

平成 21 年 4 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18406009
 研究課題名（和文） 三日熱マラリア原虫感染赤血球のロゼット形成と病原性
 研究課題名（英文） Rosetting of infected erythrocyte and virulence of *Vivax malaria*

研究代表者
 鳥居 本美 (TORII MOTOMI)
 愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：20164072

研究成果の概要：

ヒトに感染する三日熱マラリア原虫の感染赤血球が非感染赤血球に接着する現象（ロゼット形成）の起因となる原虫分子を明らかにし、病原性との関連を解析する研究である。マラリア流行地にてロゼット形成試験を行い、それと関連する原虫接着分子候補を検討したが、明らかなものは見られなかった。一方、マラリア患者体内には接着分子候補の一つに対する抗体があること、また、この分子にはヒト免疫によると思われる正の淘汰圧がかかっていることを明らかにできた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2007 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2008 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：マラリア、感染症、三日熱マラリア原虫、ロゼット形成

1. 研究開始当初の背景

マラリアは世界中で年間 2-3 億人の感染者、150 万人の死者を出す重大な感染症である。最も重篤な症状を起こす熱帯熱マラリア原虫に比べて、死亡率が高くない三日熱マラリアは、優先度が低く見られがちであるが、他の感染症との合併による間接的な死亡や体力低下に伴った生産性の低下による経済的損失が多めで、東南アジアを中心に非常に問

題となっている。マラリア原虫はヒト体内では赤血球内で増殖するが、熱帯熱マラリア原虫は感染した赤血球の表面に原虫由来の接着物質を発現し、脳の末梢血管内壁に接着することで重症化し、また、未感染の正常赤血球にも接着し（ロゼット形成）、病原性を高める。一方、三日熱マラリア原虫を含む、他のサルやネズミに感染するマラリア原虫種もロゼット形成を起こすため、ロゼット形成はマラリア原虫の哺乳類宿主体内で重要な

役割を果たしていることが予想される。ロゼット形成に関与する三日熱マラリア原虫のリガンドは、ゲノム上に約300のメンバーを持つ”Vir”と呼ばれるタンパク質や”Vir”と非常に近い構造をもち、ゲノム上に2つのメンバーがある”PvSTP”と呼ばれるタンパク質と予想されている。

2. 研究の目的

(1) 三日熱マラリア原虫のロゼット形成に特定の型の”Vir”や”PvSTP”が関与しているのか、それが発熱などの症状と相関を示すのかを明らかにする。

(2) また、ヒト血清中には、PvSTPに対する抗体が存在するのか明らかにする。

(3) PvSTPは多型を示すのかについても検討する。

3. 研究の方法

(1) 約300のメンバーがあるVirのうち、どのような型が転写発現されているのかを、タイの流行地で得た三日熱マラリア原虫からRT-PCR増幅し、塩基配列を決定することで明らかにする。また、ロゼット形成アッセイを行った後に、RNAを抽出し、関与する特定の型のVirがあるかどうかを検討する。さらに、特定の型のVirが三日熱マラリア原虫の病原性と関連するかどうかを、患者から得た三日熱マラリア原虫で発現しているVirの型と患者の症状（発熱の有無や原虫感染率など）を比較することで、明らかにする。

(2) PvSTP1とPvSTP2の細胞内外の領域について、コムギ胚芽無細胞タンパク質発現系を用いて組換えタンパク質を作成する。発現した組換えタンパク質を抗原として、三日熱マラリア感染患者の血清試料が反応するかどうかELISA法にて検討する。コントロールにマラリア感染歴のない患者血清を使用する。

(3) 三日熱マラリア感染患者から、一定の時期の間に、三日熱マラリア原虫のゲノムDNAを抽出し、PvSTPの塩基配列を決定し、多型を比較する。集団遺伝学的な解析により正の淘汰圧の検出を試みる。正の淘汰圧が検出された場合、それはヒト免疫による可能性が高いと考える。

4. 研究成果

(1) 3年間に渡り、マラリア流行地にて、共同研究者と三日熱マラリア原虫のロゼット形成アッセイを行い、その試料からDNAおよびRNAを抽出し、”Vir”/”PvSTP”の発現

に関する解析を行ったが、ロゼット形成と関連する明らかな型は、本研究では明らかにできなかった。ロゼット形成はマラリア原虫の種を越えて見られる現象であり（図1）、宿主体内において原虫の生存にとって重要な役割を果たして居ると思われる。熱帯熱マラリア原虫で判明している原虫接着分子PfEMP1は三日熱マラリア原虫を含めた他のマラリア原虫種には存在せず、マラリア原虫感染赤血球表面に発現していると考えられているVIRやPvSTPが三日熱マラリア原虫における強い原虫接着分子候補である（図2）。熱帯熱マラリア原虫感染赤血球表面に発現しているSURFINと構造が似ていることも、このような視点を支持する（図3）。ゆえに、現在までの情報の蓄積により、将来さらに試料を増やして解析をする基盤を整えることができたと考えている。

図1



図2

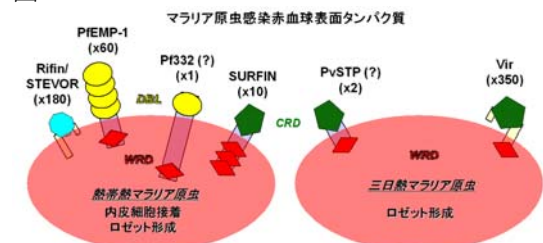
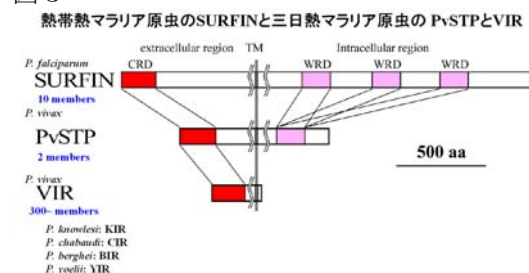


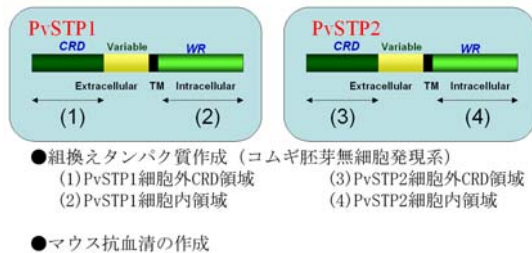
図3



(2) 3年次から300のメンバーがあり、個々の遺伝子座ごとの解析が困難なVirに比して、PvSTPが2つのメンバー（PvSTP1とPvSTP2）しかゲノム上にないことに着目し、PvSTPに焦点を絞って解析を進めた。まず、PvSTP1とPvSTP2の細胞内・細胞外領域の組換えタンパク質をコムギ胚芽無細胞タンパク質発現系

により作成することができた (図 4)。細胞外 CRD 領域は凝集しがちであったが、発現や抽出の条件を調整することで十分量のタンパク質を回収することに成功した。

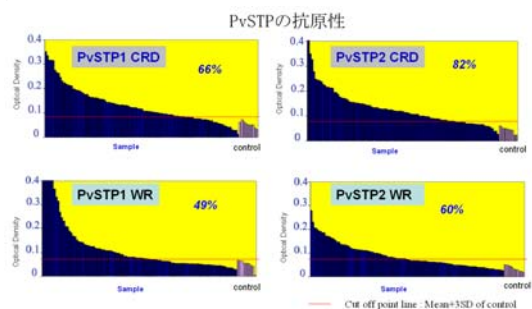
図 4



これらの組換えタンパク質をマウスの腹腔内に接種し、抗血清を得て、接種した組換えタンパク質に対する反応性を見たところ、4つの組換えタンパク質のすべてに対して、抗体ができていたことが確認できた。マalaria感染患者由来の三日熱マalaria原虫タンパク質に対して反応性をウェスタン解析にて検討したところ、PvSTP2細胞外CRD領域に対する抗血清のみが反応性を示した。間接蛍光抗体法による局在解析では、この血清は三日熱マalaria原虫のおそらく細胞質内および感染赤血球の細胞質内あるいは赤血球表面に局在するようなパターンを示した。このことは、すくなくとも PvSTP2細胞外CRD領域の組換えタンパク質は原虫タンパク質に反応する抗体を誘導することを示唆し、作成した組換えタンパク質の形状が、原虫タンパク質に似ている可能性が高いことを示唆する。

タイの流行地でロゼット形成アッセイを行った患者から同時に得た血清を用いてELISAにてこれらの組換えタンパク質に対する反応性を確認したところ、PvSTP1とPvSTP2の細胞外CRD領域に対しては66-82%が反応し、細胞内WR領域に対しては49-60%が反応した。PvSTP1とPvSTP2に対する反応性に相関があるが、特異的な反応も見られたため、どちらのタンパク質に対しても、三日熱マalaria患者には抗体ができていたことがわかった (図 5)。

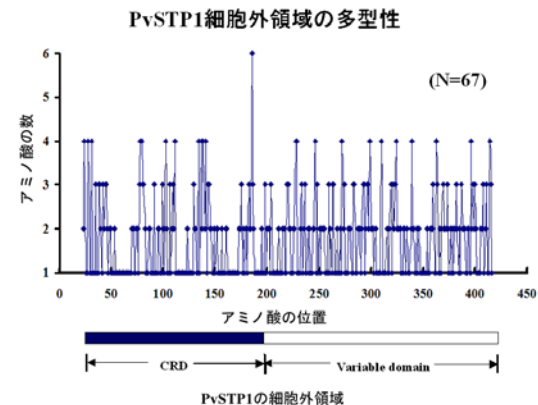
図 5



この抗体がロゼット形成阻害活性を有するかどうかの実験計画を策定した。

(3)三日熱マalaria原虫 DNA から合計 67 の PvSTP1 の塩基配列を決定し、解析を加えた。その結果、この遺伝子座が非常に多型であることがわかった (図 6)。集団遺伝学的解析の結果、正の淘汰圧がかかっていることを明らかにした。

図 6



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)

[学会発表] (計 1 件)

- Sungkapong T, Culleton R, Yahata K, Tsuboi T, Torii M, Sattabongkot J, Kaneko O, Chotivanch K. "Characterization of *Plasmodium vivax* subtelomeric transmembrane protein (PvSTP), a homolog of *P. falciparum* SURFIN" 第 78 回日本寄生虫学会大会、東京 (2009. Mar. 27-28)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳥居 本美 (TORII MOTOMI)
 愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：20164072

(2) 研究分担者

橘 真由美 (TACHIBANA MAYUMI)
 愛媛大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号：00301325

金子 修(KANEKO OSAMU) (H18~H19)
長崎大学・熱帯医学研究所・教授
研究者番号：50325370

(3) 連携研究者