

氏名(本(国)籍)	菅 沼 啓 輔 (北海道)
主指導教員名	帯広畜産大学 教授 河 津 信一郎
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	獣医博甲第406号
学位授与年月日	平成26年3月13日
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	帯広畜産大学
学位論文題目	Studies on the Expression Regulation Mechanisms of Epimastigote Stage Specific Genes in African Trypanosome (アフリカトリパノソーマエピマスティゴート型虫体特異的発現遺伝子の発現調節機構に関する研究)
審査委員	主査 帯広畜産大学 教授 鈴木 宏 志 副査 帯広畜産大学 教授 河 津 信一郎 副査 岩 手 大 学 教 授 板 垣 匡 副査 東京農工大学 教授 竹 原 一 明 副査 岐 阜 大 学 准教授 高 島 康 弘

学位論文の内容の要旨

アフリカトリパノソーマを含むキネトプラスト綱原虫の遺伝子発現は主に転写後調節によって制御されている。これまでの研究からキネトプラスト綱原虫では遺伝子の発現時期特異性が3'側非翻訳領域(3'UTR)に存在する発現調節配列(*cis*-element)と、そこに結合するRNA結合蛋白質(RBPs)によって調節されていることが明らかとなっている。しかし、先行研究では培養が容易な血流型虫体およびプロサイクリック型虫体を用いており、他のツェツェバエ体内発育ステージ、即ちメタサイクリック型虫体(MCF)やエピマスティゴート型虫体(EMF)特異的発現遺伝子の発現調節機構に関する知見はない。これらベクター体内発育ステージのうち、特にEMFは哺乳類感染型のMCFに分化する直前の発育ステージであり、ベクター体内発育ステージを標的とした新規制御法の開発において重要であると考えられている。そこで本研究は、*Trypanosoma congolense* IL3000株において、EMF特異的発現遺伝子である *congolense* epimastigote specific protein gene (*cesp*) mRNAをモデルとして、その発現時期調節が上述の3'UTRを介した調節機構によって制御されているか否かについて解析することを手掛かりとして、EMF特異的発現を司る *cis*-element、および同領域に結合するRBPsを同定し、EMF特異的遺伝子の発現調節機構を明らかにすることを目的とした。

第一章では *cesp* のEMF特異的発現が他の発育ステージを用いた先行研究で明らかとなった遺伝子発現調節機構と同様に3'UTRによって制御されているか否かについて解析した。*cesp* および *actin* 由来の5'および3'UTR配列と緑色蛍光タンパク質遺伝子(enhanced green fluorescence protein gene: *egfp*)配列を組合せて *egfp* 発現カセットを作製し、トリパ

ノソーマゲノムの α -および β -*tubulin* タンデムリピート領域に挿入して全発育ステージにおける eGFP 蛍光強度および *egfp* mRNA 発現量を比較解析した結果、*egfp* の下流に *cesp* 3'UTR を配置した場合でのみ EMF 特異的な *egfp* mRNA の発現上昇が認められた。以上より、*cesp* の EMF 特異的発現は他の発育ステージ特異的遺伝子と同様に 3'UTR 内に存在する *cis*-element によって調節されていることが明らかとなった。

第二章では *cesp* 3'UTR 内の *cis*-element 配列を同定し、同 *cis*-element RNA に結合する RBPs の検出を行った。*cesp* 3'UTR の塩基配列から RNA 二次構造を予測し、ステムループ構造等の特徴を元に Front, Loop 1, Loop 2, ARE-M に区分した。次いで、これらの領域を *cesp* 3'UTR から欠損、もしくは *actin* 3'UTR に挿入したハイブリッド 3'UTR を作製して *egfp* の下流に配置した発現カセットを作製した。これらの *egfp* 発現カセットをトリパノソーマゲノムの α -および β -*tubulin* タンデムリピート領域に挿入して全発育ステージにおける eGFP 蛍光強度、*egfp* mRNA 発現量および *egfp* mRNA 安定性を比較解析した結果、配列中に A および U を多く含む ARE-M が EMF 特異的遺伝子発現を制御する *cis*-element 配列であることが明らかとなった。次いで、ARE-M と RBPs の相互作用を RNA electro mobility shift assay (REMSA) で解析した結果、ARE-M には各発育ステージ特異的な RBPs が結合し、複合体を形成していることが明らかとなった。以上より、ARE-M が *cesp* の EMF 特異的発現を制御する *cis*-element であることが明らかとなり、さらに ARE-M と発育ステージ特異的 RBPs とによって形成される RNA-RBPs 複合体によって *cesp* mRNA が EMF 特異的に安定化し、他の発育ステージでは不安定化していることが示唆された。

第三章では ARE-M と相互作用する RBPs の同定を試みた。ARE-M 配列は A と U に富んでいたことから、先行研究で明らかとなっている RBPs の一種、uridine binding protein 1 (UBP1) に着目し、本研究で使用した *T. congolense* における UBP1 オルソログ (TcUBP1) の発現プロファイルを解析した。その結果、TcUBP1 は全発育ステージで恒常的に発現していることが明らかとなった。加えて、rTcUBP1 と ARE-M RNA との相互作用を REMSA で解析した結果、rTcUBP1 が ARE-M RNA に配列特異的に結合し、複合体を形成することが明らかとなった。次に、TcUBP1 と他のトリパノソーマ細胞質タンパク質との相互作用を共免疫沈降法で解析した結果、各発育ステージで異なるタンパク質が TcUBP1 と特異的に相互作用して複合体を形成することが明らかとなった。以上より、TcUBP1 は ARE-M RNA と特異的に相互作用する RBPs の一種であるが、*cesp* の EMF 特異的発現調節には TcUBP1 と他のタンパク質群との相互作用が必須であることが明らかとなった。

本研究により、アフリカトリパノソーマ EMF 特異的発現遺伝子である *cesp* の発現調節機構の一端が明らかとなった。今後、TcUBP1 と相互作用するタンパク質群とその機能を明らかにしていくことで EMF 特異的遺伝子の発現調節機構のみならず、アフリカトリパノソーマの発育ステージ変換に関わる分子制御機構が明らかになると期待される。

審査結果の要旨

アフリカトリパノソーマは宿主哺乳類血流中および媒介昆虫であるツェツェバエ消化管内の環境に適応するために発育ステージ変換を行う。発育ステージ変換には遺伝子群の発現制御が必須である。トリパノソーマの遺伝子発現調節機構で現在までに明らかとなったことは、mRNA の 3' 側非翻訳領域 (3' UTR) に存在する発現調節配列 (*cis*-element RNA) と、そこに結合する RNA 結合タンパク質群 (RBPs) が形成する複合体によって mRNA の安定性が発育ステージに応じて変化し、翻訳または分解が決定づけられるという事である。この知見は *in vitro* 培養が容易な血流型およびプロサイクリック型発育ステージのトリパノ

ソーマを用いて明らかとなったが、哺乳動物への感染源であるメタサイクリック型 (MCF) や、MCF へ分化する直前の発育ステージであるエピマスティゴート型 (EMF) での遺伝子発現調節機構は全く不明であった。トリパノソーマの発育ステージ中で唯一、接着依存性に分裂増殖する EMF は、未だ有効な予防法および治療薬がないアフリカトリパノソーマに対する新規制御法の標的として注目されている。そこで本研究では、全発育ステージの *in vitro* 培養系が確立されている *Trypanosoma congolense* IL3000 株を用いて、これまで全く知られていない EMF 特異的発現遺伝子の発現調節機構を解明することを目的とした。

第一章では EMF 特異的発現遺伝子 *congolense* epimastigote specific protein gene (*cesp*) の発現時期が *cesp* 3' UTR 内の *cis*-element 配列によって制御されていることを明らかにした。第二章では *cis*-element 配列の同定に加え、*cis*-element RNA に結合する RNA binding proteins (RBPs) の検出を試みた結果、*cesp* 3' UTR 内部の A と U に富んだ配列 (ARE-M) が EMF 特異的に遺伝子を発現させる *cis*-element RNA であることを明らかにした。加えて、ARE-M には各発育ステージ特異的 RBPs が結合し、複合体を形成することも明らかにした。以上の結果は、ARE-M と RBPs による複合体が *cesp* mRNA を EMF 特異的に安定化して発現させていることを示唆している。最後に、第三章では ARE-M と相互作用する RBPs の同定を試みた結果、*T. congolense* Uridine Binding Protein (TcUBP)1 が ARE-M 配列特異的に結合することを明らかにした。TcUBP1 は全発育ステージで恒常的に発現しているため、TcUBP1 と複合体を形成する未知の因子が EMF 特異的遺伝子発現を司っていると考えられる。本研究で、EMF 特異的発現遺伝子の発現調節機構の一端が明らかになった。今後、RNA-RBPs 複合体の詳細を解明することによってアフリカトリパノソーマの発育ステージ変換に関わる分子制御機構を明らかにできると期待される。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : The epimastigote stage-specific gene expression of CESP is tightly regulated by its 3' UTR
著 者 名 : Suganuma, K., Yamasaki, S., Asada, M., Kawazu, S. and Inoue, N.
学術雑誌名 : Molecular and Biochemical Parasitology
巻・号・頁・発行年 : 186 (1) : 77-80, 2012
- 2) 題 目 : Adenosine-uridine-rich element is one of the required *cis*-elements for epimastigote form stage-specific gene expression of the *congolense* epimastigote specific protein
著 者 名 : Suganuma, K., Mochabo, K. M., Hakimi, H., Yamasaki, S., Yamagishi, J., Asada, M., Kawazu, S. and Inoue, N.
学術雑誌名 : Molecular and Biochemical Parasitology
巻・号・頁・発行年 : 191 (1) : 36-43, 2013

既発表学術論文

- 2) 題 目 : Expression, immunolocalization and serodiagnostic value of Tc38630 protein from *Trypanosoma congolense*
著 者 名 : Mochabo, K. M., Zhou, M., Suganuma, K., Kawazu, S., Suzuki, Y. and Inoue, N.

学术雑誌名 : Parasitology Research

卷・号・頁・発行年 : 112 (9) : 3357-3363, 2013