

平成 30 年 4 月 25 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08449

研究課題名(和文) マラリア原虫のプリンヌクレオチド生合成を介した新たなエネルギー代謝システムの解明

研究課題名(英文) Role of MQO-mediated mitochondrial functions in severe malaria

研究代表者

新倉 保 (Niikura, Mamoru)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：30407019

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)：マラリア原虫が有する8種のTCA回路関連酵素のうち、マラリア原虫に特異的に保存されているリンゴ酸：キノン酸化還元酵素(MQO)はプリンヌクレオチド生合成系とTCA回路との代謝ネットワークの鍵分子であると考えられている。しかし、TCA回路が機能していないと考えられている赤内期のマラリア原虫において、この代謝ネットワークが機能しているかどうかは明らかにされていない。本研究により、世界に先駆けてMQOを欠損させたマウスマラリア原虫の作出に成功し、MQOがマウスマラリア原虫の病原性に関わることを見出した。これらの知見から、MQOは抗マラリア薬の新たな創薬標的になると期待される。

研究成果の概要(英文)：In Plasmodium parasites, TCA cycle is not essential for survival of asexual-blood-stage parasites, but is required for survival of mosquito-stage parasites. Whereas, two of the eight mitochondrial TCA cycle enzymes, fumarate hydratase (FH) and malate:quinone oxidoreductase (MQO), could not be genetically ablated in asexual-blood-stage Plasmodium falciparum. However, the importance of FH and MQO for asexual-stage parasite viability and growth in cerebral malaria is unclear. In this study, we revealed that MQO is a key molecule for metabolic cross-talk between purine salvage pathway and TCA cycle in rodent malaria parasites, Plasmodium berghei ANKA, and is involved in parasite viability during the blood stage. The finding that MQO is involved in the viability, the growth of asexual-blood-stage parasites and the development of experimental cerebral malaria suggest that MQO would be a potential target for the treatment of severe malaria.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア原虫 TCA回路 プリンヌクレオチド生合成 リンゴ酸：キノン酸化還元酵素 フマラーゼ オキサロ酢酸 代謝ネットワーク 抗マラリア薬

1. 研究開始当初の背景

マラリア原虫は、全世界で約2億人に健康被害を与え、年間約40万人もの人々を死に至らしめる、人類にとって未だに脅威の病原体である。

アスパラギン酸は、核酸合成に必須なアミノ酸であり、オキサロ酢酸から変換される。マラリア原虫においてオキサロ酢酸が生成される経路には、phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC: 植物や細菌などで保存されている酵素) を介する経路と、TCA回路を介する経路の2つが存在すると考えられている(図1)。TCA回路を介する経路には、核酸合成の副産物であるフマル酸をリンゴ酸に変換するフマラーゼ(FH)とリンゴ酸をオキサロ酢酸に変換するリンゴ酸:キノン酸化還元酵素(MQO: 一部の原虫や細菌で保存されている酵素)の2つのTCA回路関連酵素が関わると推測されている(図1)。しかし、TCA回路が機能していないと考えられている赤内期のマラリア原虫において、TCA回路を介したオキサロ酢酸生成経路が機能しているかどうかは明らかにされていない。

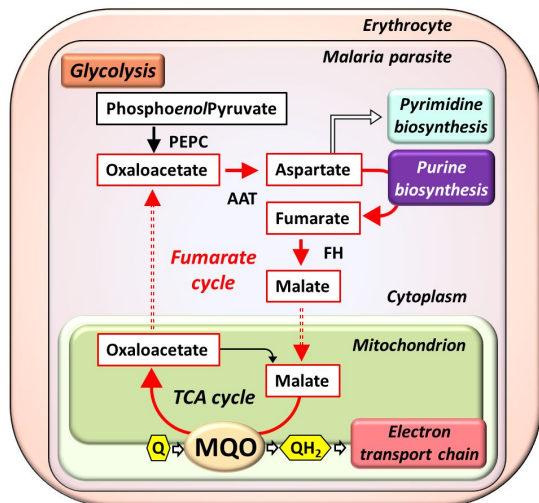


図1. マラリア原虫のTCA回路を介したオキサロ酢酸生成経路

2. 研究の目的

本研究では、FHとMQOを欠損させたマラリア原虫をそれぞれ作出し、赤内期のマラリア原虫におけるTCA回路を介したオキサロ酢酸生成経路の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) マウスマラリア原虫 *Plasmodium berghei* ANKA の *fh* 遺伝子と *mgo* 遺伝子に、薬剤耐性遺伝子とルシフェラーゼ遺伝子を相同組換えによりそれぞれ導入し、FH欠損原虫 (Δfh) とMQO欠損原虫 (Δmgo) を作出した。
- (2) マラリア原虫の細胞内ATP量は、ATP産生量に基づき細胞の代謝活性を高感

度に測定できるルシフェリン-ルシフェラーゼシステムにより測定した。

- (3) マウスを妊娠させ、妊娠12日目のマウスに野生型またはMQO欠損マラリア原虫をそれぞれ感染させた。感染後、原虫血症の推移を比較解析した。

4. 研究成果

(1) FHまたはMQOの欠損によるマラリア原虫の分化・増殖への影響

マウスマラリア原虫 *Plasmodium berghei* ANKA は赤血球に侵入した後、輪状体(6-12時間)、栄養体(12-18時間)、分裂体(18-24時間)に分化する。その後、形成されたメロゾイトが血中に放出され新たな赤血球に侵入し(24時間)、次の増殖周期が始まる。

マウスマラリア原虫の増殖周期を同調させるために、コントロール原虫、FH欠損原虫、MQO欠損原虫の分裂体を精製し、それぞれマウスに接種した。接種後、経時的に原虫の形態を観察し、FHまたはMQOの欠損による原虫の分化・増殖への影響を解析した。解析の結果、接種後6時間目において、FH欠損原虫またはMQO欠損原虫は、コントロール原虫と同様、90%以上が輪状体(図2, stage 1)に分化した。接種後18時間目では、FH欠損原虫は、コントロール原虫と同様、85%以上が後期栄養体(図2, stage 3)に分化した。一方、MQO欠損原虫の後期栄養体(stage 3)の割合は約65%であった。接種後24時間目では、コントロール原虫は90%以上が輪状体(図2, stage 1)に分化したが、FH欠損原虫とMQO欠損原虫の輪状体(stage 1)の割合は、それぞれ56%と34%であった。これらの結果から、FHまたはMQOの欠損によって、マラリア原虫の後期栄養体から分裂体のステージにおいて分化のスピードが著しく遅延することが明らかとなった(図2)。

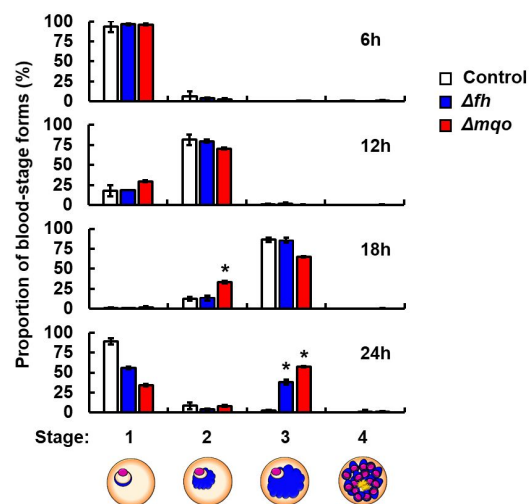


図2. MQOの欠損によるマラリア原虫の栄養体~分裂体のステージの分化の遅延

(2) FH または MQO の欠損によるマラリア原虫の代謝活性への影響

赤内期のマラリア原虫において、TCA 回路を介したオキサロ酢酸生成経路が機能しているかどうかを明らかにするために、コントロール原虫、FH 欠損原虫、MQO 欠損原虫の分裂体を接種したマウスから経時的に採血し、ルシフェリン-ルシフェラーゼシステムによりそれぞれのマラリア原虫の代謝活性を測定した。その結果、FH 欠損原虫の代謝活性は、分裂体接種後 8 時間目と 18 時間目において、コントロール原虫と同程度であった (図 3)。一方、MQO 欠損原虫の代謝活性は、分裂体接種後 8 時間目と 18 時間目において、コントロール原虫と比較して著しく低下した (図 3)。これらの結果から、赤内期のマラリア原虫において、TCA 回路を介したオキサロ酢酸生成経路が機能しており、MQO が TCA 回路を介したオキサロ酢酸生成経路の鍵分子であることが示唆された。

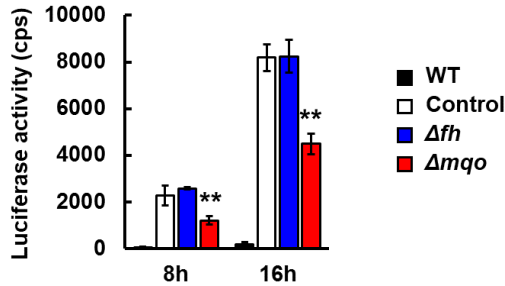


図 3. TCA 回路を介したオキサロ酢酸生成経路

FH 欠損原虫の代謝活性はコントロール原虫と同レベルであったことから、マウスマラリア原虫には FH の欠損を補填する経路が存在する可能性が示された。赤血球内には、宿主由来の FH が存在することが知られている。これらの所見から、フマル酸は宿主の FH によってリンゴ酸に変換されることが示唆された (図 4)。

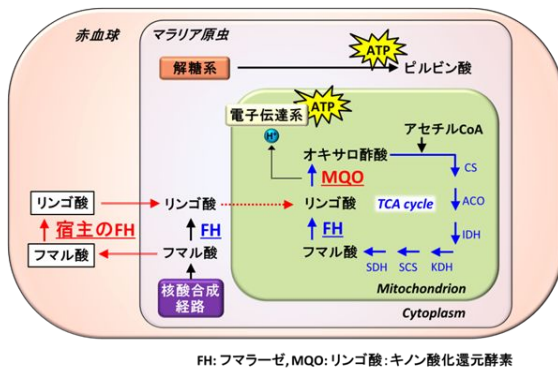


図 4. マラリア原虫の宿主由来 FH を利用した宿主 - 原虫間連携フマル酸代謝

(3) FH または MQO の欠損によるマラリア原虫の病原性への影響

FH 欠損または MQO 欠損によるマラリア原虫の病原性への影響について解析したところ、FH 欠損原虫を感染させたマウスでは、コントロール原虫を感染させたマウスと同様に病態が重症化し、感染後 7 日目にすべてのマウスが死亡した (図 5)。MQO 欠損原虫を感染させたマウスでは、病態の重症化が認められず、生存期間が著しく延長した (図 5)。これらの結果から、MQO がマラリア原虫の病原性に関与することが示された。

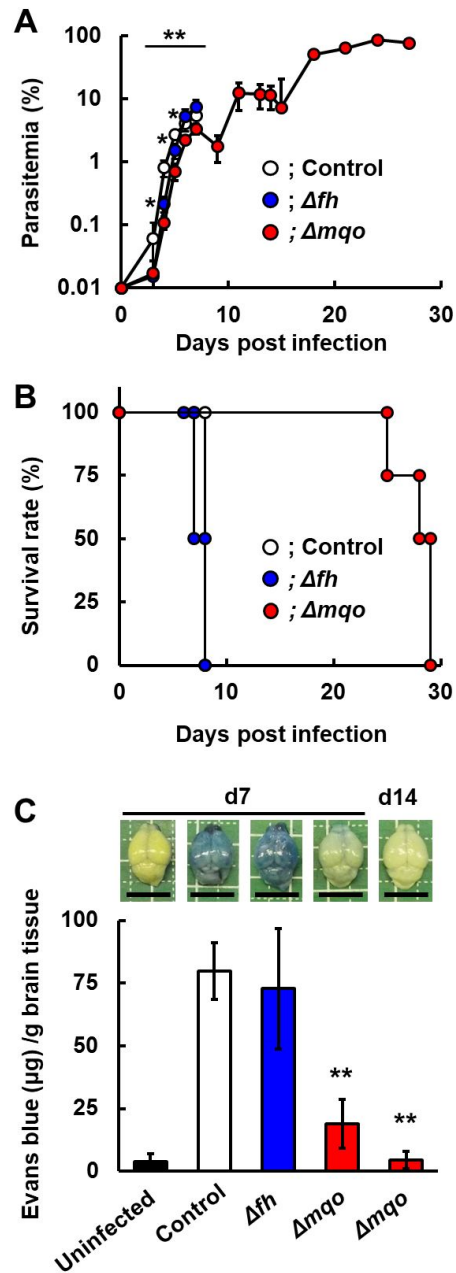


図 5. MQO の欠損によるマラリア原虫の病原性の低下

(4) 妊娠時特異的なマラリア病態重症化機構の解明

宿主であるヒトやマウスが妊娠すると、妊娠関連ホルモンの作用によって、妊娠中は造血が亢進することが知られている。造血の亢進によって、末梢血中の幼若赤血球が増加する。幼若赤血球には、成熟赤血球と比較して、マラリア原虫のエネルギー源となるグルコースやリンゴ酸などが多く含まれていることが報告されている。MQOは、グルコースやリンゴ酸の代謝に関連する酵素であることから、妊娠マラリアの病態重症化に関わると推測される。そこで、コントロール原虫とMQO欠損原虫を非妊娠マウスと交配後12日目の妊娠マウスに感染させ、原虫血症の推移を解析した。

解析の結果、コントロール原虫を感染させた妊娠マウスの原虫血症は、非妊娠の原虫血症と比較して、感染後4日目から有意に増加した。一方、MQO欠損原虫を感染させた妊娠マウスの原虫血症は、感染後3日目から5日目まで非妊娠マウスの原虫血症と同様のパターンで増加した。これらの結果から、MQO欠損原虫感染では、コントロール原虫感染と比較して、妊娠中の原虫血症の増悪が改善されることが示された。

(5) マラリア重症化に関与する新たな原虫因子の探索

比較ゲノム解析や比較プロテオーム解析は、遺伝子変異や病態重症化関連因子の解析に非常な有効な方法である。これらの手法を用いることで、マラリア原虫の新たな病態重症化関連因子が同定されてきた。

Plasmodium berghei XATは、強毒株マウスマラリア原虫である*P. berghei* NK65にX線を照射することによって弱毒化されたマウスマラリア原虫である。しかし、これまでに*P. berghei* NK65と*P. berghei* XATの病原性の違いを決定づける因子は明らかにされていない。そこで、本研究では、*P. berghei* NK65と*P. berghei* XATとの比較ゲノム解析および比較プロテオーム解析を行い、マラリア原虫の新たな病態重症化関連因子を同定することを目的とした。

比較ゲノム解析の結果、*P. berghei* NK65と*P. berghei* XAT間で約1700個の遺伝子変異が検出された。しかし、病原性の違いを決定づける因子の同定には至らなかった。次に比較プロテオーム解析を行った。その結果、*P. berghei* XATにおいて感染赤血球の接着に関わると報告されているSBP1、赤血球への侵入に関わると考えられているRhoptry-associated protein (RAP) 1とRAP2/3など計8個のタンパク質が著しく発現低下していることを見出した。本研究によって、マラリア原虫の新たな病態重症化関連因子が同定された。また、比較ゲノム解析と比較プロテオーム解析を組み合わせることで、

効率的にマラリア原虫の遺伝子変異や病態重症化関連因子を同定できることが示された。

総括

本研究で、世界に先駆けてリンゴ酸：キノン酸化還元酵素 (MQO) を欠損させたマラリア原虫の作出に成功し、MQOがマラリア原虫の病原性に関わることを見出した。マラリア原虫のMQOは、核酸合成系とTCA回路、電子伝達系との代謝ネットワークに関わる鍵分子である。さらに、MQOは、マラリア原虫に特異的な酵素で、ヒトなどの哺乳類にはホモログが存在しないことが知られている。これらの知見から、MQOを標的とした薬剤が開発されれば、マラリア原虫の代謝ネットワークを標的とした、全く新しい作用機序を有する薬剤となることが期待される。

妊娠中のマラリアの病態の重症化は、妊娠による免疫抑制が主な原因であると考えられている。一方、本研究によって、妊娠中のマラリアの病態の重症化には、フマル酸回路が関わることを示唆された。妊娠中のマラリアは、母体だけでなく胎児にも重大な影響を与えることから、マラリア流行地において社会問題となっている。しかし、その治療法は未だに確立されていない。妊娠関連ホルモンの作用による造血亢進などの変化は、妊娠マラリアの病態重症化に関わる因子であることから、これらの因子を詳細に研究することで妊娠マラリアの早期診断法や治療法の開発のための新たな知見が得られると期待される。

本研究によって、比較ゲノム解析と比較プロテオーム解析を駆使することにより、効率的にマラリア原虫の遺伝子変異や病態重症化関連因子を同定できることが明確となった。今後、マラリア原虫におけるプリンヌクレオチドの生合成系とTCA回路を介したエネルギー代謝システムの全体像を捉えるために、MQO欠損原虫や核酸輸送体欠損原虫の比較プロテオーム解析を行い、抗マラリア薬開発のための新規創薬ターゲットの探索を進めていく予定である。

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 10件)

- (1) Mamoru Niikura, Shin-Ichi Inoue, Toshiyuki Fukutomi, Junya Yamagishi, Hiroko Asahi, Fumie Kobayashi: Comparative genomics and proteomic analyses between lethal and nonlethal strains of *Plasmodium berghei*. *Exp Parasitol.* (査読あり) 185: 1-9, 2018. doi: 10.1016/j.exppara.2018.01.001.
- (2) Mamoru Niikura, Shin-Ichi Inoue,

- Shoichiro Mineo, Hiroko Asahi, Fumie Kobayashi: IFNGR1 signaling is associated with adverse pregnancy outcomes during infection with malaria parasites. *PLoS One*. (査読あり) 12 (11): e0185392, 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0185392.
- (3) Hiroko Asahi, Shin-Ichi Inoue, Mamoru Niikura, Keisuke Kunigo, Yutaka Suzuki, Fumie Kobayashi, Fujiro Sendo: Pyknosis and developmental arrest induced by an opioid receptor antagonist and dihydroarthemisinin in *Plasmodium falciparum*. *PLoS One*. (査読あり) 12 (9): e0184874, 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0184874.
- (4) Mamoru Niikura, Keisuke Komatsuya, Shin-Ichi Inoue, Risa Matsuda, Hiroko Asahi, Daniel Ken Inaoka, Kiyoshi Kita, Fumie Kobayashi: Suppression of experimental cerebral malaria by disruption of malate:quinone oxidoreductase. *Malar J*. (査読あり) 16 (1): 247, 2017. doi: 10.1186/s12936-017-1898-5.
- (5) Shin-Ichi Inoue, Mamoru Niikura, Hiroko Asahi, Yoichiro Iwakura, Yashushi Kawakami, Fumie Kobayashi: Preferentially expanding $V\gamma 1^+$ $\gamma\delta T$ cells are associated with protective immunity against *Plasmodium* infection in mice. *Eur J Immunol*. (査読あり) 47 (4): 685-691, 2017. doi: 10.1002/eji.201646699.

〔学会発表〕(計 44 件)

- (1) Mamoru Niikura, Shin-Ichi Inoue, Hiroko Asahi, Daniel Ken Inaoka, Kiyoshi Kita, Fumie Kobayashi : The role of MQO-mediated mitochondrial functions during asexual blood stage *Plasmodium* parasites. The 19th Forum Cheju, 2018.
- (2) 新倉 保, 井上信一, 松田理紗, 稲岡ダニエル健, 北 潔, 小林富美恵 : 赤内期マラリア原虫の malate:quinone oxidoreductase の役割. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (第 40 回日本分子生物学会/第 90 回日本生化学会), 2017.
- (3) Mamoru Niikura, Shin-Ichi Inoue, Hiroko Asahi, Daniel Ken Inaoka, Kiyoshi Kita, Fumie Kobayashi : MQO-mediated mitochondrial functions are required for full virulence of asexual blood-stage *Plasmodium* parasites. グローバルヘルス合同大会 2017 (第 58 回日本熱帯医学学会大会/第 32 回日本国際保健医療学会学術大会/第 21 回日本渡航医学会学術集会 合同大会), 2017.
- (4) 新倉 保, 井上信一, 稲岡ダニエル健,

北 潔, 小林富美恵 : 赤内期マラリア原虫のフマル酸回路の役割. 第 25 回分子寄生虫学ワークショップ&第 15 回分子寄生虫マラリアフォーラム合同大会, 2017.

- (5) 新倉 保, 井上信一, 朝日博子, 小林富美恵 : Metabolic adaptations during pregnancy are involved in the susceptibility to malaria parasites. 第 86 回日本寄生虫学会大会, 2017.

〔その他〕

ホームページ等

- (1) 杏林大学医学部 教室紹介
<http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/faculty/medicine/education/labo/infection/>
- (2) 杏林大学大学院 医学研究科 研究室・研究グループ紹介:感染症学教室
<http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/graduate/medicine/education/departments/infect-diss/>
- (3) 杏林大学 教員紹介
<http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/faculty/medicine/education/staff/detail/?id=med65001>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

新倉 保 (NIKURA MAMORU)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号 : 30407019

(2) 研究協力者

白井 芹奈 (SHIRAI SERINA)

小島 優輝 (KOJIMA YUKI)

松田 理紗 (MATSUDA RISA)

横田 夏紀 (YOKOTA NATSUKI)