

平成 30 年 6 月 17 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08443

研究課題名(和文) 雄性生殖体の鞭毛放出とPyGM75の構造機能相関解析

研究課題名(英文) The correlation between the structure of PyGM75 and the function in exflagellation of microgamete

研究代表者

橘 真由美 (Tachibana, Mayumi)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・助教

研究者番号：00301325

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ネズミマラリア原虫の雄性生殖体表面に発現しているPyGM75は、雄の生殖体の鞭毛放出に機能している。本研究では、PyGM75の持つプロテアーゼ様ドメイン、膜貫通領域などの分子構造が、PyGM75の機能に関与するののかについての検討を行った。膜貫通領域を欠失した原虫では、雄性生殖体の表面においてPyGM75の発現が認められなかった。さらに、蚊への感染性を検討するために、オーシスト形成を観察したところ、野生型に比べて、減少していることが確認された。これらの結果から、PyGM75のC末の膜貫通領域が雄生殖体表面におけるPyGM75の発現、および蚊への感染に重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：PyGM75 expressed on the male gamete surface of Plasmodium yoelii functions in exflagellation of microgametes. In this study, we investigated whether the molecular structure of protease-like domain and transmembrane domain of PyGM75 is involved in PyGM75 function. The transgenic parasite lacking the transmembrane region of pygm75 did not express the PyGM75 on the surface of male gametes. Furthermore, the infectivity to mosquito (the number of oocysts) was decreased compared to the wild type. These results suggested that the transmembrane domain of PyGM75 at C-terminal is important for the expression of PyGM75 on the male gamete and the ability to infect mosquitoes.

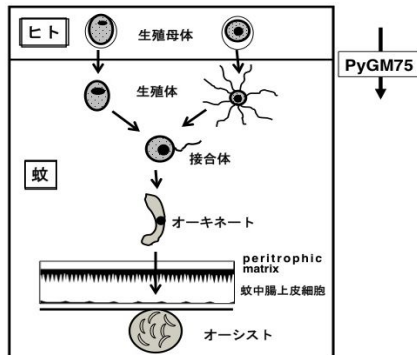
研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア 雄性生殖体 鞭毛放出

1. 研究開始当初の背景

吸血によって、蚊の中腸に取り込まれたマラリア原虫の生殖母体は、雌雄の生殖体となったものが受精した後、接合体、オーキネートへと発育し、中腸上皮を穿通して基底膜でオーシストへと変態する(図1)。生殖母体

図1 蚊の中のマラリア原虫ステージ



には osmiophilic body と呼ばれるこのステージに特有の細胞内小器官が認められる。雌の生殖母体の osmiophilic body に局在する分子 (Pfg377) は、発育に伴って寄生胞膜に移行し、生殖母体の赤血球からの放出に関与することが報告されている。また、雄特異的に発現する分子としては、受精に必須である PbGCS1 (Hirai et al., 2008) 及び雄の発育に関与している actin (Deligianni et al., 2011) などがあるが、非常に限られたものすぎない。我々は、ネズミマラリア (*Pyoelii* 17X) を用いた研究により、新規分子 PyGM75 が雄の生殖母体の osmiophilic body に局在し、鞭毛放出 (Exflagellation) 後にミクロガメートの表面へと移行することを見いだした。

PyGM75 遺伝子欠損原虫を作製して表現型を解析したところ、欠損原虫では鞭毛放出能が劇的に低下することが判明した。生殖母体の赤血球脱出や雄性生殖体の鞭毛放出は、吸血により蚊に取り込まれた直後から pH や温度変化などの刺激により活性化される現象であることは周知であるが、これに関与する分子については解析が進んでおらず、その知見は限られている。鞭毛放出に関連する現象の分子基盤を明らかにするために、PyGM75 に着目して詳細な解析を行う本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、先ず、本分子で特徴的なプロテアーゼ様ドメインの部位内に位置し、分子構造および機能に重要と思われるアミノ酸を個別に置換した遺伝子組み換え原虫を作製し、PyGM75 の細胞内局在、鞭毛放出およびプロテアーゼ活性の有無にも着目して表現型の変化を観察する。それによって未だ研究の進んでいない鞭毛放出の分子機序の一端を明らかにすることを目的として実施する。

具体的には以下の点を明らかにする。

(1) 遺伝子組換え原虫 (PyGM75 内アスパラギン酸残基置) における表現型の変化の観察: プロテアーゼ様ドメインの予測活性部位であるアスパラギン酸をアラニンに置換した組換え原虫を作出し、PyGM75 の原虫内における局在、鞭毛放出能などの表現型の変化を観察することで、プロテアーゼ様ドメインの役割を解析する。

(2) 遺伝子組換え原虫 (PyGM75 の C 末端部位) の表現型の変化を観察: 本分子の C 末端部位に対する抗体が原虫の発育に重大な影響を及ぼすという予備実験の結果を基に、C 末端部位の遺伝子組換え原虫を作出し、表現型の変化を観察する。C 末端部位の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では雄の生殖母体と生殖体に特異的に発現する PyGM75 の分子機能を解析することを目的として、以下の方法によって研究を実施した。先ず、PyGM75 分子の大半を占めるプロテアーゼ様ドメインの部位内に位置し、分子構造および機能に重要と思われるアスパラギン酸残基を個別にアラニン残基に置換した遺伝子組換え原虫を作製した。ついで、これらの原虫における PyGM75 の細胞内局在、鞭毛放出の有無に着目して表現型の変化を観察した。また、PyGM75 の C 末端部位を欠損した組換え原虫を作製し、遺伝子改変原虫の侵入機序の変化を観察することで、分子における C 末端部位の重要性についても検討を行った。

(1) PyGM75 の予想活性部位であるアスパラギン酸をアラニンに置換した原虫を作出し、osmiophilic body の形成および鞭毛放出に関連する因子の検討を行った。PyX 株 cDNA を用いて PyGM75 を PCR で増幅し、クローニング用ベクターに導入する。アスパラギン酸残基をコードする GAT を、アラニン残基をコードする GCT に置換するような、塩基の変異導入を行った。変異を導入した PyGM75 配列の下流に、組換え原虫の選択マーカーとなる薬剤耐性遺伝子 (tgdhfr) 配列を繋ぎ合わせたコンストラクトを作製した。相同組換え法により、PyGM75 コード領域をアラニンに置換した配列に置き換え、抗マラリア薬 (ピリメサミン) により薬剤耐性を獲得した PyGM75 アスパラギン酸-アラニン置換原虫のみを選択した。

(2) C 末の膜貫通領域を欠損する原虫の作出を行い、組換え原虫の表現型の変化を解析した。そのために、PyGM75 の C 末にある膜貫通領域を除く配列を PCR で増幅し、上記 (1) で用いた薬剤耐性遺伝子配列を持つ組換え導入ベクターに挿入した。(1)と同様の方法を用いて、組換え原虫の作出を行った。

(3) 組換え原虫における表現型の変化の解析を行った。PyGM75 の局在についての検討: 組換え原虫をマウスに感染させ、成熟した生殖母体が形成されていることを確認し、

血液塗抹標本を作製する。また、感染血液をキサンツレン酸含有培養液に加え、鞭毛放出を誘導したものについても同様に標本を作製する。特異抗体を用いて生殖母体および生殖体における PyGM75 の局在を確認した。

蚊への感染性についての検討：組換え原虫および野生型原虫をマウスに感染させ、4日後、蚊への吸血を行い、さらに10日後の蚊の中腸上皮にオーシスト形成数を比較する。

同時に Exflagellation 能についても検討する。組換え原虫をマウスに感染させ、4日後にマウスから採血してキサンツレン酸含有培養液を加え、鞭毛放出を誘導した。24℃の培養器で5分間静置した後、血球計算盤に移し、顕微鏡下で Exflagellation 数を観察した。

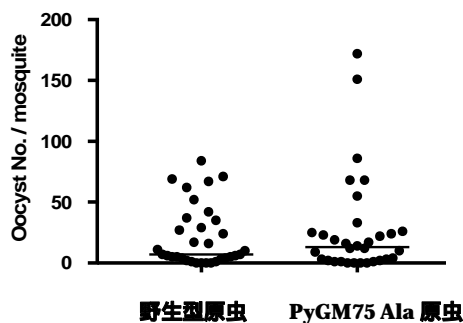
4. 研究成果

(1) PyGM75 アスパラギン酸-アラニン置換原虫

PyGM75 のプロテアーゼドメイン中のアスパラギン酸をアラニンに置換した組換え原虫および野生型原虫をマウスに感染させ、末梢血における感染率が5-10%に達したところで、蚊へ吸血を促し、10日後に蚊の中腸壁にあるオーシスト数を数えることで、蚊への感染性に影響があるかどうかについて検討した。

組換え原虫におけるオーシスト数(中央値:13)は、野生型原虫(中央値:7)と比較して有意な差は認められなかった。(図2)

図2 PyGM75 Ala 原虫の蚊中腸への感染性

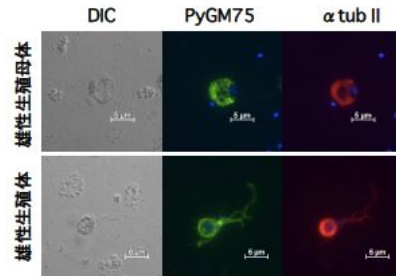


(2) PyGM75TM 欠損原虫

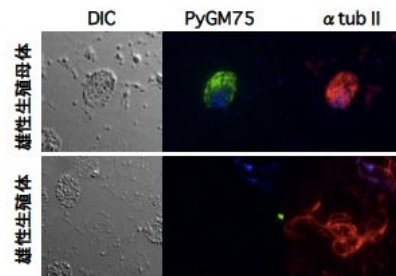
PyGM75 のC末の膜貫通領域(TM)を欠損させた組換え原虫における PyGM75 の局在を、特異抗体を用いた蛍光抗体法により確認した。野生型原虫において、PyGM75 は、雄性生殖母体の osmiophilic body と呼ばれる細胞内小器官に局在しており、その後、雄性生殖体(マイクロガメート)に発育すると表面に局在が変化することがこれまでの研究で明らかとなっている。作製した組換え原虫の生殖母体では、野生型原虫と同様に、細胞質内に点在するような像が観察された。しかしながら、雄性生殖体では、鞭毛放出(マイクロガメ

図3 PyGM75TM 欠損原虫における PyGM75 の局在解析(蛍光抗体法)

1) 野生型原虫



2) PyGM75TM 欠損原虫



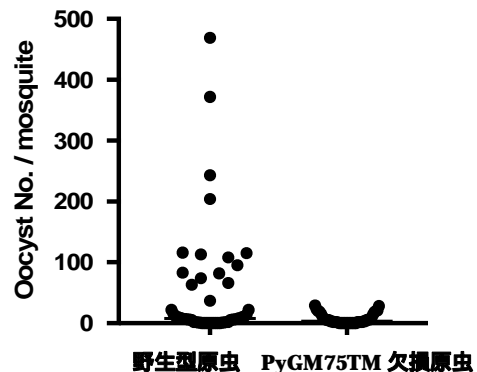
tub :male maker

ート)が認められる一方で、鞭毛表面に PyGM75 は検出されなかった。(図3)

上記(1)と同様に組換え原虫を感染させたマウスを蚊に吸血させ、10日後の蚊の中腸壁にあるオーシスト数を測定することで、蚊への感染性について変化がないかを検討した。

組換え原虫におけるオーシスト数(中央値:3)は、野生型原虫(中央値:7.5)と比較して、有意に減少していた。(P=0.018)(図4) 吸血時のタイミングで同時に exflagellation(鞭毛放出)数を計測したところ、有意な差は見られなかったものの、野生型原虫と比較して減少傾向がみられた。

図4 PyGM75TM 欠損原虫の蚊中腸への感染性



(3)まとめ

我々は、これまでの研究において、PyGM75 の遺伝子欠損原虫を用いた表現型解析により、

PyGM75 が雄性生殖母体特異的に形成される細胞小器官、osmiophilic body の形成、および、鞭毛放出に機能を持つことを明らかにした。本研究では、アスパラギン酸プロテアーゼ様ドメイン、およびC末に膜貫通領域を持つ分子である PyGM75 のどの領域が、PyGM75 の機能に重要であるのかについての検討を行った。プロテアーゼの活性部位として予測されるアスパラギン酸残基をアラニン残基に置換させた原虫では、PyGM75 の局在及び表現型は野生型と比べて変化が見られず、PyGM75 のプロテアーゼとしての機能については確認されなかった。

また、C末の膜貫通領域を欠失した原虫を用いて、PyGM75 の局在を確認したところ、雄性生殖体の表面において発現が全く認められなかった。さらに、蚊への感染性（オシスト形成数）を観察したところ、野生型に比べて、減少していることが確認された。これらの結果から、PyGM75 のC末の膜貫通領域が雄生殖体表面における PyGM75 の発現、および蚊への感染能に重要であることが示唆された。

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 1 件)

Mayumi Tachibana, Tomoko Ishino, Eizo Takashima, Takafumi Tsuboi, Motomi Torii. A male gametocyte osmiophilic body and microgamete surface protein of the rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii* (PyMiGS) plays a critical role in male osmiophilic body formation and exflagellation. *Cellular Microbiology*, 20(5), e12821. 2018.
<https://doi.org/10.1111/cmi.12821>

〔学会発表〕(計 6 件)

橘真由美、鳥居本美、坪井敬文、石野智子。新規伝搬阻止ワクチン候補 PyMiGS 抗体は、ミクロガメートの動きを止める。第 87 回日本寄生虫学会大会。東京、2018 年

Mayumi Tachibana, Motomi Torii, Takafumi Tsuboi, Tomoko Ishino. PyGM75, a protein in osmiophilic bodies, is dispensable for egress of male gametocytes but important for exflagellation of microgametes. 66th annual meeting of American Society of Tropical Medicine & Hygiene, Baltimore, USA, 2017

橘真由美、鳥居本美、須藤萌、坪井敬文、石野智子。雄特異的 osmiophilic body タンパク質 PyGM75 の生殖体・接合体形成過程における役割の解析。第 86 回日本寄生虫学会大会。札幌市、2017 年

橘真由美、鳥居本美、須藤萌、坪井敬文。新規伝搬阻止ワクチン候補 PyGM75 の抗原決定領域の決定。第 85 回日本寄生虫学会大会、

宮崎市、2016 年

Mayumi Tachibana, Motomi Torii, Moe Sudo, Takafumi Tsuboi, Tomoko Ishino. C-terminus region of male gamete surface protein, PyGM75 induce malaria transmission-blocking antibody.

Molecular approaches to Malaria 2016, Lorne, Victoria, Australia, 2016.

Mayumi Tachibana, Motomi Torii, Moe Sudo, Takafumi Tsuboi, Tomoko Ishino. Screening for highly immunogenic region of PyGM75, a novel transmission-blocking vaccine candidate. 64th Annual Meeting of American Society of Tropical Medicine and Hygiene, Philadelphia, USA, 2015.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橘 真由美 (TACHIBANA, Mayumi)
愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・
助教
研究者番号：00301325

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()

