

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08817

研究課題名(和文) RNA結合ドメインを持つマラリア原虫新規転写因子群の生理的意義と分子作用機序

研究課題名(英文) The physiological functions and the molecular mode of action of the new transcriptional factors with RNA-binding domain from malaria parasite

研究代表者

安田 加奈子(駒木加奈子)(Komaki-Yasuda, Kana)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・研究所・研究員

研究者番号：50415551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではRNA結合ドメインを特徴的に持つマラリア原虫独自の転写因子であるPREBPおよび類似した構造を持つ機能未知タンパクPf1の細胞内局在を観察した結果、これらは異なるタイミングで核局在しており、転写因子として働くタイミングの違いが示唆された。続いて、PREBPの調節ターゲット遺伝子候補をChIP-Seqによって同定した。同定された約80のターゲット遺伝子候補のうち、約4割はPfEMP1、rifinなどの表面抗原タンパク質だった。今後はPREBPがこれらの表面抗原の発現タイミングをどのように制御しているかを明らかにすることで、原虫の宿主内寄生適応機序の一端が明らかとなることが期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、マラリア原虫の転写因子の活性の制御は転写因子自身の発現の有無ではなく、核局在の調節によってなされていることを示唆され、これは原虫では全く新しい発見となった。このように転写因子の活性制御は赤血球内寄生期の細胞周期進行を支える根幹のメカニズムである可能性が示された。また、PREBPの新たなターゲット遺伝子候補としてPfEMP1に代表される表面抗原多型に関わる遺伝子を多数見出したことから、PREBPの作用がヒトの免疫から逃れようとするマラリア原虫の生存戦略の極めて重要な部分に関わっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we observed cellular localization of the malaria parasite specific transcription factor PREBP, which has an RNA-binding domain characteristically, and Pf1, a protein of unknown function with a similar character. The difference in timing of nuclear localization of them was observed, suggesting their different working timing. Subsequently, candidate target genes of PREBP regulation were identified by ChIP-Seq analyses. Of the approximately 80 target gene candidates identified, approximately 40% were surface antigen proteins such as PfEMP1 and rifin. In the future, by clarifying how PREBP regulates the expression timing of these surface antigens, it can be expected that one part of the mechanism of parasitic adaptation in the host cell becomes clear.

研究分野：分子寄生虫学

キーワード：マラリア原虫 転写因子 RNA結合ドメイン PREBP 核局在 ChIP-Seq 表面抗原 細胞周期

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マラリア原虫の遺伝子発現制御機構の分子メカニズムは他種生物と比較して未知の点が多いため、ヒストン修飾を介したエピジェネティックな発現制御機構については、マラリア原虫においても他種生物と同様の機構が存在することが明らかになりつつある一方で、マラリア原虫ゲノム上には、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が、ほとんど存在しない。このような状況と並行して、申請者は赤血球内寄生期の house keeping gene のモデルとして、トロホゾイト期に特異的に発現亢進する抗酸化タンパク質 1-Cys Peroxiredoxin 遺伝子 (*pfl-cys-prx*) の転写制御機構を解析してきた。その結果 *pfl-cys-prx* の 5' 領域にエンハンサーとして作用する *cis*-element およびそこに特異的に結合する核内因子が存在し、*pfl-cys-prx* 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標的となっていることがわかった。続けて申請者は *pfl-cys-prx* の *cis*-element に特異的に結合する核内因子を原虫細胞より直接精製・同定し、PREBP と命名した。更に PREBP は *pfl-cys-prx* のプロモーターに *cis*-element 依存的に作用し、遺伝子の発現を亢進する転写因子であることを証明した。

PREBP のアミノ酸配列より予測される構造上の特徴として、K homology (KH) ドメインを持つことがあげられる。KH ドメインとは、RNA に結合する様々な機能のタンパク質に見られるドメインである。続いて、「他にも KH ドメインを含む転写因子群がマラリア原虫および近縁の寄生原虫に存在するのではないかと考え、バイオインフォマティクス解析をおこなった。その結果、熱帯熱マラリア原虫ゲノムから、さらに PREBP 以外に KH ドメインを含む転写因子候補タンパク質が 3 つ見出された (以下、これらの因子群を KH 因子群と称する)。

2. 研究の目的

本申請研究は PREBP を含む KH 因子群の核局在タイミングおよび、染色体上で結合している領域を明らかにすることにより、これらの因子群がマラリア原虫の遺伝子発現に果たす生理的意義とその作用機序を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

1) PREBP および KH 因子群の GFP タグ付きタンパク発現株の作成

PREBP を含む 4 つの KH 因子群遺伝子の N 末相当部分あるいは C 末相当部分の配列の一部と GFP 遺伝子の配列を連結し、熱帯熱マラリア原虫で汎用されている、遺伝子導入用プラスミドベクター pHC1 に挿入する。これを培養熱帯熱マラリア原虫にエレクトロポレーションによって導入し、ピリメタミンによって遺伝子導入原虫のセレクションをおこなう。pHC1 に導入された原虫遺伝子配列は比較的容易にゲノム上の同配列と相同組換えを起こす。PCR によって相同組換えが起きたことを確認した後、限界希釈によって、クローン化する。この様にして得られた、遺伝子改変原虫株では、各因子の N 末あるいは C 末に GFP がフュージョンされた状態で、染色体上のそれぞれの因子が元来保有しているプロモーターによる制御化において、適切な時期、適切な発現量で発現することが予測できる。

2) PREBP および KH 因子群の原虫発育期による局在の観察

作成した、遺伝子改変株における、GFP 融合因子の原虫細胞内局在を共焦点顕微鏡によって観察し、それぞれの因子の細胞質あるいは核への局在が原虫の発育ステージの進行に従ってどのように変化するかを観察した。

3) PREBP による制御を受ける遺伝子群の候補の探索

GFP と PREBP のフュージョン蛋白の安定発現遺伝子組換え熱帯熱マラリア原虫を用いて、抗 GFP 抗体によるクロマチン免疫沈降および次世代シーケンス解析(ChIP-Seq)をおこなった。後期トロホゾイトから初期シズント期に同調した GFP-PREBP のフュージョン蛋白 発現原虫を材料として、ChIP をおこない、沈降産物を Illumina 社 HiSeq によって解析した。解析には、二回の独立した原虫材料を用意して、再現性を確認した。また、バックグラウンドデータとして、免疫沈降をおこなう前の Input 産物も同時に解析し、バックグラウンドとして差し引いた。次世代シーケンス解析によって得られたリードをリファレンスゲノムへのマッピングし、更にピークコール解析をおこなった。

4. 研究成果

1) PREBP および KH 因子群の GFP タグ付きタンパク発現原虫株

PREBP および未知タンパク群の N 末に GFP を融合させた遺伝子改変熱帯熱マラリア原虫を作成した。導入したベクターDNA が、ゲノムに挿入されていることを PCR によって確認したのちに、限界希釈によってクローニングをおこない、安定して、PREBP および、KH 因子群のうち 2 つ(Pf1 と Pf2 とする)について、GFP との融合タンパクを発現している原虫株を得ることができた。

2) PREBP および Pf1 の原虫発育期による局在

各 GFP 融合タンパクの細胞内局在を、原虫ステージごとに詳細に観察した結果、PREBP はトロホゾイトから初期シズント期には核内に局在し、それ以外の時期は核外の細胞質に局在していた(図 1)。一方、Pf1 は PREBP とは異なり、シズント期全体を通して核局在していた(図 2)。Pf2 に関しては、赤血球内寄生期全体を通して核への局在が認められず、転写因子以外の機能を担っている可能性が示唆された。

PREBP が核に局在する時期は、そのターゲットとなる pf1-cys-prx が発現亢進する時期と全く一致していた。PREBP 自身の mRNA の発現量はリング期に最も多いので、PREBP の転写活性化能が発揮されるタイミングは PREBP 遺伝子の発現量よりむしろ、PREBP タンパク質の核局在の時期によって調節されることが示唆された。この核局在時期の調節が発現制御の根幹となるメカニズムであると考えられた。なお、因子 A については PREBP とは異なる時期での転写調節を担っている可能性が考えられた。

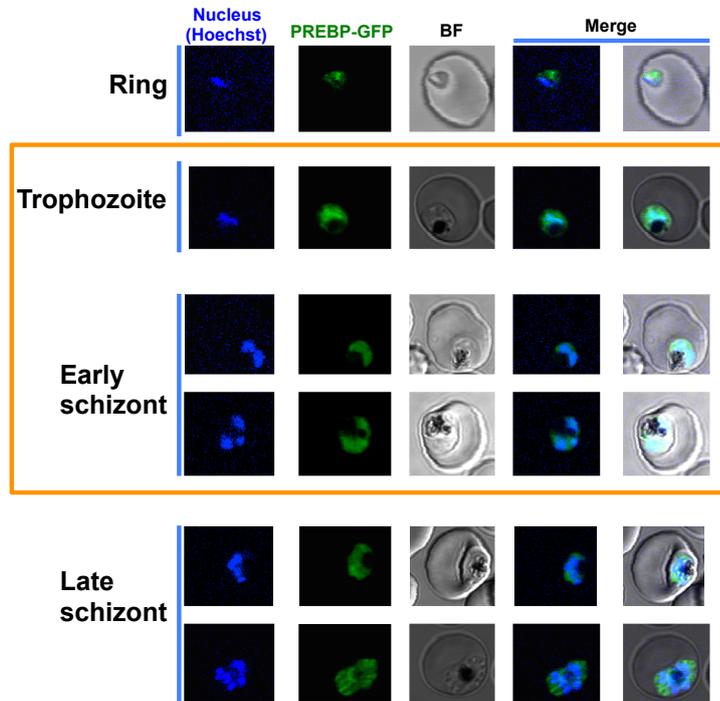


図 1 : PREBP-GFP 融合タンパク原虫細胞内局在の観察。PREBP-GFP (緑色) はトロホゾイトから初期シizont期 (オレンジ色の枠で囲んだ時期) には原虫核内に局在し、それ以外の時期は核外の細胞質に局在していた。原虫の核は Hoechst (青色) で染色している。

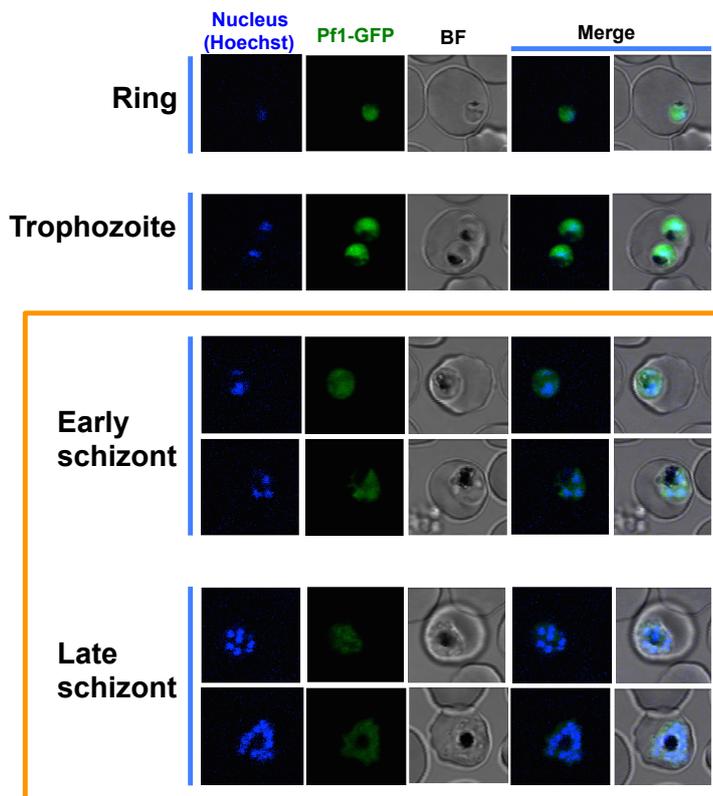


図 2 : Pf-1-GFP 融合タンパク原虫細胞内局在の観察。Pf1-GFP (緑色) はシizont期 (オレンジ色の枠で囲んだ時期) を通して原虫核内に局在し、それ以外の時期は核外の細胞質に局在していた。原虫の核は Hoechst (青色) で染色している。

今後はこれらの因子の核局在の時期調節がどのような機構によってなされているか、因子のタンパク修飾などを解析していくことによって、原虫における時期特異的遺伝

子発現調節機構がさらに明らかになっていくことが期待できる。

3) PREBP による制御を受ける遺伝子群の候補の探索

GFP と PREBP のフュージョン蛋白の安定発現遺伝子組換え熱帯熱マラリア原虫を用いて、抗 GFP 抗体によるクロマチン免疫沈降および次世代シーケンス解析(ChIP-Seq)をおこなった結果、2回の独立した解析にて再現性を持って検出される約 80 のピークを絞り込むことができた。これらのピークの約 7 割が、赤血球内寄生期に発現している遺伝子の 5' 領域に位置し、PREBP はこれらの遺伝子の調節領域に結合することで、遺伝子発現の調節をおこなっていると考えられた。ChIP-Seq によって同定された PREBP の調節ターゲット遺伝子候補のうち、約 4 割は PfEMP1、rifin などの表面抗原タンパク質が多く含まれていた (図 3)。特に PfEMP1 は、原虫ゲノム中に存在する約 60 のコピーのうち、ひとつが選択的に発現することで、宿主の免疫による攻撃をかわす機能を持つことが知られており、その排他的発現制御にはエピジェネティックなクロマチン修飾に関わることが知られている。

Surface antigen 33		Kinase/phosphatase 5	
rifin 9		adenosine-diphosphatase, putative 1	
PfEMP1 9		cyclin-dependent kinases regulatory subunit, putative 1	
erythrocyte membrane-associated antigen 1		protein tyrosine phosphatase 1	
exported protein family1 1		serine/threonine protein kinase, FIKK family 1	
exported protein family4 1		serine/threonine protein kinase, putative 1	
Pfmc-2TM Maurer's cleft two transmembrane protein 1			
Plasmodium exported protein (hyp13), unknown function 1			
Plasmodium exported protein (hyp15), unknown function 1			
Plasmodium exported protein (hyp6), unknown function 1		Lipid metabolism 4	
Plasmodium exported protein (hyp9), unknown function 1		acyl-CoA synthetase 2	
odum exported protein (PHIST), unknown function 1		lipid/sterol:H+ symporter 1	
Plasmodium exported protein (PHISTa), unknown function 2		lysophospholipase, putative 1	
Plasmodium exported protein (PHISTb), unknown function 1			
Plasmodium exported protein, unknown function 1		Others 13	
merozoite surface protein8 1		alpha tubulin 2 1	
histidine-rich protein III 1		alpha/beta hydrolase, putative 1	
Conserved protein unknown function 16		CUGBP Elav-like family member 1 1	
Conserved Plasmodium protein, unknown function 15		EMP1-trafficking protein 2	
conserved Plasmodium membrane protein, unknown function 1		golgi protein 1 1	
DNA/RNA binding protein 6		heat shock protein 40, type II 1	
RNA-binding protein, putative 1		liver stage associated protein 2 1	
U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 2, putative 1		methyltransferase, putative 1	
zinc finger protein, putative 1		mitochondrial carrier protein, putative 1	
ATP-dependent RNA helicase DHH1, putative 1		multidrug resistance protein 1 1	
eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L, putative 1		nuclear movement protein, putative 1	
pre-mRNA-splicing factor BUD31, putative 1		S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase, putative 1	
		Total 77 genes	

図 3 : ChIP-Seq によって 5'領域に PREBP-GFP の推定結合部位が検出された遺伝子一覧。

今後は転写因子 PREBP がこれらの既知のメカニズムとどの様にかかわりながら、表面抗原の発現タイミングをどのように制御しているかを明らかにすることで、原虫の宿主内寄生適応機序の一端が明らかとなることが期待できる。また、Pf1 についても今後の解析で制御している遺伝子群を明らかにすることによって、一連の解析で見出された RNA 結合ドメインを持つマラリア原虫新規転写因子の役割がさらに明らかになっていくことが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takaya S, Kutsuna S, Suzuki T, Komaki-Yasuda K, Kano S, Ohmagari N.	4. 巻 99
2. 論文標題 Case Report: Plasmodium knowlesi Infection with Rhabdomyolysis in a Japanese Traveler to Palawan, the Philippines.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Am J Trop Med Hyg	6. 最初と最後の頁 967-969
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4269/ajtmh.18-0348	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 Vincent JP, Komaki-Yasuda K, Existe AV, Boncy J, Kano S.	4. 巻 24
2. 論文標題 No Plasmodium falciparum Chloroquine Resistance Transporter and Artemisinin Resistance Mutations, Haiti.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Emerg Infect Dis	6. 最初と最後の頁 2124-2126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3201/eid2411.180738	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 Vincent JP, Komaki-Yasuda K, Iwagami M, Kawai S, Kano S.	4. 巻 17
2. 論文標題 Combination of PURE-DNA extraction and LAMP-DNA amplification methods for accurate malaria diagnosis on dried blood spots.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Malar J	6. 最初と最後の頁 373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12936-018-2527-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Takaya S, Kato Y, Katanami Y, Yamamoto K, Kutsuna S, Takeshita N, Hayakawa K, Kanagawa S, Komaki-Yasuda K, Kano S, Ohmagari N.	4. 巻 100
2. 論文標題 Imported Malaria at a Referral Hospital in Tokyo from 2005 to 2016: Clinical Experience and Challenges in a Non-Endemic Setting.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Am J Trop Med Hyg	6. 最初と最後の頁 828-834
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4269/ajtmh.18-0722	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 1件）

1. 発表者名 Kanao Komaki-Yasuda, Shigeyuki Kano
2. 発表標題 The RNA-binding KH domains are indispensable for transcriptional activity of PREBP, the unique transcriptional factor of Plasmodium falciparum
3. 学会等名 ICOPA2018(14th International Congress of Parasitology) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 駒木 安田加奈子、狩野繁之
2. 発表標題 マラリア原虫転写因子PREBPのKHドメインはシスエレメントの特異的認識に関わっている
3. 学会等名 第86回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----