

## 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 20 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 年度～2011 年度

課題番号：22790400

研究課題名（和文）マラリア原虫の新奇転写調節領域結合タンパクの性状と機能の解析

研究課題名（英文）Analysis and Characterization of the Functions of New Factor Related to Transcriptional Regulation in *Plasmodium falciparum*

研究代表者 安田 加奈子（駒木加奈子）

(Kanakano Komaki-Yasuda) 独立行政法人国立国際医療研究センター

研究者番号：50415551

研究成果の概要（和文）：マラリア原虫ゲノム上には遺伝子転写調節領域（*cis*-element）に結合する「転写調節因子」の既知のホモログが殆ど存在せず、転写制御機構の理解が進んでいない。われわれはこれまでの研究において、原虫に独自の転写調節因子を同定することを目指し、熱帯熱マラリア原虫 *prx* 遺伝子の *cis*-element に特異的に結合する DNA 結合因子の単離同定を試み、質量解析によって約 20 種類の候補タンパクを同定していた。本研究ではこれらのうち、特に質量解析でペプチドの検出数が多かったタンパク 4 種類に FLAG タグを付加し、その遺伝子をマラリア原虫に過剰発現させた。この過剰発現原虫より、抗 FLAG 抗体ビーズを用いて発現タンパクを精製し、*pfl-cys-prx* 遺伝子の *cis*-element に対する結合活性をゲルシフトアッセイによって確認した結果、候補のひとつに *cis*-element の配列に特異的な結合活性が認められた。このタンパクを以下 *prx* regulatory element binding protein: PREBP とする。PREBP に対する特異的なペプチド抗体を作製し、原虫核抽出物と *cis*-element 配列を用いたゲルシフトアッセイの反応液中に加えたところ、*cis*-element・因子・抗体の複合体に由来するスーパーシフトバンドが形成され、目的の因子が確実に同定されたことが示された。PREBP のデータベース上の ORF から予測される分子量は 130 kDa、Mass ではその中央部分の約 60 kDa に相当する部分のペプチドが検出されており、この部分が核内で作用すると考えられた。PREBP の中央部分の 60 kDa のみを過剰発現させた原虫では *pfl-cys-prx* の発現量に影響が見られず、130 kDa の ORF にコードされるタンパクの N 末と C 末は中央部が正しく機能する為に必要な領域である可能性が示唆された。また、PREBP は無細胞合成系による組換え体では *cis*-element への結合活性を示さなかったが、原虫細胞自身を用いた組換え体では結合活性を示したことから、原虫細胞内で特異的な修飾を受けることによって結合活性を得ることが予測された。

研究成果の概要（英文）：The detailed mechanisms of transcriptional regulation in malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, remains almost unknown. Genome-wide analyses of transcription-associated proteins have revealed a paucity of putative regulatory transcription factors, suggesting that this parasite has unique regulatory transcription factors distinct from those of other eukaryotes. Previously, to identify unique regulatory transcription factors in *P. falciparum*, we tried purification and identification of nuclear factor which associates specifically with *cis*-acting enhancer region of *pfl-cys-prx*, then, about 20 parasite proteins were identified. In this study, to identify the *cis*-element-binding factor, 4 candidate proteins, which showed high frequency signal detection in the mass spectrometry, were FLAG-tagged and over-expressed in the parasite cells. These over-expressed proteins were purified from the parasite cells through immunoprecipitation with anti-FLAG antibody, then, enhancer-binding activities of the recombinant proteins were analyzed by EMSA. As results, one of these proteins revealed sequence-specific enhancer-binding activity. Specific peptide antibody against the new identified factor was produced and used in the supershift assay. The supershift band was observed when the antibody was added in the EMSA reaction with *cis*-acting enhancer region of *pfl-cys-prx* and the parasite nuclear extract. These results strongly verified that the new *cis*-element binding factor was identified (this protein was named as “*prx* regulatory element binding protein”: PREBP). The molecular weight of PREBP estimated from the genome database was 130 KDa, although in the mass-spectrometry, only the peptides corresponding to the central 60 KDa region of PREBP was detected, suggesting that the central region functions in the parasite nuclear. However, the over-expression of the central 60 KDa region of PREBP did not affected to the expression of *pfl-cys-prx*. The N-terminal and C-terminal region of the 130 KDa coding region of PREBP might be necessary for the function of the central region in the nuclear. In addition, recombinant PREBP protein purified from the cell-free translation system did not show the *cis*-element binding activity. In contrast, recombinant PREBP protein directly purified from the parasite cells showed the activity, suggesting that some specific modification in the parasite cell is needed for the binding activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：分子寄生虫学

科研費の分科・細目：寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：マラリア、転写、転写因子、細胞周期

1. 研究開始当初の背景

熱帯熱マラリアは年間約5億人が罹患、およそ300万人が死亡する地球規模の感染症であり、熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*)が、媒介蚊の吸血によってヒトに感染、赤血球内に寄生、分裂・増殖することにより、引き起こされる。原虫細胞における基本的な機能である、転写、DNA修復、シグナル伝達などの詳細な分子機序は殆ど解明されていない。私はマラリア原虫の寄生適応機構の分子論に対する的確な理解をすることが、マラリア制圧の新たなストラテジーを開発する上で重要であると考え、特に転写制御機構に着目した研究をおこなってきた。原虫の遺伝子発現については、トランスクリプトーム解析によって、原虫の生活環および細胞周期と密接に関連した巧妙な転写制御が示唆されている (Le Roch KG et al. Science 2003, 301: 1503-1508; Bozdech Z et al. PLoS Biol. 2003,1: 85-100)。しかし*P. falciparum*のゲノム上には、基本転写複合体の形成に必要な基本転写因子(basal transcription factor)群、またクロマチン修飾因子群のホモログはよく保存されているが、遺伝子毎の転写調節領域(cis-element)に結合して遺伝子特異的に発現を調節する転写因子(regulatory transcription factor)のホモログは、ほとんど存在しない。加えて*P. falciparum*のゲノムは、non-coding-regionのAT含有率が90%以上という組成となっており、既知のcis-elementとのホモロジー検索もほぼ不可能となっている。これらのことから「原虫における遺伝子発現調節は他生物と異なり、転写因子の関与しない機構ではないか」という説まである (Aravind et al. Cell 2003, 115: 771-785; Deistsch et al. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2007, 77: 201-208)。一方、最近のバイオインフォマティクス解析によって、原虫には植物の転写因子AP-2ファ

ミリーに類似した構造を持つタンパク群があることが見出され、これが原虫における独自の転写因子ではないか、とも考えられている (Baraji et al, Nucleic Acids Res. 33:3994-4006, 2005; Yuda M et al. Mol. Microbiol. 2009, 71:1402-1414)。

このような状況のもと、私は抗酸化タンパク質Peroxiredoxin (Prx)遺伝子の転写制御機構を解析してきた。*prx*遺伝子は、他の多くの赤血球内ステージで発現する遺伝子と同様、原虫の細胞周期に依存した発現パターンを示し、一般的な転写制御のモデルケースとなり得ると考えた。その結果、(i) *prx*遺伝子の5'領域にエンハンサーとして作用するcis-elementが存在し、そこに特異的に結合する核内因子が存在すること、(ii) *prx*遺伝子の5'領域はヒストンアセチル化を介したエピジェネティックな制御のターゲットとなっており、その時*prx*遺伝子のcis-elementには、ヒストンアセチル基転移酵素PfGCN5がリクルートされていることがわかった (Komaki-Yasuda K et al. Mol. Biochem. Parasitol 2008, 162: 40-45)。これらの結果は、*P. falciparum*においてもやはり転写因子が存在し、これがcis-elementに結合し、またこれとクロマチン修飾を介したエピジェネティックな制御の協調による転写制御が成されていることを強く示唆している。

更に、私は*prx*遺伝子のcis-elementに特異的に結合する核内因子の同定を試みた。33 Lの培養原虫 ( $5 \times 10^{11}$  cells) より核抽出物 110 mL よりを調製し、そこから5段階のクロマトグラフィーを経て目的の因子を精製した。各精製段階において、cis-elementの配列をプローブとして用いたゲルシフトアッセイをおこない、因子の活性を確認した。精製の結果、30  $\mu$ Lの活性を持つフラクションが得られ、これをSDS-PAGEによって展開した結果、目的の因子の候補を分子量約 60 KDaの3本

のバンドに絞り込むことができた。これらのバンドを切り出し LC/MS/MS による質量解析をおこなった結果、約 20 種類の候補タンパクが同定された。

## 2. 研究の目的

ここまでの研究によって同定された 20 種類の転写因子候補タンパクはいずれも、既に報告されている原虫の転写因子の候補である AP-2 ファミリーには属さず、新しい原虫独自の転写因子である可能性が高い。本申請研究ではこれらの候補の中から、真に *pfl-cis-prx* の *cis-element* に作用する因子を特定し、その性状と機能を解析することによって、原虫の転写制御の独自性を解明することを目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 候補タンパク過剰発現原虫株の作製

熱帯熱マラリア原虫用の過剰発現用プラスミドベクター、pHC1 の expression cassette に目的タンパクの遺伝子を挿入した。この時、後の解析のために N 末に FLAG ペプチド、C 末に His Tag がつくように設計した。また、候補タンパクの中で、データベース上のサイズが、Mass で同定したバンドのサイズ(60 KDa)より著しく大きいものについては、ペプチドが検出された、60 kDa に対応する部分のみを発現する様に設計した。このプラスミドをエレクトロポレーションによって培養熱帯熱マラリア原虫 FCR-3 株に導入し、ピリメタミンによって候補因子過剰発現株を薬剤選択した。

### (2) 候補タンパク過剰発現原虫からの発現タンパクの精製

作製した遺伝子過剰発現原虫のライセートを材料として、抗 FLAG 抗体付加アガロースビーズ (GE Healthcare 社) を用いた免疫沈降によって、発現タンパクの粗精製をおこなった。ウエスタンブロットによって目的の組換え体の粗精製を確認した。得られたタンパクの DNA 結合能はゲルシフトアッセイにて確認した。

### (3) PREBP に対するペプチド抗体の作製

同定されたタンパク(PREBP)に対する抗体を作製するため、抗原として適切なエピトープとなりうるペプチドを 2 箇所合成し、ウサギに対してカクテル免疫をおこない、その血清より抗原ペプチドをもちいたアフィニティー精製をおこなうことによってポリクローナル抗体を得た。この抗体はスーパーシフトアッセイに用いた。

### (4) 無細胞合成系による PREBP タンパクの作製

PREBP の中央部 60 KDa について無細胞合成系 (TransDirect system: 島津) を用いて組換え体を作製した。各組換え体には N 末に

FLAG tag を付加し、合成後には抗 FLAG 抗体付加アガロースビーズ (GE Healthcare 社) を用いた粗精製をおこなった。組換え体の活性の確認には *prx* 遺伝子の *cis-element* 102bp をプローブとして用いたゲルシフトアッセイをおこなった。

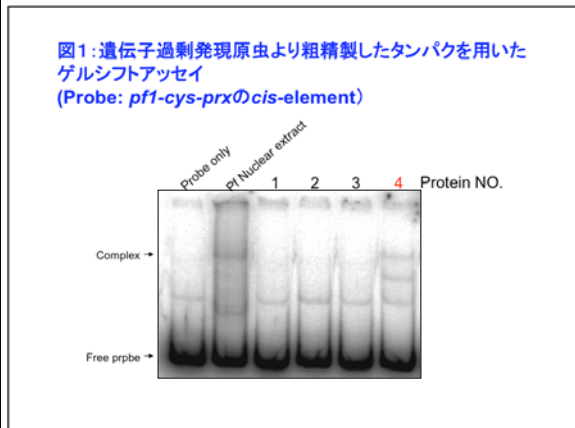
### (5) PREBP 過剰発現原虫における *pfl-cis-prx* 遺伝子の発現量の定量

PREBP 中央部 60 KDa の過剰発現マラリア原虫株、および親株 (FCR-3) をそれぞれ同調培養し、トロホゾイト/シゾン時期に達したところで、RNA を抽出し、ランダムプライマーを用いて逆転写反応をおこない、cDNA を得た。これを材料にして、リアルタイム定量 PCR (ABI7900 を使用)をおこない、*pfl-cis-prx* 遺伝子の発現量を定量した。

## 4. 研究成果

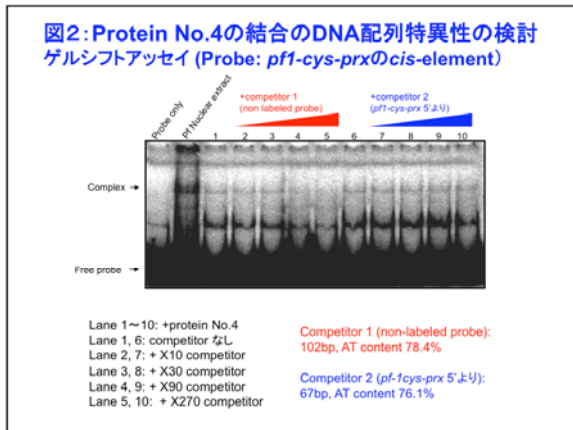
### (1) *pfl-cys-prx* 遺伝子に特異的に結合する因子の決定

ここまでの研究によって同定された 20 種類の転写因子候補タンパクから、特に質量解析によるペプチドの検出数の多かった 4 種類について、過剰発現熱帯熱マラリア原虫株を作製し、そこから発現タンパクの粗精製をおこなった。これらの精製タンパクを用いて、ゲルシフトアッセイをおこなった。このとき、DNA プローブは *pfl-cys-prx* の *cis-element* の配列を用いた。すると、図 1 に示す様に 4 番のタンパクを用いた時のみ、原虫の核抽出物を用いたときと同じ位置にシフトバンドが形成された。このことによって 4 番のタンパクは *cis-element* に結合することが示唆された。

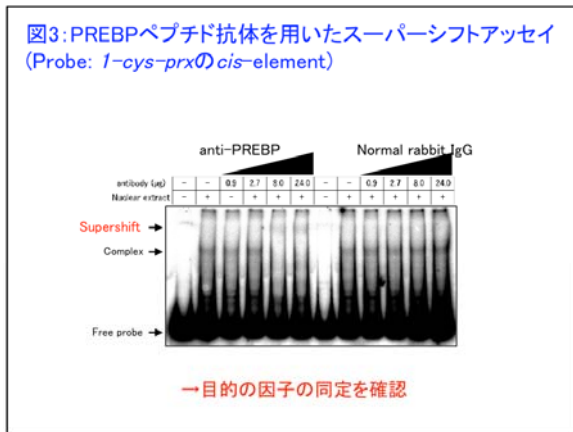


さらに、4 番タンパクと、*cis-element* の結合の塩基配列特異性を調べる目的で、ゲルシフトアッセイの反応液中にコンペティターとなる DNA 断片を加えた。その結果、コンペティターとして *cis-element* 自身、すなわち non-label-probe を加えた場合には 90 倍加えたところで、シフトバンドがほぼ消失しているのに対し、無関係の DNA 断片を加えた場合には 270 倍加えても、シフトバンドは消失せず、この結合が *cis-element* の配列に特異的で

あることが示された (図2)。



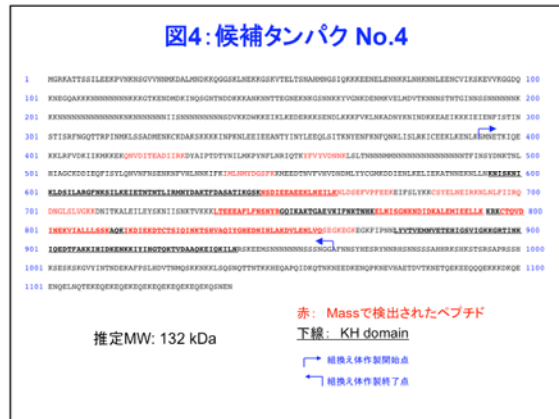
さらに、このタンパクに対する特異的ペプチド抗体を作製し、原虫核抽出物と *cis-element* 配列を用いたゲルシフトアッセイの反応液中に加えたところ、*cis-element*・核内因子・抗体の複合体に由来するスーパーシフトバンドが形成され、目的の核内因子が確実に同定されたことが示された (図3)。



(2)同定された因子の性質

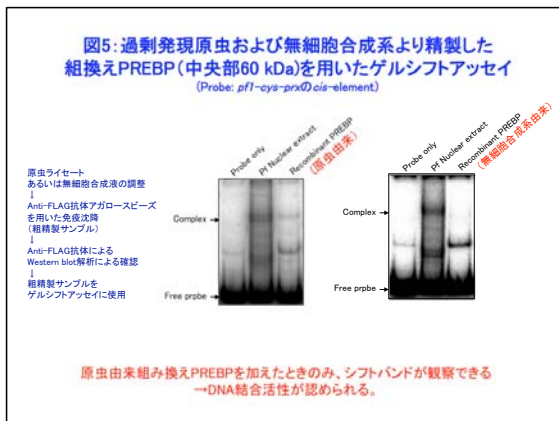
この因子はデータベース上では“hypothetical protein”として登録されていた (PlasmoDB:PF10\_0115; 登録名 QF122 antigen 以下、*prx* regulatory element binding protein: PREBP とする)。PREBP は既知の原虫の転写因子候補である AP-2 ファミリーには属さない新奇のタンパクであり、新しい原虫独自の転写因子である可能性が高い。このタンパクは *Plasmodium* 属では広く保存されているが機能は全く未知である。データベース上の ORF から予測される分子量は 132 kDa、Mass ではそのうち、中央部分の約 60 kDa に相当する部分のペプチドが検出されて来ている。同定時に切り出したバンドのサイズは約 60 kDa なので、何らかの理由で ORF の一部が functional なタンパクとして核内で発現すると思われる。[QF122 ‘antigen’]という名前の由来は 1980 年代の「原虫メロゾイトの表面抗原としてこのタンパクの N 末部分が同定された」という報告(Epping RJ et al, Mol

BiochemParasitol, 8:1-10, 1988)によるもので、QF122 は N 末部分が原虫表面に局在し、中央部分が核内に局在する可能性がある。PREBP の構造上の特徴としては KH ドメインと呼ばれる RNA あるいは single strand DNA に結合することが報告されているドメインが 4 箇所あることがあげられ、PREBP はこのドメインを介して *cis-element* を認識している可能性がある (図4)。



(3)PREBP が原虫内で受ける修飾の可能性

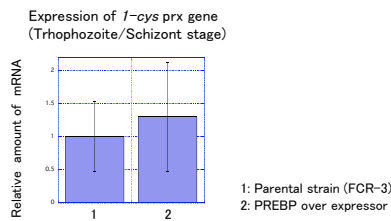
PREBP は無細胞合成系による組換え体では結合活性を示さなかったが、原虫細胞自身を用いた組換え体では結合活性を示した。よってこのタンパクは発現の際、何か原虫細胞内での特異的な修飾を受けることによって結合活性を得ることが予測される (図5)。



(4)PREBP 過剰発現原虫における *pfl-cis-prx* の発現

PREBP の中央部分 60 KDa の過剰発現によって、ターゲットと考えられる、*pfl-cys-prx* の発現が影響を受けるかどうかを、RT-PCR によって調べた。その結果、中央部 60kDa を過剰発現させた原虫では *pfl-cys-prx* の発現量に影響が見られなかった(図6)。この結果から、130 kDa の ORF にコードされるタンパクの N 末と C 末は中央部が正しく機能する為に必要な領域である可能性が考えられた。

図6:PREBP中央部過剰発現原虫では1-cys-prx遺伝子の発現量に変化が認められない(RT-PCR)



➡ PREBPの機能にはN末およびC末が必要??

#### (5)今後の課題・方針

PREBP 遺伝子欠損原虫を作製して、*prx* 遺伝子の発現パターンを解析し、PREBP が *prx* 遺伝子の発現調節にどの程度の影響を及ぼすのかを明らかにする。さらに遺伝子欠損原虫のマイクロアレイ解析によって全遺伝子の発現パターンを解析し、赤血球内寄生ステージにおいて、PREBP が *prx* 遺伝子以外ではどのような遺伝子群の転写制御に関わっているのか、どのようなプロモーターの構造が PREBP の支配を受けるのかを明らかにする。さらに PREBP の ORF 全長の過剰発現原虫株を作製する必要がある。過剰発現原虫において、原虫のステージ毎の PREBP の N 末、C 末、中央部の局在の変化を間接蛍光抗体法によって明らかにする。ORF の一部の過剰発現原虫との比較から「N 末と C 末が中央部の 60 kDa の functional な PREBP が核に局在するために必要である」という仮説を検証する。PREBP の機能解析の為に *cis-element* 結合活性を持つ PREBP の組換え体を大量に得るための条件を決定する。活性のある組換え体を用いて、PREBP が原虫細胞内で *cis-element* 結合活性を示すために必要な修飾を明らかにし、さらに修飾部位を決定する。PREBP と複合体を形成して転写制御に関わる因子群を同定する。PREBP と *prx* 遺伝子 *cis-element* の結合様式を決定する X 線結晶構造解析の準備段階として PREBP 組換え体と *prx* 遺伝子 *cis-element* の共結晶化条件を決定する。

#### 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. Katakai Y., Komaki-Yasuda K., Tangpuldee N., Wilairatana P., Krudsood S., Kano S.: Evaluation of the NOW Malaria immunochromatographic test for quantitative diagnosis of falciparum and

vivax malaria density. **Tropical Medicine and Health** 39:105-108, 2011.

2. Kawazu S., Takemae H., Komaki-Yasuda K., Kano S.: Target proteins of the cytosolic thioredoxin in *Plasmodium falciparum*. **Parasitology International** 59:298-302, 2010

[学会発表] (計 3 件)

1. 駒木-安田加奈子, 奥脇暢, 永田恭介, 河津信一郎, 狩野繁之: 熱帯熱マラリア原虫 *pfl-cys-prx* 遺伝子 *cis-element* に結合する新奇核内因子の同定およびその性状の解析, 第 80 回日本寄生虫学会, 2011 年 7 月 17 日, 慈恵医科大学
2. 駒木-安田加奈子, 奥脇暢, 永田恭介, 河津信一郎, 狩野繁之: 熱帯熱マラリア原虫 *pfl-cys-prx* 遺伝子 *cis-element* に結合する新奇核内因子の同定, 第 71 回日本寄生虫学会東日本支部大会, 2012 年 10 月 1 日, 杏林大学
3. 駒木-安田加奈子, 奥脇暢, 永田恭介, 河津信一郎, 狩野繁之: 熱帯熱マラリア原虫 *pfl-cys-prx* 遺伝子 *cis-element* に結合する新規核内因子の性状の解析, 第 81 回日本寄生虫学会, 2012 年 3 月 24 日, 兵庫医科大学

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

[http://www.ncgm.go.jp/rese/top/j/rese\\_trop.html](http://www.ncgm.go.jp/rese/top/j/rese_trop.html)

#### 6. 研究組織

- (1)研究代表者 安田 加奈子 (駒木加奈子)  
(Kanako Komaki-Yasuda)

研究者番号 : 50415551