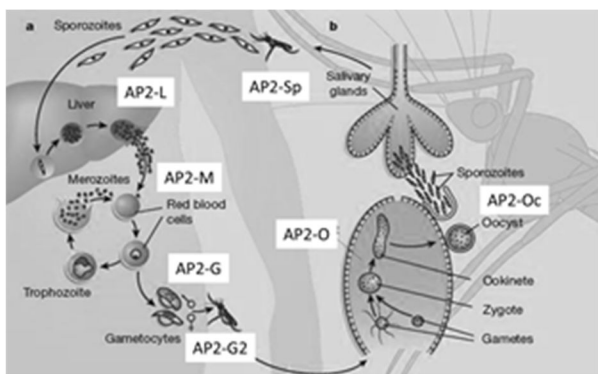
研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the function of each Plasmodium transcription factor, identified its binding sequences, and determined target genes. Our results demonstrated the unique transcriptional regulation mechanism of Plasmodium parasites, in which a stage-specific transcription factor directly and comprehensively regulates genes and determines the gene expression repertoire at each stage. We have also revealed the dynamic linkage of gene expression through the lifecycle by viewing it as a chain of targetomes.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア 転写因子 ターゲットーム

### 1. 研究開始当初の背景

マラリア原虫は蚊および宿主動物内の複数の生育ステージからなる複雑な生活環を有する。この複雑な生活環はステージ特異的に遺伝子発現を変化させ、異なる宿主環境(宿主動物: 赤血球・肝臓、媒介蚊: 中腸・唾液腺)に適応することで維持されている。その制御機構を解明することはマラリア原虫のポストゲノム研究の中心的課題である。マラリア原虫のゲノムには約30の配列特異的転写因子(以下、転写因子)の候補がこれまで確認されている。これらの遺伝子はすべてAP2ドメインと呼ばれるDNA結合ドメインを有する同一のファミリー(AP2ファミリー)に属する。この転写因子の総数は標準的な真核生物に予想される転写因子数の十分の一にすぎず、また複雑なライフサイクルという特徴とも相容れない。しかしながら近年の我々のグループを中心とした研究により、マラリア原虫は他の真核生物とは異なる極めてシンプルな遺伝子発現制御機構を有していること、この機構により少数の転写因子だけでライフサイクルを維持していることが明確となってきた。すなわち各ステージの遺伝子発現レパートリーは原則として1個のステージ特異的な転写因子により決定され、その連鎖によりライフサイクルが成立している(したがって



転写因子はAP2の後に発現するステージの頭文字を付して命名される、左図参照)。このシンプルな転写制御は寄生というライフスタイルにより、外部からの入力に反応するための複雑な転写因子ネットワークが不要になったことから進化したと考えられる。

遺伝子転写制御機構の解明はポストゲノム研究の最重要課題であるがマラリア原虫ではこの分野の研究はこれまでほとんど行われてこなかった。我々はAP2ファミリー遺伝子がマラリア原虫のステージ特異的な転写因子であることを世界に先駆けて証明した。すなわちオオキネート、スポロゾイト、肝臓ステージそれぞれで特異的に発現する転写因子 AP2-O AP2-Sp 及び AP2-L を同定し、これらの転写因子が各ステージの形成に必須であること、各ステージの主要な遺伝子を直接制御していることを証明した(*Molecular microbiology*. 2009, *Molecular microbiology*. 2010, *PloS one*. 2012)。さらに各ステージにおける転写制御の全体像を明らかにするためオオキネートをはじめとする感染ステージの転写因子の標的遺伝子群を ChIP-seq 法でゲノムワイドに探索し、1個のマスター転写因子が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おける遺伝子発現制御の基本モチーフを明らかにした (*PLoS Pathog*. 2015)。さらにこれらの研究の過程で転写因子ターゲットームが当該ステージのマスタープランを表現するものであり、感染関連遺伝子探索などにおいて強力なツールとなることを証明した。またこれと独立してステージ転換過程や生殖母体生成過程における複数の転写因子のターゲットーム解析を通じ、ターゲットームの比較からステージ間のダイナミックな連関を解き明かすことができるとの知見を得た(*Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 等)。以上の成果よりターゲットーム解析がこの分野の研究を推進する原動力になるとの確信を得、全ターゲットームを解析する本プロジェクトを構想した。一方マラリア原虫には、ホストの組織から分離、精製することが困難な多くのステージ(肝臓ステージやオオシストなど)が存在し、これらのステージをターゲットーム解析の対象とすることはこれまで不可能であった。我々はこの問題を解決するために ChIP-seq 法の改良に取り組み、ホストの細胞が大部分を占める未精製のサンプルを材料として解析を実施するプロトコルを確立した。これにより事実上すべてのステージでターゲットーム解析を実施することが可能になり、全ターゲットーム解析を目的とする本研究を実施することとした。

### 2. 研究の目的

マラリア原虫は一つのマスター転写因子が当該ステージの遺伝子発現全体を直接制御するというシンプルな遺伝子制御機構を有し、複雑なライフサイクルを26個の転写因子で維持している。各ステージの形成はステージ特異的転写因子の発現により開始され、その標的遺伝子の総体(ターゲットーム)は当該ステージのマスタープランを表現する。本課題はマラリア原虫特有のこの制御機構に着目し、全転写因子のターゲットームを ChIP-seq 法で解析し、ライフサイクルをターゲットームのダイナミックな連鎖として統一的に理解することを目的とする。本研究はマラリア原虫のポストゲノム研究を先導し、侵入、寄生、無性生殖、有性生殖の機構を分子レベルで理解する基盤情報としてマラリア研究を推進する原動力となることが期待される。

### 3. 研究の方法

各転写因子の GFP 融合蛋白発現原虫とノックアウト原虫を作製し、これらの遺伝子組み換え原虫を用いライフサイクルが停止した(または影響を受けた)ステージとそのステージで

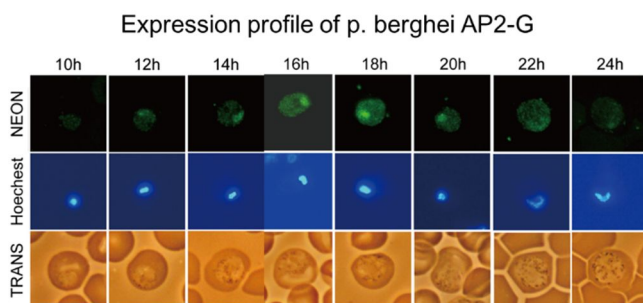
の GFP の発現の両者を確認した。発現ステージが決定された転写因子の ChIP-seq 解析を実施し結合配列、全標的遺伝子を決定した。ChIP-seq 解析はすべて GFP 融合遺伝子を発現する原虫を用い、独立して二度以上実施し再現性を確認した。INPUT (IP 前のコントロールサンプル) を合わせて 1 転写因子あたり 4 ライブラリーを作製した。ChIP-seq に用いた原虫細胞の調整方法は材料とするステージにより調整方法が異なる。血液ステージではパラホルムアルデヒド固定後赤血球を溶出し細胞を調製した。雌雄生殖母体では、感染マウスをスルファジジン処理し無性生殖期の原虫を除去した後細胞を調製した。スポロゾイトステージでは感染蚊の中腸をパラホルムアルデヒド固定しそのまま ChIP-seq に使用した。一方、細胞の調製後の処理は細胞の由来に関係なくほぼ同一条件で実施された。すなわちリシスバッファーで溶解、超音波でクロマチンを断片化し抗 GFP 抗体で ChIP をおこなった。得られた DNA で NGS 用ライブラリーを作製した。ChIP-seq のリードデータは *P. berghei* ゲノム上に Bowtie2 を用いてマッピングし、MACS2 ソフトウェアを用いてピークコールを行った。評的遺伝子の同定には独自に作製したスクリプトを用い、ピークが上流 1.2kb 以内に存在する遺伝子を標的遺伝子として選択した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 生殖母体における転写制御の解明

###### 生殖母体のマスター転写因子 AP2-G の役割

マラリア原虫の配偶子形成には、転写因子 AP2-G が必須である。しかし、AP2-G が分裂期において生殖母体形成の運命を決定するのか、あるいは AP2-G が後期栄養体期において直接生殖母体の分化・形成を誘導するのかは、不明であった。本研究では、AP2-G の発現プロファイルをネズミマラリア原虫 *Plasmodium berghei* を用いて調べ、ゲノムワイドな標的遺伝子を決定することで、この問題に取り組んだ。蛍光顕微鏡観察により、AP2-G の発現は赤血球侵入の 12 時間後に初めて観察され、初期配偶子細胞で性徴が初めて現れる 18 時間後に発現のピークに達することがわかった(下図)。AP2-G の発現は、その後性分化が進むにつれて減少した。この結果から AP2-G は後期栄養体期において直接生殖母体の分化・形成を誘導する可能性が高いことが示唆された。



ことがわかった(下図)。AP2-G の発現は、その後性分化が進むにつれて減少した。この結果から AP2-G は後期栄養体期において直接生殖母体の分化・形成を誘導する可能性が高いことが示唆された。

我々はさらに AP2-G の発現ピーク時に ChIP-seq を行い、ゲノム上の結合部位を同定した。結合部位から予測される TF の主な結合モチーフは GTACNY であった。予測された

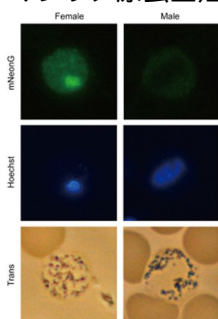
標的にはタンパク質合成に関連する遺伝子が多く含まれており、AP2-G が性分化に必要な細胞基盤を構築する役割を担っていることが示唆された。また、AP2-G 結合部位は、AP2-G2、AP2-FG という生殖母体特異的な TF の上流にも存在した。さらに、標的には 2 つの AP2TF 関連遺伝子が含まれていた。これらの遺伝子を破壊すると、オオキネートの発生が停止することがわかった。これらの結果は、AP2-G のもう一つの役割、すなわち初期生殖母体への転換を促進するための転写因子カスケードを活性化する役割を持つことを示唆した。さらに AP2-G 結合部位は、AP2-G 自身の上流にも存在しており、AP2-G がポジティブフィードバックにより自己の転写を活性化していることが分った。以上のことから、AP2-G は分裂体の性的コミットメントの確立には関与せず、むしろ栄養体後期段階での分化の開始と配偶子細胞の初期発生に関与していることが示唆された。

###### 雌性生殖母体のマスター転写因子 AP2-FG の役割

マラリア原虫生殖体の前駆体である生殖母体は、蚊を媒介とするマラリア伝搬に不可欠なステージである。生殖母体は脊椎動物の宿主の血液中で雄または雌に分化成熟し、吸血後の蚊の中腸で雌雄生殖体に変化する。生殖母体はマラリアのライフサイクル維持において重要であるにもかかわらず、その遺伝子制御機構は十分に理解されていない。特に、雌雄性特異的な遺伝子発現に関与する転写因子はこれまで同定されていない。本研究では、AP2 ファミリーの転写因子である AP2-FG が雌性特異的な遺伝子制御に関与していることを初めて明らかにした。

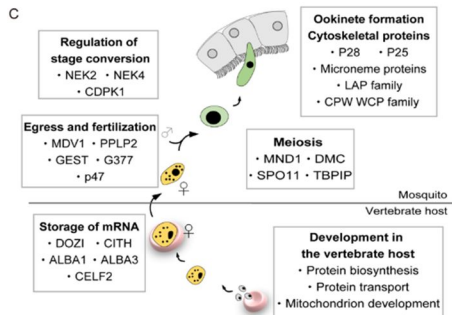
*Plasmodium berghei* における AP2-FG の発現は、発育中の生殖母体において雌雄分化が認められる 4-6 時間前に、雌の配偶子細胞でのみ観察された(左図)。AP2-G の発現はこの時期から減弱してゆくことより、マスター

転写因子がこの時期を境に交代することが示唆された。AP2-FG 遺伝子の破壊は雌の成熟を停止させたが、雄の発生には影響を及ぼさなかった。ノックアウト原虫は蚊への感染能を完全に喪失していた。





クロマチン免疫沈降法による解析の結果、AP2-FG は 700 以上の遺伝子を直接制御していることが示唆された。その標的には、配偶子形成、受精、接合子の発生など、雌生殖母体特異的な機能を担う遺伝子が含まれていた(左図)。このことから本転写因子は雌生殖母体で発現する遺伝子を包括的に制御していることが明らかになった。

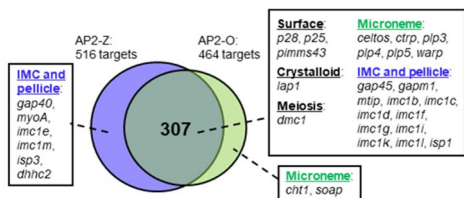
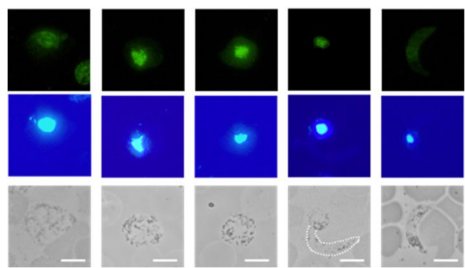


クロマチン免疫沈降法による解析は、AP2-FG の標的遺伝子プロモーターへの結合が 10 塩基の配列モチーフと関連していることも明らかにした。マラリア人工染色体を用いたプロモーターアッセイでは、この 10 塩基モチーフの破壊により P28 遺伝子の雌特異的プロモーターの活性が優位に低下することが分かった。

これらの結果は、AP2-FG が雌特有の遺伝子発現レパートリーを制御することで、初期生殖母体から成熟雌生殖母体への分化に関与していることを示唆している。

### 融合体(ザイゴート)期転写因子 AP2-Z の役割

マラリア原虫の有性期は、マラリア原虫が受精し、蚊に感染するためにオオキネートを形成する重要なステップである。これまでの研究では原虫の受精後に始まるレトート期オオキネートの形成は、蓄積された雌の mRNA の翻訳により進行し、接合子の転写活性は停止していると考えられてきた。

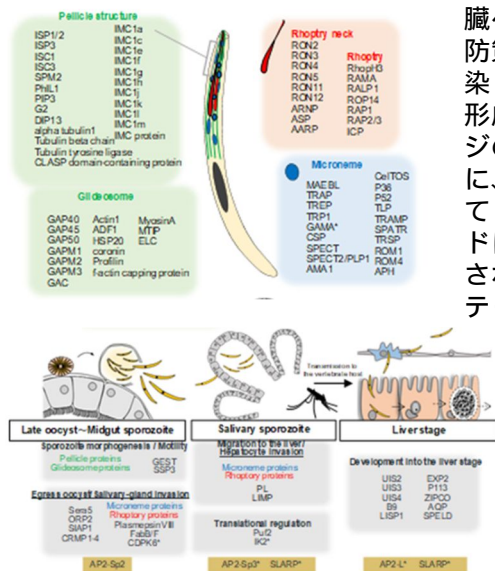


AP2-Z はわれわれが AP2-G の標的遺伝子から同定した遺伝子であり、雌の転写制御因子として報告していた。本遺伝子の破壊によってオオキネートの発生はレトート期で停止する。今回の研究で我々は、AP2-Z が雌で転写されるものの、DOZI 複合体によって翻訳抑制されること、受精後に翻訳され接合子ステージ発現がピークに達することを明らかにした(左上図)。AP2-Z の ChIP-seq 解析により、AP2-Z は特定の DNA モチーフ上に結合し、AP2-O の標的とほぼ重複するオオキネート形成に必須な遺伝子群を標的としていること、加えて他の転写因子の標的に属さない独自の遺伝子も標的としていることがわかった(左下図)。

AP1-Z は AP2-G 及び P2-FG の標的遺伝子であり、また AP2-O 及び P2-O2 を標的としている。本研究の結果は、AP2-G に始まる、配偶子形成から卵子形成に至る転写因子のカスケードの存在を明らかにした。

### (2) スポロゾイト期における転写制御機構

マラリア原虫のヒトへの感染は肝臓へのスポロゾイトの感染から始まる。スポロゾイトの遺伝子制御を解明することは、この寄生虫による肝臓への感染メカニズムの解明を促進し、マラリア感染予防策の開発に貢献することが期待される。



AP2-Sp は、感染した蚊の中腸にあるオーシスト内でのスポロゾイト形成(スポロゴニー)に不可欠な TF である。このステージの転写調節系におけるこの TF の役割を理解するために、後期オーシストを含む蚊の中腸全体を出発材料として ChIP-seq 解析を行い、その標的遺伝子をゲノムワイドにて探索した。その結果、697 個の標的遺伝子が同定された。これらの遺伝子はスポロゾイト形成から肝臓ステージに至るスポロゾイトの異なるプロセスで発現する遺伝子を網羅的に含んでいた(左図)。これらの結果は、AP2-Sp が幅広い遺伝子を直接標的とすることによって、遺伝子発現の基礎的なパターンを決定していることを示唆した。また、ChIP-seq 解析により、AP2-Sp は転写自己活性化機構(正のフィードバックループ)により自身の発現を維持し、AP2-Sp2, AP2-Sp3, SLARP などスポロゾイトで転写されることが報告されているすべての TF を誘導することが示された。その結果、AP2-Sp はこのステージの転写カスケードの頂点に存在し、マスターレギュレーターとしてこのステージの形成をトリガーしていることが明らかになった。

その結果、AP2-Sp はこのステージの転写カスケードの頂点に存在し、マスターレギュレーターとしてこのステージの形成をトリガーしていることが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Addo-Gyan Daniel, Matsushita Haruka, Sora Enya, Nishi Tsubasa, Yuda Masao, Shinzawa Naoaki, Iwanaga Shiroh	4. 巻 17
2. 論文標題 Chromosome splitting of Plasmodium berghei using the CRISPR/Cas9 system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0260176	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 Shinzawa Naoaki, Nishi Tsubasa, Hiyoshi Fumiya, Motooka Daisuke, Yuda Masao, Iwanaga Shiroh	4. 巻 3
2. 論文標題 Improvement of CRISPR/Cas9 system by transfecting Cas9-expressing Plasmodium berghei with linear donor template	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-020-01138-2	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 Yuda Masao, Kaneko Izumi, Iwanaga Shiroh, Murata Yuho, Kato Tomomi	4. 巻 113
2. 論文標題 Female specific gene regulation in malaria parasites by an AP2 family transcription factor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Microbiology	6. 最初と最後の頁 40～51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/mmi.14334	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 Bando Hironori, Pradipta Ariel, Iwanaga Shiroh, Okamoto Toru, Okuzaki Daisuke, Tanaka Shun, Vega-Rodriguez Joel, Lee Youngae, Ma Ji Su, Sakaguchi Naoya, Soga Akira, Fukumoto Shinya, Sasai Miwa, Matsuura Yoshiharu, Yuda Masao, Jacobs-Lorena Marcelo, Yamamoto Masahiro	4. 巻 216
2. 論文標題 CXCR4 regulates Plasmodium development in mouse and human hepatocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 1733～1748
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1084/jem.20182227	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 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 Nishi Tsubasa, Shinzawa Naoaki, Yuda Masao, Iwanaga Shiroh	4. 巻 11
2. 論文標題 Highly efficient CRISPR/Cas9 system in Plasmodium falciparum using Cas9-expressing parasites and a linear donor template	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-97984-z	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 Aliprandini Eduardo, Tavares Joana, Panatieri Raquel Hoffmann, Thiberge Sabine, Yamamoto Marcio Massao, Silvie Olivier, Ishino Tomoko, Yuda Masao, Dartevelle Sylvie, Traincard Francois, Boscardin Silvia Beatriz, Amino Rogerio	4. 巻 3
2. 論文標題 Cytotoxic anti-circumsporozoite antibodies target malaria sporozoites in the host skin	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Microbiology	6. 最初と最後の頁 1224 ~ 1233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41564-018-0254-z	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 該当する

1. 著者名 Payungwong Tongchai, Shinzawa Naoaki, Hino Akina, Nishi Tsubasa, Murata Yuho, Yuda Masao, Iwanaga Shiroh	4. 巻 67
2. 論文標題 CRISPR/Cas9 system in Plasmodium falciparum using the centromere plasmid	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 605 ~ 608
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2018.06.002	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 Akbari Masoud, Kimura Kazumi, Bayarsaikhan Ganchimeg, Kimura Daisuke, Miyakoda Mana, Juriasingani Smriti, Yuda Masao, Amino Rogerio, Yui Katsuyuki	4. 巻 86
2. 論文標題 Nonspecific CD8+ T Cells and Dendritic Cells/Macrophages Participate in Formation of CD8+ T Cell-Mediated Clusters against Malaria Liver-Stage Infection	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Infection and Immunity	6. 最初と最後の頁 e00717 ~ 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/IAI.00717-17	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 Shiratsuchi Takayuki, Rai Urvashi, Kaneko Izumi, Zhang Min, Iwanaga Shiroh, Yuda Masao, Tsuji Moriya	4. 巻 35
2. 論文標題 A potent malaria vaccine based on adenovirus with dual modifications at Hexon and pVII	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 6990 ~ 7000
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vaccine.2017.10.066	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 Bayarsaikhan Ganchimeg, Miyakoda Mana, Yamamoto Kazuo, Kimura Daisuke, Akbari Masoud, Yuda Masao, Yui Katsuyuki	4. 巻 66
2. 論文標題 Activation and exhaustion of antigen-specific CD8 + T cells occur in different splenic compartments during infection with Plasmodium berghei	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 227 ~ 235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2017.01.022	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 西翔, 新澤直明, 平山泰士, 油田正夫, 岩永史朗
2. 発表標題 Cas9 スクレアーゼ発現熱帯熱マラリア原虫を用いた新規ゲノム編集法の確立
3. 学会等名 日本寄生虫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村田 優穂, 金子 伊澄, 加藤 知美, 岩永 史郎, 油田正夫
2. 発表標題 マラリア原虫のAP2-FGは雌生殖母体形成のマスター転写因子である
3. 学会等名 第87会日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2018年

〔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
---------	---------