

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15138

研究課題名（和文）新規マラリアワクチン候補LSA3の赤血球侵入時における機能解析

研究課題名（英文）Understanding the potential role of LSA3, a novel malaria vaccine candidate, during erythrocyte invasion by Plasmodium falciparum

研究代表者

森田 将之（Morita, Masayuki）

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・講師

研究者番号：60709632

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：マラリアワクチン候補タンパク質LSA3の遺伝子欠損によって赤血球期マラリア原虫の増殖率が低下した。さらに、赤血球侵入時のタイムラプスイメージングから、LSA3遺伝子欠損原虫は野生型原虫に比べて侵入に遅延が起きていることが示唆された。また、内在性LSA3は赤血球侵入後期に分泌され侵入中メロゾイトの後部に局在していた。本研究課題によって、LSA3はマラリア原虫の赤血球侵入の完了に関わる分子である可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マラリア原虫の赤血球侵入はワクチンや治療薬のターゲットとして精力的に研究が進められているが、その侵入メカニズムには未解明な部分が多い。マラリア原虫は赤血球侵入のために緻密に制御されたステップを踏んでいるが、その中でもLSA3は侵入後期に関わることが示唆された。今後、LSA3の機能解析を進めることでマラリア原虫の赤血球侵入の分子メカニズムの一端を明らかにでき、マラリアワクチン開発に貢献できると考える

研究成果の概要（英文）：Genetic deletion of the malaria vaccine candidate protein LSA3 reduced the growth rate of the blood-stage Plasmodium falciparum parasites. Time-lapse imaging during red blood cell invasion suggested that the LSA3 deficient parasite had a delayed invasion compared to the wild-type parasite. In addition, endogenous LSA3 was secreted at late stages of red blood cell invasion and localized at the posterior part of the invading merozoite. These findings suggest that LSA3 plays important roles in the late stages of red blood cell invasion by Plasmodium falciparum.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア 寄生虫 ワクチン LSA3 赤血球侵入

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マラリアは熱帯・亜熱帯地域を中心として毎年 2 億人以上が罹患し、40 万人以上が死に至る重篤な寄生虫感染症である。マラリア原虫がヒト体内で赤血球への侵入と破壊を繰り返すということがマラリア症状を引き起こす原因であり、発熱や貧血が引き起こされて最終的にはヒトを死に至らしめる。その治療として抗マラリア薬の投与が有効であるが、第一選択薬であるアルテミシニン系薬剤に対する耐性マラリア原虫が現れつつあり、大きな問題となっている。マラリア対策の切り札としてワクチンの開発が挙げられるが、未だ実用されたマラリアワクチンは無い。そこで代表者は、これまで免疫スクリーニングによりマラリアゲノム網羅的な赤血球期マラリアワクチン候補の探索を行ってきた。その結果、Liver Stage Antigen 3 (LSA3) に対するヒト抗体が培養熱帯熱マラリア原虫の赤血球侵入を阻害することを明らかにし、LSA3 を新規赤血球侵入阻止マラリアワクチン候補として報告した。しかし、LSA3 はその分子機能は不明であるため、代表者は LSA3 ワクチンの開発に向けて、まず LSA3 の赤血球期における機能の解析が必須と考えた。

2. 研究の目的

これまで長年研究されてきた赤血球期マラリアワクチン候補は、いずれも第 2 相臨床試験において効果が無く開発が断念された。これら候補抗原が抱える問題点の一つは、分子機能が未解明なため、どのようにして高いワクチン効果を得るか手がかりがないことである。そこで代表者は、LSA3 の機能を明らかにするため、これまでに LSA3 遺伝子欠損マラリア原虫 (Δ LSA3) を作製している。本研究課題では Δ LSA3 の赤血球期の表現型の解析および LSA3 の時空間的な動態を解析することで、LSA3 が赤血球侵入時にどのように機能するか明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Δ LSA3 の増殖率の解析

本研究課題ではまず、野生型原虫 NF54 株と Δ LSA3 の増殖率を比較することによる LSA3 遺伝子欠損の原虫への影響を解析した。具体的には、NF54 株および Δ LSA3 をリング期に同調し、その後 48 時間毎に感染率を測定し、両者を比較した。感染率が高くなりすぎて培養条件が悪化することを避けるため、48 時間毎に両原虫を同倍率で希釈した。

(2) Δ LSA3 の赤血球侵入時タイムラプスイメージング

抗 LSA3 抗体が熱帯熱マラリア原虫の赤血球侵入阻害活性を示すことから、LSA3 は赤血球侵入時に機能すると考えられる。そのため、LSA3 遺伝子を欠損したことによる赤血球侵入への影響を明らかにするため、成熟シゾント原虫を精製し、メロゾイトの赤血球侵入をタイムラプスイメージングによってリアルタイムで観察した。

(3) 赤血球侵入時の LSA3 の局在解析

熱帯熱マラリア原虫の赤血球侵入時に LSA3 がいつでもどこへ分泌されるか時空間的な局在の動きを明らかにするために解析を行った。LSA3 の C 末端に GFP を融合させた遺伝子組換え原虫を用いた蛍光リアルタイムイメージングおよび野生型原虫の赤血球侵入中の固定サンプルを用いた免疫蛍光観察を行った。

4. 研究成果

(1) Δ LSA3 の増殖率の解析

リング期に同調して感染率の測定を開始してから 144 時間後に Δ LSA3 の感染率が NF54 株に比べて有意に低くなった。感染率の測定開始から 240 時間後には Δ LSA3 の感染率は NF54 株の約 1/2 となった。このことから、LSA3 遺伝子の欠損によって熱帯熱マラリア原虫の増殖率がわずかに低下することが分かった。

(2) Δ LSA3 の赤血球侵入時タイムラプスイメージング

マラリア原虫メロゾイトは赤血球へ侵入する際、まず赤血球表面へ接着する。その後、赤血球膜を変形させながら自身の方向を変えて先端部と赤血球膜の間に強い結合を形成する。その後、赤血球内部へ侵入を開始する。侵入の途中から赤血球膜が棘状に変化するエキノサイトーシスが起こる。棘状に変化した赤血球膜の形が正常に戻ると侵入が完了した原虫を赤血球内部に観察できる。メロゾイトは通常この侵入過程を 10 分以内に完了させる。タイムラプスイメージングによってメロゾイトが赤血球膜を変形させてから 15 分間観察したところ、NF54 株では 70% が上記の通り赤血球への侵入を完了させた。しかし、 Δ LSA3 では 30% しか侵入を完了させられなかった。本実験では 15 分以降は培養条件の悪化によりタイムラプスイメージングで侵入観察を行えなかったが、エキノサイトーシスが終わり赤血球膜が正常な形に戻った後に Δ LSA3 メロゾイトの一部が露出していたことが観察された。研究成果 (1) で LSA3 遺伝子の欠損による原虫増殖への影響はわずかであると示されたことから、ほとんどの Δ LSA3 メロゾイトは最終的に

赤血球への侵入を完了させられると考えられる。そのため、 Δ LSA3 は NF54 株に比べて赤血球侵入に長い時間がかかる、つまり侵入遅延が起こっていることが示唆された。

(3) 赤血球侵入時の LSA3 の局在解析

LSA3 の C 末端に GFP を融合させた遺伝子組換え原虫を用いて赤血球侵入時の LSA3-GFP の蛍光リアルタイムイメージングを試みた。しかし、励起光照射下で赤血球への侵入を成功させたマラリア原虫は観察できなかった。そこで、野生型マラリア原虫の赤血球侵入中の固定サンプルを調製し、内在性 LSA3 の局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、赤血球侵入の初期段階では LSA3 はまだ分泌されておらず原虫の内部に観察されたが、後期段階になると分泌されて原虫の後部に局在していることが分かった。さらに、原虫の後部に分泌された LSA3 は外部環境へ露出しており、外部から抗体がアクセス可能であることが分かった。

本研究課題において、LSA3 の遺伝子欠損によって侵入遅延が起こったこと、LSA3 は赤血球侵入中の熱帯熱マラリア原虫後部に局在したことから、特に赤血球侵入の完了に関わる分子である可能性が考えられる。LSA3 の機能解析を進めることで熱帯熱マラリア原虫の赤血球侵入の分子メカニズムの一端を明らかにでき、マラリアワクチン開発に貢献できると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 森田将之、Charlie Jennison、石野智子、Matthew O' Neill, Justin A. Boddey、高島英造、坪井敬文
2. 発表標題 マラリアメロゾイトの赤血球侵入時におけるデンスグラニユール分子LSA3の機能解析
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 森田将之、Charlie Jennison、石野智子、Justin A. Boddey、高島英造、坪井敬文
2. 発表標題 赤血球侵入イメージングによるマラリアワクチン候補LSA3の機能解析
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・マラリアフォーラム合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Morita M, Jennison C, Ishino T, O' Neill MT, Boddey JA, Takashima E, Tsuboi T
2. 発表標題 Characterization of LSA3, a blood-stage malaria vaccine candidate, during erythrocyte invasion of a malaria merozoite.
3. 学会等名 The 17th Protein Island Matsuyama (PIM) International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Morita M, Jennison C, Ishino T, O' Neill MT, Boddey JA, Takashima E, Tsuboi T
2. 発表標題 Characterization and imaging analysis of a blood-stage vaccine candidate, PfLSA3, during erythrocyte invasion of malaria merozoites.
3. 学会等名 ASTMH 68th annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Morita M, Jennison C, Ishino T, O'Neill MT, Boddey JA, Takashima E, Tsuboi T
2. 発表標題 Characterization and imaging analysis of PfLSA3, a dense granule protein, during erythrocyte invasion of malaria merozoites.
3. 学会等名 MAM 2020, Molecular Approaches to Malraia (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森田将之
2. 発表標題 マラリアワクチン候補LSA3の赤血球侵入時動態解析
3. 学会等名 第27回分子寄生虫ワークショップ・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 森田将之、Charlie Jennison、石野智子、Matthew O'Neill, Justin A. Boddey、高島英造、坪井敬文
2. 発表標題 熱帯熱マラリア原虫メロゾイトのデンスグラニユール分子LSA3の性状解析
3. 学会等名 第89回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----