

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 24 年 6 月 6 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790397

研究課題名（和文） 遺伝子間障壁に着目したマラリア原虫の遺伝子発現メカニズムの解明

研究課題名（英文） Regulatory gene expression by cohesin in malaria parasite

研究代表者

矢幡 一英 (YAHATA KAZUHIDE)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：40467965

研究成果の概要（和文）：マラリア原虫で解析されていないコヒーシンの機能を明らかにするため、マラリア原虫のコヒーシンをマラリア原虫よりクローニングし、組換えマラリア原虫を作製した。これを基にクロマチン沈降法からの DNA 断片をゲノムデータベースにマッピングするための基盤を構築している。マラリア原虫の各発育期におけるコヒーシン集積部を解析することで、マラリア原虫の遺伝子発現メカニズムの一端を明らかに出来るものと考えている。

研究成果の概要（英文）：The new evidence is emerging suggesting that the cohesin complex is involved in the regulation of gene expression in yeast and mammals. However, a precise role for the cohesion complex in the regulation of gene expression remains completely unexplored in malaria parasite. Thus we cloned cohesin from malaria parasite and generated the cohesin-tagged transgenic parasite to assess the cohesin distribution in the genome. Cohesin mapping would reveal the gene expression mechanism of different developmental stages between mammalian host and mosquito of malaria parasite.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

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・エピジェネティック・インスレーター

1. 研究開始当初の背景

マラリアは世界中で年間 2-3 億人の感染者、150 万人の死者を出す重大な感染症である。近年、マラリア原虫の解析手法として遺伝子導入法の開発が進んでいるが、人工的に構築した遺伝子発現ベクターを遺伝子導入すると、予想とは異なるタイミングで発現が起こったり、発現そのものが見られない現象がある。このような現象は哺乳類や酵母においても知られており、隣接する遺伝子領域による転写干渉や、遺伝子発現が抑制されている不活性なヘテロクロマチン領域への遺伝子導入によって生じる導入遺伝子のヘテロクロマチン化によるものと考えられている。マラリア原虫に導入した遺伝子が予想とは異なる発現や不活性化したりする現象も、このような転写干渉やヘテロクロマチン化が原因となっていると思われる。研究申請者はこれまでに、哺乳類細胞において転写干渉を起こしている遺伝子領域にインスレーターを導入することで転写干渉を制御できることを見出していた (Yahata K. et al. 2007)。インスレーターは真核生物のゲノム上にある遺伝子間領域であり、隣接する遺伝子同士が起こす転写干渉やエンハンサー効果、またヘテロクロマチン化の抑制に働くことが分かっている。さらに近年、ヒトゲノム上を ChIP on ChIP 法でコヒーシンをマッピングすることにより、染色体分配に働くとされていたコヒーシスがインスレーターとしても働いていることを初めて見出した。これらの成果は人体の設計図であるヒトゲノムを機能別のブロック単位で理解できるようになる成果であり、遺伝病の原因究明や遺伝子治療の進歩につながると期待されている。

マラリア原虫は蚊・ヒトに寄生する際に形態を変化させ、組織、周期特異的な遺伝子発現を厳密にコントロールしているが、遺伝子発現メカニズムは不明な点が多く、ゲノムは AT 含有率が 80% を超えるなど、特殊な構造を持ち、哺乳類細胞で得られた知見が直接あてはめることができず、マラリア原虫における転写干渉の機構、またインスレーターに関する遺伝子発現メカニズムなどの詳細は分かっていない。このような分子機構はマラリア原虫に特異的なものと予想されるため、将来的には創薬の標的になりうると考えている。

2. 研究の目的

遺伝子組換えマラリア原虫作製のため、マラリア原虫に外来遺伝子を導入した際に、導入した遺伝子からのタンパク質発現が見られなかったり、発現のタイミングが予想とは異

なるといった転写干渉と呼ばれる問題が起こる。真核生物で転写干渉現象を止めることが分かっているトリのインスレーターを導入することにより、マラリア原虫での転写干渉現象を止めることが出来るのかを検討したが、トリ由来のインスレーターは効果がなく、マラリア原虫特有のインスレーターの存在が示唆された。そこで、ヒトの遺伝子間領域にコヒーシスが集積していたという共同研究から、マラリア原虫ゲノム上でのコヒーシンの分布を解析することで、遺伝子間の障壁を担うインスレーター領域を探索し、マラリア原虫のゲノム上における遺伝子発現機構の一端を明らかにすることを旨とする。マラリア原虫において遺伝子発現調節メカニズムは不明な点が多く、マラリア原虫においてインスレーターの研究を行うことは生物学的にも全く独特の機構を持つ可能性があり、マラリア原虫の転写制御の研究に新しい着眼点から切り込めると考えられる。研究の応用として、遺伝子導入ベクターにインスレーター領域を挿入することで、正確なタイミングで発現し、かつ発現抑制を起こさない効率の良い遺伝子導入法を開発する。

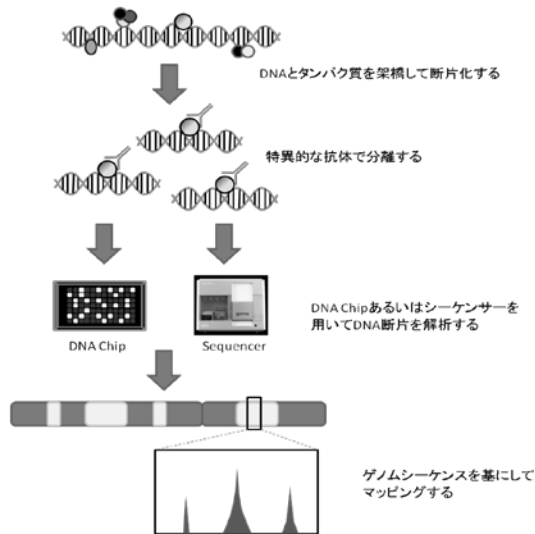
3. 研究の方法

(1) マラリア原虫のコヒーシんに結合するゲノム領域を明らかにするため、ChIP 法で用いるコヒーシンに対する特異抗体を取得する。哺乳類でのコヒーシンに対する市販抗体、さらにマラリア原虫のコヒーシンに対するペプチド抗体を作製する。市販抗体、また作製した抗体が機能しないことを考慮し、熱帯熱マラリア原虫ゲノムデータベースを用いてコヒーシンの活性ドメインを有するコヒーシンオーソログである PfSCC1/PfRad21、PfSMC1、PfSMC3 をマラリア原虫のゲノム DNA、cDNA よりクローニングし、GFP/Ty タグを付加する。クローニングしたコヒーシンはマラリア原虫用の遺伝子発現ベクターに導入する。

(2) コヒーシン-GFP/Ty を持つ遺伝子発現ベクターを熱帯熱マラリア原虫にエレクトロポレーション法にて遺伝子導入し、薬剤選択下において遺伝子組換えマラリア原虫を得る。その後、市販抗体、ペプチド抗体、さらに遺伝子組換えマラリア原虫を用いて ChIP 法により組換えコヒーシンに結合する DNA 断片を得る。

(3) ChIP 法で得られた DNA 断片を基に、ChIP on ChIP 法、ChIP sequence 法により、マラリア原虫ゲノム上におけるコヒーシン集積部位を特定する。これをマラリア原虫の異なる発育期においても実施することで、発育時

期特異的な遺伝子発現とコヒーシンの関連性や、また PfEMP1 等の他排他的な転写調節とコヒーシンの関連性を検証する。(図 1)。



(図 1)

4. 研究成果

(1) コヒーシン複合体のクローニング

クロマチン免疫沈降法では特異的な抗体が必須である。マラリア原虫の特異抗体は市販化されておらず、個々に抗体を作製する必要があるため、コヒーシンが他の生物種で保存されているのかを確認したところ、機能部位は保存されているが、市販抗体のエピトープ部位はホモロジーが 50%以下であった。そこで市販されているコヒーシン抗体と共にマラリア原虫のコヒーシン (PfRad21/PfSCC1、PfSMC1、PfSMC3) と推定されているアミノ酸配列よりペプチド抗体を得た。また、作製した抗体が作用しない可能性を考え、マラリア原虫のゲノムプロジェクトから得られたデータベースより、コヒーシンの活性ドメインが保存されている PfRad21/PfSCC1、PfSMC1、PfSMC3 の 3' 末端と全長 cDNA を熱帯熱マラリア原虫から Gateway システムを用いて GFP/Ty タグを付加してクローニングした。

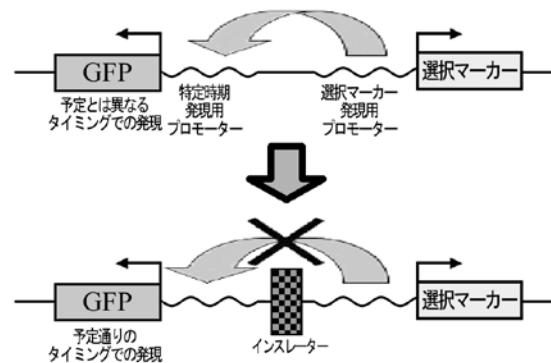
(2) マラリア原虫での ChIP 法

クローニングしたコヒーシンを熱帯熱マラリア原虫用の遺伝子発現ベクターに入れ、熱帯熱マラリア原虫にエレクトロポレーション法により遺伝子導入した。1 か月間薬剤選択することにより、遺伝子発現プラスミドを保有する組換えマラリア原虫を得た。その組換えマラリア原虫をホルムアルデヒド固定の後、超音波破碎で 500 bp 程度の DNA-タンパク質複合体を回収した。得られた DNA-タンパク質複合体は GFP/Ty 抗体を用いて免疫沈降を行い、DNA-コヒーシン複合体を回収後、脱結合させてコヒーシン複合体に結合した DNA 断片を回収した。しかしながら予想

よりも得られた DNA 量が少なく、本来の特異的な結合なのか特異抗体を詳細に選定する必要が出てきた。組換えマラリア原虫の特異抗体と合わせて作成したペプチド抗体を用いてさらにクロマチン免疫法の条件検討を行なっている。

(3) ChIP 法で得られた DNA 断片のゲノムデータへのマッピング

ChIP 法で得られた DNA 断片を次世代シーケンサーを使用してゲノムデータベース上にマッピングするため、条件検討中である。マッピング後、赤内期におけるマラリア原虫の各ステージにおけるコヒーシン分布を比較し、遺伝子間領域に存在する配列を相互比較することにより、インスレータードメインを決定する。コヒーシン集積部とインスレータードメインを相互解析することで、マラリア原虫の遺伝子発現メカニズムの一端を明らかにすると共に、コヒーシン集積部を遺伝子導入コンストラクトに挿入することで、正確なタイミングで発現し、かつ発現抑制を起こさない効率の良い遺伝子導入法を目指している(図 2)。



(図 2)

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)

[学会発表] (計 1 件)

矢幡一英、Richard Culleton、金子修
「Time-lapse imagingを用いたマラリア原虫の赤血球侵入時における動態観察」 第 80 回日本分子寄生虫学会大会 (東京慈恵会医科大学) 平成 23 年 7 月 17 日

[その他]

ホームページ等

<http://www.tm.nagasaki-u.ac.jp/protozoology/Member-KY-J.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢幡 一英 (YAHATA KAZUHIDE)
長崎大学・熱帯医学研究所・助教
研究者番号：40467965

(2) 研究分担者

該当なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

該当なし ()

研究者番号：