

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15449

研究課題名（和文）マラリア原虫におけるヘテロクロマチン解除機構の解明

研究課題名（英文）Elucidating the molecular mechanism underlying regulation of heterochromatin dissociation in human malaria parasite

研究代表者

中嶋 舞（Nakashima, Mai）

大阪大学・微生物病研究所・特任助教（常勤）

研究者番号：50911319

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 400,000円

研究成果の概要（和文）：マラリア原虫はヒト赤血球で無性生殖により増殖するが、数%は細胞運命を変え生殖母体へと分化する。このステップを担うのは転写因子であるAP2-Gであるが、その転写はヘテロクロマチン化により厳密に抑制されており、発現調節機構は未だ解明されていない。そこで研究代表者は、AP2-G遺伝子領域におけるヘテロクロマチンの解除システムの解明を試みた。方法として、AP2-G遺伝子座を欠失させた原虫株に改変AP2-G遺伝子座を組み込んだ人工染色体をレポーターとして導入し、ヘテロクロマチンおよび遺伝子発現変化の評価を行う新規アッセイを構築した。結果、AP2-Gの発現抑制に関与する遺伝子領域を見いだすことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、独自に開発した技術である *in vivo* レポーターシステムを用いてマラリア原虫の転写制御評価系を確立したことは、将来的に未だ未知のヘテロクロマチン制御機構を分子レベルで解明することに繋がる。また、本研究はAP2-Gを通じたマラリア原虫の性分化のエピジェネティックな発現制御機構に新たな知見を加えるだけでなく、抗原転換による宿主免疫回避機構の解明の糸口となり、ひいてはこの機構を標的とした新規ワクチンの開発や創薬などマラリアの予防・治療を目指した医療応用研究に新たな道を拓くものである。

研究成果の概要（英文）：Plasmodium falciparum, a causative agent of human malaria, is a unicellular parasite that reproduces asexually during the intraerythrocytic cycle. A small fraction of them develops into gametocytes, the sexual form critical for transmission from human to mosquito vector. Gametocytogenesis is triggered by a single master regulator, AP2-G. AP2-G is a transcription factor, and its transcription is strictly repressed by heterochromatinization of the gene locus, although the fundamental mechanism of AP2-G regulation has remained elusive. In this study, we tried to identify a sequence element in the heterochromatinized AP2-G promoter that participates in chromatin dissociation leading to AP2-G expression, using *in vivo* reporter system in which artificial chromosome vectors carrying AP2-G promoter, coding region and terminator are introduced into AP2-G-deleted parasite. As a result, we identified a unique sequence required for the maintenance of chromatin condensation on the reporter.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア 転写制御 エピジェネティクス 寄生虫

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界3大感染症の一つであるマラリアは年間数億人が感染する寄生虫疾患であり、新規薬剤やワクチンの開発が急務である。研究代表者は、マラリア原虫の存続に必須である「有性生殖」のステップを医療応用研究のターゲットとし、その分子機構を解明することを目的に研究を開始した。

マラリア原虫は真核生物に特有の、ヘテロクロマチンによる遺伝子発現制御機構を有する。この機構が、原虫が無性生殖期から有性生殖期に転換する「性分化」のステップに関わる遺伝子の制御の肝となっている。この制御機構は临床上及び学術上の両面において意義が大きくマラリア研究の中心的課題となっているが、既存の研究手法では分子レベルのアプローチが困難であり、未だ大部分が解明されていない状況であった。

2. 研究の目的

マラリア原虫の性分化は、たった一つのマスター転写因子である AP2-G が発現することで始まる。AP2-G は通常、ヘテロクロマチン構造によりその発現が厳密に抑制されている(図1)。そこで研究代表者は、AP2-G の発現がいつどのようなタイミングで開始され、どういった分子が関与しているか? その際ヘテロクロマチンの状態はどのようになっているか、を分子レベルで解明することを目的とした。

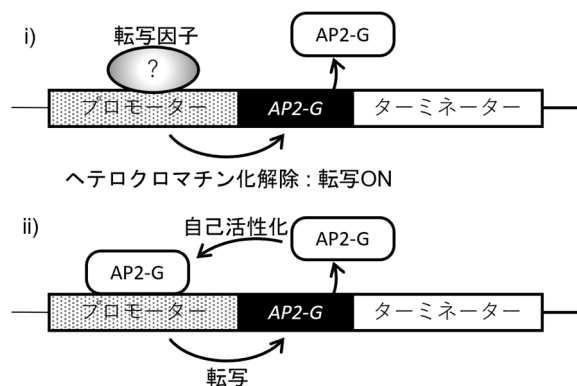
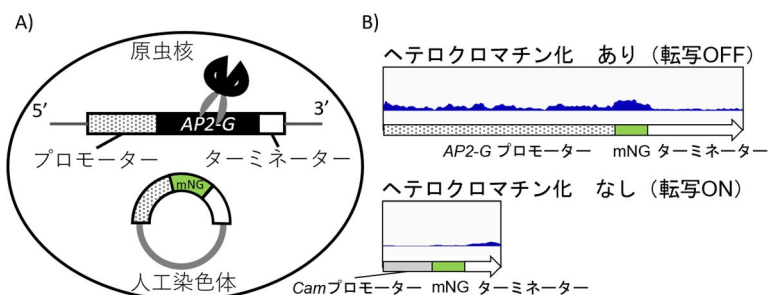


図1 AP2-G の2段階的転写制御機構

i) 未知の因子によりヘテロクロマチンが解除され AP2-G の転写がおこる。ii) 次に AP2-G の自己活性化により転写の継続・増幅が起こる。

3. 研究の方法

本研究においては、独自に確立した人工染色体技術である *in vivo* ヘテロクロマチン評価システムを用いた。これは AP2-G の遺伝子領域における DNA 配列を人工染色体(レポーター)上で自在にデザインし、クロマチン免疫沈降(ChIP-qPCR, ChIP-seq)および RNA-seq にてヘテロクロマチンの状態や転写量を評価するという方法である。この *in vivo* レポーターを、AP2-G 遺伝子座



のヘテロクロマチン領域全てを世界で初めて欠失させた独自の原虫株に導入し、レポーター上におけるヘテロクロマチンの構築から解除を評価した(図2)。

図2 人工染色体を用いた *in vivo* ヘテロクロマチン評価システム

A)CRISPR/Cas9 システムにより *AP2-G* をノックアウトした原虫株に、*AP2-G* プロモーター、ターミネーター、mNG で構成された人工染色体を導入する。 B)ChIP-seq にて人工染色体がヘテロクロマチン化されていることが確認された。一方カルモジュリン(*Cam*)プロモーターではヘテロクロマチン化が解除されており、*AP2-G* のプロモーター配列に依存するヘテロクロマチン化機構の存在が示唆された。

4 . 研究成果

研究代表者らは、*AP2-G* 遺伝子領域を様々に欠失させたレポーターの解析を行った結果、ヘテロクロマチン制御に必須の遺伝子領域(数百 bp 相当)を *AP2-G* 遺伝子座において特定することに成功した。この遺伝子領域を欠失させると、ヘテロクロマチンが解除され、*AP2-G* の転写量が増加していることが確認された。現在、同領域を欠損させた場合の発現遺伝子の変動解析を行っており、ヘテロクロマチン制御に関連する分子の特定を試みている。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Mori Toshiyuki, Nakashima Mai	4. 巻 9
2. 論文標題 Sequence-dependent heterochromatin formation in the human malaria parasite Plasmodium falciparum	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e19164 ~ e19164
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2023.e19164	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中嶋 舞、岩永 史朗
2. 発表標題 熱帯熱マラリア原虫におけるAP2-Gの転写制御配列
3. 学会等名 第93回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 中嶋 舞、西翔、油田正夫、岩永 史朗
2. 発表標題 熱帯熱マラリア原虫におけるヘテロクロマチン局在因子AP2-HC の解析
3. 学会等名 第78回 日本寄生虫学会西日本支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中嶋 舞、森 稔幸、岩永 史朗
2. 発表標題 ヒトマラリア原虫における生殖分化マスター転写因子AP2-G遺伝子のヘテロクロマチン化による制御システムの解明
3. 学会等名 第16回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中嶋 舞
2. 発表標題 マラリア原虫におけるヘテロクロマチン解除の分子機構にせまる
3. 学会等名 第28回分子寄生虫学ワークショップ/第18回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中嶋 舞、森 稔幸、岩永 史朗
2. 発表標題 ヒトマラリア原虫の有性生殖制御遺伝子における、ヘテロクロマチン解除と転写制御の始点となるシスエレメントの同定
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中嶋 舞、森 稔幸、岩永 史朗
2. 発表標題 熱帯熱マラリア原虫における転写因子AP2-Gの遺伝子座配列依存的ヘテロクロマチン形成機構の解明
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 中嶋 舞、森 稔幸、岩永 史朗
2. 発表標題 ヒトマラリア原虫における生殖分化マスター転写因子AP2-G遺伝子のヘテロクロマチン化による制御システムの解明
3. 学会等名 第16回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2023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
---------	---------