

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：	14101
研究種目：	若手研究（B）
研究期間：	2011～2012
課題番号：	23790458
研究課題名（和文）	マラリア原虫生殖母体の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成熟過程を制御する 2 種類の転写因子 AP2-G1 および AP2-G2 を同定した。さらに雄ガメトサイト特異的なクロマチンリモデリング複合体 SWI/SNF complex の subunit が成熟制御に関与していることを見出した。これらの 3 分子の ChIP-seq を行い各分子の全標的遺伝子を同定した。同定した標的遺伝子についてガメトサイト期における発現・機能解析を行った。本研究の結果、これら 3 つの分子が単独または協調して、マラリア原虫ガメトサイト形成過程の遺伝子発現を制御していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We identified two transcription factors AP2-G1 and AP2-G2 that regulate sexual development of Plasmodium gametocyte. In addition, we identified a male specific chromatin remodeling complex SWI/SNF subunit that is involved in male gametocyte development. We performed ChIP-seq of these 3 factors and identified their target genes. We analyzed the expression and function of these genes. Our study indicated that these transcription factors and a SWI/SNF subunit regulate gene expression independently or cooperatively during gametocyte development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：マラリア原虫

1. 研究開始当初の背景

マラリア原虫雌雄成熟ガメトサイト（生殖母体）は、ヒトから媒介蚊への伝播を担う唯一

のステージであり、その成熟過程で発現されるタンパク質は薬剤開発や伝播阻止戦略の重要な標的である。しかしながら血液中でマラリア原虫ガメトサイトが如何にして感染

性の雌雄ガメトサイトへと成熟していくのか、その機構はこれまで全くわかっていなかった。申請者はネズミマラリア原虫 *Plasmodium berghei* ガメトサイトにおいて、AP2 family 転写因子である AP2-G1 (APETALA2 in gametocyte 1) および AP2-G2 (APETALA2 in gametocyte 2) がこの成熟過程を制御していることを見出した。すなわち AP2-G1 は雌雄ガメトサイトの遺伝子群を、AP2-G2 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成熟させている。さらに雄ガメトサイトにおいても、雄特異的なクロマチンリモデリング複合体 SWI/SNF (mating-type swiching / sucrose non-fermenting) complex の subunit が成熟制御に関与していることを見出した。

2. 研究の目的

本研究ではこれらの成果をもとに、1. 雌雄ガメトサイト成熟過程の遺伝子制御機構の全体像を解明すること、2. これら転写因子の全標的遺伝子をゲノムワイドに解析し、ガメトサイトの成熟阻止および伝播阻止戦略のための候補分子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

ChIP-seq 法による転写因子 AP2-G1 および AP2-G2 の全標的遺伝子の同定

hydrazine 処理により貧血にしたマウスに各転写因子の GFP 融合タンパク質発現原虫を感染させる。次いで sulfadiazine 処理を行い asexual stage の原虫を除去し、感染血液中のガメトサイトを濃縮する。この感染血液をパラホルムアルデヒドで固定し超音波処理を行う。これを抗 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)。次いで得られたゲノム DNA 断片の末端配列を次世代高速シーケンサーで解析する (sequencing)。この配列をゲノム上にマッピングしてピークを算出し標的遺伝子を同定する。さらにピーク周辺の DNA 配列のコンピューター解析により各転写因子の cis 配列を予測する。

yeast two-hybrid 法による SWI/SNF subunit をリクルートする転写因子 X の同定

Bait タンパク質は Gal4 DNA 結合ドメイン融合 SWI/SNF subunit を用いる。prey タンパク質は、上記方法でガメトサイトを濃縮した原虫からすでに作製済みの Gal4 活性化ドメイン融合タンパク質ライブラリーを用いる。

本解析により転写因子 X が同定できない場合、転写因子 X が AP2 family であることを想定し、並行して他の AP2 family 遺伝子の機能・発現解析を進める。また本 subunit が、SWI/SNF complex 中で他の subunit を介して転写因子と相互作用する可能性も考えられる。その場合得られた subunit を用いてさらに yeast two-hybrid 法を行うことで転写因子 X を同定する。

転写因子 X を同定後は GFP 融合 X 発現原虫を作製し、上記と同様に ChIP-seq 法を行い全標的遺伝子の同定および cis 配列の予測を行う。

ゲルシフトアッセイによる各転写因子結合配列の同定

前述で予測した cis 配列を含む標的遺伝子上流域配列を用いてゲルシフトアッセイを行う。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 cis 配列に point 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解析するために、合成オリゴマーを用い各塩基に mutation を加え結合への影響を解析する。

レポーターアッセイによる各転写因子結合配列の cis-acting element としての証明

マラリア原虫人工染色体を用いてレポーターアッセイを行い、ゲルシフトアッセイ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。プロモーターにはゲルシフトアッセイ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、レポーターには GFP または luciferase 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証明する。

FRET イメージングによる各因子間の相互作用の解析

AP2-G2 の標的遺伝子上流域に AP2-G2 および AP2-G1 の両 cis 配列が、転写因子 X の標的遺伝子上流域に転写因子 X および AP2-G1 の両 cis 配列が存在することを確認する。確認後、考案したモデル通り各転写因子がダイマーを形成していることを FRET イメージングにより解析する。「AP2-G1・AP2-G2」間 FRET 解析の場合、pyrimethamine 耐性 hDHFR 遺伝子を選択マーカーとした CFP 融合 AP2-G1 発現コンストラクトおよび sulfadiazine 耐性 DHPS 遺伝子を選択マーカーとした YFP 融合 AP2-G2 発現コンストラクトを野生型マラリア原虫にコトランスフェクションする。なお

これら薬剤選択マーカーを有する発現コンストラクトはすでに作製し、コトランスフェクション可能であることを確認済みである。次いでこの原虫の感染血液を *in vitro* culture して原虫ステージを同調させる。この原虫を FRET イメージングシステム下で経時的に観察し、各転写因子が成熟過程のどの段階で発現し相互作用するのかについて解析する。

遺伝子欠損原虫および GFP 融合タンパク質発現原虫を用いた標的遺伝子の機能・発現解析
 上記で同定した各転写因子の標的遺伝子について遺伝子欠損原虫を作製し表現型を解析する。PCR 法をベースとした high throughput なコンストラクト作製法を用いる。ガメトサイトの機能・成熟に影響の認められた遺伝子に関して、GFP 融合タンパク質発現原虫を作製し発現時期・局在を特定する。

4. 研究成果

マラリア原虫ガメトサイトにおいて成熟過程を制御する 2 種類の転写因子 AP2-G1 および AP2-G2 を同定した。さらに雄ガメトサイト特異的なクロマチンリモデリング複合体 SWI/SNF complex の subunit が成熟制御に関与していることを見出した。これらの 3 分子の ChIP-seq を行い各分子の全標的遺伝子を同定した。

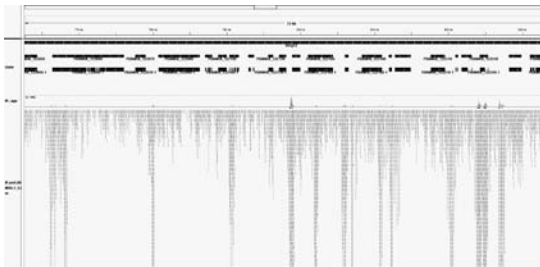


図 1 *Plasmodium berghei* 12 番染色体上の一領域に検出された peak の一例

同定した標的遺伝子についてガメトサイト期における発現・機能解析を行った。AP2-G1 および AP2-G2 について、ChIP-seq 法で同定した各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、各転写因子の cis-acting element の候補配列を同定した。

それら候補配列について、ゲルシフトアッセイ (EMSA) および人工染色体を用いたレポーターアッセイを行い、各転写因子のシス配

列であることの証明を行った。

現在は、各転写因子の標的遺伝子の発現・機能解析を進めガメトサイト形成に果たす役割の解明を行っている。さらに、AP2-G1、AP2-G2 および SWI/SNF complex subunit のガメトサイト形成における相互作用の解析を進めている。

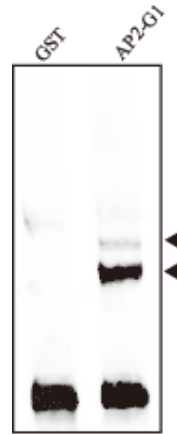


図 2 AP2-G1 の EMSA 結果の一例

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 3 件)

① Iwanaga S, Kaneko I, Kato T, Yuda M., Identification of an AP2-family protein that is critical for malaria liver stage development. PLoS One. 2012;7(11) 査読有

② Iwanaga S, Kato T, Kaneko I, Yuda M., Centromere plasmid: a new genetic tool for the study of Plasmodium falciparum. PLoS One. 2012;7(3) 査読有

③ Iwanaga S, Kaneko I, Yuda M., A high-coverage artificial chromosome library for the genome-wide screening of drug-resistance genes in malaria parasites. Genome Res. 2012 ;22(5):985-92. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

① 第 82 回日本寄生虫学会大会
金子伊澄、加藤知美、岩永史朗、油田正夫
 マラリア原虫転写因子 AP2-O のオーキネート形成に果たす役割
 2013 年 3 月 29 日～31 日、東京医科歯科大学

②第 81 回日本寄生虫学会大会
金子伊澄、岩永史朗、加藤知美、油田正夫
マラリア原虫肝臓ステージの遺伝子発現を
制御する転写因子の研究
2012 年 3 月 23 日～24 日、兵庫医科大学

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