

機関番号：14101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790403

研究課題名（和文）マラリア原虫生殖母体の分化・成熟を制御する転写因子の研究

研究課題名（英文）Investigation of transcription factors that regulate development of Plasmodium gametocytes.

研究代表者

金子 伊澄 (KANEKO IZUMI)

三重大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20515720

研究成果の概要（和文）：マラリア原虫ガメトサイトにおいて、その成熟を制御する2種類の転写因子 AP2-G1 および AP2-G2 を同定した。これら転写因子結合部位をゲノムワイドに解析するために ChIP-seq を行い、各転写因子の標的遺伝子、さらに cis-acting element の候補配列を同定した。本研究の結果、これら2転写因子はマラリア原虫ガメトサイトの成熟過程で単独または協調して遺伝子発現制御を行うこと、さらに別の制御因子の関与を示唆する結果を得た。

研究成果の概要（英文）：

We identified two transcription factors of malaria parasites (AP2-G1 and Ap2-G2) that regulate sexual development of gametocytes. We investigated binding sites of these transcription factors on the genome with ChIP-seq (Chromatin immunoprecipitation followed by high-throughput DNA sequencing) and identified candidate sequences for their cis-acting elements. Our study indicated that these transcription factors regulate gene expression independently or cooperatively and suggested that other regulatory factors are involved in the gene regulation by these transcription factors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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

薬剤耐性マalaria原虫が急速な広がりを見せるなか、新たな制御戦略が求められている。雌雄ガメトサイト（生殖母体）は宿主から蚊への伝播を担う唯一のステージであり、伝播阻止戦略における非常に重要なターゲットとして注目されている。しかし、雌雄ガメトサイトへの分化や成熟の制御機構は明らかになっていない。申請者はネズミマalaria原虫 *Plasmodium berghei* において、ガメトサイトの分化・成熟が2種類の転写因子 AP2-G1 (APETALA2-Gametocyte1) および AP2-G2 (APETALA2-Gametocyte2) によって制御されていることを見出した。すなわち前者は雌・雄両ガメトサイトの遺伝子群を、後者は雌ガメトサイトの遺伝子群を特異的に制御して、雌・雄それぞれのガメトサイトに分化・成熟させている。

2. 研究の目的

本研究では、1. これら転写因子が制御する全ての遺伝子、すなわち雌および雄ガメトサイト特異的発現遺伝子をゲノムワイドな解析により同定し、その**遺伝子制御機構の全体像を解明する**、2. 同定した被制御遺伝子群からガメトサイトの**分化・成熟阻止および伝播阻止戦略のための候補分子の同定を試みる**ことを目的とした。

3. 研究の方法

ChIP による転写因子 AP2-G1 および AP2-G2 結合 DNA 配列の回収

GFP 融合 AP2-G1 および GFP 融合 AP2-G2 発現原虫の感染血液をそれぞれパラホルムアルデヒドで固定する。超音波処理を行った

後、抗 GFP 抗体で免疫沈降し各転写因子の結合したクロマチンを回収する (ChIP 法)。AP2-G1 および AP2-G2 はガメトサイト期に発現されるが、この時期の原虫はネズミマalaria原虫では感染血液中に一部しか存在しない。そこでマウスをあらかじめ hydrazine 処理し貧血状態にした後、各 GFP 融合タンパク質発現原虫に感染させる。次いで sulfadiazine 処理し asexual stage の原虫を除去した後 ChIP を行う。

ChIP on chip 法による転写因子 AP2-G1 および AP2-G2 の被制御遺伝子群の同定

AP2-G1 および AP2-G2 について、上記 ChIP 法で回収したクロマチンからゲノム DNA を抽出し、DNA マイクロアレイのターゲット作製のテンプレートとする。DNA マイクロアレイ用チップはアジレント社製の高密度タイリングアレイを使用する。

ChIP-seq 法による転写因子 AP2-G1 および AP2-G2 の被制御遺伝子群の同定

AP2-G1 および AP2-G2 について、上記 ChIP 法でクロマチンを回収する。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・クラスタリングすることで転写因子結合部位を同定する。

ChIP on chip 法と ChIP-seq 法は各転写因子のゲノム上の結合部位を同定するという同じ目的で行う。両方法ともマalaria原虫で試みられたことが無い方法であること、検出原理が異なること、本研究の要をなす部分であることを考慮して、両方の実験を実施し結果を総合的に判断することが必要と考えた。

ChIP-qPCR による AP2-G1 および AP2-G2

のプロモーター領域への結合の確認

上記方法により制御されていることが明らかとなったガメトサイト期発現遺伝子のプロモーター領域に、各転写因子が結合していることを確認する。具体的には ChIP 法で回収した DNA 断片をテンプレートとし、各遺伝子上流域に対して設計したプライマーを用いた定量的 PCR で IP による enrichment を評価する。

研究計画・方法 (つづき)

被制御遺伝子プロモーター領域に高頻度に存在する配列の同定

ChIP on chip 法および ChIP-Seq 法で同定した被制御遺伝子群のプロモーター領域に高頻度に存在する DNA 配列をコンピューター解析により明らかにする。これにより cis-acting element を予測した後、この配列を用いて EMSA およびリポーターアッセイを行う。

EMSA による AP2-G1 および AP2-G2 結合配列の同定

上記コンピューター解析により予測された cis-acting element を含む被制御遺伝子の上流域配列を用いて EMSA を行う。具体的には、まず上流域配列に転写因子が結合することを確認する。次いで予測した塩基配列に mutation を加え、結合への影響を調べる。さらに詳細に結合配列を調べるために、合成オリゴマーを用い各塩基に同様に mutation を加え、cis-acting element を決定する。

リポーターアッセイによる AP2-G1 および AP2-G2 結合配列の cis-acting element としての証明

マラリア原虫人工染色体を用いてリポーターアッセイを行い、EMSA で同定した各転写

因子結合配列が実際に in vivo で cis-acting element として機能していることを確かめる。なおマラリア原虫人工染色体は赤血球感染ステージで安定的に保持されることが証明されている (現在投稿中)。リポーター遺伝子には GFP またはルシフェラーゼを、プロモーターには EMSA で同定した結合配列を含むガメトサイト遺伝子上流域配列を用いる。結合配列中に mutation を加え、各転写因子結合配列がガメトサイト期に cis-acting element として機能していることを確かめる。

平成 22 年度

転写因子 AP2-G1 および AP2-G2 の cis-acting element の解析

平成 21 年度に引き続き、各転写因子の cis-acting element を EMSA およびリポーターアッセイにより解析する。

ノックアウト原虫の表現型解析による被制御遺伝子の機能の特定

上記の方法で明らかにした AP2-G1 または AP2-G2 の被制御遺伝子について、ノックアウト原虫を作製しその表現型を解析する。選択マーカーには hDHFR-ts 遺伝子を用い、相同組換えにより標的遺伝子をノックアウトする。得られたノックアウト原虫を用い、どのステージで影響が出ているかについて以下をはじめとする解析方法により評価する。

1. ノックアウト原虫の蚊への感染能の解析：ノックアウト原虫をマウスに感染させ蚊に吸血させる。その蚊を解剖しオーシスト、中腸スポロゾイト数をそれぞれカウントし野生型と比較する。
2. 接合能の解析：接合能は in vitro culture したノックアウト原虫のザイゴート・オオキネート形成効率および形態を野生型と比較することで評価する。
- 3.

雌雄機能の解析：ノックアウトした遺伝子がどちらの性の機能に影響を及ぼしているかについて、cross fertilizationにより調べる。すなわちノックアウト原虫と、雌または雄ガメトサイトどちらか一方の機能が失われた原虫とをかけ合わせることで、雌・雄ガメトサイトそれぞれの接合能を調べる。

GFP 融合タンパク発現原虫を用いた目的タンパク質の発現時期・局在の特定

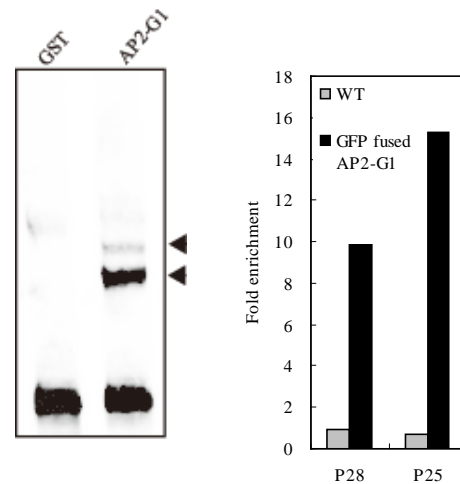
上記の機能解析により影響の認められた遺伝子に関し、GFP 融合タンパク質発現原虫を作製する。具体的には、目的遺伝子の3'末端に GFP 発現配列を結合した GFP 発現コンストラクトを相同組換えにより野生型マラリア原虫に導入する。各ステージの GFP を蛍光顕微鏡下で観察し、その発現時期・局在を特定する。

以上の解析により各ステージにおける影響が明らかになったものに関し、それぞれに適した解析を進める。

4. 研究成果

AP2-G1 に関し、クロマチン免疫沈降法(ChIP)を行い AP2-G1 結合配列を得た。得られた配列を次世代高速シーケンサーで解析し、各配列をゲノム上にマッピングすることで転写因子結合部位を同定した(ChIP-seq)。それにより AP2-G1 の標的遺伝子群の候補を同定した。ChIP-Seq 法で同定した AP2-G1 標的遺伝子群のプロモーター領域に高頻度に存在する塩基配列を解析し、AP2-G1 の cis-acting element の候補配列を同定した。さらに AP2-G1 のマイクロアレイ解析を行い AP2-G1 遺伝子欠損により発現量の減少する遺伝子群を同定した。それら遺伝子群の上流域に高頻度に存在する塩基配列を解析し、AP2-G1 の

cis-acting element の候補配列を同定した。現在その候補配列に関し EMSA およびリポーターアッセイによる解析を進めている。AP2-G2 に関し、ChIP を行い AP2-G2 結合 DNA 配列の回収を行った。また AP2-G2 のマイクロアレイ解析を行い、その結果をもとに AP2-G2 の cis-acting element の候補配列の解析を進めている。



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 2 件)

- ① Iwanaga S, Khan SM, Kaneko I, Christodoulou Z, Newbold C, Yuda M, Janse CJ, Waters AP. Functional identification of the Plasmodium centromere and generation of a Plasmodium artificial chromosome. Cell Host Microbe 2010 査読有 18;7(3) 245-55

②Yuda M, Iwanaga S, Shigenobu S, Kato T, Kaneko I. Transcription Factor AP2-Sp and its Target Genes in Malarial Sporozoites. Molecular Microbiology. 2009 査読有 75 854-863

[学会発表] (計 2 件)

①第 79 回寄生虫学会
金子伊澄、加藤知美、岩永史朗、油田正夫、ChIP-seq 法を用いたマラリア原虫転写因子 AP2-O の新規標的遺伝子の同定、2010.5.20-21、旭川市大雪クリスタルホール

②第 78 回寄生虫学会
金子伊澄・岩永史朗・加藤知美・油田正夫、ChIP-seq 法を用いたマラリア原虫転写因子結合部位の genome wide な解析、2009.3.27-28、法政大学

[図書] (計 1 件)

①油田正夫、金子伊澄、羊土社、実験医学、増刊 「感染症-ウイルス・細菌・寄生虫の感染戦略」、2009、1503-1508

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)
名称：熱帯マラリア原虫への新規な直接遺伝子導入法
発明者：岩永 史朗・油田 正夫・金子 伊澄
権利者：国立大学法人三重大学
種類：PCT/JP2011/001781

番号：PCT/JP2011/001781

出願年月日：2011.3.26

国内外の別：国際特許

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 伊澄 (KANEKO IZUMI)
三重大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：20515720

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：