

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：82610

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15127

研究課題名(和文) マラリア原虫の転写因子群強制発現による原虫発育期強制転換の可能性

研究課題名(英文) Possibility of forced conversion of the developmental stage of malaria parasite by forced expression of transcription factors

研究代表者

安田 加奈子(駒木加奈子)(Kanakano, Komaki-Yasuda)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・研究所 熱帯医学・マラリア研究部・研究員(移行)

研究者番号：50415551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では培養マラリア原虫(赤血球内寄生期)にその他のステージで働く転写因子を強制発現させて形態変化誘導を試みた。ガメトサイト期の転写因子AP2-G、AP2-G2の強制発現用のベクター構築は、遺伝子のサイズ、AT-リッチ、遺伝子多型等が原因で達成できなかった。スポロゾイト期の転写因子AP2-Sp強制発現用ベクターは構築に成功し、原虫に導入した。AP2Spの発現の誘導の結果、わずかな原虫増殖率の抑制の他には表現型が得られなかった。過剰発現のon/offの調節が働かなかった可能性も考えられる。今後は、原虫で不足している、遺伝子発現のon/offの仕組みを明らかにする必要があると考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, induction of forced developmental stage conversion of malaria parasite was attempted by the forced expression of transcription factors, which act at various developmental stages. Construction of plasmid vectors, for expression of gametocyte stage specific transcription factors AP2-G and AP2-G2, could not be achieved due to those gene size, AT-richness, genetic polymorphism etc. The plasmid vector for the expression of sporozoite stage specific transcription factor AP2-Sp was successfully constructed and introduced into the cultured intraerythrocytic parasite. As a result of the induction of expression of AP2Sp, no phenotype other than a slight suppression of growth rate was observed. It is also possible that the system for on / off regulation of overexpression did not work. In future, we think that it is necessary to elucidate the mechanism for on / off regulation of gene expression which is deficient in the parasite.

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 遺伝子発現 形態変化

## 1. 研究開始当初の背景

本研究の着想の背景には、哺乳類細胞で盛んにおこなわれている幹細胞の研究がある。多細胞生物は、受精卵の状態ではあらゆる細胞に分化できる「全能性」を備えているが、発生が進み分化すると、通常は「全能性」を持つ状態に戻る事ができない。iPS細胞は、発生初期の細胞で働く転写因子のセットを、強制的に分化の進んだ細胞に発現させると、細胞が「初期化」され、再度「全能性」を獲得した多能性幹細胞になるものである。iPS細胞の発見は、細胞の分化・未分化状態の規定にはごく少数の転写因子の発現で充分である、という驚くべき発見でもあった。申請者は単細胞のマラリア原虫に、「脱分化」の概念はあり得るのだろうかと考えた。そして、ヒトと蚊の間で巧妙に形を変えながら行き来する原虫にとって、その形態の変化の運命（スポロゾイト→肝内型→赤血球内寄生サイクル→ガメトサイト→ガメト→ザイゴート→オーキネート→オーシスト→スポロゾイト）から自由になり、形態を自由に変えられることが原虫にとっての「脱分化」「初期化」に相当するのではないかと考えた。また、最近、オーキネート、スポロゾイト、肝内型、ガメトサイトの各ステージにおいて、そのステージに特異的な遺伝子のセットを発現させるために特定の APiAP2 ファミリーと呼ばれる遺伝子群に属する転写因子が作用し、それぞれのステージに特異的に発現する多くの遺伝子群の発現を制御しているという知見が得られている。以上の背景から、これらの転写因子を原虫に強制発現させれば、通常の培養原虫（赤血球内寄生期）から、自在にガメトサイト、究極的にはスポロゾイトを直接作り出せる可能性があるのでは、という着想に至った。

## 2. 研究の目的

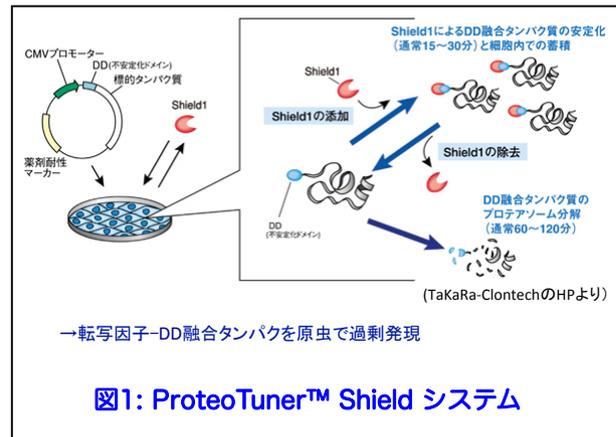
培養熱帯熱マラリア原虫（赤血球内寄生サイクル）にガメトサイトで働く転写因子のセットを強制発現させて高効率でガメトサイトを作成することを目指す。同時に、究極的な目標として、スポロゾイトで働く転写因子を赤血球内寄生サイクルの培養原虫に強制発現させ、スポロゾイトへの形態変化を起こすことを試みる。実験用に得ることが困難なガメトサイト、スポロゾイトの大量調製の方法を確立することと、原虫の形態変化に転写因子が果たしている役割を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

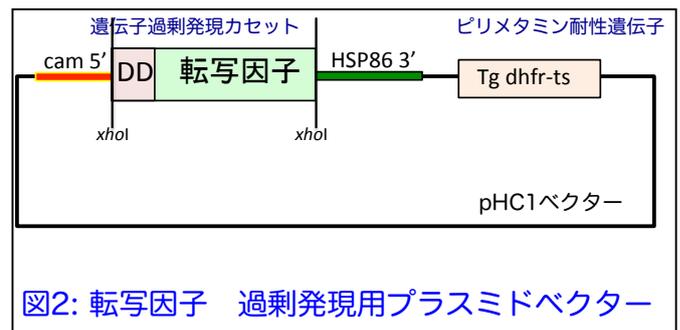
### i) プラスミドの構築

ガメトサイト期特異的、スポロゾイト期特異的に働く転写因子について「過剰発現のタイミングを調節できる株」を樹立する為

のプラスミドを作成した。この目的の為に Clontech 社の ProteoTuner™ Shield システムを利用する。このシステムでは、標的タンパク質は不安定化ドメイン (DD) と融合された状態で発現され、これは速やかに分解される (図 1)。そこに膜透過性の低分子リガンド Shield1 を添加すると、DD を介した分解が抑制され、標的タンパク質が発現される。この系を利用した、転写因子時期特異的過剰発現株作成用プラスミドを構築する。



各因子の遺伝子は、熱帯熱マラリア原虫のゲノム DNA をテンプレートとした PCR によって増幅した。増幅された各 coding region の 5' 末端に DD をコードする配列を付加、pHC1 プラスミド (マラリア原虫で汎用されている過剰発現用ベクター) の expression site に導入した (図 2)。



ii) プラスミドベクターの原虫への導入、上記で作成したプラスミドを、エレクトロポレーションによって培養熱帯熱マラリア原虫に導入する。0.1 μM のピリメタミンで遺伝子導入原虫を選択し、安定したプラスミド保持原虫を得た。

### iii) 因子の強制発現

プラスミド導入原虫の培養液中 1.5 μM Shield1 添加した。DD を介した分解を抑制することで、導入遺伝子に由来するタンパクを

強制発現させる。添加以降、毎日培養液を交換しながら、5日間にわたって原虫の形態、寄生率を観察した。

#### 4. 研究成果

ガメトサイト期特異的転写因子 AP2-G の過剰発現用のプラスミドは、遺伝子のサイズが大きく(7 kbp)また、AT-リッチであるために、マラリア原虫用の過剰発現ベクターpHC1への導入を試みたが大腸菌を利用したプラスミド構築ではプラスミドが得ることができなかった。

もうひとつのガメトサイト期特異的転写因子 AP2-G2 に関しては coding region をマラリア原虫のゲノムから PCR で増幅し、プラスミドにサブクローニングし、シーケンス解析したところ、異なる遺伝子配列が複数種類得られ、その中にはフレームシフトを起こしているものも認められたため、この遺伝子が遺伝子多型を持ち、変異のホットスポットである可能性が示された。この遺伝子多型は、マラリア原虫株によってガメトサイトの形成効率に差があることの原因となっている可能性も考えられる。また、正しい coding region を持つプラスミドを構築することはできなかった。

スポロゾイト期特異的転写因子 AP2-Sp の過剰発現用のプラスミドに関しては構築が終了し、エレクトロポレーションによって原虫に導入した。ピリメタミンによる遺伝子導入原虫の選択後、Shield1 添加によって AP2-Sp の過剰発現を試み、無添加時との原虫増殖率を比較した。発現の on/off 時の原虫増殖率を比較した。結果、Shield1 添加時にはわずかに原虫増殖率の抑制が認められた他には表現型が得られなかった (図 1)。

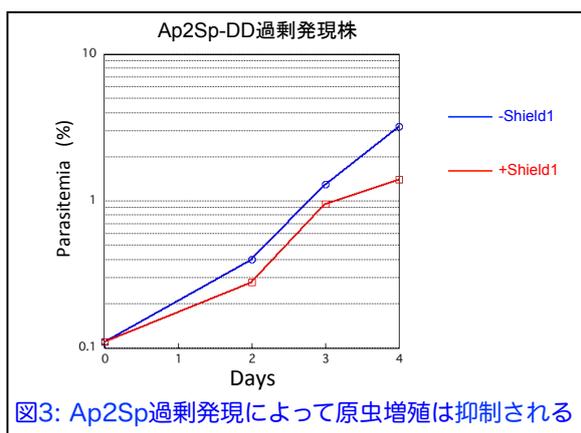


図3: Ap2Sp過剰発現によって原虫増殖は抑制される

さらに Shield1 添加時の原虫ライセートを DD に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングによって解析した。AP2-Sp-DD 発現ベクター導入マラリア原虫の培養液中に 1.5  $\mu$ M の Shield1 を添加し、5時間後の原虫細胞を回収した。コントロールとして、同じ培養

に Shield1 を添加しなかったものも調製した。これらの原虫細胞の whole lysate を SDS-PAGE によって展開、PVDF 膜にトランスファーした後に、DD ドメインに対する特異的なモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングによって AP2-Sp-DD のタンパク質レベルでの発現の検出を試みた。しかし、Shield1 を添加時において、AP2-Sp-DD のタンパク質発現が検出できず、発現の亢進が起きていないことが示唆された。この様に今回は、ProteoTuner Shield 1 システムによる調節が、期待した通りには原虫で働いていないことが示唆された。

今後については、転写因子の機能と原虫の形態変化の関係について別の方向からアプローチする必要があると考えている。具体的には申請者が発見した転写因子 PREBP の作用メカニズムを解析する目的で立ち上げた、レポーターアッセイを用いた系を利用して、AP2-Sp の転写因子としての作用に重要なドメイン、また、これらの転写因子の働きに重要な転写調節 DNA 配列の解析をおこなうことが考えられる。これらの基礎的な知見の積み重ねによって、原虫において不足している、遺伝子発現の on/off の仕組みを明らかにしていく必要がある。現在、マラリア原虫において不足している分子生物学的なメカニズムについての研究を進めるためにもこれらの知見は必須と考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. 駒木-安田加奈子, 松本-高橋エミリー, 川合寛, 狩野繁之: PURE/LAMP 法のマラリア診断への応用. *Clinical Parasitology* 26: 83-85, 2015

[学会発表] (計 5 件)

1. 駒木-安田加奈子, 狩野繁之: マラリア原虫独自の転写因子 PREBP タンパクの活性化部位の探索 第 85 回日本寄生虫学会、2016 年 3 月 19 日、宮崎市民プラザ
2. Kanako Komaki-Yasuda and Shigeyuki Kano: Functional analyses for a Novel Identified Transcription Factor Which Works in the Intraerythrocytic Stage of *Plasmodium falciparum*. 18th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim, Parasitic disease panel, Bethesda, USA, Jan., 2016

3. 駒木-安田加奈子, 狩野繁之 : 5 種マラリア原虫の 18S リボソーム RNA 遺伝子を標的とした改良型 PCR 診断法の開発 第 75 回日本寄生虫学会東日本支部大会、2015 年 9 月 26 日、LEN 貸会議室 御茶ノ水ニコライ堂前
4. 駒木-安田加奈子, 狩野繁之 : PURE/LAMP 法のマラリア診断への応用 第 26 回日本臨床寄生虫学会、2015 年 6 月 20 日、栃木県総合文化センター
5. Kanako Komaki-Yasuda, Shin-ichiro Kawazu and Shigeyuki Kano: Identification of a Novel Transcription Factor which Works in the Intraerythrocytic Stage of Plasmodium falciparum. 25th Annual Molecular Parasitology and Vector Biology Symposium, Athens, USA, Apr., 2015

[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  
なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者 安田加奈子 (駒木加奈子)  
(Kanako Komaki-Yasuda)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター  
研究所  
熱帯医学・マラリア研究部  
研究員

研究者番号 : 50415551