

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15119

研究課題名(和文) ガメトサイト期におけるマラリア原虫のエネルギー蓄積メカニズムの解析

研究課題名(英文) Energy storing mechanism in Plasmodium falciparum gametocytes

研究代表者

徳外 富由樹 (Tokumasu, Fuyuki)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任准教授

研究者番号：60733475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：この研究では、赤内期からガメトサイト移行する時、(1)マラリア原虫が細胞内に脂質膜と油滴状の中性脂質を栄養素として貯蔵すること、(2)より長い不飽和脂肪酸の含有率が増えていること、(3)不飽和脂肪酸を培地に加えるとガメトサイトの量が増えることを明らかにした。また(4)中性脂質分解産物であるグリセロール添加実験では、リン脂質にラベルされたグリセロール組み込まれており、グリセロール骨格の再利用が行われていることもわかった。これらの知見は、原虫が脂質の再利用と脂肪酸種を変化させることで蚊のステージにおける栄養環境と温度変化へ適応していることを示し、伝播抑制の観点から、将来の薬剤開発に役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this project, we found that (1) *Plasmodium falciparum* (a malaria parasite) stores lipids, membranes and neutral lipids in cytoplasm as an energy source, (2) fractions of long unsaturated fatty acids increased, and (3) unsaturated fatty acid supplemented to the culture media facilitated gametocytogenesis. In addition, glycerol, that is a metabolite of neutral lipids, added to the culture media was used as a glycerol back-bone of phospholipids, indicating that glycerol is 're-cycled' for phospholipid synthesis.

These data suggest that *P. falciparum* adapts to mosquito environment with low nutrients and temperature by adjusting fatty acid species and recycling stored lipids. These findings could be applied to future research to discover a candidate for transmission blocking agent.

研究分野：マラリア感染赤血球および脂質膜の生物物理

キーワード：マラリア 脂質代謝 脂質膜 エネルギー再利用 赤血球

1. 研究開始当初の背景

マラリアは蚊によって媒介され、アフリカや東南アジア諸国などで毎年約50万人近くの死者を出す深刻な感染症であり、日本や西洋諸国では旅行者による輸入マラリアも問題となっている。決定的なワクチンがなく、治療目的の抗マラリア薬の使用が一般的な処置であるにもかかわらず、マラリア原虫は薬剤耐性の獲得スピードが大変速く、薬剤の開発→耐性の獲得というサイクルが繰り返されてきた。最新の抗マラリア薬であるアルテミシンに対しても耐性の獲得が確認されたため、今後のマラリア研究ではこのサイクルに依存しない新しい対抗策が必要となっている。この目的を達成できる可能性の一つは、原虫が有性生殖期に移るガメトサイト(血液中)の発生期にあると考えられ、蚊に取り込まれた後のステージをターゲットにしたトランスミッションブロッキングの技術(薬剤)開発が期待されている。この時期は細胞形状と代謝が大きく変化する。生物学的サイクルの存在しない(一方向への分化)このステージを攻略できれば有効的な抗マラリア対策の発展が期待できる。

2. 研究の目的

ガメトサイトは、ヒトから蚊への宿主移行にともって大きな環境変化(温度と影響環境)にさらされる。蚊の虫体内では、ヒト赤内ステージのように十分な栄養環境にないにもかかわらず、Exflagellation(鞭毛放出)やオーキーネートステージのように活発な分化をみせる。また脂質を体内に蓄積する傾向があり、この生物学的意味と蚊の体内での生存能力との関係ははっきりと解明されていない。本研究では、蓄積脂質が代謝系に消費(備蓄エネルギーの再利用)されるという仮説を脂質代謝の面から検証することにより、ヒトから蚊への宿主移行にともなう環境変化に適応する、マラリア原虫の分子的適応システムを明らかにする。

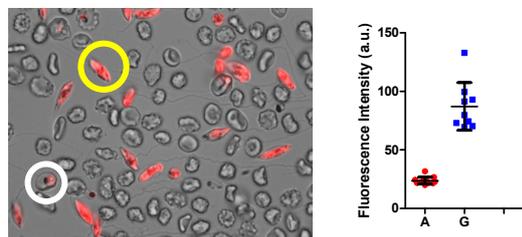
3. 研究の方法

本研究では、ガメトサイト期の脂質代謝を明らかにするため、(1)脂質膜の生成・蓄積、(2)リン脂質プロファイルの変化、そして(3)蓄積脂質の代謝物であるGlycerolの追跡を行った。脂質の蓄積には、Di-4ANEPPDHQ(脂質一般・脂質膜)、LipidTOX(中性脂質)脂質蛍光アナログを用いて、脂質膜と中性脂質の局在と蓄積量を蛍光顕微鏡で可視化・解析し、リン脂質プロファイルは、回収した原虫からMtOHで抽出した脂質サンプルを液体クロマトグラフィー/質量分析計(LC-MS/MS)を用いて解析した。またGlycerol代謝物は、重水素または¹³CラベルされたGlycerolを培養液に加え、

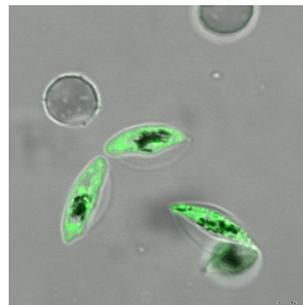
LC-MS/MS, GC-MSを用いて、Glycerol骨格がどのように再利用されていたかを脂質合成とエネルギー代謝の両面から調べた。データ解析にはこれらの計測結果をもとに多変量解析も含めて多角的な視点からの評価も行った。また代謝アクティビティに関しては、ハイパースペクトルイメージングによるHemoglobin濃度の解析(原虫がどの程度Hbを消費するか)を行った。

4. 研究成果

(1) 蛍光アナログによる脂質蓄積のモニタリング: 無性生殖期である赤内型ステージと、そこから分化したガメトサイトで比較したところ、ガメトサイトではDi-4による一般的な脂質標識のみならず、中性脂質(トリグリセリドなどに代表される)の蓄積も多く見られた(下図参照)。



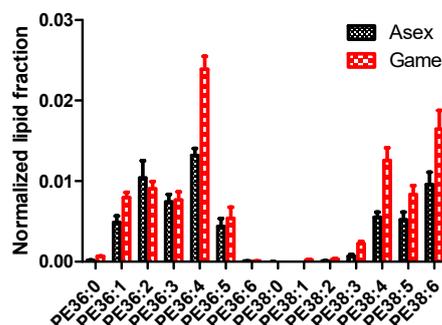
Di-4 ANEPPDHQ 染色 (黄色: Gametocyte 白: Asexual)



LipidToxによる中性脂質解析

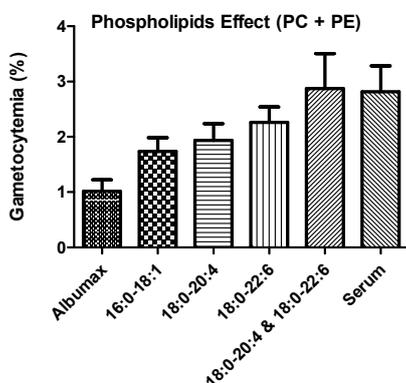
これら結果はガメトサイトに多くの脂質が蓄積されることを示しており、ステージ移行にともなって脂質代謝の変化も発生していることが確認できた。

(2) ガメトサイトにおける不飽和脂肪酸の増加: ガメトサイト期にどのような脂質が増加するかを質量分析計を用いてリン脂質プロファイル、中性脂質プロファイルを脂肪酸種によって比較した。リン脂質44種(PCとPE)、中性脂質9種の主要分子の比較にお



いて、無性生殖期では短鎖飽和脂肪酸を持つものが多く（上図に PE での比較を示す）、ガメトサイトでは長鎖かつ不飽和脂肪酸をもつ脂質が増えていることが確認できた。特に DHA やアラキドン酸などの多価不飽和脂肪酸を持つものの増加が検出できたのは大変興味深い。多変量解析も行っており、無性生殖期と Gametocyte では異なるプロファイルであることもわかった。

(3) 不飽和脂肪酸増加のメカニズム
マラリア原虫は脂肪酸合成経路が存在するにもかかわらず、脂質の多くを外環境から取り込んでいる。また無性生殖期の培養に使用される Albumax (アルブミン添加剤) はガメトサイト培養に適さないため、不飽和脂肪酸が外部由来だという仮説をたて Albumax と血漿脂肪酸種の比較を行った。その結果、血清には Albumax より多くの DHA と AA が含まれており、この結果は正常なガメトサイト分化にこれら多価不飽和脂肪酸が必要である可能性を示している。この可能性を検証するため、Albumax の存在下で多価不飽和脂肪酸を添加した結果、DHA と AA の両方を添加したものは血漿で培養したものと同等レベルのガメトサイトミア (ガメトサイトの頻度) に到達した。この結果はガメトサイト分化に多価不飽和脂肪酸が必須であることが示されている。



(4) 蓄積脂質の再利用メカニズム：原虫の細胞質内には脂質が蓄積されており ((1) 参照)、どのように再利用されているかは不明であった。今回、そのメカニズムを解明するため、無性生殖期とガメトサイト培養に外部よりラベル付きグリセロール (重水素体、または 13C 体) を取り込ませ、原虫の増殖への影響と代謝物を調べた。グリセロールを加えた培養では、96 時間における感染率は、通常培養と比べて大きく増加しており、Glycerol Kinase の活性も上がっていた。一方、LC-MS/MS でラベル体の代謝物を検出した結果、各種リン脂質・中性脂質でラベル体が検出され、添加した脂肪酸が脂質合成に「再利用」されていることが確認できた。興味深いことに無性生殖期と Gametocyte では取り込む脂肪酸の種類が異なり、Gametocyte では不飽和脂肪酸の取り込み率 (一定時間内

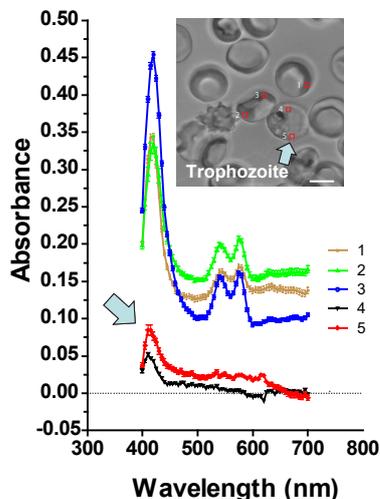
に取り込まれた量をラベル無しのもので割ったもの) が高く、脂質プロファイルで確認されたガメトサイトの不飽和脂肪酸の増加と一致しており、グリセロール骨格への脂肪酸取り込み効率の差が脂質プロファイルの変化に貢献している可能性が示唆された。

脂質以外の代謝物の検出には GC-MS を使用した。その結果、Glycerol は Glycerol Kinase によって Glycerol-3-phosphate (G3P) に代謝されており、リン脂質代謝経路に供給されていることが確認できた。ただし、DHAP や TCA 代謝産物ではシグナルが弱く、Glycerol からのエネルギー産生は少なくとも Asexual ステージでは顕著ではないと思われる。現在 Gametocyte でも解析中である。

(5) ハイパースペクトルイメージング (HIS) による Hemoglobin 濃度分布の解析

HIS の原理： 米国国立標準技術研究所との共同研究により、1 細胞内の分子 (当研究ではヘモグロビン) の分布を測定する技術を開発した。通常の顕微鏡に UV 側から赤外までの波長の光を順に照射・画像取得を繰り返し、照射光と透過光の差をヘモグロビンの吸収スペクトルとして画像化し、分子の細胞内分布を解析した。この技術により、生きたままの細胞内の分子分布を「標識無し」で可視化することができる。本研究では、この技術を用いことにより、ガメトサイト期ではヘモグロビンのほとんどを消費してしまっていることがわかり、代謝状態の特徴を知ることができた。

ガメトサイトでは赤血球内でのヘモグロビン吸光度が低い (矢印)



以上の研究結果をまとめた論文は、現在投稿準備中である。

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 1 件)

- ① Docosahexaenoic acid preserves visual function by maintaining correct disc morphology in retinal photoreceptor cells. Shindou H., Koso H, Sasaki J., Nakanishi H., Sagara H., Nakagawa KM., Takahashi Y., Hishikawa D., Iizuka-Hishikawa Y., Tokumasu F., Noguchi H., Watanabe S., Sasaki T., Shimizu T. (2017) J. of Biol. Chem. (in press)

[学会発表] (計 6 件)

- ① The 86th Annual Meeting of the Japanese Society of Parasitology in Sapporo, Japan (2017). Incorporation of Extracellular Glycerol into Phospholipids by *Plasmodium falciparum* was Associated with a Higher Parasite Growth Rate. F. Tokumasu, S. Tokuoka, T.Q. Tanaka, E. Balogun, D.K. Inaoka, F. Hamano, S. Kawazu, K. Kita, T. Shimizu (P-18)
- ② The 89th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society in Sendai, Japan (2016). Incorporation of extracellular glycerol by *Plasmodium falciparum* for phospholipid synthesis. F. Tokumasu, S. Tokuoka, T.Q. Tanaka, D.K. Inaoka, F. Hamano, S. Kawazu, K. Kita, T. Shimizu (1P-352 & 1T16-03)
- ③ The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity (2016) Critical roles of extracellular phospholipids in sexual differentiation of *Plasmodium falciparum*, T.Q. Tanaka, S.M. Tokuoka, D. Nakatani, F. Hamano, T.E. Wellems, S. Kawazu, K. Kita, T. Shimizu, F. Tokumasu (P-71).
- ④ The 85th Annual Meeting of the Japanese Society of Parasitology in Tokyo (2016) Phospholipid and Neutral Lipid Profile Analyses of *Plasmodium falciparum* gametocyte. T.Q. Tanaka, S. Tokuoka, D. Nakatani, S. Kawazu, K. Kita, T. Shimizu, F. Tokumasu (2A-05).
- ⑤ BMB2015 Biochemistry and Molecular Biology (Joint-meeting of the 88th Annual Meeting of the Japanese Biochemical

Society and the 38th Annual Meeting of the Japanese Society of Molecular Biology) in Kobe, Japan (2015) Unveiling Lipid Profile in *Plasmodium falciparum* Gametocytes. T.Q. Tanaka, S. Tokuoka, D. Nakatani, F. Hamano, S. Kawazu, K. Kita, T. Shimizu, F. Tokumasu (2P0371).

- ⑥ The 23rd Molecular parasitology workshop/The 14th Molecular parasitology and malaria research forum in Obihiro, Hkkaido, Japan (2015) Lipid profile study of *Plasmodium falciparum* gametocytes. T.Q. Tanaka, S. Tokuoka, D. Nakatani, F. Hamano, S. Kawazu, K. Kita, T. Shimizu, F. Tokumasu (10-3)

[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 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

徳舛 富由樹 (Tokumasu, Fuyuki)
東京大学・大学院医学系研究科・特任准教授
研究者番号：60733475

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()