

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07084

研究課題名(和文) 転写因子の標的遺伝子解析によるマラリア原虫メロゾイトの侵入機構の解明

研究課題名(英文) Genetic dissection of merozoite invasion by target gene analysis of merozoite-specific transcription factors in malaria parasites

研究代表者

新澤 直明 (Shinzawa, Naoaki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：10583015

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ChIP-seq法によるメロゾイトのマスター転写因子であるAP2Mの標的遺伝子解析を行い、メロゾイト赤血球侵入に関わる新規遺伝子群同定およびその遺伝子発現機構の解明を試みた。ヒト熱帯熱マラリア原虫AP2MのChIP-seq解析によって、503の標的遺伝子とその結合モチーフを同定した。その中には、マイクロRNA遺伝子、ロブトリー遺伝子など既知の侵入関連因子の他、多数の機能未知遺伝子が同定され、メロゾイトの機能に関わる新規分子であることが推測された。さらに、AP2Mは標的遺伝子上流配列に含まれる結合モチーフに結合して、転写活性化を促す役割を持つことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マラリア原虫のメロゾイトによる赤血球への侵入は、感染赤血球からの脱出、新しい赤血球への接着、先端部の方向転換、寄生胞を伴う侵入、侵入後のステージ転換などのステップからなる複雑な現象である。本研究で同定した新規侵入関連因子の機能を明らかにしていくことで、赤血球侵入機構の全貌解明につながることを期待される。赤血球侵入期は、マラリア原虫が直接抗体の攻撃にさらされるため、ワクチンの最重要な標的ステージであるといえる。本研究成果により提示される新しい侵入関連遺伝子はワクチン標的分子の候補としてワクチンの開発者に極めて重要な情報となるだろう。

研究成果の概要(英文)：Erythrocyte invasion by merozoites of malaria parasites is a complex phenomenon consisting of steps such as escape from infected erythrocytes, adhesion to new erythrocytes, apical reorientation, invasion with parasitic spores, and post-invasion stage change. In this study, we attempted to identify novel genes involved in merozoite invasion and elucidate their gene expression mechanisms by analyzing the target genes of AP2M, the master transcription factor of merozoites, using the ChIP-seq method. ChIP-seq analysis of human *Plasmodium falciparum* AP2M identified 503 target genes and its binding motif. We revealed that AP2M bind to the binding motifs in the upstream sequences of the target genes to activate their transcription.

研究分野：寄生虫の分子生物学

キーワード：マラリア ゲノム編集 次世代シーケンサー ChIP-seq メロゾイト

1. 研究開始当初の背景

マラリア原虫のメロゾイトによる赤血球への侵入は、感染赤血球からの脱出、新しい赤血球への接着、先端部の方向転換、寄生胞を伴った侵入、侵入後のステージ転換などのステップからなる複雑な現象である。この過程には、古典的な免疫学的手法により同定されたメロゾイト表面タンパク質や先端部小器官(マイクロネーム・ロプトリー・デンスグラニュール)局在タンパク質、原虫膜下のモーター複合体など多数の分子が関与する。また各ステップの進行には、メロゾイト内でのシグナル伝達(リン酸化シグナルなど)が重要な役割を果たすと考えられる。しかし、これまでに解析されてきた分子による知見では、「メロゾイトの赤血球侵入機構の全貌解明」という長年のマラリア研究の中心的命題は解かれていない。メロゾイト赤血球侵入機構の全貌の解明は、ワクチン・薬剤開発に直接的につながるため、マラリア制圧上、最も重要であるといっても過言ではない。分子生物学の発展以前より、免疫学的手法や電子顕微鏡解析を中心とした表面・先端部小器官タンパク質の同定・解析がなされてきた。しかし、マラリア研究に分子生物学的手法が導入された以降も革新的な研究は少なく、侵入機構の全貌解明には至っていない。

2. 研究の目的

申請者の研究グループは、マラリア原虫の AP2 ファミリー転写因子を世界に先駆け発見し、1 個のマスター転写因子が生育ステージ全体の遺伝子発現パターンを決定するというマラリア原虫における遺伝子発現制御の基本モデルを明らかにしてきた (*Mol. Microbiol.* 2009, *Mol. Microbiol.* 2010, *PLoS One.* 2012)。さらに、マラリア研究にクロマチン免疫沈降 (ChIP) と次世代シーケンサー (NGS) 解析を組み合わせた ChIP-seq 解析を導入し、転写因子の標的遺伝子の網羅的同定により感染関連遺伝子探索において強力な手法となることを証明した (*PLoS Pathog.* 2015)。以上により、申請者はメロゾイトのマスター転写因子を対象とした標的遺伝子解析はメロゾイト侵入機構の解明に最適な方法論であると着想した。

そこで予備的研究としてメロゾイトのマスター転写因子の探索を行った。赤血球侵入に関わるロプトリー遺伝子群は中期シズント以降に発現することに着目し、「それ以前に発現のピークを持つ AP2 遺伝子がメロゾイトのマスター転写因子である」と仮説を立て、既存のトランスクリプトームデータより該当する AP2 遺伝子 (PBANKA_0112100) を同定し、AP2-M と名付けた。

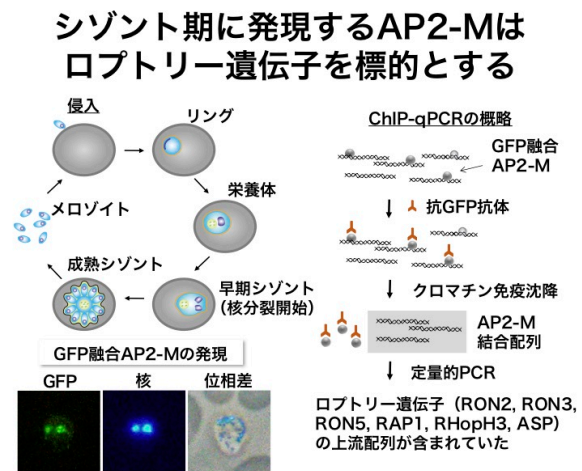
次に、ネズミマラリア原虫 (*Plasmodium berghei*) の GFP 融合 AP2-M 発現原虫を作製し、発現解析・ChIP-qPCR 解析を行ったところ、AP2-M は核分裂開始と同時に核内での発現が始まり中期シズントに発現のピークを有すること、並びに AP2-M はメロゾイトのロプトリー遺伝子の 5' -UTR 上流に特異的に結合することが示された。以上の結果は、AP2-M はメロゾイトのマスター転写因子であることを強く示唆するものであった。

そこで、AP2-M の標的遺伝子解析によりメロゾイトの赤血球侵入に関わる分子を網羅的に同定し、新規の先端部小器官に局在するタンパク質とメロゾイト内シグナル伝達に関わる分子の機能解析を行うことで、赤血球侵入機構に関する新しい知見を得られると考え、本研究計画を立案した

3. 研究の方法

①ChIP-seq 法による標的遺伝子解析

GFP 融合 AP2-M 発現 *P. berghei* (PbAP2-M::GFP) を用いた ChIP-seq 法により、AP2-M の結合位置および結合配列を決定する。GFP 発現のピークを有するステージ (核分裂後からシズント中期) の原虫を用いて、抗 GFP 抗体でクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行った。複数核存在するシズントを用いるため、ChIP に必要な原虫ゲノムは十分に存在すると考えられる。得られた DNA で NGS 解析を実施し、得られたリード配列を宿主ゲノムと原虫ゲノム配列をマージして作製した仮想ゲノム上にマッピングし、原虫ゲノム配列上に単独でマップされたリード配列のみを続ける解析に使用する。上流 1.2kb 以内に転写因子結合のピークが現れた遺伝子を AP2-M の標的遺伝子とした。またピーク付近の DNA 配列から AP2-M の結合モチーフを決定した。さらに、熱帯熱マラリア原虫 *P. falciparum* でも同様に GFP 融合 AP2-M (PF3D7_0613800) 発現原虫を作成し、ChIP-seq により標的遺伝子解析を行い、*Plasmodium* 属での保存性を解析した。



②標的遺伝子プロモーターを用いたレポーターアッセイ

標的遺伝子の発現時期と結合モチーフの遺伝子発現における役割を解明するために、標的遺伝子のプロモーターを用いたレポーターアッセイを行った。プロモーターを赤色蛍光タンパク質遺伝子である mCherry の上流に挿入したセントロメアプラスミドを作成した。さらに、①で解析した結合モチーフに変異を導入したプラスミドを作成した。これらのレポータープラスミドを野生型 *P. falciparum* に導入し、組換え原虫の蛍光観察を行った。

③リボザイムによるコンディショナルノックダウン法の開発

赤血球侵入に必要なタンパク質は欠損変異体での解析は不可能である。そこで、候補因子の機能解析は、最近、赤血球期タンパク質の機能解析に用いられる *glmS* リボザイムによるコンディショナルノックダウン法を用いることとした (Nat. comm. 2017, eLife 2017、図 1)。熱帯熱マラリア原虫 *P. falciparum* では *glmS* リボザイムを標的遺伝子 mRNA の 3' 末端に付加することで、グルコサミン存在下で mRNA が分解され、翻訳されるタンパク質量が低下する。この手法の確立のために、GFP 発現プラスミドの 3' UTR に *glmS* 配列を挿入したプラスミドを作成し、グルコサミン依存的に発現低下が見られるか否かを解析した。また、同時にテトラサイクリンまたはテオフィリン誘導性リボザイムの検討も行った。

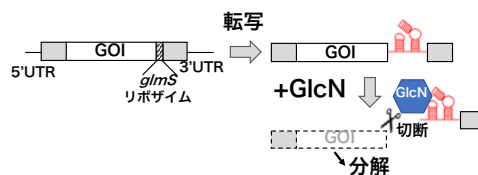


図 1: *glmS* によるコンディショナルノックダウン法

4. 研究成果

①ChIP-seq 法による標的遺伝子解析

PbAP-2M::GFP を用いた ChIP-seq 解析を行った。シズント期のクロマチン DNA を回収し抗 GFP 抗体を用いたクロマチン免疫沈降を行い、得られた DNA を用いて次世代シーケンサー解析を行った。その結果、226 の標的遺伝子を得た。この中には、これまでに同定されたロプトリー遺伝子群やモーター複合体遺伝子群などの侵入関連遺伝子、メロゾイト表面タンパク質である MSP ファミリー分子が多数含まれていた。一方で、小胞輸送に関わる SNARE タンパク質や細胞骨格に関わるタンパク質も含まれていることからメロゾイト形成あるいはメロゾイトの機能にこれらのタンパク質が関わっている可能性が示唆された。

続いて、*P. falciparum* の GFP 融合 AP2M 発現原虫を作成した。組換え原虫の作出は、最近申請者らが開発した *P. falciparum* の CRISPR/Cas9 を用いた (図 2)。この原虫を用いて、PfAP2-M の発現時期を GFP の蛍光観察により解析したところ、*P. berghei* と同様に、メロゾイト形成前 (8-10 核期) に発現のピークを示した。その後、メロゾイトが形成される直前の核分裂中に発現は消失した (図 3)。

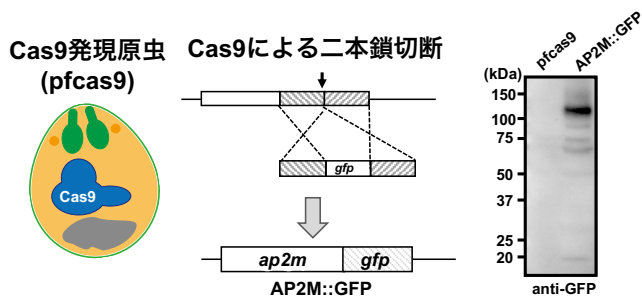


図 2: CRISPR/Cas9 による AP2M::GFP 原虫の作出

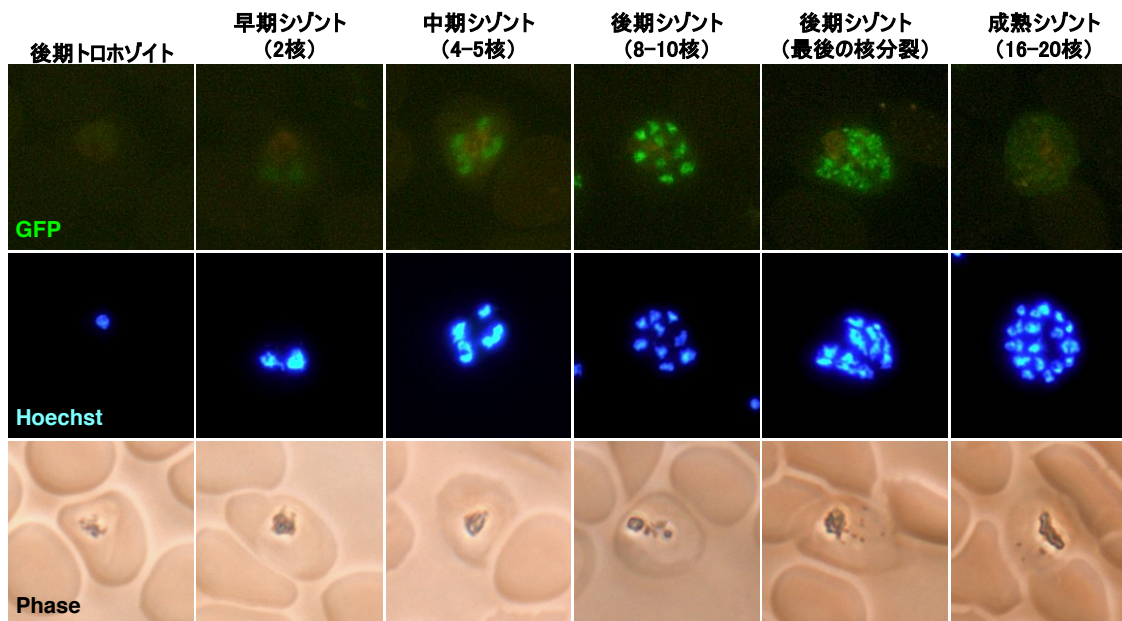


図 3: PfAP2M::GFP の発現パターンの解析

この結果は、AP2-Mはメロゾイトの形成過程で発現し、メロゾイト発現遺伝子のマスター転写因子であることが *Plasmodium* 属で高く保存されていることを強く示唆した。

次に、PfAP2-M::GFP の発育ステージを同調させ、GFP の強い発現が見られた 4-10 核の中後期シズントを回収し、抗 GFP 抗体を用いたクロマチン免疫沈降により AP2-M が結合する DNA 配列を含むクロマチン DNA を精製した。その DNA を用いた次世代シーケンサー解析を行い、AP2-M が結合する DNA 配列をゲノムワイドに同定した。インフォマティクス解析によって AP2-M の結合ピークが遺伝子上流 1500bp 以内に現れた遺伝子を AP2-M の標的遺伝子として 503 遺伝子を同定した。その中には、マイクロネーム遺伝子、ロプトリー遺伝子など既知の侵入関連因子の大多数が含まれていた。一方で、117 の機能未知遺伝子が同定され、メロゾイトの機能に関わる新規分子であることが推測された。以上のことは、*Plasmodium* 属間でメロゾイト形成機構およびその遺伝子発現機構は高く保存されていることを示している。

また、トランスクリプトームデータベースからシズント期で発現する AP2 を AP2-M の他に新たに 3 つ同定した。一つは AP2-I であり、既にメロゾイト形成に関わる AP2 転写因子として報告されている (Santos et al., 2017 Cell Host Microbe)。新たに同定した 2 種の AP2 を AP2-M2、AP2-TS と名付け、AP2-I、AP2-M2、AP2-TS の *P. falciparum* での GFP 融合株を作出し、発現時期解析を行った結果、AP2-I、AP2-M、AP2-M2、AP2-TS の順番に発現が見られた。続いて、それぞれの GFP 発現株を用いて、抗 GFP 抗体を用いた ChIP-seq 解析を行った。その結果、4 つの AP2 の標的遺伝子は多くが重複しているが、少しずつ結合モチーフを変えることで、発現制御する遺伝子を少しずつ変えていくことが明らかになった。赤血球侵入に重要な先端部小器官の遺伝子は、マイクロネーム、ロプトリー、デンスグラニュールの順番に発現していく。つまり、4 つの AP2 を順番に使い分けることによって、これらの遺伝子の発現順序を厳密に制御することがメロゾイト形成に重要であることが示唆された。

②標的遺伝子プロモーターを用いたレポーターアッセイ

ChIP-seq 解析の結果、AP2M の特異的結合モチーフは GTGCAC もしくは TGCATG であることが示唆された。そこで、GTGCAC が上流配列に存在する機能未知標的遺伝子 R (論文未発表のため遺伝子名は伏せる) の発現パターン

と結合モチーフ配列の重要性を調べるために、遺伝子 R の上流配列を用いた mCherry 遺伝子レポーターアッセイを行った (図 4)。その結果、遺伝子 R の発現ピークは AP2-M の発現ピークよりも遅く、成熟シズント期であることが示された。さらに、結合モチーフに変異を導入した場合 (GTGCAC から GatCAC に変異させた)、遺伝子 R 上流配列の転写活性は完全に失われた (図 5)。以上の結果は、AP2-M が遺伝子 R の上流に存在する特異的結合モチーフに結合することで、遺伝子 R の転写を活性化することを明らかにした。

③リボザイムによるコンディショナルノックダウン法の開発

標的遺伝子のメロゾイト形成における機能解析のために、リボザイムを用いたコンディショナルノックダウン系の構築を行った。ama1 プロモーター制御下でシズント期からリング期に GFP を発現するセントロメアプラスミドを作成し、終止コドン直下に gImS 配列を挿入した。作成したプラスミド (pama1-GFP-gImS) を野生型原虫に導入し、2.5mM グルコサミン存在下での蛍光観察を行ったところ、蛍光の減弱は認められなかった。2.5mM 以上の濃度では、原虫生存率に顕著な低下が認められたため、gImS によるコンディショナルノックダウンは技術的に困難であると結論づけた。さらに、テトラサイクリン誘導性リボザイムである 11.4 配列および Tc40 配列、テオフィリン誘導性リボザイムである L2cmd 配列、aTheoAz 配列、Theo5 配列、TAP-1 配列でも同様に GFP 直下にこれらのリボザイム配列を挿入し、それぞれの試薬存在下での GFP 観察を行った。しかし、テトラサイクリン (2.5μM)、テオフィリン (1mM) 共に GFP の発現減弱は認められなかった。以上のことから、マラリア原虫でのリボザイムを用いたコンディショナルノックダウン法は構築できなかった。そのため、メロゾ

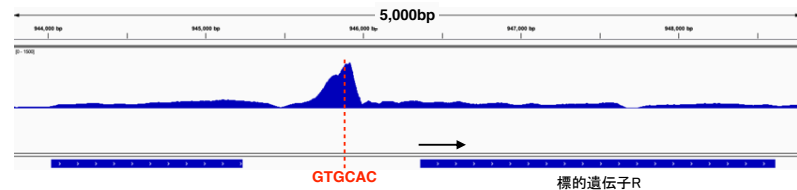


図 4: ChIP-seq 結果における AP2M 標的遺伝子 R 付近の IGV スクリーンショット

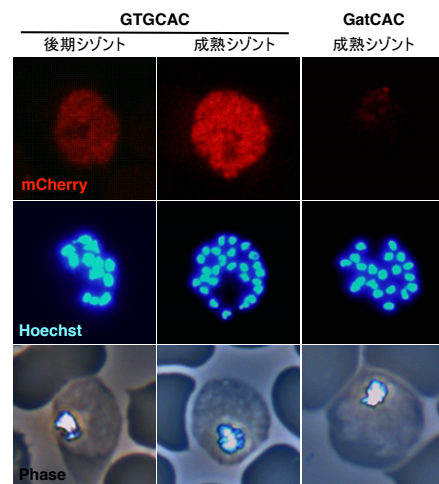


図 4: 標的遺伝子 R のプロモーター配列を用いたレポーターアッセイ

イト形成における AP2M 標的遺伝子解析のためには、他の誘導性遺伝子発現制御法の開発を行う必要があると考える。現在は、ラパマイシン誘導性の DiCre-loxP システム (Knupfer et al., Sci Rep 2017) や、プロテアソーム依存的に分解される DD ドメインとその保護試薬を用いたシステム (DD-Sh1d1 システム、Kumar et al., 2017 Nature) の報告を参考にし、その構築を行っている。コンディショナルノックダウン系の構築に成功すれば、新規侵入関連遺伝子の機能解析が可能となる。新規侵入関連因子の機能を明らかにしていくことで、赤血球侵入機構の全貌解明につながることを期待される。

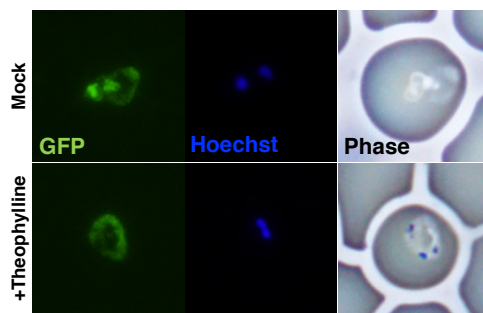


図 5: TAP-1 配列によるコンディショナルノックダウンの検討

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Taku Izumi, Hirai Tomohiro, Makiuchi Takashi, Shinzawa Naoaki, Iwanaga Shiroh, Annoura Takeshi, Nagamune Kisaburo, Nozaki Tomoyoshi, Saito-Nakano Yumiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Rab5b-Associated Arf1 GTPase Regulates Export of N-Myristoylated Adenylate Kinase 2 From the Endoplasmic Reticulum in Plasmodium falciparum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 610200
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2020.610200	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 Shinzawa Naoaki, Nishi Tsubasa, Hiyoshi Fumiya, Motooka Daisuke, Yuda Masao, Iwanaga Shiroh	4. 巻 3
2. 論文標題 Improvement of CRISPR/Cas9 system by transfecting Cas9-expressing Plasmodium berghei with linear donor template	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 426
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-020-01138-2	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 Tsukamoto Kentaro, Shinzawa Naoaki, Kawai Akito, Suzuki Masahiro, Kidoya Hiroyasu, Takakura Nobuyuki, Yamaguchi Hisateru, Kameyama Toshiki, Inagaki Hidehito, Kurahashi Hiroki, Horiguchi Yasuhiko, Doi Yohei	4. 巻 11
2. 論文標題 The Bartonella autotransporter BafA activates the host VEGF pathway to drive angiogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3571
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-17391-2	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 Teruya S, Hiramatsu Y, Nakamura K, Fukui-Miyazaki A, Tsukamoto K, Shinoda N, Motooka D, Nakamura S, Ishigaki K, Shinzawa N, Nishida T, Sugihara F, Maeda Y, Horiguchi Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 Bordetella Dermonecrotic Toxin Is a Neurotropic Virulence Factor That Uses CaV3.1 as the Cell Surface Receptor.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e03146-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mBio.03146-19.	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 Payungwong Tongchai, Shinzawa Naoaki, Hino Akina, Nishi Tubasa, Murata Yuho, Yuda Masao, Iwanaga Shiroh	4. 巻 67
2. 論文標題 CRISPR/Cas9 system in Plasmodium falciparum using the centromere plasmid	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 605 ~ 608
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2018.06.002	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 Fukui-Miyazaki Aya, Toshima Hirono, Hiramatsu Yukihiko, Okada Keisuke, Nakamura Keiji, Ishigaki Keisuke, Shinzawa Naoaki, Abe Hiroyuki, Horiguchi Yasuhiko	4. 巻 9
2. 論文標題 The Eukaryotic Host Factor 14-3-3 Inactivates Adenylate Cyclase Toxins of Bordetella bronchiseptica and B. pertussis, but Not B. parapertussis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mBio.00628-18	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 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 西翔、新澤直明、平山泰士、油田正夫、岩永史朗
2. 発表標題 Cas9スクレアーゼ発現熱帯熱マラリア原虫を用いた新規ゲノム編集法の確立
3. 学会等名 第88回日本寄生虫学会
4. 発表年 2019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
研究協力者	岩永 史朗 (Iwanaga Shiroh)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	油田 正夫 (Yuda Masao)		

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			
米国	コロンビア大学			
フランス	パスツール研究所			