

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 大学院医歯学総合研究科 寄生虫学・熱帯医学分野

【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理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。継続助成となる本年度は、昨年度までの解析で同定した赤血球侵入関連因子の機能解析に向けたコンディショナルノックダウン法の開発を行った。

【方法】

熱帯熱マラリア原虫におけるコンディショナルノックダウンの方法として報告されたTetR-DOZI aptamer システムは、無水テトラサイクリン(aTc)依存的なTetRとRNA aptamerの相互作用とDDX6 RNAヘリカーゼであるDOZIが関与する翻訳抑制機構を組み合わせたコンディショナルノックダウン法である¹⁾。TetRとDOZIの融合タンパク質TetR::DOZIはRNA aptamerを持つ標的mRNAに結合する。結合したmRNAはDOZIが構成する翻訳抑制複合体に運ばれ、翻訳抑制機構によりタンパク質発現が抑制される。aTc存在下では、TetR::DOZIはRNA aptamerに結合できず、タンパク質が発現する。そこで、ゲノム編集を用いてTetR::DOZIの恒常発現カセットを熱帯熱マラリア原虫のゲノム中に組み込んだ組換え株(3D7[TD])を作出した。3D7[TD]を親株として、蛍光レポーターによるタンパク質発現ON/OFFの検証を行った。さらに、侵入関連因子であるロプトリータンパク質についてコンディショナルノックダウンを適用し、赤血球侵入時の機能解析を行った。

【結果】

TetR::DOZIをPfhsp90プロモーター下に発現するカセットを3D7株に導入し、TetR::DOZI恒常発現株3D7[TD]の作出に成功した。導入箇所はゲノム中の特定の遺伝子間領域(未発表のため、詳細は非記載)とした。この遺伝子間領域は、マラリア原虫の生活環に影響を及ぼさないことを確認している。TetR::DOZI恒常発現は3D7[TD]の増殖速度に影響を示さな

かった。続いて、蛍光レポーターによるコンディショナル発現制御の検証を行うために、GFP の高輝度誘導体である mGreenLantern (mGL) を恒常的に発現する発現カセットを導入した。mGL による蛍光は 3'UTR に挿入されたアプタマー配列依存的に抑制された。さらに aTc 添加には mGL の蛍光が検出された。つまり、TetR::DOZI はアプタマー配列が付加された mRNA の翻訳を選択的に抑制し、aTc と TetR の結合により mRNA の翻訳抑制が解除されることが確認された。続いて、aTc 添加時の蛍光は薬剤除去後赤血球 1 サイクル以内に消失した。この結果は一つ前の赤血球サイクルで薬剤を除去すれば、次の赤血球サイクルでタンパク質発現が十分に抑制されることを意味し、この手法によって効率的なコンディショナルノックダウンが可能であることが明らかになった。

続いて、3D7[TD]を用いて、侵入関連因子であるロプトリータンパク質のコンディショナルノックダウンを試みた。前年度のメロゾイト形成期転写因子の標的遺伝子解析から得られたロプトリータンパク質をコードする遺伝子(未発表のため RhopX とする)の 3'UTR に aptamer 配列を導入した株(3D7[TD]/RhopX-apt)を作成した(図 1A)。3D7[TD]/RhopX-apt は aTc 存在下で、正常な増殖を示した。一方で、メロゾイト形成期であるシズント期の約 24 時間前に aTc を除去すると、シズント期での RhopX タンパク質の発現は著しく低下した(図 1B)。この結果は aTc 除去による内在性タンパク質の発現抑制に成功したことを示している。さらに、RhopX 発現減弱原虫において、メロゾイトによる赤血球侵入は完全に阻害された(図 1C)。以上の結果から、RhopX はメロゾイトの赤血球侵入に必須のタンパク質であることが明らかになった。

【考 察】

本研究では、TetR-DOZI aptamer システムを改良し、より利便性の高いコンディショナルノックダウン系を確立した。TetR::DOZI 恒常発現株を親株とすることで、標的遺伝子の 3'UTR へ aptamer 配列を導入するだけでコンディショナルノックダウンが可能となる。このことはゲノム編集に使用するドナーDNA 作成を簡便化する。また、従来法と比較して、薬剤耐性遺伝子のゲノム導入を伴わないため、aptamer 配列を複数遺伝子に適用することで、複数遺伝子の同時ノックダウンも可能となる。さらに、蛍光レポーターの例のように、外来遺伝子の薬剤誘導性強制発現も可能であることから、新たな遺伝学的手法の開発も期待される。

一方で、前年度に行ったメロゾイト形成期転写因子の標的遺伝子解析では、多数の未知遺伝子が含まれていた。今回開発した改良型 TetR-aptamer システムを用いることで、これらの未知遺伝子の赤血球侵入における機能解析が可能となった。今後は、コンディショナルノックダウン系を利用した新規メロゾイト侵入因子の同定を進めていきたいと考えている。

【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をコンディショナルノックダウン系で解析していくことで、新規の侵入関連因子を同定することが可能である。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alaria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。

【参考・引用文献】

- Ganesan SM, Falla A, Goldfless SJ, Nasamu AS, Niles JC. Synthetic RNA-protein modules integrated with native translation mechanisms to control gene expression in malaria parasites. *Nat. Commun.* 2016 Mar 1;7:10727. doi: 10.1038/ncomms10727.

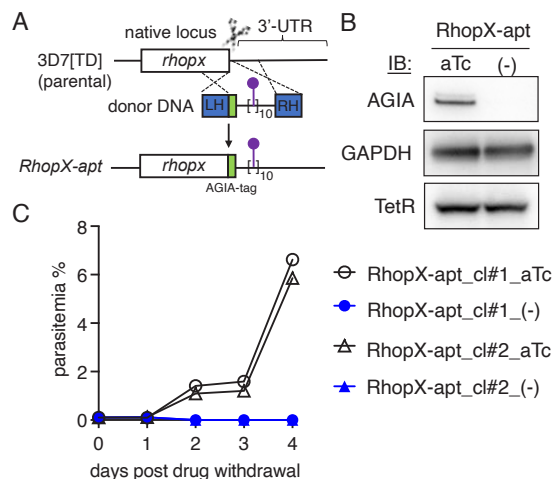


図 1. RhopX のコンディショナルノックダウン解析 (A) RhopX-apt 作成の概略図。(B) Western blotting による薬剤除去によるノックダウンの確認。(C) RhopX ノックダウンによるマalaria原虫増殖への影響