

令和 5 年 6 月 17 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07473

研究課題名(和文) 赤内型マラリア原虫の遺伝子発現の厳密な時期を決める転写因子活性制御機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms for regulation of transcription factor activity that determines the strict timing of gene expressions in Plasmodium falciparum at the intraerythrocytic stages

研究代表者

安田 加奈子(駒木加奈子)(Komaki-Yasuda, Kanako)

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

研究者番号：50415551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マラリア原虫独自のRNA結合ドメインを持つ転写因子がその制御のターゲットとして、いる遺伝子群を網羅的に探索した。その結果、表面抗原遺伝子群、また代謝に関わる因子群が同定され、原虫の抗原多型のswitching、house keepingな代謝などの、生育の根幹に関わる遺伝子群の発現が調節されていることが示唆された。既存の報告と合わせて考察した結果、RNAとDNAの両方に結合する性質を持つ因子群が、原虫核内のユークロマチン領域が集積する転写活性化コンパートメントに局在し、様々なタンパクと共役しつつ転写活性化装置を形成し、転写の促進をおこなっているという可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界三大感染症のひとつであるマラリアを引き起こす病原体である、マラリア原虫既存のモデル生物から系統的に遠いために、基礎的な分子生命機構の理解が十分に進んでいるとは言い難い。我々は原虫の寄生適応の根幹を成すと考えられる転写制御機構に着目し、そこに関わる分子メカニズムを明らかにしていきたいと考え、以前に発見したRNA結合ドメインをもつマラリア原虫独自の転写因子の機能の解析をおこなった。その結果、原虫の宿主の免疫回避する機構に関わる抗原多型のスイッチングに関わることが示唆された。疾病としてのマラリアの理解、また、生物学的に新規な因子の機能の発見、両方の側面から意義のある結果となった。

研究成果の概要(英文)：A comprehensive search was conducted for genes targeted for regulation by unique transcription factors with RNA-binding domains of Plasmodium falciparum. As a result, surface antigen genes and metabolic factor genes were identified, suggesting that the expression of genes involved in the fundamental functions of Plasmodium falciparum, such as antigen polymorphism switching and housekeeping metabolism, is regulated by the transcription factors. Taken together with existing reports, these factors, which bind both RNA and DNA, localize to the transcriptional activation compartment of the parasite nucleus where euchromatin regions accumulate and cooperate with various proteins to form transcriptional activator that promotes transcription.

研究分野：分子寄生虫学

キーワード：マラリア マラリア原虫 転写因子 RNA結合ドメイン KHドメイン ChIP-Seq 表面抗原多型

1. 研究開始当初の背景

マラリアは世界三大感染症のひとつであり、長年、精力的な対策が進められているにも関わらず、年間 2 億人以上が罹患し、60 万人以上の死者を出している。十分に有効なワクチンは未だ開発されておらず、また、既存の抗マラリア薬に対しても薬剤耐性が生じている問題があり、完全なマラリア排除までに乗り越えるべき課題は多い。マラリアを引き起こす病原体、マラリア原虫は、アピコンプレクサ門に属する単細胞真核生物であり、既存のモデル生物から系統的に遠いために、基礎的な分子生命機構の理解が十分に進んでいるとは言い難い。我々は原虫の寄生適応の根幹を成すと考えられる転写制御機構に着目し、そこに関わる分子メカニズムを明らかにしていきたいと考えている。

マラリア原虫赤血球内寄生期の厳密な遺伝子発現制御機構は、それを担う転写因子の正体を含めて詳細がわかっていない。研究代表者は熱帯熱マラリア原虫の赤血球内寄生期のトロホゾイト期に特異的に発現する遺伝子 *pf1-cys-prx* のプロモーターに作用して転写活性化する因子 PREBP を同定した。PREBP は RNA binding ドメインである、KH ドメインを持つことを構造上の特徴とし、マラリア原虫では KH ドメインを持つタンパクを転写因子として利用されている可能性が考えられた(文献1)。研究代表者はさらに、バイオインフォマティクス解析にて PREBP と類似構造を持つ新規因子 A を同定した。PREBP と因子 A は赤血球内寄生期の原虫細胞内の核局在のタイミングが異なり、それぞれが転写制御をおこなう時期の違いを反映していると考えられ、また、この細胞内局在時期の調節は時期特異的な発現制御の根幹となるメカニズムであると考えた(文献2)。

2. 研究の目的

本申請研究では PREBP と因子 A について因子が発現制御する遺伝子群を明らかにし、KH ドメインを持つ原虫独自の転写因子が原虫生育においてどのような役割を果たしているのかを明らかにする。また、これらに因子のターゲットとなるプロモーターに共通するモチーフを明らかにし、マラリア原虫赤血球内寄生期の細胞周期進行を支える転写制御機構の解明に迫ることを目的とする。

3. 研究の方法

3-1 ChIP-Seq 解析

以前作成していた PREBP-GFP 融合タンパク発現熱帯熱マラリア原虫および PREBP-GFP 融合タンパク発現熱帯熱マラリア原虫を材料として、ホルマリンによってクロマチンを固定し、抗 GFP 抗体を用いてクロマチン免疫沈降をおこなった。沈降産物を次世代シーケンサー HiSeq (イルミナ) によって解析し、ChIP-Seq 解析をおこなった。

3-2 ルシフェラーゼアッセイ

ChIP-Seq によって見出された PREBP ターゲット候補遺伝子が実際に PREBP による制御を受けているのかを明らかにするために、候補遺伝子約 40 種類のプロモーターそれぞれの下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を接続したプラスミドベクターを作成し、また同じプラスミド上に PREBP の過剰発現カセットを挿入したプラスミドベクターの作成もおこなった。これらのプラスミドベクターをレニラルルシフェラーゼ発現ベクターとともに、培養熱帯熱マラリア原虫に導入し、デュアルルシフェラーゼアッセイをおこなった。PREBP 過剰発現カセットの有無で、ホタルルシフェラーゼの発現量が影響を受けるかどうかを検討した。

4. 研究成果

4-1 PREBP が結合しているプロモーター領域の網羅的探索

PREBP が染色体上でどの遺伝子群の 5' に結合しているのかをクロマチン免疫沈降と次世代シーケンサーによる網羅的 ChIP-Seq によって解析し、その候補遺伝子群を明らかにした。検出された 80 ピークを分析した結果、70%にあたる 56 のピークがなんらかの遺伝子の 5' 側に検出された。これらの遺伝子を機能別に分類すると、PfEMP1 や *rifin* などの赤血球表面抗原遺伝子が 43%、キナーゼ

／ホスファターゼ遺伝子が 8%、DNA/RNA 結合タンパク遺伝子が 6%、脂質代謝に関わる遺伝子が 5%、その他および機能未知タンパクの遺伝子が 38%となっていた。PREBP によって原虫の抗原多型の switching、house keeping な代謝などの、生育の根幹に関わる遺伝子群の発現が調節されている可能性が考えられた。

4-2 因子 A が結合しているプロモーター領域の網羅的探索

PREBP と類似構造を持つ新規因子 A がどのような遺伝子群の発現に関わっているのかについて探索する目的で、因子 A を対象とした網羅的 ChIP-Seq をおこなった。その結果、得られた遺伝子の大半が PfEMP1 や rifin などの赤血球表面抗原遺伝子であった。以上の結果から、マラリア原虫の宿主免疫 忌避に関わっている、表面抗原遺伝子群の発現および発現抑制には、複数の PREBP 類似構造を持つ因子が関与している可能性が考えられた。

4-3 PREBP および因子 A が結合しているプロモーター領域のモチーフ検索

CHIP-Seq で得られたプロモーター配列から、共通のモチーフ配列の探索を試みたが、典型的なパリンドローム構造を持つ特定のモチーフは検出されなかった。PREBP および、因子 A のプロモーターへの結合は RNA を介している可能性があり、典型的なモチーフ配列をターゲットとしていない可能性が考えられる。

4-4 同定されたプロモーターの活性に対する PREBP の影響

ルシフェラーゼアッセイの結果、一部の rifin 遺伝子プロモーターの下流に接続したホタルルシフェラーゼ遺伝子の発現が、PREBP の過剰発現時に抑制されており、遺伝子発現抑制効果が示唆された。その他の PfEMP1 のプロモーターに関しては、PREBP の影響は観察されなかった。次項に述べる通り、PfEMP1 は多数の遺伝子コピーからひとつのみが選択されて発現する遺伝子であるため、PfEMP1 の発現への、PREBP および因子 A の影響を観察するためには、材料とする培養マラリア原虫の集団が、PfEMP1 を 1 種類だけ選択発現している状態にクローン化して解析をおこなう必要があると考えられる。

4-5 まとめ

原虫の表面抗原 PfEMP1 の選択的発現 に関しては、多くの研究が報告されている。PfEMP1 をコードする遺伝子(var)は原虫ゲノム上に約 60 コピー存在し、そのうちのひとつのみが選択されて発現している。発現が active な var 遺伝子は原虫の核内周辺領域に位置する転写活性化コンパートメントに配置され、また、その付近のヒストンアセチル化は亢進しており、クロマチンの構造が緩んでいる(ユークロマチン領域)ことが報告されている(文献3)。このように、var 遺伝子の選択的発現にはエピジェネティックな制御と、核内の染色体のダイナミクスが大きく関わる。さらに近年、var 遺伝子の発現制御には var 遺伝子のイントロン領域から転写された長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA)が関わっていることが報告されている(文献4)。発現が亢進している染色体上の var 遺伝子にこの lncRNA がリクルートされている。さらには最近の報告では、この lncRNA にはレドックス制御に関わる PfTPx1 はじめ、様々なタンパクが結合しており、これらが転写活性化コンパートメント内の転写制御の調節に関わると考えられるが、一連の lncRNA 結合タンパクに PREBP も含まれていたのである(文献5)。これは本研究の ChIP-Seq の結果と一致する結果であり、PREBP が var 遺伝子の制御に関わることを支持するものである。さらに、哺乳類細胞では、PREBP と類似する KH ドメイン構造をもつタンパクを含む RNA 結合タンパクの ChIP 解析をおこなったところ、RNA 結合タンパクの多くが、染色体上離れた位置にある、エンハンサー同士を結びつけ、そのほかの転写活性化因子と共同で、転写の亢進に関わることを示唆する結果が得られている(文献6)。以上より、「RNA と DNA の両方に結合する性質を持つ因子群が、原虫核内のユークロマチン領域が集積する転写活性化コンパートメントに局在し、選択的発現をしている表面抗原遺伝子、house keeping 遺伝子問わず、発現が活性化してい

る遺伝子座をリクルートし、ヒストン修飾因子、レドックス制御因子、その他の転写因子 ApiAP2 などの様々なタンパクと共役しつつ転写活性化装置を形成し、転写の促進をおこなっているという可能性が考えられた。

【関連論文】

1. Komaki-Yasuda K, Okuwaki M, Nagata K, Kawazu S, Kano S. Identification of a novel and unique transcription factor in the intraerythrocytic stage of *Plasmodium falciparum*. PLoS One. 2013 Sep 5;8(9):e74701.
2. Komaki-Yasuda K, Kano S. The RNA-binding KH-domain in the unique transcription factor of the malaria parasite is responsible for its transcriptional regulatory activity. (Submitted)
3. Ralph SA, Scheidig-Benatar C, Scherf A. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum* is associated with movement of var loci between subnuclear locations. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Apr 12;102(15):5414-9.
4. Amit-Avraham I, Pozner G, Eshar S, Fastman Y, Kolevzon N, Yavin E, Dzikowski R. Antisense long noncoding RNAs regulate var gene activation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Mar 3;112(9):E982-91.
5. Heinberg A, Amit-Avraham I, Mitesser V, Simantov K, Goyal M, Nevo Y, Kandelis-Shalev S, Thompson E, Dzikowski R. A nuclear redox sensor modulates gene activation and var switching in *Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2022 Aug 16;119(33):e2201247119.
6. Xiao R, Chen JY, Liang Z, Luo D, Chen G, Lu ZJ, Chen Y, Zhou B, Li H, Du X, Yang Y, San M, Wei X, Liu W, Lécuyer E, Graveley BR, Yeo GW, Burge CB, Zhang MQ, Zhou Y, Fu XD. Pervasive Chromatin-RNA Binding Protein Interactions Enable RNA-Based Regulation of Transcription. Cell. 2019 Jun 27;178(1):107-121.e18.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 駒木-安田 加奈子、狩野 繁之
2. 発表標題 マラリア原虫転写因子の細胞内局在解析
3. 学会等名 第89回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 駒木-安田 加奈子、狩野 繁之
2. 発表標題 マラリア原虫転写因子PREBPの標的遺伝子群の網羅的探索
3. 学会等名 第91回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kanao Komaki-Yasuda, Shigeyuki Kano
2. 発表標題 Analysis of a unique factor with the RNA-binding KH domain involved in transcriptional regulation of Plasmodium falciparum
3. 学会等名 International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim
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
---------	---------