

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460515

研究課題名(和文) アピコンプレクサ類原虫侵入ステージ形成の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular basis of invasive stages formation in Apicomplexan parasites

研究代表者

金子 伊澄 (Kaneko, Izumi)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20515720

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：マラリア原虫オオキネート期のマスター転写因子AP2-0 が直接制御する500以上の標的遺伝子を同定した。その中のアピコンプレクサ類特有の遺伝子群について、GFP発現原虫を作製し目的タンパク質の細胞内局在・発現動態を解析すると共に遺伝子欠損原虫を作製しその機能を解析した。その結果、複数のオオキネート形態形成に關与する新規タンパク質の同定に成功した。加えてマイクロネームタンパク質等侵入ステージ形成に必須の複数の遺伝子を同定した。本研究の成果は同類原虫侵入ステージ形成の共通基盤の解明に繋がると共に、抗原虫薬開発の新たな候補分子情報を提供し感染阻止戦略へ多大な貢献をもたらすものである。

研究成果の概要(英文)：AP2-0 is an AP2 family transcription factor that is expressed in the mosquito midgut-invading stage, called the ookinete, and is essential for normal morphogenesis of this stage. In this study, we identified the genome-wide target genes of AP2-0 by chromatin immunoprecipitation-sequencing and elucidate how this AP2 family transcription factor contributes to the formation of this motile stage. The analysis revealed that AP2-0 binds specifically to the upstream genomic regions of more than 500 genes, suggesting that approximately 10% of the parasite genome is directly regulated by AP2-0. These genes are involved in distinct biological processes such as morphogenesis, locomotion, midgut penetration, protection against mosquito immunity and preparation for subsequent oocyst development.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア

## 1. 研究開始当初の背景

マラリア原虫はオオキネート、スポロゾイト、メロゾイトの3つの宿主侵入ステージを有し、それぞれ蚊中腸、肝臓、赤血球に侵入する。侵入ステージの原虫は標的細胞へ感染するために短時間のうちに複雑な細胞内構造を形成する。この構造はアピカルコンプレクスと呼ばれ、アピコンプレクサ類侵入ステージ原虫特有の細胞内構造である。アピカルコンプレクスは細胞膜下に存在する microtubular cytoskeleton, inner membrane complex (IMC) や分泌器官であるマイクロネームなどから形成されている。この形成過程にはアピコンプレクサ類原虫間で共通した分子群が関与すると考えられる。しかしながらその大部分は他の生物との相同性を持たないために、侵入ステージ形成に関与する遺伝子群の同定はこれまでほとんど進んでいなかった。

一方、申請者らはネズミマラリア原虫 *Plasmodium berghei* を用いたこれまでの研究で、マラリア原虫オオキネートにおいて、蚊中腸侵入に関わる遺伝子群の発現がマスター転写因子 AP2-0 によって制御されていることを発見した (Kaneko, 2008; Yuda, 2009)。さらに AP2-0 の標的遺伝子を ChIP-seq (chromatin immunoprecipitation and sequencing) 法によりゲノムワイドに解析し、AP2-0 が直接制御する 500 を超えるオオキネート期特異的遺伝子を同定した。それら遺伝子の構造解析を行ったところ、その中には細胞骨格タンパク質、分泌型マイクロネームタンパク質、細胞表面タンパク質、モータータンパク質をコードする遺伝子などが含まれていることがわかった。

## 2. 研究の目的

AP2-0 が直接制御する 500 以上の標的遺伝子を同定し解析を進めた結果、これら遺伝子

群が侵入ステージ形態形成に深く関与しているという知見を得た。本研究はこれらの成果をもとにマラリア原虫オオキネートをモデルとしアピコンプレクサ類原虫に共通した侵入ステージ形成の分子基盤を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

AP2-0 標的遺伝子群に含まれるアピコンプレクサ類原虫特有の遺伝子について、マラリア原虫人工染色体を用いた細胞内局在・発現動態解析を行った。さらに GFP 発現原虫を用いた免疫電子顕微鏡解析を行い、目的タンパク質の詳細な局在を解析した。オオキネートでの局在が同定された分子について、遺伝子欠損原虫を作製し表現型解析を行うことで侵入ステージ形成のメカニズム解明を試みた。

## 4. 研究成果

AP2-0 の ChIP-seq を再度行いこれまでにを行った ChIP-seq 結果と比較し再現性の確認を行った。その結果図 1 に示すように 2 回の ChIP-seq でピーク位置・大きさ共に一致し高い再現性が確認された。(図 1)

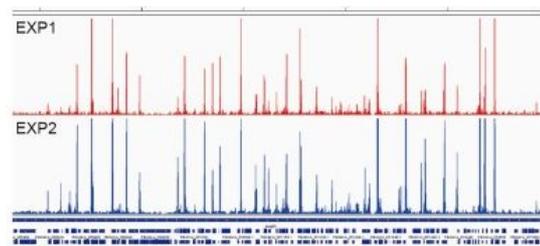


図 1. 2 回の ChIP-seq 結果の比較

ChIP-seq の結果、*Plasmodium berghei* 全遺伝子の約 10% にあたる 541 個の標的遺伝子を同定した。これら遺伝子はタンパク質の機能に基づき分類を行った。(図 2)

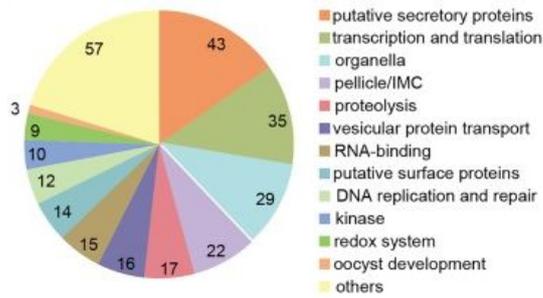


図 2. AP2-0 標的遺伝子の機能分類 (hypothetical protein を除く 282 遺伝子)

標的遺伝子の機能分類の結果、AP2-0 はアピコンプレクサ類侵入ステージ原虫の持つ特有の構造ペリクルおよび glideosome のコンポーネントをコードする遺伝子群のほとんど全ての発現を制御していることがわかった (図 3)。

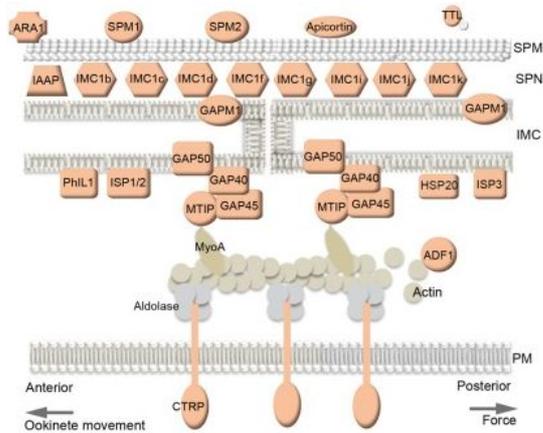


図 3. ペリクル構造およびその内側に存在する滑走運動に関わるモータータンパク質の複合体 glideosome AP2-0 の標的遺伝子はオレンジ色で示す。

AP2-0 標的遺伝子群に含まれるアピコンプレクサ類原虫特有の遺伝子群の解析により、侵入ステージ原虫特有の構造形成に関与する多数の新規タンパク質を同定した。そのうちの 1 つ PUA26 (protein unique to apicomplexan parasites) は、96 アミノ酸をコードし、この遺伝子の ortholog は *T. gondii* や *Neospora caninum* 等のアピコンプレクサ類原虫にのみ存在していた。

GFP-tagged PUA26 の解析から PUA26 は原虫の先端部分を除くオオキネート表面に局在することがわかった (図 4)。

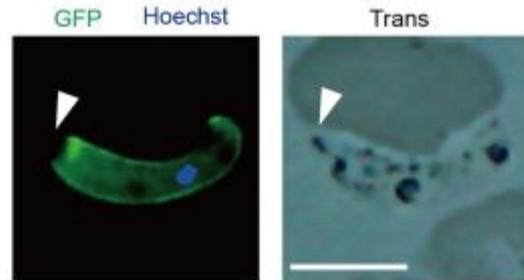


図 4. GFP-tagged PUA26 発現原虫を用いた発現解析の結果 (接合 24 時間後のオオキネート) Scale bar, 10 μm

PUA26 の詳細な局在を解析する為に、GFP 融合 PUA26 発現原虫および抗 GFP 抗体を用いた免疫電子顕微鏡解析を行った。その結果、PUA26 は原虫表面の IMC (inner membrane complex) に局在していることがわかった (図 5)。

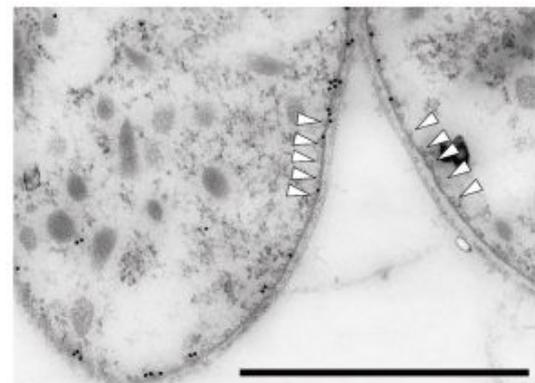


図 5. GFP-tagged PUA26 発現原虫の接合 24 時間後のオオキネート Scale bar, 1 μm

これらの結果から、PUA26 を IAP (IMC associated apicomplexan protein) と名付けた。

IAP 欠損原虫を作製し機能解析を行ったところ、IAP 欠損原虫のオオキネートは形態的に異常なオオキネートを形成し、蚊中腸への

侵入は 1/4 以下に減少した ( 図 6 および 7 )。

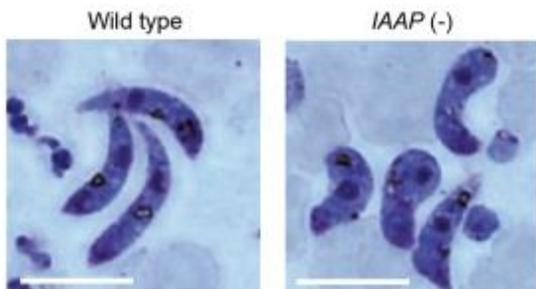


図 6. 接合 24 時間後の野生型および IAAP 欠損原虫のオオキネート Scale bar, 10 μm

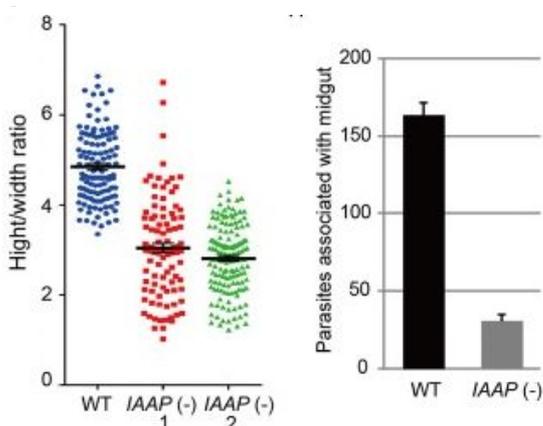


図 7. ( 左 ) 上記オオキネートの縦 - 横比 ( 右 ) 蚊の吸血 24 時間後の蚊中腸に侵入した原虫数の比較

このように AP2-0 標的遺伝子群に含まれるアピコンプレクサ類原虫特有の遺伝子群の解析により、PUA26 をはじめ、侵入ステージ原虫特有の構造形成に関与する多数の新規タンパク質を同定した。

それに加え、オオキネート期の RNA-seq を行い、その結果と ChIP-seq の結果との比較を行ったところ、第 14 番染色体の下記に示す一領域に新規のタンパク質をコードする遺伝子を発見した ( 図 8 )。

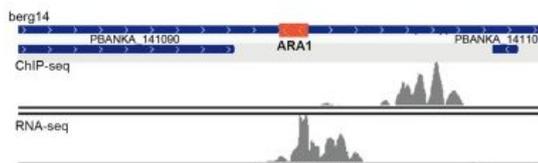


図 8. AP2-0 ChIP-seq ( 上段 ) とオオキネート期の RNA-seq ( 下段 ) 結果の比較とマラリア原虫ゲノム中に新規に同定された遺伝子 ARA1

この遺伝子は 63 アミノ酸の非常に小さいタンパク質をコードしていた。本タンパク質の局在を解析する為に、GFP 融合タンパク質発現原虫を作製し、蛍光顕微鏡観察および電子顕微鏡観察を行った ( 図 9 および 10 )。その結果、このタンパク質はオオキネート先端部分に存在するアピカルリングに局在することがわかった。アピカルリングに局在するタンパク質は、Plasmodium で初めての発見であり、この発現様式から本新規タンパク質を ARA1 ( Apical Ring Associated protein 1 ) と名付けた。

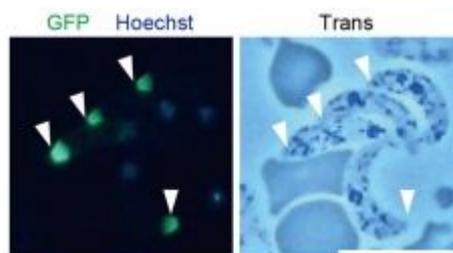


図 9. GFP 融合 ARA1 発現原虫 ( 接合 24 時間後のオオキネート ) の蛍光顕微鏡観察結果 Scale bar, 10 μm

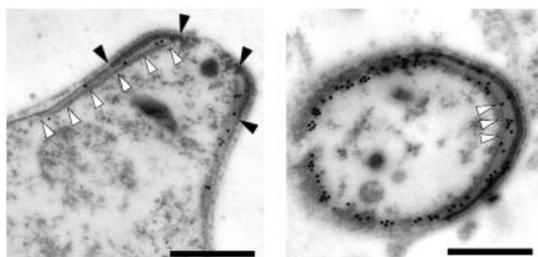


図 10. GFP 融合 ARA1 発現原虫および抗 GFP 抗体を用いた免疫電子顕微鏡解析結果 ( 接合 24 時間後のオオキネート ) Scale bar, 0.5 μm

以上のように、本研究により AP2-0 標的遺伝子群に含まれる複数のアピコンプレクサ類原虫特有の遺伝子について、マラリア原虫人工染色体を用いてオオキネート期における局在・発現動態を明らかにした。さらに免疫電子顕微鏡解析を行い目的タンパク質の詳細な局在を同定した。また遺伝子欠損原虫を作製し表現型解析を行うことで、それら遺伝子のオオキネート形態形成に果たす役割を同定した。

本研究は ChIP-seq 法を用い転写因子とその全標的遺伝子を手がかりとして侵入ステージ形成に必須の分子群の同定が可能であることを証明した。

## 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4件)

1. Yuda M, Iwanaga S, Kaneko I, Kato T. Global transcriptional repression: An initial and essential step for Plasmodium sexual development. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Oct 13; 112(41):12824-9. doi: 10.1073/pnas.1504389112. 査読有

2. Kaneko I, Iwanaga S, Kato T, Kobayashi I, Yuda M. Genome-Wide Identification of the Target Genes of AP2-0, a Plasmodium AP2-Family Transcription Factor. PLoS Pathog. 2015 May 27;11(5):e1004905. doi: 10.1371/journal.ppat.1004905. 査読有

3. Niikura M, Inoue S, Mineo S, Yamada Y, Kaneko I, Iwanaga S, Yuda M, Kobayashi F. Experimental cerebral malaria is suppressed by disruption of nucleoside

transporter 1 but not purine nucleoside phosphorylase. Biochem Biophys Res Commun. 2013 Mar 15; 432(3):504-8. doi: 10.1016/j.bbrc. 査読有

[学会発表](計2件)

1. 日本寄生虫学会, 2016/3/19-2016/3/20, 宮崎市民プラザ(宮崎県・宮崎市) 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スポロゾイト期の転写因子 AP2-Sp の全標的遺伝子の同定

2. INTERNATIONAL CONGRESS OF PARASITROGY, 2014/8/10-2014/8/15, MEXICO CITY (MEXICO), Izumi Kaneko, Shiroh Iwanaga, Tomomi Kato, Masao Yuda Genome-wide investigation of taegat genes of a Plasmodium AP2 family transcription factor AP2-0

[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.medic.mie-u.ac.jp/idoubutsu/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

金子伊澄 (KANEKO Izumi)

三重大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 20515720

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし