

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19454

研究課題名(和文) マラリア原虫分子LISP2は宿主細胞核に移行後どのように宿主細胞を制御するのか？

研究課題名(英文) Do malaria parasites control host cells via LISP2 protein translocated to the host nuclei?

研究代表者

石野 智子 (Ishino, Tomoko)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・准教授

研究者番号：40402680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)： LISP2欠損原虫に強いIGFPを発現させた遺伝子組換えネズミマラリア原虫を作成した。GFP蛍光を指標に、野生型およびLISP2-KOの感染肝細胞をセルソーターにより分取する方法が確立でき、LISP2による宿主細胞の遺伝子発現における影響を解析するツールが整った。また、哺乳類細胞側の「原虫感染促進/抵抗因子」を探索するために、複数の培養細胞を用いて、スポロゾイト侵入/細胞内での発育の2つの点で、受容する細胞と抵抗する細胞に分類できた。さらに、肝内休眠体はその対策を困難にしている三日熱マラリア原虫において、LISP2は休眠体には発現せず、増殖期へと移行する際に発現が認められることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蚊によって媒介されるマラリア原虫は、哺乳類体内で初めに肝細胞に寄生し、短期間のうちに数万倍の赤血球感染型へと増殖分化する。従って、肝細胞ステージが感染阻止法の最適なターゲットと言える。しかしながら肝細胞内での原虫発育機構については不明なまま残されている。本研究は、肝細胞ステージ特異的に発現し、宿主細胞核へと移行するLISP2を足がかりに、マラリア原虫による宿主細胞改変メカニズムを解析しようとするものである。さらに、肝内休眠型というユニークなステージを経る為に対策が困難であった三日熱マラリア原虫においても、LISP2の発現を確認し、これが増殖期への移行と関連することを示した。

研究成果の概要(英文)： We generated liver stage specific protein 2 (LISP2) disrupted transgenic parasites expressing GFP constitutively in Plasmodium berghei. The infectivity of LISP2-KO sporozoites to mice was 20 to 50-fold less than that of wild-type. Wild-type or LISP2-KO parasite-infected HepG2 cells were successfully purified by flow cytometry at 36 h post sporozoite inoculation. This strategy will be useful to screen host molecules which are affected by LISP2 expression. We also detected LISP2 expression in the liver-stage parasites of Plasmodium vivax and Plasmodium cynomolgi, in which hypnozoites, dormant forms in hepatocytes, cause the relapse. By using anti-PvLISP2 antibodies, it was revealed that LISP2 expression correlates to the re-entry of proliferation phase in hepatocytes.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア 肝臓ステージ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マラリア原虫の哺乳類への感染の成否は、最初の感染細胞である肝細胞内で、感染型メロゾイトを大量に作り出す効率に依存している。すなわち、マラリア感染予防法開発の為の最適な標的は、肝細胞感染時 / 肝細胞内での発育時期であり、ワクチン開発のターゲットとして注目されている。しかしながら、原虫の特異な増殖機構や、宿主から異物として認識・排除されない防衛メカニズムが、どのような分子基盤に支えられているのか明らかにされていない。感染肝細胞内では異物排除等の緊急応答が起きる為に、原虫が能動的に誘導する変化のみを抽出して検出できないのも、研究が遅れる要因のひとつである。さらに、研究の材料となるスポロゾイトは、感染蚊の唾液腺を摘出して得るしか方法がなく、十分量回収するのが困難である。

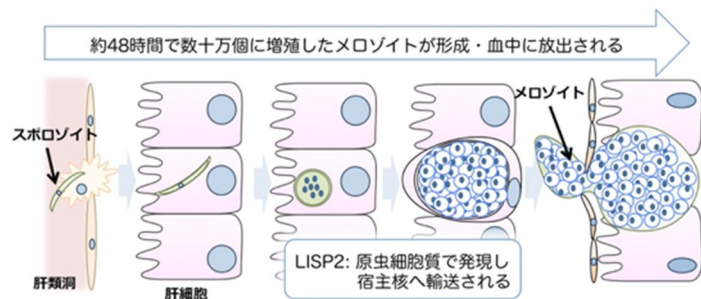
申請者は、マラリア原虫の哺乳類感染成立の分子基盤を解明するために、ネズミマラリア原虫をモデルとして、逆遺伝学的手法によってスポロゾイトの移動 / 細胞侵入に関わる分子を複数同定してきた。次いで、肝細胞内の原虫発育のメカニズムを解明しようと、肝臓ステージに特異的に発現する原虫分子を探索した結果、Liver stage specific protein 1 (LISP1), LISP2 を同定し、どちらも原虫の発育に重要であることを報告した (Ishino *et al.*, Cell. Microbiol. 2009, Orito, Ishino *et al.*, Mol. Microbiol. 2012)。ほ乳類宿主の中で原虫が活発に増殖・分化するのは、肝細胞内のみではなく赤血球の中でも行われる。ところが LISP1, 2 は肝細胞内の原虫のみで発現することから、有核の細胞内での生存戦略、例えば異物排除機構からの回避等、に関わることが考えられる。このうち LISP2 は、感染後期に宿主細胞の核へと輸送されるという興味深い形質を示したことから、LISP2 が宿主肝細胞の遺伝子発現をコントロールし、いわば肝細胞をハイジャックすることで原虫発育に適した環境に作り替えるのではないかと、という本課題の着想を得た。

2. 研究の目的

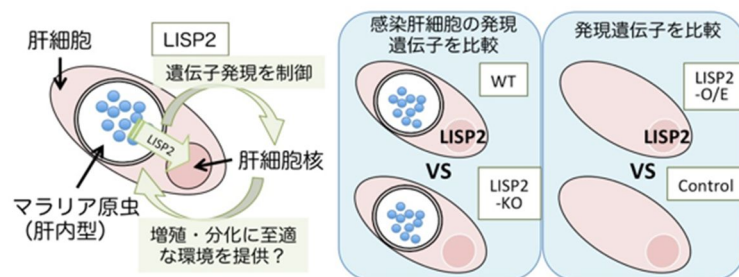
媒介蚊によってヒト体内に打ち込まれたマラリア原虫は、最初に肝細胞に寄生し、2-7日のうちに数十万倍にも増殖する。ネズミマラリア原虫の肝細胞感染様式を模式的に示す(図1)が、約48時間のうちに、小さな単細胞の原虫(スポロゾイト)が、数十万もの赤血球感染型原虫(メロゾイト)へと増殖・分化を行う。原虫はこの間に、DNA複製、タンパク質・脂質合成等、非常に活発に活動する。そのエネルギー源や合成の材料の多くは宿主細胞から調達していると考えられているが、分子基盤は全く解明されていない。さらに、宿主細胞からの攻撃を回避し、宿主細胞のアポトーシスを抑制すると予想されているものの、実体は不明のままである。マラリア原虫の肝細胞への侵入、細胞内での増殖・分化は、ヒトへの感染成立段階であり、予防薬 / ワクチン開発のためにも、その分子機構の解明は喫緊の課題である。

申請者は、肝臓ステージ後期に発現し、原虫の増殖・分化に必要な分子(LISP2)を同定し、これが宿主細胞の核へと輸送されることを見いだした。そこで、LISP2が宿主細胞の遺伝子発現を制御することで、自身の増殖・分化に最適な環境を積極的に構築している、という作業仮説を着想した。これを検証するために、本課題では、宿主細胞と原虫の相互作用の観点から肝細胞感染の分子基盤の理解することを目標とし、まずはLISP2

依存的に発現制御される宿主細胞分子を網羅的に同定することに着手する。また、宿主細胞側に、マラリア原虫の侵入あるいは細胞内での発育を受容する、あるいは阻止する分子が存在すると考え、スポロゾイトの感染効率によって各種培養細胞を分類する。これらのトランスクリプトームデータの比較により、感染受容 / 抵抗宿主細胞分子の絞り込みを目指す。



<図1 マラリア原虫の肝細胞内での発育とLISP2発現>



<図2 LISP2の宿主細胞改変メカニズム解明のためのアプローチ>

3. 研究の方法

(1) 野生型および LISP2 欠損原虫感染肝細胞の遺伝子発現プロファイルの比較

LISP2 の遺伝子座を GFP を恒常的に発現させるカセットと置換した遺伝子改変ネズミマラリア原虫を作出する。肝癌由来培養細胞(HepG2)に野生型あるいは LISP2 欠損原虫を感染させて 36 時間経過後 (LISP2 が宿主細胞の核へと輸送される時期) 感染肝細胞を GFP のシグナルを指標にセルソーターにより分取する。RNA を抽出、cDNA ライブラリーを構築し遺伝子発現プロファイルを比較する。解析には次世代シーケンサーを用い、LISP2 依存的に発現量に差のある宿主分子を選択する。

(2) 各種培養細胞におけるスポロゾイトの感染効率の比較

ネズミマラリア原虫 (*P. berghei* ANKA 株) のスポロゾイトは、ヒトの肝癌由来培養細胞である HepG2 細胞によく感染することが知られている。そこで、汎用されているヒト肝細胞、あるいは上皮細胞由来培養細胞 7 種類を用いて、スポロゾイトの侵入・感染の効率を比較する。各種細胞を至適条件で培養したのち、同数の GFP 蛍光を発現しているスポロゾイトを添加し、1.5 時間後、あるいは 45 時間後に細胞を回収し、フローサイトメーターにより、GFP 蛍光を指標に感染細胞の割合を算出する。これにより、スポロゾイトの侵入/その後の原虫発育を受容する細胞と抵抗する細胞に分類し、それぞれに共通する宿主分子の絞り込みを行う。

(3) 三日熱マラリア原虫における LISP2 の発現解析

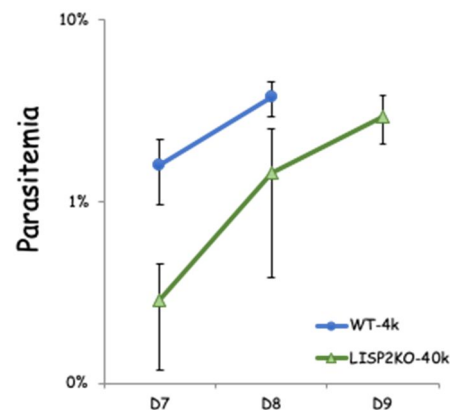
ヒトに感染し、主にアジアや南米で流行する三日熱マラリアは、肝細胞内で休眠体を生じる。これが一定期間後に増殖を再始動することで「再燃」が起きるため、致死率は低いものの感染の対策が非常に困難となる。LISP2 の宿主細胞に対する影響の解析の一環として、この休眠あるいは再始動に LISP2 が関与するのか、三日熱マラリア原虫、およびその近縁種であるサルマラリア原虫を用いて解析を行った。具体的には、肝内型原虫における LISP2 の発現パターンと、原虫の大きさや薬剤への感受性との関連を解析する。

4. 研究成果

(1) 野生型および LISP2 欠損原虫感染肝細胞の遺伝子発現プロファイルの比較

相同組換え法により、LISP2 の遺伝子座を、hsp70 のプロモーターに GFP のコーディング領域を繋いだ「恒常的 GFP 発現カセット」と置換した。まずは、LISP2 の遺伝子座を human DHFR と yeast FCU の薬剤耐性カセットと置換し、ピリメサミンで組換え原虫を選択したのち、薬剤耐性カセットを GFP 発現カセットと組換えた原虫を、5-FC 投与により選択した。得られた原虫を限界希釈法によりクローン化した。これをマウスに感染させた後、媒介蚊 (*Anopheles stephensi*) に吸血させ、約 3 週間後に唾液腺を摘出しスポロゾイトを回収する。これをネズミの静脈より投与し、感染赤血球の割合をギムザ染色により計測した。野生型スポロゾイトを LISP2-KO の 1/10 量投与したところ、野生型の方が平均値で 2-5 倍感染赤血球の割合が高くなった (図 3)。すなわち、LISP2-KO スポロゾイトは、野生型の 20-50 分の 1 程度までにネズミへの感染効率が減少していることが明らかになった。この結果は、過去の論文 (Orito, Ishino *et al.*, Mol. Microbiol. 2012) と一致しており、また、強い GFP 蛍光が検出できたことから、本研究で使用するのに適した遺伝子欠損原虫が作出できた。

次いで、LISP2-KO と同レベルに GFP 蛍光を発する WT-GFP 原虫を、ヒト肝癌由来培養細胞に添加し、36 時間後に培養細胞を回収し、セルソーターで感染肝細胞と、非感染肝細胞を分取した。24 well plate に confluent になった HepG2 に対し、感染蚊の唾液腺から回収したスポロゾイトを 1 well あたり 30 万添加した。異なる群の感染蚊を用いて 2 回実験を行い、それ



<図 3 LISP2-KO スポロゾイトの感染性>

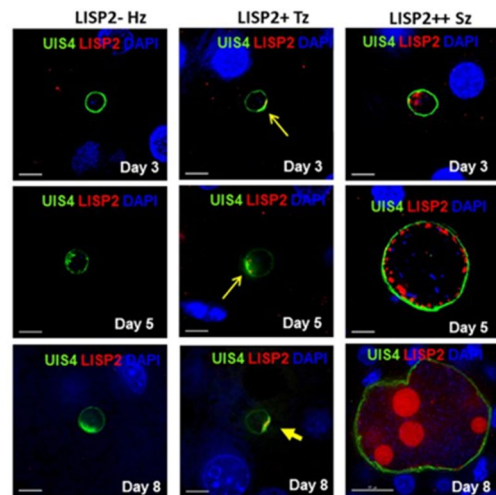
ぞれ、WT-GFP を 90 万、60 万、および LISP2-KO を 120 万、110 万スポロゾイト回収することができた。ソーティングにより、得られた感染肝細胞は、1 回目が WT-GFP が 6000 個、LISP2-KO が 9600 個。2 回目は、それぞれ 6600 個と、7000 個回収できた。RNA を抽出したところ、次世代シーケンスに用いられるグレードの RNA を充分量回収することができなかつた。スポロゾイトは実体顕微鏡下で解剖により感染蚊から抽出するしかなく、一度に用いるスポロゾイトの数に限界があるため、より少ない量から質の高い RNA を抽出するキットを検討することが次の課題である。

(2) 各種培養細胞におけるスポロゾイトの感染効率の比較

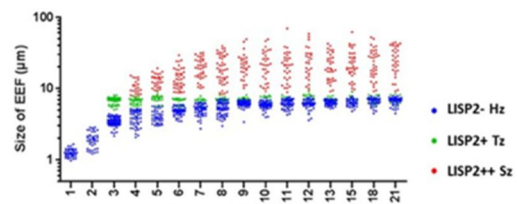
ヒト由来肝細胞 2 種類、上皮由来細胞 4 種類を 8 well chamber slide に撒き、コンフルエントになったら、スポロゾイトを添加し、1.5 時間後にフローサイトメーターにより感染細胞の割合を計測した。その結果、HeLa 等の上皮由来細胞にも、効率は減少するもののスポロゾイトが侵入できることを見出した。一方で、肝由来培養細胞の一種類にはほとんどスポロゾイトが侵入できなかった。さらに、原虫発育まで認められる上皮由来の細胞も見出された。今後は、細胞侵入 / 発育の 2 つの点で、感受性 / 抵抗性の細胞に分類し、これらのトランスクリプトームデータの比較から、侵入および発育に関わる宿主細胞分子の絞り込みを行い、スポロゾイト感染に促進的 / 抑制的に関わる宿主細胞分子の同定へと繋げていく。

(3) 三日熱マラリア原虫における LISP2 の発現解析

LISP2 は全てのマラリア原虫種のゲノム配列上に相同体が報告されている。そこで、ヒトに感染し肝細胞内で休眠するというユニークな性質を持つ、三日熱マラリア原虫 (Pv) の LISP2 相同体の発現解析を実施した。PvLISP2 部分組換えタンパク質を小麦胚芽由来無細胞タンパク質合成系を用いて合成し、これをウサギに免疫して抗体を得た。三日熱マラリア感染患者血液を吸血させた感染蚊から唾液腺を摘出して得られたスポロゾイトを、ヒト由来肝細胞に添加して作成した肝臓ステージ原虫に対して、得られた抗体を用いて間接蛍光抗体法を実施し、確かに三日熱マラリア原虫の LISP2 に



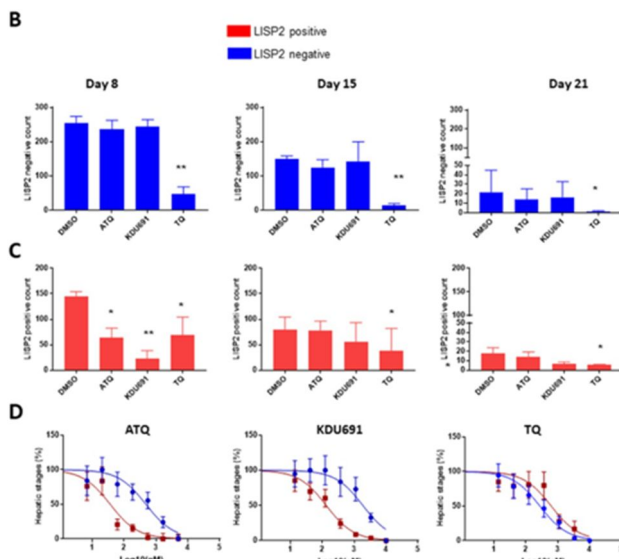
< 図 4 三日熱マラリア原虫の肝臓ステージにおける LISP2 の発現パターン >



< 図 5 サルマラリア原虫の肝臓ステージのサイズと LISP2 発現パターンの相関 >

反応することを確認した。

ヒトの肝細胞を移入したマウス(ヒト化マウス)に三日熱マラリア原虫のスポロゾイトを感染させたのちに、継続的にサンプリングした肝臓切片に対し、この抗体を用いて間接蛍光抗体法を実施した結果を図 4 に示す。日にちが経過してもサイズが変わらない原虫(休眠体・左)には反応しない一方で、成熟しつつある肝臓ステージ(右)において LISP2 が検出された。さらに、三日熱マラリア原虫の近縁種であるサルマラリア原虫 (*Plasmodium cinomolgi*) のスポロゾイトを初代培養細胞に添加し



< 図 6 薬剤への感受性と LISP2 の発現の相関 >

た場合には、大きさに依存して、LISP2 の発現が認められることがわかった (図 5)。増殖型を標的とした薬剤 (アトバコン等) と休眠体を標的とした薬剤 (タフェノキン) に対する感受性の違いを調べたところ、LISP2 を発現している肝内型原虫はアトバコン感受性を示した (図 6)。逆に、LISP2 を発現していない原虫は、タフェノキンに弱く感受性を示した。すなわち、LISP2 の発現と、増殖期への始動には相関が認められた。今後、LISP2 を休眠状態を脱した原虫のマーカーとして活用することで、休眠状態及びその解除の分子基盤解明へと繋げることが期待される。さらに、LISP2 の発現調節、機能の解析を手がかりとして、肝臓ステージマラリア原虫の感染戦略の解明へと展開できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Gupta Devendra Kumar, Dembele Laurent, Voorberg-van der Wel Annemarie, Roma Guglielmo, Yip Andy, Chuenchob Vorada, Kangwanrangsang Niwat, Ishino Tomoko, Vaughan Ashley M, Kappe Stefan H, Flannery Erika L, Sattabongkot Jetsumon, Mikolajczak Sebastian, Bifani Pablo, Kocken Clemens HM, Diagona Thierry Tidiane	4. 巻 8
2. 論文標題 The Plasmodium liver-specific protein 2 (LISP2) is an early marker of liver stage development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e43362
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.43362	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

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石野智子
2. 発表標題 スポロゾイトにおけるロプトリータンパク質群の網羅的機能解析
3. 学会等名 分子寄生虫学フォーラム
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

愛媛大学 プロテオサイエンスセンター 寄生病原体学部門 https://www.m.ehime-u.ac.jp/school/parasitology/
--

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
---------------------------	-----------------------	----