

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08805

研究課題名（和文）マラリア原虫感染細胞における脂質リサイクリングと膜多様性構築機構の解析

研究課題名（英文）Analyses of lipid recycling and phospholipid variety induction mechanisms in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes

研究代表者

徳舛 富由樹（TOKUMASU, Fuyuki）

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：60733475

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、マラリア感染細胞における細胞環境バランスを解明するため、脂質分子のリサイクリングと膜多様性の構築システムに焦点を当てて解析した。感染細胞に重水素ラベル脂質を添加した活性実験では、パルミチン酸などの特定の脂質に対する特異性が確認された。しかし、リン脂質合成における脂肪酸の組み合わせにも特徴があり、同じ脂肪酸を添加しても作成されるリン脂質の種類が限定されることがわかった。また有性生殖期であるガメトサイトでは脂質取り込みのターンオーバーが速く、特にPEで顕著であった。これらの結果より、マラリア原虫がステージ特異的に脂質のプロファイルをコントロールしている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マラリアは宿主である赤血球内部で増殖し、赤血球内部に様々な膜構造を作り出しながら自身の成長に最適な環境を構築する。その過程の中でも脂質リモデリングは、脂質膜の特性や膜タンパク質の機能に重要な脂質分子のバラエティ構築を司っている。このプロセスを理解することはマラリアのコントロールに大きく寄与するが、マラリア原虫の脂質リモデリングに関わる分子メカニズムの多くは不明のままであった。本研究では脂質リモデリングに関与する分子を、ヒトにおける相同分子から同定し、特徴的な脂質取り込みパターンが存在することを示した。この研究データからマラリアが宿主内で独自の環境整備を行うメカニズムの一部がわかった。

研究成果の概要（英文）：This research project focused on the lipid remodeling system to understand mechanisms to establish an infected cell environment by Plasmodium parasites. By adding deuterated fatty acid to the cell culture, we found that parasites incorporate particular fatty acids including palmitic acid, but the combinations of two fatty acids are limited. In addition, we observed that gametocytes showed faster turnover of incorporating fatty acids. This quick remodeling of phospholipids was more evident in PE. These observations suggested that Plasmodium parasite controls stage-specific lipid profile.

研究分野：マラリア、脂質生物学、生物物理学

キーワード：マラリア 脂質代謝 脂質膜 リン脂質 リモデリング アシル転移酵素 リピドミクス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マラリアはマラリア原虫が蚊によって媒介され、ヒトの肝臓ステージを経た後、無性生殖期である赤血球ステージへと移行する。このステージにおいて、原虫は赤血球へ感染する際に赤血球膜を取り込む形(寄生胞膜)で侵入する。感染が成立すると、原虫は寄生胞膜に包まれた状態となり、細胞外からは赤血球膜と寄生胞膜という2重の膜構造に隠れた形で増殖する。この構造は、原虫がホストの免疫系の攻撃を避けることができるため好都合と考えられるが、同時に細胞外からの栄養分の取得や病原性を示す自身のタンパク質の発現には不都合である。このため、原虫は居住空間である赤血球の細胞質にタンパク質輸送のための膜構造(例: Maurer's Cleft)を作り出し、寄生胞膜自体にもタンパク質輸送機構を構築する。こうしてホスト細胞のリモデリングを行い最適な環境を作りだしている。こうした最適化は膜構造だけではなく、化学的・物理的な面にも及ぶことがわかった。我々はこれまでの研究で、感染細胞では(1)表面電位の変化、(2)膜タンパク質凝集、(3)界面活性剤への感受性、そして(4)細胞内コレステロールの濃度勾配の発生が起こることを確認した。特に(4)は、コレステロール生合成系を有しないマラリア原虫が増殖すると、赤血球膜⇒寄生胞膜⇒原虫膜の順にコレステロール濃度が減少し、完成細胞内での特殊な化学濃度勾配が形成されていることを示している。コレステロール濃度は膜の機械特性や物理化学特性、膜タンパク質の機能に直接影響するため、原虫の環境形成がより高度なものである可能性がある。一方、膜形成の主な分子であるリン脂質の細胞内分布とホストリモデリングとの関係に関してはほとんどわかっていない。膜の多様性はリン脂質の分子種の違い(アシル鎖の不飽和度、炭素数、そしてそれらの組み合わせ)によって主に決定され数千種類にも上る。個々にコレステロールの濃度分布が加わり、さらに複雑なものになる。ほ乳類の研究では、膜多様性は、臓器や組織ごとの構造や機能を決定づけたり、そこに発現するタンパク質の機能に関して重要な役割を担っていることがわかってきている。しかし、マラリア研究では脂質代謝そのものの研究が著しく遅れており、膜多様性の重要性は全く理解されていない。

2. 研究の目的

この研究では感染赤血球におけるリモデリングを通して、原虫が自身の環境を作り上げている要因として、脂質リサイクリングと膜多様性の重要性を解析する。脂質のリサイクリングプロセスは、すでに存在しているリン脂質がリパーゼによって切断されてリゾリン脂質になり、新たな脂肪酸を取り込み、別の脂肪酸の組み合わせを持ったリン脂質になることである。これは脂質リモデリングとも呼ばれ、膜の多様性において最も重要な反応である。本研究ではこの脂質リサイクリングによる膜多様性のメカニズムを解析し、関わる分子の機能を明らかにすることである。

3. 研究の方法

リモデリング酵素候補の発現と機能解析: ヒト・マウスで確認されているリゾリン脂質アシル転移酵素(リモデリング酵素)は約10種類同定されている。このうち、Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1(LPCAT1)の酵素活性中心の機能ドメイン配列をもとに、マラリア原虫におけるLPCAT1相同タンパクを探索した。その結果2つの候補遺伝子があり、機能ドメインの必須アミノ酸が保存されていることが判明した。我々はこの遺伝子をコムギ胚無細胞タンパク質発現系により発現し、膜分画を精製、その後リゾリン脂質(LPC)と脂肪酸を基質として加え、作成されたジアシルリン脂質を質量分析計で解析した。

重水素ラベルされた脂質の追跡: リン脂質の多様性を追跡するため、重水素ラベルされた脂肪酸またはグリセロールを原虫の培養に添加し、一定時間後脂質をメタノールで抽出し質量分析計でラベル化されたリン脂質種のプロファイルをとる。脂肪酸の取り込みでは主に脂質リモデリング、グリセロールへの取り込みではリン脂質の合成ターンオーバーを観察することができる。また¹³Cラベルされたグリセロールも培養に添加し、脂質合成系と解糖系における代謝への移行バランスも解析した。これらはすべて赤内型とガメトサイトステージで比較した。

過剰発現株での酵素活性測定と蛍光タンパク質でラベルされた酵素の局在解析: より詳細な酵素活性測定を行うため、候補遺伝子の過剰発現株を作成しその酵素活性を細胞レベルで測定した。また蛍光タンパク質であるDendraを付加したアシル転移酵素を強制発現させ、その局在とステージ依存性を解析した。

4. 研究成果

リモデリング酵素候補の発現と機能解析: ターゲット遺伝子であるPFAGPAT1(仮称)は418aaのタンパク質であり、3つの膜貫通領域が予想され、アシル転移酵素で一般的な4つの機能ドメイ

ンの重要なアミノ酸が保存されている。この遺伝子をコムギ胚発現系に最適化し、発現した結果、40kDaあたりのサイズが確認された（理論値は約49kDa）。このタンパク質から膜画分を精製し、ホスファチジルコリン（Phosphatidylcholine, PC）とホスファチジルエタノールアミン（Phosphatidylethanolamine, PE）に関してアシル転移活性を測定した。測定にはLPC16:0またはLPE17:1と脂肪酸-CoA（16:0, 18:1, 18:2, 20:4, 22:6）混合液をタンパクに加え37度で10分間反応させた。結果、すべての脂肪酸で活性が認められたが、16:0がもっとも多く取り入れられた（図1）。

細胞ベースでの活性測定、リン脂質追跡において、通常の脂肪酸-CoAでは赤血球からのバックグラウンド活性が大きく、原虫由来の反応が明確ではなかったため、CoAのない遊離脂肪酸を使用した。この実験では、原虫が取り込んだ脂肪酸を脂肪酸CoAにするためデータのS/N比を向上させることができる。オレイン酸やパルミチン酸、アラキドン酸など様々な鎖長や不飽和度をもつ脂肪酸を加え生成されたリン脂質を解析した結果、添加脂肪酸の種類に応じて特徴的な取り込みパターンがあるのがわかった。同じ脂肪酸でも取り込まれて作成される組み合わせで、可能なものと可能でないものが存在し、酵素活性における嗜好性または特異性が確認できた（図2）。

また重水素ラベルされたグリセロールを添加した実験では、無性生殖期と有性生殖期であるガメトサイト期で取り込みが発生したリン脂質の種類と取り込み比率が大きく異なっていることも判明した（図3）。このデータは、ガメトサイト期の方がグリセロール骨格への脂肪酸取り込み比率が大きく、その種類は不飽和脂肪酸が多い。これらの結果は、原虫がステージによって異なる環境に対応するために、作り出す脂質種をコントロールしている可能性を示している。また脂質プロファイル比較で見られるリン脂質種と中性脂質分子種の違いにも現れていると考えられる（図4）。

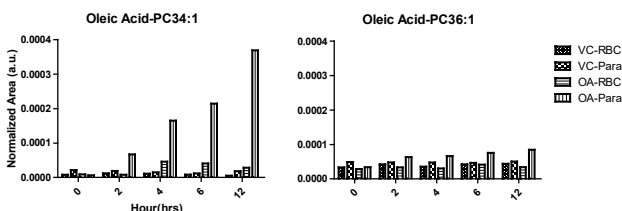


図2：オレイン酸はPC34:1には取り込まれるが、PC36:1には取り込まれない。

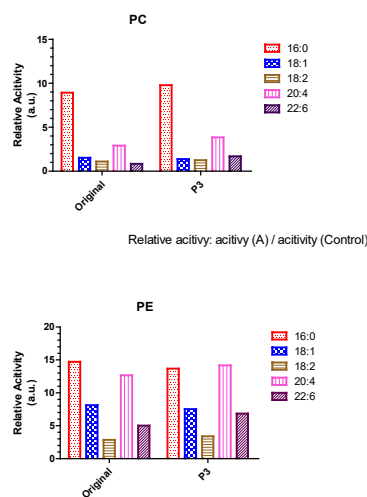


図1：コムギ胚無細胞系で発現させたPfAGPAT1の活性

嗜好性または特異性が確認できた

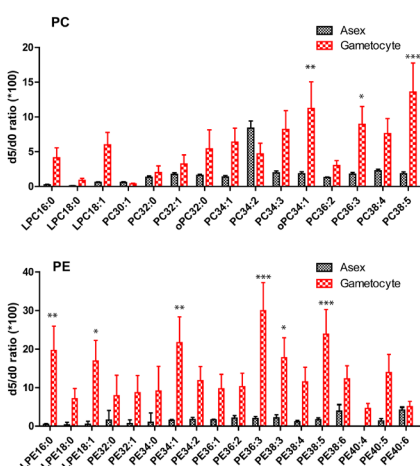


図3：d5 グリセロールが取り込まれた脂肪分子種

Tokumasu et al., Biology Open (2019) 8, bio042259

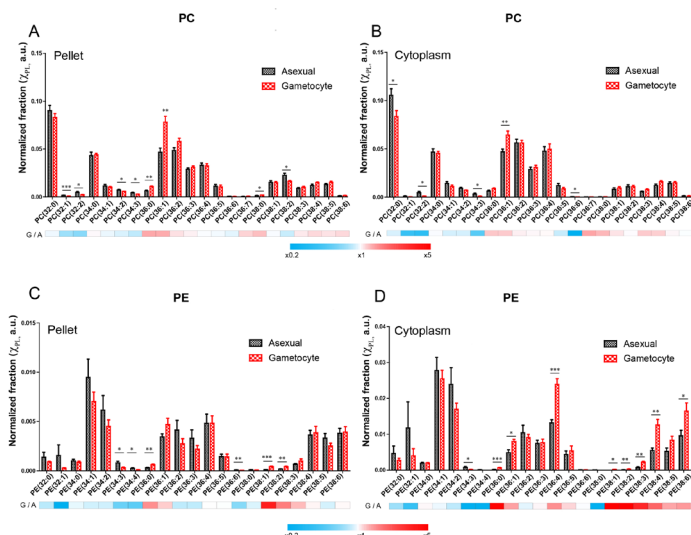


図4：赤内型無性生殖期の原虫とガメトサイト期におけるリン脂質プロファイルを比較した。それぞれ、粗分画し膜分画と細胞質分画にし、それぞれPCとPEで解析した。また、ガメトサイトでの脂質プロファイル（全体のリン脂質に対する各脂質の割合）の変化を見るため、Gametocyte/Asexualを算出し、その割合に依存した疑似カラーをつけた。このデータより、PCに比べてPEの不飽和脂肪酸の取り込みが多いことがわかった。

ガメトサイト期における脂質の要求性：ガメトサイトは通常培養に使用する Albumax (アルブミン添加剤) 入りの培地では分化せず、ヒト血清が添加された培地が必要である。この現象は以前より知られているが、その原因は不明であった。またガメトサイトへの分化に関わる分子メカニズムの多くも解明されておらず、特に細胞外因子は全く同定されていなかった。我々は Albumax でガメトサイトの分化を誘導できない原因を解明するため、ガスクロマトグラフィーを使用して2つの培地の脂肪酸組成を調べた。その結果、Albumax にはアラキドン酸やドコサヘキサエン酸(docosahexaenoic acid, DHA)などの多価不飽和脂肪酸が少ないことがわかった。これらの結果をもとに不足脂肪酸量を計算し Albumax に添加したところ、通常血清培地と同レベルまでガメトサイト量が増加した(図5)。この実験から、マラリアの伝播に非常に重要なステップであるガメトサイト分化に必要な、正に働く外部因子を初めて同定でき、かつ脂質が分化に重要であることを示すことができた。

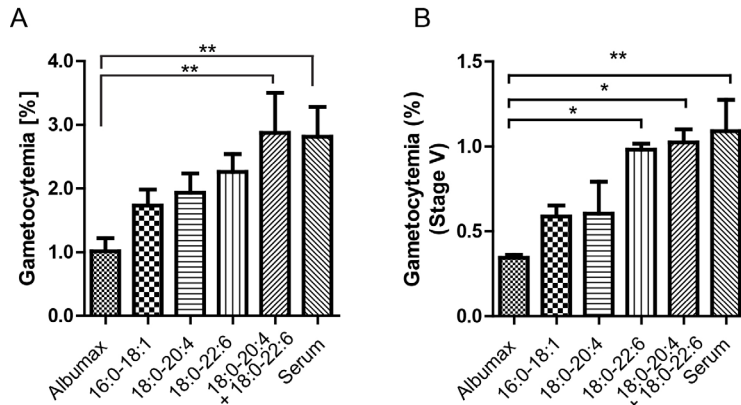


図5：添加脂質によるガメトサイト分化への影響。Albumax には 20:4 と 22:6 が少ないため、これらをリン脂質の形で培養に添加した。両方を添加した培養ではガメトサイトへの分化が血清培地と同レベルまで回復した。A：全ガメトサイト数、B：ステージVガメトサイト数。

これらのガメトサイトと無性生殖期における脂質プロファイルの変化と、ガメトサイト分化プロセスに必要な脂質に関する知見は Tokumasu et al., *Biology Open* (2019) 8, bio042259 に公表した。

過剰発現株での酵素活性測定と蛍光タンパク質でラベルされた酵素の局在解析：アシル転移酵素の細胞内での活性がどのようなものかを確認するため、PfAGPAT1の過剰発現株と過剰発現タンパク質に Dendra を付加した株を作成した。過剰発現した PfAGPAT1 の局在は、無

性生殖期では原虫の細胞質全体に局在しているが、ガメトサイト期では局在に偏りが生じていた(図6)。これらの結果は脂質関連酵素の発現パターンがステージによって変化している可能性を示している。一方、通常過剰発現株では脂質プロファイルの明らかな変化は認められていない。これに関しては、現在さらなる解析を継続中である。

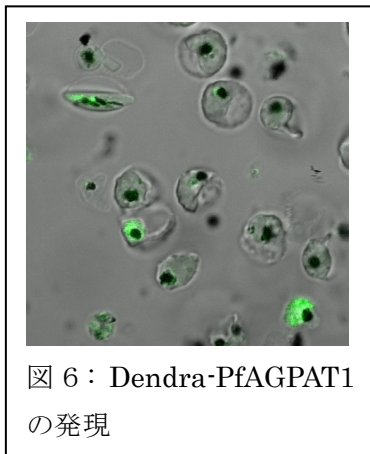


図6：Dendra-PfAGPAT1の発現

本研究では、脂肪酸のリサイクルとリン脂質への取り込みには特異的な制御があり、それは脂質分子種と原虫のステージ両方に依存することが明らかとなり、原虫の脂質代謝が増殖と分化に重要な働きをしていることがわかった。これらの結果は当初研究の目的と合致しているものである。

現在進行中の実験：過剰発現株での脂質プロファイルは大きな差が認められなかったため、現在コンディショナルノックアウト株の作成中である。この系は DiCre-LoxP システムを使い、ラパマイシンで目的のタンパク質を切断することができる。この原虫を使用し、目的の時間やステージにおいてノックアウトを発生させ、その脂質プロファイルやその他の表現系を解析する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tanaka Takeshi Q., Tokuoka Suzumi M., Nakatani Daichi, Hamano Fumie, Kawazu Shin-ichiro, Wellens Thomas E., Kita Kiyoshi, Shimizu Takao, Tokumasu Fuyuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Polyunsaturated fatty acids promote Plasmodium falciparum gametocytogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/bio.042259	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Shindou Hideo, Koso Hideto, Sasaki Junko, Nakanishi Hiroki, Sagara Hiroshi, Nakagawa Koh M., Takahashi Yoshikazu, Hishikawa Daisuke, Iizuka-Hishikawa Yoshiko, Tokumasu Fuyuki, Noguchi Hiroshi, Watanabe Sumiko, Sasaki Takehiko, Shimizu Takao	4. 巻 292
2. 論文標題 Docosahexaenoic acid preserves visual function by maintaining correct disc morphology in retinal photoreceptor cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 12054~12064
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.M117.790568	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 磯尾直之、小松谷啓介、徳舛富由樹、原眞純、四柳宏、北潔
2. 発表標題 赤内型マラリア原虫は宿主血小板由来エクソソームを介して脂質受容体CD36に供給され、増殖に必要なステロールを宿主LDL から取り込む
3. 学会等名 第89回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Santos Herbert J., Tokumasu Fuyuki, Tokuoka Suzumi M., Hamano Fumie, Nozaki Tomoyoshi
2. 発表標題 Elucidation of biosynthesis of very long chain fatty acids in the protozoan pathogen Entamoeba histolytica
3. 学会等名 第88回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石崎隆弘、麻田正二、徳舛富由樹、坂口美亜子、矢幡一英、金子修
2. 発表標題 ネズミマラリア原虫Plasmodium yoeliiのdiacylglycerol kinase (DAGKp)は赤血球侵入関連分子の表面分泌に関わる
3. 学会等名 第27回分子寄生虫学ワークショップ / 第17回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 徳舛富由樹
2. 発表標題 マラリア原虫感染細胞の脂質variationに関わる代謝系の解析
3. 学会等名 第27回分子寄生虫学ワークショップ / 第17回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fuyuki Tokumasu
2. 発表標題 Importance of Lipid Biology in Plasmodium falciparum development and differentiation
3. 学会等名 The 18th Awaji International Forum on Infection and Immunity (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fuyuki Tokumasu, Suzumi M. Tokuoka, Hideo Shindou, Eizo Takashima, Takao Shimizu
2. 発表標題 Characterizations of Lysophospholipid Acyltransferase in Plasmodium falciparum
3. 学会等名 第87回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akinori Kogure, Yoshikazu Takahashi, Fuyuki Tokumasu, Hideo Shindou, Takao Shimizu
2. 発表標題 Composition-dependent alterations in thickness and physical properties of lipid bilayer film revealed by frequency modulation atomic force microscopy (FM-AFM)
3. 学会等名 The 62nd Annual Meeting of Biophysical Society at San Francisco, CA, USA (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fuyuki Tokumasu, Suzumi M. Tokuoka, Hideo Shindou, Shigeo Yoshinari, Bernard N. Kanoi, Eizo Takashima, Takao Shimizu
2. 発表標題 Characterizations of Lysophospholipid Acyltransferase in Plasmodium falciparum
3. 学会等名 第26回分子寄生虫学ワークショップ / 第16回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 植松真章、徳舩富由樹、進藤英雄	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 9 (310)
3. 書名 脂質解析ハンドブック (編集: 新井洋由、清水孝雄、横山信治)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	徳岡 涼美 (TOKUOKA Suzumi) (60511376)	東京大学・大学院医学系研究科・特任助教 (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	早川 枝李 (HAYAKAWA Eri) (00383753)	自治医科大学・医学部・助教 (32202)	