

## 次世代シーケンサー解析とゲノム編集によるマラリア原虫の赤血球侵入機構の解明

新澤直明

東京医科歯科大学大学院 歯学総合研究科 国際環境寄生虫病学分野

### 【研究の背景】

マラリアは年間約2億人の罹患者と約40万人の死者を出す世界三大感染症の一つである。その原因病原体であるマラリア原虫はヒト赤血球に侵入し、無性的に増殖後に脱出し、再び赤血球への侵入を繰り返す。赤血球感染型ステージであるメロゾイトによる侵入機構は、感染赤血球からの脱出、新しい赤血球への接着、先端部の方向転換、寄生胞を伴った侵入、侵入後のステージ転換など複数のステップからなる。ここに関わる代表的な分子は、先端部小器官ロプトリーや分泌小胞(マイクロネーム・エクソネーム・デンスグラニュール)に局在するタンパク質群や滑走運動に関わるグライデオソームタンパク質群であるが、それらの知見だけでは、メロゾイトの赤血球侵入機構の全貌は明らかとなっていない。

### 【目的】

赤血球侵入機構の全貌解明には、新しい解析手法による新規侵入関連因子の同定が必要である。一方、我々は、マラリア原虫のAP2ファミリー転写因子を世界に先駆け発見し、クロマチン免疫沈降と次世代シーケンサーを組み合わせたChIP-seqによる転写因子標的遺伝子解析によって、1個のステージ特異的マスター転写因子が生育ステージ全体の遺伝子発現パターンを決定するというマラリア原虫ステージ形成の基本原則を明らかとしてきた。本研究では、メロゾイトのマスター転写因子の標的遺伝子解析によって、新規の赤血球侵入関連因子の同定を行い、それらの機能解析を経て、メロゾイトの赤血球侵入機構の全貌解明を目指した研究を展開した。

### 【方法】

トランスクリプトームデータベースからメロゾイト形成期(シズント期)に発現するAP2を7遺伝子同定し、独自開発したマラリア原虫のゲノム編集法<sup>1)</sup>を用いて、そのうち5つのGFP融合遺伝子発現株を作出した。それらのGFP観察を行い、発現時期を特定した。次に、5つのGFP融合AP2発現株の中からメロゾイト形成前とメロゾイト形成時に発現するAP2-M2とAP2-M4に関してChIP-seq解析を行い、標的遺伝子群と結合モチーフを同定した。さらに、標的遺伝子の上流配列を用いたレポーターアッセイにより、標的遺伝子転写における結合モチーフの役割を解析した。

### 【結果】

5つのGFP融合AP2発現株の蛍光観察を行った結果、これらのAP2がシズント期で順番に発現していくことが明らかになった。この中からメロゾイト形成前とメロゾイト形成時に発現するAP2-M2とAP2-M4に関してChIP-seq解析を行った。AP2-M2とAP2-M4のゲノムDNA結合パターンは近似しており、多くの標的遺伝子に重複があった。ロプトリーやグライデオソームの遺伝子群はAP2-M2とAP2-M4の双方が標的とし、分泌小胞であるマイクロネーム・エクソネーム・デンスグラニュールの遺伝子はAP2-M4のみが標的とした。一方で、AP2-M2とAP2-M4の標的遺伝子数はそれぞれ263、460が同定された(図1)。その中には、ロプトリーやマイクロネーム遺伝子で構成される56の既知の侵入関連因子の他、合計で141の機能未知遺伝子が存在した(図2)。続いて、結合モチーフ解析を行った結果、両転写

因子はどちらも TGCA をコア配列とした結合モチーフを持ち、標的遺伝子に多くの重複があることを支持した。さらに、標的遺伝子の上流配列を用いた mCherry レポーターアッセイにより、メロゾイト形成期 AP2 と結合モチーフの結合は下流遺伝子の転写を活性化することが明らかになった。

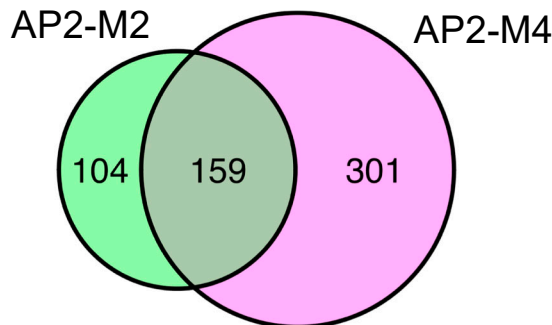


図 1: AP2-M2 と AP2-M4 の標的遺伝子数

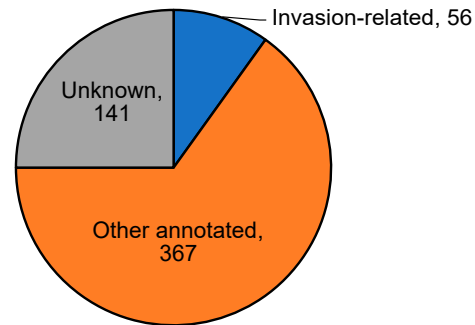


図 2: AP2-M2 と AP2-M4 の全標的遺伝子の内訳

### 【考 察】

本研究では、メロゾイト形成時に発現する転写因子を複数発見し、これらが時期を変えながら順番に発現していくことを明らかにした。それらの標的遺伝子解析の結果、複数の転写因子がお互いに標的を重複させながら、メロゾイト形成に必要な遺伝子の段階的な転写制御を行うことが示唆された。この段階的な標的遺伝子の変化から、ロプトリーやグライデオソームの形態形成が先に行われ、メロゾイトの形態がある程度完成してから分泌小胞が出現するというメロゾイトの形成原理が予想された。一方で、標的遺伝子の中には多くの機能未知遺伝子が得られ、これらの中には、新規の侵入関連因子が含まれていることが期待される。今後は、他のメロゾイト形成期 AP2 の標的遺伝子解析やコンディショナルノックダウン法による機能未知遺伝子の機能解析を行い、メロゾイト形成から赤血球侵入過程の包括的な理解を目指す。

### 【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究で同定した機能未知標的遺伝子には、新規の侵入関連因子が含まれていることが予想される。これらの新規侵入関連遺伝子はワクチン標的分子の候補となりうる。また侵入過程のシグナル伝達に関与する分子は抗マラリア薬の標的候補として新規薬剤開発に繋がる可能性を持つ。

また、メロゾイト形成期 AP2 転写因子の結合モチーフは共通したコア配列を持っていたことから、この結合モチーフを利用したデコイ核酸はメロゾイト形成期の転写を特異的に阻害できる可能性が高く、核酸医薬によるマラリア治療法開発にも発展する可能性を持つ。

### 【参考・引用文献】

1. Nishi T, Shinzawa N, Yuda M, Iwanaga S. Highly efficient CRISPR/Cas9 system in *Plasmodium falciparum* using Cas9-expressing parasites and a linear donor template. **Scientific Reports** 2021, 11(1):18501