

機関番号：14101

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2010

課題番号：20249023

研究課題名（和文） マラリア原虫転写因子を手掛かりとした「ゲノムワイド」な宿主侵入関連遺伝子群の探索

研究課題名（英文） Exploration of malaria parasite genes involved in host-invasion using a transcription factor as a clue

研究代表者

油田 正夫（Masao Yuda）

三重大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90293779

研究成果の概要（和文）：マラリア原虫オオキネートはマラリア原虫がベクターであるハマダラ蚊の中腸に侵入するステージである。本研究はオオキネートの転写因子 AP2-O が制御する遺伝子を同定し、その機能を解明することを目的として行われた。ChIP-seq 法による「ゲノムワイド」な探索により AP2-O の結合領域はゲノム上に 2000 以上存在することが判明した。さらにこれらの結合領域から約 400 の遺伝子が標的遺伝子として同定された。この結果は AP2-O が全遺伝子の 10% 近くを直接誘導していることを意味した。またこれらの遺伝子はオオキネート期に特異的に発現していることが知られている全ての遺伝子を含んでいた。さらに個々の標的遺伝子の機能を遺伝子ターゲティング法で解析したところ、標的遺伝子は中腸侵入に関与する遺伝子ばかりでなく、形態形成に関わる遺伝子、中腸侵入後に機能する遺伝子を含んでいることが分った。以上の結果は、AP2-O がオオキネートのマスター転写因子として機能していることを示唆した。

研究成果の概要（英文）：

Malaria parasites have three host-invasive stages in the life cycle. The ookinete is one of these stages, in which malaria parasites invade the midgut of the mosquito. The purpose of this study was to identify target genes of AP2-O and elucidate roles of these genes in ookinetes. By genome-wide analysis with ChIP-Seq, over two thousand of binding sites of AP2-O were identified in the genome of the rodent malaria parasite, *Plasmodium. berghei*. Based on this result, over four hundred of target genes, which contained all genes that had been reported to be specifically expressed in the ookinete, were identified. Targeted gene disruption experiments in these genes revealed that they contained not only genes for midgut-invasion, but also those necessary for ookinete formation and those prepared in ookinetes and then used after mid-gut invasion. These results indicated that Ap2-O acts as a master transcription factor in the ookinete stage.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	13,000,000	3,900,000	16,900,000
2009 年度	12,500,000	3,750,000	16,250,000
2010 年度	11,300,000	3,390,000	14,690,000
年度			
年度			
総計	36,800,000	11,040,000	47,840,000

研究分野：寄生虫学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：マラリア、転写因子

1. 研究開始当初の背景

マラリア原虫は異なる3種類の宿主侵入ステージ（メロゾイト、オオキネート、スポロゾイト）を持ち、それぞれ赤血球、蚊中腸、肝臓に感染する。個々の侵入ステージはそのステージに特異的な膜蛋白質、分泌性蛋白質を発現し、これらの蛋白質が宿主細胞側分子と相互作用することによって標的細胞に侵入する。これら宿主細胞侵入関連蛋白質は、宿主細胞一寄生虫間の相互作用を理解するための鍵であるとともに、侵入ステージを標的としたワクチンの重要な候補分子である。

侵入関連蛋白質は、各ステージの形成期に特異的かつ大量に発現されるが、その発現調節機構は解っていない。また遺伝子発現調節の主役である「転写因子」はマラリア原虫ではこれまで同定されていない。

研究代表者は宿主侵入ステージの1つ、蚊の中腸への侵入ステージであるオオキネートの中腸上皮細胞への感染機構をこれまで研究してきた。この研究の過程で中腸侵入に関連した遺伝子群の発現を調節する転写因子 AP2-O を同定した。AP2-O は各遺伝子のプロモーター上の特異的な6塩基配列を認識し発現を誘導する。この転写因子の結合モチーフはこれまで報告されているすべてのオオキネート期特異的遺伝子上流に存在するばかりでなく、その他新規の中腸侵入関連遺伝子群の発現も同時に制御していた。

これらの結果をもとに研究代表者は、転写因子とその結合配列を手掛かりにして「ゲノムワイド」な探索を行なうことにより宿主細胞侵入に関わる遺伝子群の総体、すなわち侵入マシナリーの全体像を解明出来ると考えた。

2. 研究の目的

本研究ではこれらの結果をもとに、オオキネ

ートの転写因子 AP2-O が制御する全ての遺伝子を同定し、オオキネートの侵入関連遺伝子の全体像を明らかにする。また侵入関連遺伝子が一個のマスター転写因子 AP2-O によって制御されていることを証明する。さらに遺伝子ターゲティング法により個々の遺伝子の感染における機能を解明する。

3. 研究の方法

ChIP-seq 法による AP2-O 被制御遺伝子群の同定

オオキネート期の転写因子 AP2-O に関し ChIP-Seq 法で genome wide な解析を行い、この転写因子が制御する遺伝子群を同定する。GFP 融合 AP2-O 発現原虫からオオキネートを培養し、パラホルムアルデヒドで固定する。超音波処理を行なった後、抗 GFP 抗体で免疫沈降し AP2-O の結合したクロマチンを回収する (Chromatin immunoprecipitation (ChIP) 法)。抽出したゲノム DNA 断片の末端配列を超並列シーケンサーで解析し、その配列をゲノム上にマッピングしクラスター化することで転写因子結合部位を同定する。

遺伝子ターゲティング法による標的遺伝子の機能解明。

以上の方法で同定された新規な遺伝子に対し遺伝子ターゲティング法によりその機能を解明する。

GFP 融合蛋白を用いた細胞内局在及び発現ステージの解明

同定された新規遺伝子に対し、人工染色体を用いて GFP 融合蛋白を原虫内で発現させ細胞内局在及び発現ステージを解析する。遺伝子ターゲティングによる表現型と局在から機能を推定する。

4. 研究成果

ChIP-seq 法による全標的遺伝子の同定

超並列シーケンサーで得られた配列をゲノム上にマッピングしピーク領域を算出した。FDRが1%以内の場合、70%以上でピーク中心より50bp以内に予想される結合配列が存在していた。以上に結果よりAP2-Oの結合領域はゲノム上に2000以上あることが判明した。さらにこれらの結合領域から1000bp以内に存在する約400の遺伝子を標的遺伝子として同定した。標的遺伝子には実際にこれまでAP2-Oの標的遺伝子として証明されているほぼすべての遺伝子が含まれており、AP2-Oの標的遺伝子が網羅されていると考えられた。この結果はAP2-Oが全遺伝子の10%近くを直接誘導していることを意味した。

標的遺伝子の機能

a. 形態形成関連遺伝子群

同定された標的遺伝子にはオオキネートの形態形成に関与すると推測される遺伝子が多数含まれていることが分かった。これらの遺伝子を遺伝子ターゲティング法により破壊し原虫の表現型を調べたところ形態が異常なオオキネートが形成された。また別の遺伝子では形態上は正常でも蚊への感染能が有意に低下した。GFP融合蛋白質の発現による解析では、これらの遺伝子産物は侵入期に特有の構造であるpolar ring、IMC (inner membrane complex) に局在していることが分かった。以上の結果よりAP2-Oはオオキネートの形態形成に関わる遺伝子群を誘導していることが明らかになった。

b. マイクロネーム蛋白質

標的遺伝子には分泌性蛋白質をコードしていると考えられる遺伝子が多数含まれていた。これらの蛋白質は中腸侵入時に分泌され細胞膜接着、細胞膜破壊、細胞内移動等に関与するマイクロネーム蛋白質であると推測された。例えば細胞膜へのチャンネル形成に

関わりと考えられるMAC (membrane attack complex) ドメインを有する遺伝子3種類が含まれていた。このうちの1つの遺伝子をノックアウトするとオオシストの形成は全く見られなくなった。その他複数の遺伝子において中腸への感染が有意に低下するものが同定された。

c. 細胞表面蛋白質

オオキネートの細胞表面たんぱく質としてはこれまでP28,P25が報告されているが、今回同定された標的遺伝子には、これらに加えGPI アンカー配列または膜貫通ドメインを有する細胞膜結合蛋白質と推定されるものが数種類存在していた。これらの遺伝子をノックアウトすると中腸への感染が有意に低下した。

d. オオシスト形成に関与する遺伝子群

AP-Oはオオキネートの中腸侵入に関与する上記の遺伝子に加え、オオシストの形成に関与する遺伝子の発現を誘導していることが明らかになった。これらの遺伝子は翻訳レベルで発現が制御されており、原虫の中腸侵入後に翻訳され機能すると考えられる。

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8件 全て査読有り)

1. Production of IFN- γ by CD4+ T cells in response to malaria antigens is IL-2-dependent. Int. Immunol., Kimura D., Miyakoda M., Honma K., Yuda M., Chinzei Y., and Yui K., In press
2. Functional Identification of the *Plasmodium* Centromere and Generation of a *Plasmodium* Artificial Chromosome. Iwanaga S, Khan SM, Kaneko I, Christodoulou Z, Newbold C, Yuda M. Janse CJ, Waters AP Cell, Host & Microbe. 7(3):245-255 (2010)
3. Transcription Factor AP2-Sp and its Target

Genes in Malarial Sporozoites. Yuda M, Iwanaga S, Shigenobu S, Kato T, Kaneko I. Mol Microbiol. 75, 4, 854.(2010)

4. LISP1 is important for the egress of *Plasmodium berghei* parasites from liver cells. Ishino T, Boisson B, Orito Y, Lacroix C, Bischoff E, Loussert C, Janse C, Ménard R, Yuda M, Baldacci P. Cell Microbiol. 11:1329. (2009)

5. Identification of a transcription factor in the mosquito-invasive stage of malaria parasites. Yuda M, Iwanaga S, Shigenobu S, Mair GR, Janse CJ, Waters AP, Kato T, Kaneko I. Mol Microbiol. 71:1402. (2009)

6. Gene expression profiling of peripheral T-cell lymphoma including gammadelta T-cell lymphoma. Miyazaki K, Yamaguchi M, Imai H, Kobayashi T, Tamaru S, Nishii K, Yuda M, Shiku H, Katayama N. Blood. 113:1071. (2009)

7. Miyakoda M, Kimura D, Yuda M, Chinzei Y, Shibata Y, Honma K, Yui K. Malaria-specific and nonspecific activation of CD8+ T cells during blood stage of Plasmodium berghei infection. *J Immunol*. 181(2):1420-8 (2008).

8 Ménard R, Heussler V, Yuda M, Nussenzweig V. Plasmodium pre-erythrocytic stages: what's new? *Trends Parasitol*. 564-569. (2008)

[学会発表] (計 3 件)

1. Identification of Transcription factor of Malaria Sporozoite. S. Iwanaga, I. Kaneko, and M. Yuda, Awaji, Japan (2010, Sep 9th-12th) The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity

2. Identification of Transcription factor of Malaria Sporozoite. S. Iwanaga, I. Kaneko, and M. Yuda ers Washington, D.C. USA (2009, Nov 18-22) American Society of Tropical Medicine and Hygiene 58th Annual Meeting

3. Functional Characterization of the plasmodium centromere and generation of a plasmodium artificial chromosome. S. Iwanaga, M. Yuda, I. Kaneko, C.J. Janse, and A.P. Waters Washington, D.C. USA (2009, Nov 18-22) American Society of Tropical Medicine and Hygiene 58th Annual

Meeting

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

①名称：マラリア原虫人工染色体を用いた薬剤耐性遺伝子の迅速同定法および組換えマラリア原虫作製法

発明者：岩永史朗・油田正夫・金子伊澄

権利者：：国立大学三重大学

種類：特許

番号：PCT/JP2011/001781

出願年月日：23年3月26日

国内外の別：PCT (国際)

②名称：マラリア原虫人工染色体を用いた薬剤耐性遺伝子の迅速同定法

発明者：岩永史朗・油田正夫

権利者：：国立大学三重大学

種類：特許

番号：特願 2010-071688

出願年月日：22年3月26日

国内外の別：国内

③名称：マラリア原虫人工染色体

発明者：岩永史朗・油田正夫

権利者：：国立大学三重大学 (90%)・国立大学鳥取大学 (10%)

種類：特許

番号：特願 2009-051454

出願年月日：21年3月5日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

油田 正夫 (Yuda Masao)

三重大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90293779

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：