

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08455

研究課題名(和文) 肝内型マラリア原虫の高速増殖ドライビング・ギアの分子基盤

研究課題名(英文) Insights into the molecular machinery involved in regulating Plasmodium liver-stage proliferation

研究代表者

案浦 健 (Annoura, Takeshi)

国立感染症研究所・寄生動物部・主任研究官

研究者番号：90407239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：世界最大の感染症の一つであるマラリアは、年間死亡者数44万人以上、罹患者数は2億人以上にもおよぶ疾患であり、様々な対策がなされているがその制圧には至っていない。ハマダラカの吸血時にヒトに感染するマラリア原虫は、まず肝臓に寄生(肝内型)・増殖後に、赤血球に寄生(赤内型)し発育する。この肝内型原虫の分裂増殖スピードは、真核生物全体を俯瞰してもトップグループの高速増殖に該当するが、高速増殖を可能にする様々な要素・駆動装置(ドライビング・ギア)に関してはほとんど明らかとなっていない。そこで本研究では、この高速増殖を可能にする分子メカニズムを明らかにするために基盤的な研究を展開した。

研究成果の概要(英文)：The protozoan parasites Plasmodium is the etiological agents of malaria that is transmitted by the Anopheles mosquito to human. The Plasmodium liver-stage parasite represents the first of the intracellular infectious step in human following a mosquito bite, and this asymptomatic stage forms many thousands of merozoites with have undergone tremendous multinuclear hyper-proliferation. Some Plasmodium species generate a dormant uninucleate parasite during liver-stage development termed the hypnozoite which persists for months or even years following an infection. The developmental decision-making that controls promotes proliferation (or dormancy) in Plasmodium liver-stage is made before nuclear segregation. However, the detailed molecular mechanism (s) that regulates proliferation is poorly understood. We employed the rodent malaria models P. berghei to reveal molecular insights into Plasmodium liver-stage development.

研究分野：寄生虫学、分子生物学、細胞生物学

キーワード：マラリア 肝内型原虫 増殖分子メカニズム 寄生胞膜

1. 研究開始当初の背景

マラリアは、年間罹患患者数 2 億人以上、死亡者数 44 万人以上にもおよぶ世界最大の感染症の一つであり、様々な対策がなされているが制圧には至っていない。病原体であるマラリア原虫は、ハマダラカの吸血時にヒト体内に注入され、原虫はまず肝臓に寄生(肝内型)・増殖後に、赤血球に寄生(赤内型)する。この肝内型の発育期は、寄生成立に必須の発育期であり、原虫種により肝細胞寄生後すぐには増殖しない休眠期がある一方で、増殖期に移行した場合には真核生物全体でもトップグループの高速増殖を示す。この肝内型原虫の高速増殖は、多核体形成を伴うユニークな増殖様式を行い、様々な要素(材料・代謝・分子)が必要となるが、その詳細な分子メカニズムは明らかとなっていない。そこで本研究では、この高速増殖を可能にする分子メカニズムを明らかにするために基盤的な研究を展開した。

2. 研究の目的

本研究では、肝内型原虫の高速増殖を可能にする分子基盤を明らかにするために、原虫側分子、宿主側分子、宿主と原虫を隔てるインターフェース(PVM)分子に着目し、多角的なアプローチにより原虫が増殖する分子メカニズムを明らかにするために基盤研究を実施した。本研究により肝内型原虫に特異的な増殖・分子メカニズムが明らかとなれば、新たな抗マラリア薬・ワクチン開発に有益であるのみならず、生物界においても新しい高速増殖メカニズムを明らかにできる可能性がある。

3. 研究の方法

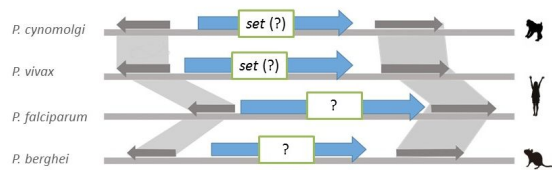
原虫側分子の探索には、発育期により異なる役割を担う可能性のある分子を中心として各種 *in silico* 解析を実施した。解析の結果得られた各候補分子の重要性を明確に

するため、齧歯類マラリア原虫(*P. berghei*)を用いて、各候補分子の欠損株、発育期特異的な過剰発現株の作製を試みた。宿主側分子としては、まず宿主 Atg 応答に着目し研究を実施した。CRISPR/Cas9 システムを用いて、宿主の Atg 応答に関連する各遺伝子を欠損させた細胞株を作製し、マラリア原虫(スポロゾイト)を感染させ、宿主 Atg 応答など各種解析を実施した。また宿主と原虫のインターフェースである PVM に関与する分子メカニズムを明確にするため、PVM 形成不全を生じる各種変異原虫株などを用いて詳細な解析を行った。

4. 研究成果

原虫側分子の探索には、マラリア原虫の発育期により異なる役割を担うことが示唆される制御分子をプローブとして、様々な *in silico* 解析を実施した。特に原虫種間での保存性の違いや、推定 2 次構造・ドメイン構造が原虫種間で大きく異なる分子を中心に解析を行い、各候補遺伝子の発現プロファイルが変動することを網羅的に解析した。核の増殖制御に影響を与える分子を集中に詳細な解析を実施したところ、全てのマラリア原虫種に hypothetical protein 遺伝子

Fig 1. Conserved hypothetical protein gene, containing SET domain (tentatively named SET-TA)

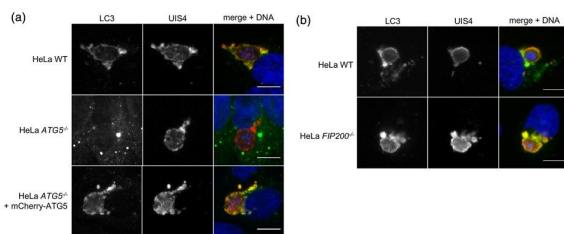


として高度に保存されているが、推定 2 次構造や機能ドメインが原虫種間で異なる SET-TA (仮称) を見出した(Fig 1)。この SET-TA の原虫内での生理的な機能を明確にするために、*set-ta* 欠損原虫株ならびに発育期特異的なプロモーターを用いた過剰発現株の作製を行った。これらの変異原虫株の増殖は、各発育期に応じて野生型とは

大きく異なり、また異なる原虫種の SET-TA を過剰発現させることで、その影響が明確になる可能性が示された。

我々を含めたこれまでの先行研究から、宿主 Atg 応答のマーカー分子である LC3 は、肝内型原虫の感染初期に集積することが明らかになっている。そこで本研究では、これら宿主 Atg 応答に必須の役割を担う Atg5 と FIP200 の欠損細胞を作製し、肝内型原虫の感染時における LC3 の集積を観察した。その結果、肝内型原虫に認められる宿主 LC3 の蓄積は、宿主 Atg5 に依存的であるが宿主 FIP200 には非依存的であることが明確に示された (Fig 2)。この結果から肝内型原虫に対する宿主 LC3 の蓄積は、通常の宿

Fig 2. LC3-association with the parasitophorous vacuole membrane of *Plasmodium berghei* liver stages follows a noncanonical autophagy pathway



Incorporation of LC3 into the PVM depends on ATG5, but not on FIP200.

主オートファジー応答とは異なる分子メカニズムにより集積する可能性が明らかとなった。

また Loss of function 解析により作製した PVM 形成不全変異株を用いて、宿主 LC3 応答を観察した。その結果、肝内型原虫に対する宿主 LC3 の応答は、これらの変異株では全く認められず、これらの宿主応答は肝内型原虫の PVM 依存的に起こることが明確に示された。また上記の Atg5 欠損細胞あるいは FIP200 欠損細胞を用いて、これらの変異株を感染させた場合にも、同様の結果が確認され、宿主 LC3 の肝内型原虫への応答は PVM に特異的であることが明確に示された。

今後、この様な原虫-宿主の相互作用や、

肝内型原虫の増殖分子メカニズムを明確にすることで、新規ワクチン開発や新規薬剤開発に付与する分子基盤情報を明確にする。

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 6 件)

1. Uchida S, Oiso N, Sanjoba C, Matsumoto Y, Yanagihara S, Annoura T, Kato Y, Shirano M, Goto Y, Kawada A. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Israel. *J Dermatol*. 2018 Mar 22. In press. doi: 10.1111/1346-8138.14300.
2. Wacker R, Eickel N, Schmuckli-Maurer J, Annoura T, Niklaus L, Khan SM, Guan JL, Heussler VT. LC3-association with the parasitophorous vacuole membrane of *Plasmodium berghei* liver stages follows a noncanonical autophagy pathway. *Cell Microbiol*. 2017 Oct;19(10). In press. doi: 10.1111/cmi.12754.
3. Bautista-López NL, Ndao M, Camargo FV, Nara T, Annoura T, Hardie DB, Borchers CH, Jardim A. Characterization and Diagnostic Application of *Trypanosoma cruzi* Trypomastigote Excreted-Secreted Antigens Shed in Extracellular Vesicles Released from Infected Mammalian Cells. *J Clin Microbiol*. 55(3):744-758 (2017). doi: 10.1128/JCM.01649-16.
4. Fougère A, Jackson AP, Bechti DP, Braks JA, Annoura T, Fonager J, Spaccapelo R, Ramesar J, Chevalley-Maurel S, Klop O, van der Laan AM, Tanke HJ, Kocken CH, Pasini

- EM, Khan SM, Böhme U, van Ooij C, Otto TD, Janse CJ, Franke-Fayard BM. Variant exported blood-stage proteins encoded by *Plasmodium* multigene families are expressed in liver stages where they are exported into the parasitophorous vacuole. *PLoS Pathog.* 12(11):e1005917. (2016). doi: 10.1371/journal.ppat.1005917.
5. Rijpma SR, van der Velden M, Annoura T, Matz JM, Kenthirapalan S, Kooij TW, Matuschewski K, van Gemert GJ, van de Vegte-Bolmer M, Siebelink-Stoter R, Graumans W, Ramesar J, Klop O, Russel FG, Sauerwein RW, Janse CJ, Franke-Fayard BM, Koenderink JB. Vital and dispensable roles of *Plasmodium* multidrug resistance transporters during blood- and mosquito-stage development. *Mol Microbiol.* 101(1):78-91. (2016). doi: 10.1111/mmi.13373.
6. Rijpma SR, van der Velden M, González-Pons M, Annoura T, van Schaijk BC, van Gemert GJ, van den Heuvel JJ, Ramesar J, Chevalley-Maurel S, Ploemen IH, Khan SM, Franetich JF, Mazier D, de Wilt JH, Serrano AE, Russel FG, Janse CJ, Sauerwein RW, Koenderink JB, Franke-Fayard BM. et al. Multidrug ABC transporters are essential for hepatic development of *Plasmodium* sporozoites. *Cell Microbiol.* 18, 369-83. (2016). doi: 10.1111/cmi.12517.

[学会発表](計 14 件)

- 1). 第 25 回 分子寄生虫学ワークショップ / 第 15 回 分子寄生虫・マラリア研究フォー

ラム合同大会 2017 年 8 月 27 日-8 月 30 日 帯広畜産大学・原虫病研究センター PK ホール 「肝内型マラリア原虫の休眠・増殖分子メカニズムの解明」 案浦 健、荒木 球沙、川合 覚、小林 宏尚、片岡 紀代、Wacker R、Janse CJ、Khan SM、Heussler VT、野崎 智義

- 2). 第 50 回日本原生生物学会大会と第 1 回日本共生生物学会大会の合同大会にてシンポジストとして成果発表 2017 年 11 月 17 日-19 日 :筑波大学・筑波キャンパス中地区第 2 エリア 2B 棟ほか 「肝内型マラリア原虫の休眠・増殖分子メカニズムの解明」 案浦 健、荒木 球沙、川合 覚、小林 宏尚、片岡 紀代、Wacker R、Janse CJ、Khan SM、Heussler VT、野崎 智義
- 3). 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 にてシンポジウム指定演題として発表 2017 年 12 月 6 日-9 日 神戸ポートアイランド 「肝内型マラリア原虫の休眠・増殖分子メカニズムの解明; Molecular dissection of the hyperproliferation and dormancy machinery in *Plasmodium* liver-stage parasites」 案浦 健、荒木 球沙、川合 覚、Wacker R、Janse CJ、Khan SM、Heussler VT、野崎 智義
- 4). 第 87 回 日本寄生虫学会大会 2018 年 3 月 17 日-18 日 :国立研究開発法人国立国際医療研究センター研究所 「肝内型マラリア原虫の休眠分子メカニズムの解明; Insights into the molecular mechanisms responsible for dormancy in *Plasmodium* liver stage」 案浦 健、荒木 球沙、川合 覚、小林 宏尚、片岡 紀代、角田 宗一郎、Wacker R、Janse CJ、Khan SM、Heussler VT、野崎 智義、久枝 一
- 5). 第 24 回 分子寄生虫学ワークショップ / 第 14 回 分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会 2016 年 8 月 21 日-8 月 24 日 帯広畜産大学・原虫病研究センター PK ホール 「肝内型マラリア原虫の増殖分子メカニズムの解明」 案浦 健、荒木 球沙、Franke-Fayard BM、Janse CJ、川合 覚、Khan SM、Heussler VT、野崎 智義

- 6). 第 57 回日本熱帯医学会大会において「シンポジウム 2: 熱帯医学研究の基礎からのアプローチ」にてシンポジストとして成果発表 2016 年 11 月 5 日-6 日 : 一橋大学 一橋講堂(東京都千代田区一ツ橋)「肝内型マラリア原虫- 宿主間“ 闘ぎ合い” 分子メカニズムの解明; Insight into the molecular interplay between host and Plasmodium liver-stage parasites: a fight for supremacy」案浦 健, 荒木 球沙, Franke-Fayard BM, Janse CJ, 川合 覚, Khan SM, Heussler VT, 野崎 智義
- 7). 第 12 回 霊長類医科学フォーラム 2016 年 11 月 18 日 つくば市の文部科学省研究交流センター「肝内型マラリア原虫の休眠・増殖分子メカニズムの解明」案浦 健, 荒木 球沙, Franke-Fayard BM, Janse CJ, 川合 覚, Khan SM, Heussler VT, 野崎 智義
- 8). バイオロジクスフォーラム 第 14 回 学術集会 2017 年 1 月 12 日 文京シビックホール 小ホール「マラリア原虫弱毒生ワクチン開発の現状と展望」案浦 健
- 9). 第 90 回 日本細菌学会 2017 年 3 月 19 日-21 日: 仙台国際センター展示棟 にてシンポジウム指定演題として発表「肝内型マラリア原虫の休眠・増殖分子メカニズムの解明」案浦 健, 荒木 球沙, Franke-Fayard Blandine M., Janse Chris J., 川合 覚, Khan Shahid M., Heussler Volker T., 野崎 智義
- 10). 26th Annual Molecular Parasitology/Vector Biology Symposium 2015 年 4 月 28 日-4 月 29 日 アメリカ・ジョージア州・アセズ(ジョージア大学)「New members of the Plasmodium 6-Cys family-related proteins have distinct and critical roles in liver stage development」Annoura T, van Schaijk BC, Ploemen IH, Sajid M, Lin JW, Vos MW, Dinmohamed AG, Inaoka DK, Rijpma SR, van Gemert GJ, Chevalley-Maurel S, Kiełbasa SM, Scheltinga F, Franke-Fayard B, Klop O, Hermsen CC, Kita K, Gego A, Franetich JF, Mazier D, Nozaki T, Hoffman SL, Janse CJ, Sauerwein RW, Khan SM.
- 11). 第 23 回分子寄生虫学ワークショップ / 第 13 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会 2015 年 8 月 30 日-9 月 2 日 帯広畜産大学・原虫病研究センター PK ホール「肝内型マラリア原虫と宿主の“闘ぎ合い”生物学の解明にむけて・・・」案浦 健, 荒木 球沙, Franke-Fayard BM, Janse CJ, 浅井 史敏, 川合 覚, Khan SM, Heussler VT, 野崎 智義
- 12). 第 9 回細菌学若手コロッセウム 2015 年 11 月 23 日-11 月 25 日 KKR ホテル敬天閣「細胞内・寄生原虫による“宿主ハイジャック生物学”の解明」案浦 健, 荒木 球沙, Franke-Fayard BM, Janse CJ, 浅井 史敏, 川合 覚, Khan SM, Heussler VT, 野崎 智義
- 13). 2nd International Symposium Matryoshka-type Evolution of Eukaryotic Cells 2015 年 10 月 1 日-10 月 2 日 筑波大学 大学会館「New member of the Plasmodium 6-Cys family B9 have distinct and critical roles in liver stage development」Annoura T, van Schaijk BC, Ploemen IH, Sajid M, Lin JW, Vos MW, Dinmohamed AG, Inaoka DK, Rijpma SR, van Gemert GJ, Chevalley-Maurel S, Kiełbasa SM, Scheltinga F, Franke-Fayard B, Klop O, Hermsen CC, Kita K, Gego A, Franetich JF, Mazier D, Nozaki T, Hoffman SL, Janse CJ, Sauerwein RW, Khan SM.

14). BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会)2015年11月30日-12月4日 神戸ポートピアホテル、他「肝内型マラリア原虫-宿主間“闘ぎ合い”分子メカニズムの解明」
案浦 健, 荒木 球沙, Franke-Fayard BM, Janse CJ, 浅井 史敏, Khan SM, Heussler VT, 野崎 智義

〔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

案浦 健 (ANNOURA TAKESHI)
国立感染症研究所・寄生動物部・主任研究官
研究者番号：90407239

(2)研究分担者

佐々木 年則 (SASAKI TOSHINORI)
国立感染症研究所・昆虫医科学部・主任研究官
研究者番号：10300930