

令和元年5月23日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08758

研究課題名(和文) マラリア原虫雌性ガメトサイト特異的な転写因子の研究

研究課題名(英文) Female-specific gene regulation in malaria parasites by an AP2-family transcription factor

研究代表者

金子 伊澄 (Kaneko, Izumi)

三重大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20515720

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)：マラリア原虫雌雄成熟ガメトサイト(生殖母体)は、ヒトから媒介蚊への伝播を担う唯一のステージである。ガメトサイトで発現される遺伝子群がコードするタンパク質は蚊への伝播阻止戦略・薬剤開発の重要な標的である。本研究は雌性ガメトサイト特異的な転写因子AP2-F(APETALA2 in female gametocyte)を発見し、AP2-Fが制御する全標的遺伝子を同定した。AP2-Fが制御する遺伝子群は雌ガメトサイトの成熟から蚊内のガメトサイトさらには蚊中腸侵入ステージであるオオキネートの形成に必須の遺伝子まで、蚊への伝播に必須の一連の遺伝子群が含まれていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではマラリア原虫のヒトから蚊への伝播を担うステージである雌性ガメトサイトを対象とし、一つの転写因子AP2-Fを手掛かりとすることで、雌性ガメトサイトで発現される遺伝子群を同定した。本研究で得られた成果は、マラリア伝播阻止戦略における新たな候補抗原開発に貢献する。

研究成果の概要(英文)：The malarial gametocyte, the gamete precursor, is the parasite stage obligatory for malarial transmission to the mosquito vector. We report that an AP2-family transcription factor, AP2-F, is responsible for female-specific gene regulation. AP2-F expression in *Plasmodium berghei* was observed exclusively in female gametocytes. AP2-F disruption resulted in the arrest of female maturation, but did not affect the development of males. ChIP-seq analysis showed that AP2-F directly regulates over 750 genes. Its targets include genes for female gametocyte-specific functions, such as gametogenesis, fertilization, and zygote development. AP2-F binding to target gene promoters was associated with a 10-bp sequence motif. These results indicate that AP2-F plays a role in the differentiation of early gametocytes into mature females by governing a female-specific gene expression repertoire.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

マラリア原虫雌雄成熟ガメトサイト(生殖母体)は、ヒトから媒介蚊への伝播を担う唯一のステージである。ガメトサイトで発現される遺伝子群がコードするタンパク質は蚊への伝播阻止戦略・薬剤開発の重要な標的であるが、その発現制御機構は未だ不明である。

近年の研究でガメトサイトへの移行期の遺伝子発現は 2 種類の AP2 family 転写因子 AP2-G(APETALA2 in gametocyte)および AP2-G2(APETALA2 in gametocyte 2)により制御されていることが明らかとなってきた。AP2-G は無性増殖期の原虫がガメトサイトへとコミットメントする際に必須の転写因子である(Sinha,2014,Nature)。申請者らは最近の研究で、AP2-G2 がガメトサイトへの移行期において無性増殖期の遺伝子群の転写を抑制しているリプレッサーであることを報告した(Yuda,2015,PNAS)。このようにガメトサイトへの移行期における遺伝子発現制御が明らかになってきた一方、それに続く成熟期の性特異的な遺伝子発現制御やそれに関わる転写因子はこれまでわかっていなかった。

申請者はこれまで *Plasmodium berghei* ゲノム中に同定されている全 27 種類の AP2 family 転写因子の解析を行ってきた。その過程で、1 つの AP2 family 転写因子 AP2-F が雌性ガメトサイトの核に特異的に発現していることを発見した(図 1)。そこで AP2-F 遺伝子欠損原虫を作製しその機能を解析した結果、雌性ガメトサイトは形態的に未成熟でその蚊への伝播能は完全に失われていた(図 2)。一方で雄性ガメトサイトは機能・形態的にも正常であった。この結果から申請者は、AP2-F がこれまで見つかっていなかった雌性ガメトサイト成熟期特異的な遺伝子発現を制御しているマスター転写因子であると考えた。

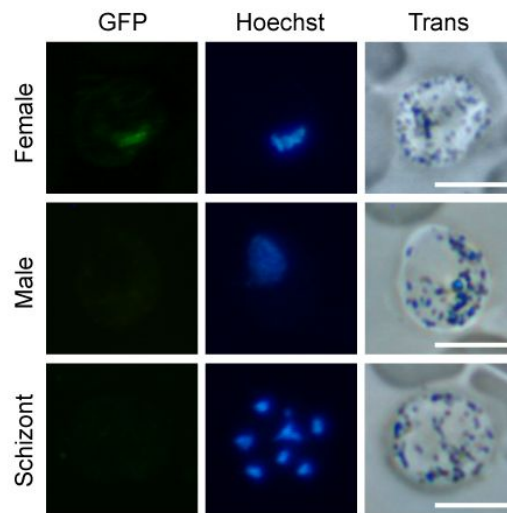


図 1 AP2-F::GFP 原虫を用いた発現解析  
AP2-F はマラリア原虫雌ガメトサイトの核に局在している

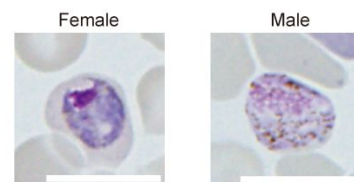


図 2 AP2-F 欠損原虫を用いた機能解析  
AP2-F 欠損原虫の雄ガメトサイトは正常であるのに対し雌ガメトサイトは未成熟である

### 2. 研究の目的

本研究では、1 .AP2-F の全標的遺伝子群を ChIP-seq(chromatin immunoprecipitation and sequencing)法を用いゲノムワイドに同定することで、その雌性ガメトサイト成熟に果たす役割を解明すること。2 .AP2-F の結合配列を基に雌性ガメトサイト特異的な遺伝子発現制御機構を解明すること。3 .AP2-F 標的遺伝子群の機能解析から、雌性ガメトサイトの成熟・伝播に関わる新規遺伝子を同定することを目的とした。

### 3. 研究の方法

AP2-F 欠損原虫を用いたマイクロアレイ解析を行った。AP2-F 欠損原虫および野生型原虫を in vitro で 16 時間同調培養を行いシズントを精製し、得られたシズントをラットに i.v.し、26 時間後の雌雄成熟ガメトサイトに同調した原虫から RNA を抽出した。RNA は

各原虫で 4 サンプルずつ抽出し、マイクロアレイ解析により遺伝子発現を比較した。AP2-F の ChIP-seq 法を行い全標的遺伝子および結合配列を同定した。ChIP-seq は、sulfadiazine 処理を行い asexual stage の原虫を除去し、感染血液中のガメトサイトを濃縮した原虫を用いた。解析で得られた配列をゲノム上にマッピングして AP2-F 標的遺伝子を同定した。同定した結合配列の cis-acting element としての機能を EMSA (electrophoresis mobility shift assay) およびプロモーターアッセイにより解析した。プロモーターアッセイは、レポーターを GFP とした人工染色体を用いた。

#### 4. 研究成果

AP2-F 欠損原虫および野生型原虫を用いたマイクロアレイ解析の結果、AP2-F 欠損により P47 等の雌ガメトサイト特異的遺伝子を含む 206 個の遺伝子の発現量が野生型と比較して 3 倍以上減少していることがわかった。さらに AP2-F が直接制御する全遺伝子を同定するために ChIP-seq を行った。ChIP-seq は独立した 2 回の解析を行い再現性のある結果を得た。マイクロアレイの結果と比較したところ、AP2-F 欠損により発現量が変化する遺伝子の

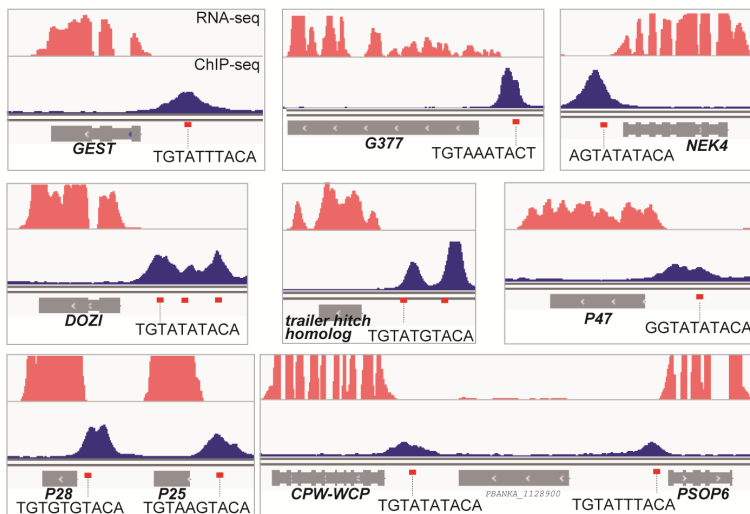


図3 AP2-F::GFP および抗 GFP 抗体を用いた ChIP-seq の結果 (下段) とガメトサイト期の RNA-seq (上段) AP2-F は雌ガメトサイト遺伝子群の上流域に結合し、その上流域には共通した cis 配列が確認される

子のの上流域に AP2-F が結合していることが確認された。

さらに既報のガメトサイト期の RNA-seq の結果と ChIP-seq 結果を比較することで、雌性ガメトサイト遺伝子の上流域に AP2-F が結合していることを確認した (図 3)。

ChIP-seq の結果、

*Plasmodium berghei* 全遺伝子約 14% にあたる 750 を超える AP2-F 標的遺伝子を同

定した。これらの遺伝子はタンパク質の機能に基づき分類を行った (図 4)。

標的遺伝子の機能分類の結果、AP2-F は protein biosynthesis や female-specific functions に関わる遺伝子群の発現を多数制御していた。AP2-F は哺乳類宿主中の雌

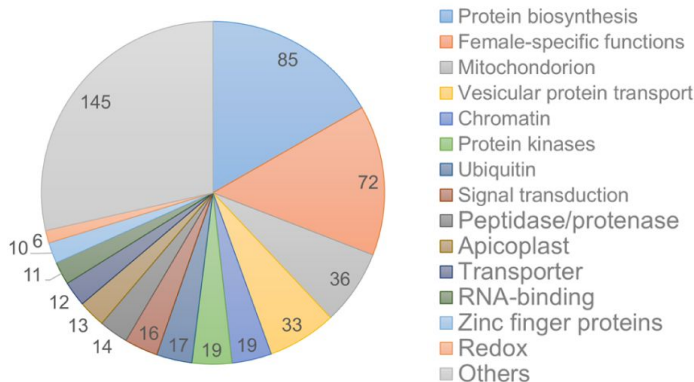


図4 AP2-F の標的遺伝子の機能分類

性ガメトサイトで、その development に関する遺伝

子群の発現を制御し、さらに蚊へ媒介後のガメトの egress や fertilization, meiosis に必要とされる遺伝子群、次のステージであるオオキネート期に必要とされる遺伝子群の一連の遺伝子発現をも制御していることが分かった (図 5)。AP2-F はオオキネートの持つアピ

コンプレクサ類侵入ステージ原虫特有の構造 pellicle および glideosome のコンポーネントをコードする遺伝子群のほとんどすべての発現を制御していた (図 6)。

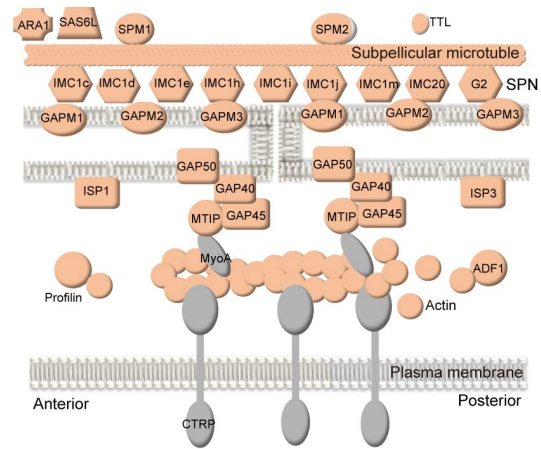
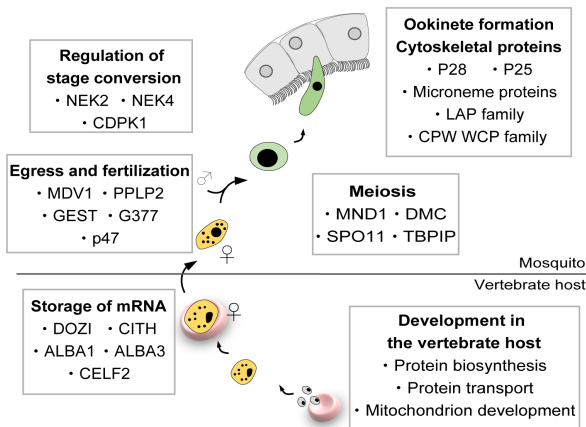


図 5 AP2-F の標的遺伝子  
AP2-F は雌ガメトサイト期からオオキネート期に必要とされる一連の遺伝子群の発現を制御している

図 6 pellicle 構造およびその内側に存在する原虫の滑走運動に関わるモータータンパク質の複合体 glideosome AP2-F の標的遺伝子はオレンジ色で示す

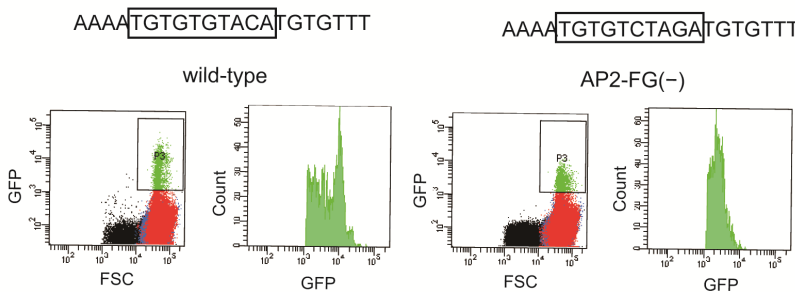


図 7 AP2-F cis 配列の解析  
標的遺伝子 p28 上流域に存在する 10 塩基配列に mutation を加えるとその発現は減少する

ChIP-seq により得られたピーク周辺の DNA 配列を解析し、AP2-F の cis 配列の予測を行った。予測した AP2-F 結合配列の cis-acting element としての機能を人工染色体を用いたプロモーターアッセイにより解析した。プロモーターには AP2-F 標的遺伝子である p28 の上流域を用い、その領域中に存在する 10 塩基中に変異を加え、GFP の発現を LSR Fortessa により解析し野生型と比較した (図 7)。その結果、GFP 発現量は mutation により減少し、予測した配列が cis-acting element として機能していることが証明された。

以上のように、本研究により転写因子 AP2-F の全標的遺伝子をゲノムワイドに同定し、AP2-F による雌性ガメトサイト成熟から蚊への伝播に果たす役割を明らかにした。また AP2-F の結合配列を同定し、その cis-acting element としての機能を証明した。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Shiratsuchi T, Rai U, Kaneko I, Zhang M, Iwanaga S, Yuda M, Tsuji M. A potent malaria vaccine based on adenovirus with dual modifications at Hexon and pVII. *Vaccine*. 15;35(50):6990-7000 (2017) 査読有
2. Li X, Huang J, Kaneko I, Zhang M, Iwanaga S, Yuda M, Tsuji M. A potent adjuvant effect of a CD1d-binding NKT cell ligand in human immune system

- mice., *Expert Rev Vaccines*. 16(1):73-80 (2017) 査読有
3. Zhang M, Kaneko I, Tsao T, Mitchell R, Nardin EH, Iwanaga S, Yuda M, Tsuji M. A highly infectious *Plasmodium yoelii* parasite, bearing *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. *Malar J*. Apr 12;15:201 (2016) 査読有

〔学会発表〕(計0件)

〔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

<http://www.medic.mie-u.ac.jp/idoubutsu/>

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。