

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22780258

研究課題名（和文） 創薬へ向けた原虫トランスクリプトームの高解像度解析

研究課題名（英文） High resolution transcriptome analysis in protozoan parasites

研究代表者

山岸 潤也（YAMAGISHI JUNYA）

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・助教

研究者番号：80535328

研究成果の概要（和文）：RNA-seq や TSS-seq に代表される次世代型シーケンサーを用いた新しい技術によって種々の生物の遺伝子発現を網羅的に解析することが可能になっている。我々は当該技術を哺乳類一般を宿主とする原虫の 1 つであるトキソプラズマに適応し、その生活環を構成する代表的な 3 ステージの解析を行うことで、各ステージの遺伝子発現プロファイルを明らかにし、その制御に関わる DNA cis-element を推定した。

研究成果の概要（英文）：By using RNA-seq and TSS-seq which are one of the application of next generation sequencers, it becomes possible to obtain transcriptomes of wide variety of living organisms. We applied the methods on representative three stages which consist of lifecycle of an obligate, intracellular, parasitic protozoan, *Toxoplasma gondii*. As a result, we demonstrated gene expression profiles of the three stages as well as putative DNA cis-elements which regulate the gene expression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：原虫、トキソプラズマ、トランスクリプトーム、次世代シーケンサー、転写開始点、バイオインフォマティクス

1. 研究開始当初の背景

（1）ゲノムは生物の設計図であり膨大な生物学的情報が含まれているが、ゲノム単体からの情報抽出には大変な困難が伴う。そこで近年、プロテオームやメタボロームなどの網羅的解析を援用して、ゲノムに含まれる情報を噛み砕いて理解する試みが盛んに行われている。トランスクリプトームもその一つであり、具体的には、EST、SAGE、microarray

が一般的な解析方法として用いられるが、網羅性、感度、定量性、検出範囲に改善の余地があることも認識されつつある。一方で、近年開発された次世代型シーケンサーを採用する TSS-seq 法は、圧倒的な網羅性と 1 塩基単位の高解像度で転写開始点（Transcription Start Sites：TSSs）を解析できる画期的な新規解析方法であり、この方法を用いる事で、これまでには考えられなか

った多くの知見がゲノムから得られつつある。これら、ゲノムとトランスクリプトームの組合せから明らかにされる種々の生物学的情報の中には、創薬ターゲットとして発展していくものも有り得る。例えば、病原性微生物の転写制御モチーフや転写制御因子が明らかになれば、その相互作用に対する阻害剤等により転写の人為的かく乱が可能となり、その結果、病原性微生物の増殖が阻害されることが予想される。

(2) 創薬の対象となる病原性微生物の1つに原虫があげられる。トキソプラズマはアピコンプレクス門コクシジウム綱に分類される原虫の一種で、生肉の摂取や、終宿主であるネコとの接触により伝播される。健康な成人が感染した場合には重篤な症状を引き起こさないが、妊娠中の初感染は、流産や新生児の障害を誘発する場合があります、幼い子供やHIVなどの感染で免疫が十分でない状態でも重症になることがあることから、効果的な予防・治療方法の確立が望まれている。加えて、生活環におけるダイナミックな形態変化(急増虫体: tachyzoites (Tz)、緩増虫体: bradyzoites (Bz)、種虫: sporozoites (Sz)間のstage conversion)や、複雑な宿主・寄生虫間の相互作用等、生物学的にユニークな性質を有している。これらは、原虫が宿主との闘い合いや過酷な環境に打ち勝ち生存し続けるために獲得した形質と考えられることから、逆に、この分子機構に関わる転写制御を明らかにし標的とすることで、この原虫による感染症に対する予防・治療薬に繋がる知見を得られるのではないかと着想した。

(3) 我々は、強毒株トキソプラズマ原虫を対象として、TSS-seq法を用いたトキソプラズマトランスクリプトームの高解像度解析をスタートさせている。これまでに、Tzステージでの転写開始領域を約1万箇所特定しており、また、転写制御の要となるコアプロモーター内の特定位置にイニシエーター配列が頻出することを既に明らかにしている。

2. 研究の目的

本研究では、次世代型シーケンサーの援用によって解析力が大幅に向上した転写開始点解析技術をトキソプラズマへ適用することによって、これまでにない高解像度でトランスクリプトーム解析を行うこと。次にその結果を用いて、1) コアプロモーターの構造解析、2) 原虫の各ステージ特異的に発現する遺伝子のカタログ化、3) 新規転写制御モチーフの発見を試み、その結果明らかになる事が期待される転写における原虫と宿主の差異を対象に、4) 創薬ターゲットの探索と評価を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) トキソプラズマ Tz、Bz、Sz 虫体の調整: 本研究では、ゲノムが公開されており Tz、Bz、Sz 各虫体に分化が可能な弱毒株である ME49 株を供試した。本究計画には、シーケンサーによる網羅的解析がふくまれているため、Tz、Bz、Sz 各虫体を大量かつ高純度で調整する必要がある。Tz はヒト繊維芽細胞を宿主に用いる *in vitro* 培養により調整した。Bz は pH8.0 培養液を用いるストレス負荷状態で Tz を *in vitro* 培養することにより誘導した。Sz はアメリカ農務省 Dubey 博士の好意により ME49 株感染ネコの糞便より精製した oocyst の分譲を受け、これを *in vitro* で脱囊することで調整した。

(2) 次世代シーケンサーを用いた転写開始点の網羅的な取得: トキソプラズマ各ステージの転写開始点の網羅的な取得には、mRNA の末端キャップ構造を oligo RNA linker で置換するオリゴキャッピング法で cDNA を合成し、それを次世代シーケンサーで解析する TSS-seq 法を用いた。プロモーター領域の特定は、得られた転写開始点をクラスタリングし、統計解析することで行った。各ステージで活性を持つプロモーター領域を比較することで、プロモーター領域の特異性を決定した。加えて、各プロモーターの代表的な転写開始点を規定し、そこから前方 500 塩基、後方 100 塩基を抽出したプロモーター配列データセットをステージ毎に構築し、cis-finder を用いて解析することで、プロモーター配列内で活性のステージ特異性を規定する cis-element の特定を行った。

(3) 次世代シーケンサーを用いた転写配列の網羅的な取得: トキソプラズマ各ステージで転写される配列の網羅的な取得は、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 法で行った。得られた配列をゲノム配列にマップし各遺伝子の発現量を推定することで、各ステージにおける遺伝子発現プロファイルを決した。得られた各ステージの遺伝子発現プロファイルを比較することで、ステージ特異的に発現する遺伝子群を特定した。加えて、KEGG を利用した pathway 解析を行うことで、ステージ特異的に活性化されている代謝経路を推定した。

(4) 阻害剤を利用した特異的代謝経路の推定: 推定したステージ特異的に活性化されている代謝経路が実際に機能していることを確認するため、各種阻害剤を利用したアッセイを行った。評価は『細胞の』ATP 測定試薬を用いた ATP 量の測定で行った。脂肪酸β酸化を標的とした阻害剤には、トリメタジジン、および、Ranolazine を用いた。NADH-フマレート還元反応・グリオキシル酸回路を標的とした阻害剤には、Flutolanil およびイタコン酸を用いた。電子伝達系を標的とした阻害剤には、ATPase 阻害剤である

Oligomycin と、複合体Ⅲの阻害剤である Antimycin A1 を用いた。まず宿主への影響を確認するため、各阻害剤を種々の濃度で HFF 細胞の培養液に添加した。Tz への影響を評価するためには、各阻害剤をトキソプラズマ感染 HFF 細胞の培養液に添加した。Sz への影響を評価するために、Sz 懸濁液に各阻害剤を添加した。

4. 研究成果

(1) コアプロモーター構造の推定：予備実験として行ったトキソプラズマ原虫 (RH 株) の TSS-seq 解析からは、当該原虫のコアプロモーターには動物や植物で認められるイニシエーター様のモチーフが存在することが示唆されている。そこで RH 株の転写開始点周辺配列、すなわちプロモーター配列をパイオインフォマティクスを応用して詳細に解析することにより、イニシエーター以外の制御モチーフの探索を行った。その結果、イニシエーターの直下にチミジン配列がクラスターを形成することを見出し、これを Downstream Thymidine Cluster (DTC) と呼称することにした。さらに DTC の存在と転写活性の関係を統計的に解析したところ、DTC が転写の活性化に関与する可能性が示唆された。一方、動物や植物で機能することが知られている TATA box や TFIIB recognition element 等のモチーフはトキソプラズマ原虫のプロモーターに存在しておらず、動物・植物と原虫の基本的な転写制御分子機構の間には多様性があることが予想された。加えて、トキソプラズマの 5'UTR 長を網羅的に解析した結果、その最頻値が 120 塩基から 140 塩基の間にあることが明らかとなった。この値は動物・植物とほぼ一致した。以上を統合することで、トキソプラズマ原虫のコアプロモーター構造を推定した。

(2) プロモーター領域の特定と cis-element の推定：Tz、Bz、Sz のトランスクリプトームを、TSS-seq・RNA-seq を用いて取得した。転写開始点に特化しプロモーター領域の特定が可能な TSS-seq 法を用いた結果、Tz、Bz、Sz のそれぞれで、811、1044、2136 か所のプロモーター領域を特定するに至った。さらに、ステージ特異的なプロモーターを選抜し解析を行った結果、Bz では CCAAGTG、Sz では TGTnnnnACA がステージ特異的な制御に関与する cis-element であることが示唆された。

(3) 遺伝子発現プロファイルの推定：遺伝子発現のカタログ化に有効な RNA-seq 法を用いた結果、Tz、Bz、Sz のそれぞれで特異的に発現する、96、196、548 個の遺伝子を特定するに至った。この中には、それぞれ、1、1、2 個の AP2 転写制御因子が含まれていたことから、それらが同定された cis-element を介してステージ特異的な遺伝子発現を司るマ

スターレギュレーターである可能性が示唆された。続いて、得られた遺伝子発現プロファイルについて、KEGG を利用した pathway 解析を行なった。その結果、エネルギー代謝経路について、Tz では TCA 回路と酸化リン酸化が、Sz では脂肪酸 β 酸化が特異的に機能している可能性が示唆された。

(4) 阻害剤を利用した特異的代謝経路の検証：トランスクリプトーム解析からは、Sz では脂肪酸 β 酸化が活性化している可能性が示唆された。一方で、電子伝達系が不活性化されていることも同時に示唆されている。これらの知見から、β 酸化で産生する大量の NADH とアセチル CoA を、電子伝達系の関与無しに代謝し ATP を得ることが出来るか否かが、次の焦点となる。そこで、Sz における脂肪酸 β 酸化と電子伝達系の関与と、電子伝達系をバイパスして ATP を合成しうる可能性がある NADH-フマレート還元反応、グリオキシル酸回路の関与を阻害剤を用いた生化学的実験により検討した。

① 脂肪酸 β 酸化：阻害剤として、トリメタジジン、および、Ranolazine を用いた。両化合物ともトキソプラズマにおける活性は不明なため、予備実験としてタキゾイトを用いて活性の有無を検討した。HFF 細胞へトキソプラズマを感染させ 48 時間後に阻害剤を添加し、その 24 時間後にタキゾイトを精製し虫体に含まれる ATP を測定したが、HFF 細胞に影響の出ない最大濃度 (100 μM) でもタキゾイト含有 ATP に変化は認められず、両化合物のトキソプラズマにおける阻害活性の有無を明らかにすることは出来なかった。一方、同一濃度の阻害剤を脱囊後のスポロゾイトへ作用させ、含有 ATP 量を継時的に測定したが、コントロール区との差異を認めることはできなかった。従って、スポロゾイトで β 酸化は利用されていないのか、利用されているにも関わらず両化合物が阻害活性を示さなかったのかは、現状では明らかではない。

② NADH-フマレート還元反応・グリオキシル酸回路：阻害剤として、Flutolanil およびイタコン酸を用い、同様に、それぞれ 100 μM、1000 μM をスポロゾイトへ添加したが含有 ATP に違いは認められなかった。従って、当該経路が利用されていないのか、阻害剤作用が無いのかは、現状では明らかではない。

③ 電子伝達系：ATPase 阻害剤である Oligomycin と、複合体Ⅲの阻害剤である Antimycin A1 を用いた。Oligomycin は 0.5 μg/mL でタキゾイトに対して ATP 合成阻害を示したが、スポロゾイトに対しては、それより濃い 50 μg/mL でも阻害を示さなかった。これは、スポロゾイトでは ATPase

を介した ATP 合成が行われていない可能性を示唆している。一方、Antimycin A1 を用いた際には含有 ATP 量の低下が認められた。従って、スポロゾイトでは複合体 III が関与する ATP 合成系が機能している可能性がある。

以上の検討により、当初想定していた NADH-フラムレート還元反応やグリオキシル酸回路の関与を積極的に示す結果は得られなかったため、 β 酸化によって産生するアセチル CoA から直接 ATP を合成する acetyl-CoA synthetase (TGME49_066640, EC 2.8.3.8) に注目した。この酵素はスポロゾイトでも転写産物が認められており、また、ヒトにホモログは無い。代謝産物である酢酸の濃度変化を計測することで、この酵素の関与が推定可能と考えられる。当初の研究計画にはなかったが、脱嚢スポロゾイト虫体を精製することなしに、oocyst 構成成分と共に ATP 含有量を計測した結果、非常に高い値が得られた。これは、oocyst 内に大量の ATP が貯蔵されている可能性を示唆している。また、脱嚢後 18 時間のスポロゾイトからは、僅かな ATP しか検出することが出来なかった。これは、スポロゾイトには継続して ATP 合成を行う能力がない可能性を示唆している。

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 8 件)

1. Characterization of *Toxoplasma gondii* 5' UTR with encyclopedic TSS information. Yamagishi J, Watanabe J, Goo YK, Masatani T, Suzuki Y, Xuan X. *J Parasitol.* 査読有. 2012 Apr;98(2):445-7. doi: 10.1645/GE-2864.1
2. Construction and analysis of full-length cDNA library of *Cryptosporidium parvum*. Yamagishi J, Wakaguri H, Sugano S, Kawano S, Fujisaki K, Sugimoto C, Watanabe J, Suzuki Y, Kimata I, Xuan X. *Parasitol Int.* 査読有. 2011 Jun;60(2):199-202. doi: 10.1016/j.parint.2011.03.001
3. Full-parasites' database of full-length cDNAs of apicomplexa parasites, 2010 update. Tuda J, Mongan AE, Tolba ME, Imada M, Yamagishi J, Xuan X, Wakaguri H, Sugano S, Sugimoto C, Suzuki Y. *Nucleic Acids Res.* 査読有. 2011 Jan;39(Database issue):D625-31. doi: 10.1093/nar/gkq1111
4. High-resolution characterization of

Toxoplasma gondii transcriptome with a massive parallel sequencing method. Yamagishi J, Wakaguri H, Ueno A, Goo YK, Tolba M, Igarashi M, Nishikawa Y, Sugimoto C, Sugano S, Suzuki Y, Watanabe J, Xuan X. *DNA Res.* 査読有. 2010 Aug;17(4):233-43. doi: 10.1093/dnares/dsq013

[学会発表] (計 19 件)

1. Advances in Tropical Genomics: Conservation and Sustainable Utilization of Tropical Biodiversity, 20 - 21 December 2011, Bogor, Indonesia. Transcriptomics of a Parasit *Toxoplasma gondii* from Next Generation Sequencing. Junya Yamagishi, Hiroyuki Wakaguri, Junichi Watanabe, Kawazu Shin-ichiro, Yutaka Suzuki, Xuan Xuan
2. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 6-10 September 2011, Sapporo, Japan. Comparative transcriptomics among tachyzoites, bradyzoites and sporozoites of *Toxoplasma gondii* using massive parallel sequencing method. Junya Yamagishi, Hiroyuki Wakaguri, Akio Ueno, Makoto Igarashi, Junichi Watanabe, Yutaka Suzuki, Xuan Xuan

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○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 :

[その他]

ホームページ等

Full-Toxoplasma

http://fullmal.hgc.jp/index_tg_ajax.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山岸 潤也 (YAMAGISHI JUNYA)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機
構・助教

研究者番号：80535328