

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06986

研究課題名（和文）マラリア原虫メロゾイト形成期のターゲットーム解析による赤血球侵入・感染機構の解明

研究課題名（英文）Evaluation of the mechanism for erythrocyte-invasion through the targetome analyses in the Plasmodium merozoite stage

研究代表者

西 翔（Nishi, Tsubasa）

三重大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50880051

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ネズミマラリア原虫 *Plasmodium berghei* を用いて、メロゾイト形成期に特異的に発現する3種のAP2ファミリー転写因子の標的遺伝子解析を行った。その結果、メロゾイト形成期には、短い時間の中で3種の転写因子によって経時的に遺伝子が活性化され、核分裂、細胞分裂、侵入関連細胞小器官の形成等の過程が順序だてて制御されていることが明らかとなった。以上の結果は、メロゾイト形成の基盤となる遺伝子転写制御機構の全体像を明らかにするのみならず、ワクチン標的候補となりうるメロゾイト赤血球侵入機構に重要な新規遺伝子の探索にも非常に有力な情報となることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マラリアは三大感染症の一つであり、現在も途上国を中心に年間約2億人の罹患者、60万人を超える死者が報告されている。本研究の成果は、マラリアの病原体である *Plasmodium* 属原虫の赤血球侵入ステージであるメロゾイトについて、深い理解を与えるものである。また、原虫の赤血球ステージはその病原性に直接かかわっており、特にメロゾイトは細胞侵入ステージであることから、マラリアワクチンにおける魅力的な標的とされる。よって、本研究のメロゾイト形成期における標的遺伝子解析の結果は、新たなワクチン標的分子の探索においても非常に有力な情報となる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the function of three AP2-family transcription factors that are specifically expressed during the merozoite formation in *Plasmodium berghei*. We revealed that the three transcription factors generate the cascade of gene transcription to regulate the merozoite formation in several steps, such as karyokinesis, cytokinesis, and formation of invasion-related organelles. Our data are not only important for evaluating the transcriptional regulation that underlies the *Plasmodium* merozoite formation but also contribute to the studies that aim to identify new candidates for malaria vaccine targets.

研究分野：寄生虫（原虫）

キーワード：マラリア原虫 遺伝子転写制御機構 メロゾイト

1. 研究開始当初の背景

マラリア原虫の赤血球ステージはヒトへの病原性に直接関わる重要な細胞ステージである。中でも細胞侵入ステージであるメロゾイトは、薬剤やワクチンの開発を目的としてこれまでに多くの研究がなされている。しかしながら、メロゾイトの増殖・侵入・感染に関わる研究は特定の分子のみに焦点を当てており、その機構の全容を明らかとするものではない。メロゾイト形成には多様な遺伝子が関与しており、原虫の増殖・赤血球侵入・感染機構を完全に解明するには、それらの遺伝子全体を包括する視点に立つ研究が不可欠である。マラリア原虫は寄生という性質により、ごく少数の配列特異的転写因子(約30種のAP2ファミリー転写因子(AP2-TF))のみで成立する、非常に単純な遺伝子制御機構を獲得した生物である。我々はこれまでに、いくつかの細胞ステージにおいて、特異的に発現したAP2-TFがそのステージ形成に必要な遺伝子を包括的に制御していることを証明してきた。この成果は、マラリア原虫において、ある細胞ステージを形成する遺伝子全体をとらえるためには、そのステージで発現するAP2-TFとそれによる遺伝子制御を理解することが必要であることを示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、メロゾイト形成期に発現するAP2-TFのChIP-seq解析により、メロゾイト形成期の遺伝子転写制御を解明する。また、それらのAP2-TFの標的遺伝子解析(ターゲットーム解析)を行い、メロゾイトを形成する分子基盤の全体像を明らかにする。代表者はこれまでにネズミマラリア原虫(*P. berghei*)を用いて、赤血球ステージで必須である全てのAP2-TFのGFP融合遺伝子発現株を作製し、それらの発現時期を同定した。その結果、メロゾイト形成期には3種のAP2-TFが発現することを発見した。この3種のAP2-TFはメロゾイト形成期の短い時間の中で経時的に発現しており、代表者はこれらが段階的に働き複雑なメロゾイト形成の過程を制御することを示唆している。したがって代表者は、それらのターゲットーム解析を行うことで、メロゾイト形成期における分子基盤を詳細に解明できると考えた。さらに代表者は、その結果をもとに機能未知遺伝子についても、どの遺伝子群と同様の制御を受けるかを分類することで、その機能を解明する手掛かりを得られると考えた。

3. 研究の方法

本研究では、メロゾイト形成期特異的な3種の転写因子について、ChIP-seq解析などを行い、メロゾイト形成期における遺伝子転写制御機構の全容を明らかにする。また、ターゲットーム解析により各機能を持つ遺伝子群がどのような順序で活性化されているかを解析し、メロゾイト形成の分子基盤を解明する。具体的には、以下のからの実験を行う。

各AP2-TFのGFP融合遺伝子発現株を用いてChIP-seq解析を行う。まず、それぞれの発現時期に合わせて細胞を回収し、固定、溶血を経た後、クロマチンを超音波で剪断する。その後、あらかじめ抗GFP抗体を結合させておいた磁気ビーズと混ぜ、ChIPを行う。得られたクロマチンからDNAを精製し、次世代シーケンシング(NGS)により解析する。得られたピーク情報から、ピーク領域に濃縮されている配列を解析し、各AP2-TFの結合配列を同定する。

DiCreシステムを用いた条件付きノックアウトにより、RNA-seqを用いた遺伝子発現変動解析を行い、実際の転写制御への寄与を調べる。DiCreシステムは、Cas9発現原虫から作製したDiCre発現原虫を用いる。このシステムでは、標的遺伝子座(各AP2-TF遺伝子)にIoxP配列をCRISPR/Cas9システムによって2ヶ所導入し、ラパマイシンの投与によりノックアウトを誘導する。ノックアウトの誘導は、in vitroの培養にて行う。そして、各AP2-TFの発現時期に合わせて、ラパマイシン投与原虫と未投与原虫からRNAを回収し、RNA-seq解析を行って、トランスクリプトームを比較する。

DIP-seq解析によりin vitroで結合配列を確認する。各AP2-TFのDNA結合ドメイン(AP2ドメイン)のGST融合リコンビナントタンパク質(GST-AP2)を作製する。GST-AP2を短く剪断した原虫のゲノムDNAと混ぜ、GST-AP2が結合したDNA断片を、グルタチオンセファロースを用いて回収する。回収したDNAをNGSで解析し、得られたピーク情報から結合配列がの結果と一致することを確認する。

CRISPR/Cas9システムを用いて、標的遺伝子上流に存在するAP2-TFの結合配列に変異を導入する。その後、RT-qPCRとChIP-qPCRにより変異導入前後での変化を調べ、その結合配列のシスエレメントとしての機能を評価する。

ターゲットーム解析により、各AP2-TFにより制御される遺伝子群を機能ごとに分類し、各遺伝子群がどのように制御されるかを明らかにする。各遺伝子の分類は、1種のAP2-TFによって独立に制御されるものや複数のAP2-TFによって制御されるものなどに詳細に分類し、メロゾイト形成の分子基盤およびその遺伝子制御機構を理解する。さらに、機能未知の遺伝子についても上記と同様に分類し、どの機能を持つ遺伝子群と同様に分類されるかを解析する。

4. 研究成果

本研究の結果から、3種の AP2-TF はメロゾイト形成期において経時的に発現し、遺伝子転写のカスケードを制御していることが明らかとなった。特にそれらのうち、中期に発現する AP2-TF については、ロプトリーやメロゾイト先端部関連遺伝子を制御しており、メロゾイトの形成に中心的な役割を担っていることが示された。この結果は、メロゾイト形成の基盤となる遺伝子転写制御機構の全体像を明らかにするのみならず、ワクチン標的候補となりうるメロゾイト赤血球侵入機構に重要な新規遺伝子の探索にも非常に有力な情報となることが期待される。一方で本研究では、原虫が赤血球内で複数のメロゾイトを形成する過程(シゾゴニー)において重要な DNA 複製や核分裂に関わる遺伝子群が、標的遺伝子解析にあまり含まれていなかったことから、その他にも重要な転写因子とそれらに対応する cis エlementが存在することが考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nishi Tsubasa, Kaneko Izumi, Iwanaga Shiroh, Yuda Masao	4. 巻 19
2. 論文標題 PbAP2-FG2 and PbAP2R-2 function together as a transcriptional repressor complex essential for Plasmodium female development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1010890
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1010890	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 -
1. 著者名 Nishi Tsubasa, Kaneko Izumi, Iwanaga Shiroh, Yuda Masao	4. 巻 18
2. 論文標題 Identification of a novel AP2 transcription factor in zygotes with an essential role in Plasmodium ookinete development	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1010510
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1010510	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 -
1. 著者名 Yuda Masao, Kaneko Izumi, Murata Yuho, Iwanaga Shiroh, Nishi Tsubasa	4. 巻 14
2. 論文標題 Targetome Analysis of Malaria Sporozoite Transcription Factor AP2-Sp Reveals Its Role as a Master Regulator	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e0251622
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mbio.02516-22	査読の有無 無
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 Iwanaga Shiroh, Kubota Rie, Nishi Tsubasa, Kamchonwongpaisan Sumalee, Srichairatanakool Somdet, Shinzawa Naoaki, Syafruddin Din, Yuda Masao, Uthaipibull Chairat	4. 巻 13
2. 論文標題 Genome-wide functional screening of drug-resistance genes in Plasmodium falciparum	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-33804-w	査読の有無 無
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, Okubo Kazuhiro, Nishi Tsubasa	4. 巻 93
2. 論文標題 Plasmodium 6-cysteine proteins determine the commitment of sporozoites to liver-infection	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102700 ~ 102700
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2022.102700	査読の有無 無
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 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 e0260176
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 無
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 無
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 18501
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 無
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, Kaneko Izumi, Iwanaga Shiroh, Yuda Masao	4. 巻 -
2. 論文標題 PbARID-associated chromatin remodeling events are essential for gametocyte development in Plasmodium	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 gkae207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkae207	査読の有無 無
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 Murata Yuho, Nishi Tsubasa, Kaneko Izumi, Iwanaga Shiroh, Yuda Masao	4. 巻 12
2. 論文標題 Coordinated regulation of gene expression in Plasmodium female gametocytes by two transcription factors	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 RP88317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.88317	査読の有無 無
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 Kaneko Izumi, Nishi Tsubasa, Iwanaga Shiroh, Yuda Masao	4. 巻 120
2. 論文標題 Differentiation of Plasmodium male gametocytes is initiated by the recruitment of a chromatin remodeler to a male-specific cis-element	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2303432120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2303432120	査読の有無 無
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 Hashizaki Emi, Sasai Miwa, Okuzaki Daisuke, Nishi Tsubasa, Kobayashi Takashi, Iwanaga Shiroh, Yamamoto Masahiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Toxoplasma IWS1 Determines Fitness in Interferon- γ -Activated Host Cells and Mice by Indirectly Regulating ROP18 mRNA Expression	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e0325622
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mbio.03256-22	査読の有無 無
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4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 西翔、金子伊澄、岩永史朗、油田正夫
2. 発表標題 RIME法によるマラリア原虫雌性生殖母体特異的転写因子AP2-FG2のコファクターの同定
3. 学会等名 第92回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tsubasa Nishi, Izumi Kaneko, Shiroh Iwanaga, Masao Yuda
2. 発表標題 Transcriptional regulation by a novel AP2 transcription factor AP2-Z during Plasmodium zygote development
3. 学会等名 第20回あわじ感染と免疫国際フォーラム(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西翔、金子伊澄、岩永史朗、油田正夫
2. 発表標題 転写因子AP2-Zによる マラリア原虫接合体の遺伝子制御
3. 学会等名 第91回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西翔、金子伊澄、岩永史朗、油田正夫
2. 発表標題 マラリア原虫雄性生殖母体形成における クロマチンリモデリング因子gSNF2とPbARIDの役割
3. 学会等名 第93回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2024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
---------	---------