

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03459

研究課題名(和文) スポロゾイトの分泌タンパク質輸送メカニズムにおけるRAMAの作用機序の解明

研究課題名(英文) Investigation of the mechanisms of RAMA on secretory protein trafficking in sporozoites

研究代表者

石野 智子 (Ishino, Tomoko)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：40402680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：マラリア原虫の標的細胞侵入機構の主要部分を担うロプトリータンパク質群の作用機序を解明することを目標とし、ロプトリーの膜上に局在するGPIアンカー型膜タンパク質であるRAMAに着目した。スポロゾイト時期特異的にRAMAの発現を抑制した遺伝子改変原虫作出により、RAMAがスポロゾイトの唾液腺への侵入に重要であることを見出した。成熟過程で切断されるN末側の繰り返し配列、成熟型のP40のいずれがRAMA機能に重要か解析したところ、双方がスポロゾイトの唾液腺侵入、およびマウス肝臓への感染に必須であることを明らかにした。さらに、RAMAが他のタンパク質のロプトリーへの輸送に関わることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マラリアは現在でも、年間60万人が亡くなる世界三大感染症の一つである。2021年に初のマラリアワクチンとして、肝臓感染ステージを抑制するRTS,Sの使用が推奨されたが、重症化抑制効果は30%程度に留まる。加えて、既存の薬剤に対する抵抗性を獲得した原虫が世界中に蔓延しつつあるのが大きな問題となっている。新規ワクチン開発、あるいは異なる作用機序を持つ薬剤の開発が急務であるが、その拠り所となる感染機構については不明な点が多く残されている。本研究で、RAMAが感染に重要な他の分泌型タンパク質の輸送に関わることを提唱され、原虫特有のタンパク質輸送経路の解明から新規薬剤開発への道が拓かれる。

研究成果の概要(英文)：We focused on RAMA, a GPI-anchored membrane protein localized on the rhoptry membranes in sporozoites, with the goal of elucidating the mode of a series of rhoptry proteins that play a major part in the target cell invasion mechanism of malaria parasites. By generating a genetically engineered parasites that suppresses RAMA expression specifically at the sporozoite stage, we found that RAMA is important for sporozoite invasion of the mosquito salivary glands. We analyzed the functional domain of RAMA, consistent of the N-terminal repeat, which is cleaved during maturation, and P40, the mature form, and found that both are essential for sporozoite invasion of the salivary glands and infection of the mouse liver. Furthermore, RAMA is involved in the transport of other proteins to rhoptries.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア スポロゾイト ロプトリー タンパク質輸送

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

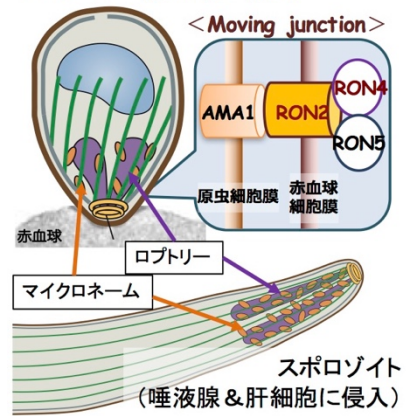
マラリア原虫は、標的細胞に侵入する際には、複数のタンパク質を分泌することが報告されている。赤血球に寄生するマラリア原虫（メロゾイト）は、先端部から分泌されたタンパク質が複合体として赤血球膜に挿入され（図1、RON2, RON4, RON5）、原虫細胞膜上に輸送された AMA1 と相互作用することで侵入を促進する。侵入後には、さらに別のタンパク質が分泌され、原虫を取り囲む膜（寄生胞膜）を修飾することで寄生状態の維持に関わる。メロゾイトの先端部には、マイクロネームとロプトリーと呼ばれる小器官が存在する。RON2, RON4, RON5 はロプトリーに、AMA1 はマイクロネームに貯蔵され、侵入時に順序よく分泌されることが効率の良い寄生メカニズムの基盤となっているが、その輸送や分泌のメカニズムについてはほとんど解明されていない。

マラリア原虫は蚊によって媒介される。蚊からヒトへの感染を担うのが、スポロゾイトと呼ばれるもう一つの侵入型である。スポロゾイトは、媒介蚊の体内で発育し、まず蚊の唾液腺に侵入し、吸血の際にヒトの皮内に注入される。これらが次にヒトの肝細胞に寄生することでマラリア感染が成立する。スポロゾイトの先端部の構造はメロゾイトとよく類似している（図1）。申請者らはメロゾイトのロプトリータンパク質の多くが、スポロゾイトのロプトリーにも局在することを見出した（図2、Tokunaga, ..., Ishino*, 2019, *Front. Cell. Microbiol.*）。そこで、細胞侵入の過程は、スポロゾイトとメロゾイトに共通のメカニズムが存在するのではないかと考え、共通に発現するロプトリータンパク質に着目した。スポロゾイト時期特異的に発現抑制する遺伝子改変原虫を作出する方法を開発し、**RON2** が唾液腺侵入に重要な役割を担うことを明らかにした（Ishino et al, 2018, *Cell. Microbiol.*）。網羅的にロプトリー分子の機能を調べるうちに、ロプトリー分子の中では最も早く発現し、その膜上に局在する RAMA (rhoptry associated membrane antigen) に着目した。最近、多くの生物で小胞体輸送に関与することが知られる Sortilin の相同体がマラリア原虫にも存在し、RAMA と結合しうることが報告された（Hallee et al., *mSphere*, 2018）。そこで申請者らは、RAMA がタンパク質のロプトリーへの輸送に関わることでスポロゾイトの侵入能に関与する可能性を考えた。

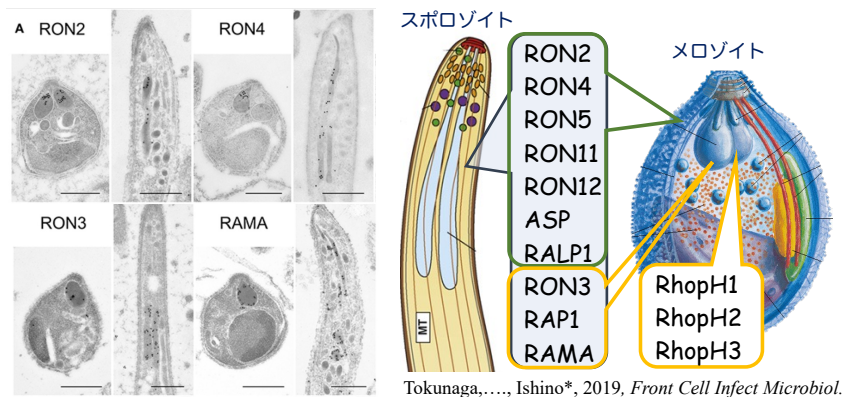
2. 研究の目的

本研究課題では、マラリア原虫の侵入に必須なタンパク質がロプトリーに輸送されるメカニズムを解明することを目標に、ロプトリーの膜上に局在する GPI アンカー型膜タンパク質であり、スポロゾイトの唾液腺侵入に重要な役割を担う RAMA に着目し、その役割および作用機序を解明しようとする。具体的には、スポロゾイト時期特異的に RAMA の発現を抑制する原虫 (RAMA-cKD) を作出し、RAMA の役割を解析する。さらに RAMA-cKD スポロゾイトにおける他

メロゾイト（赤血球に侵入）



<図1 侵入関連分泌タンパク質は先端部小器官に局在する>



<図2 メロゾイトとスポロゾイトのロプトリーには共通の分泌型タンパク質が貯蔵される>

のロプトリー分子群の発現、局在を解析することで、RAMA と関連するロプトリー分子群を同定する。加えて、RAMA と相互作用するロプトリータンパク質を探索し、それらの輸送に RAMA が関わるのか検証する。

3. 研究の方法

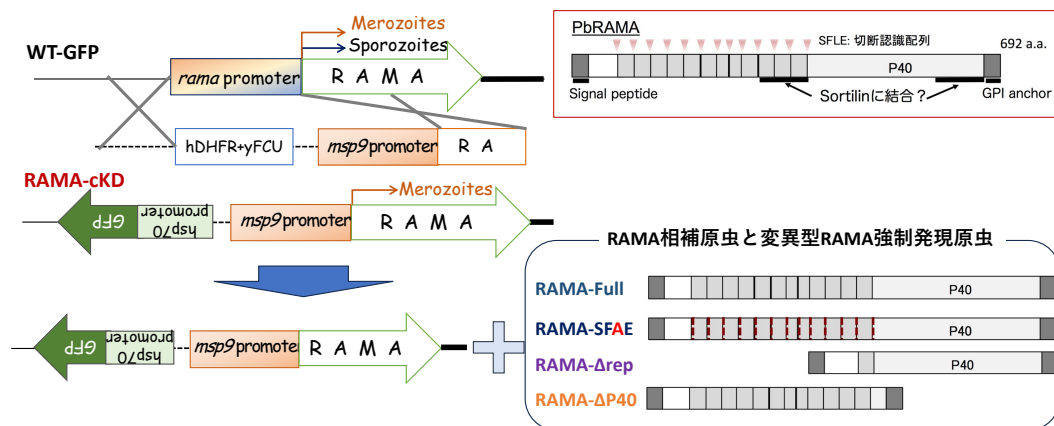
本研究は以下の方法で実施した。

- (1) スポロゾイト時期特異的 RAMA 遺伝子発現抑制原虫の作出
- (2) RAMA-cKD 原虫の蚊の体内での発育、唾液腺侵入効率の検証
- (3) RAMA-cKD 原虫のマウス肝臓への感染性の評価
- (4) RAMA-cKD スポロゾイトにおける、他のロプトリータンパク質の局在解析
- (5) RAMA-AirID タグ融合型を発現させることで相互作用タンパク質の同定

(1) スポロゾイト時期特異的 RAMA 遺伝子発現抑制原虫の作出

-RAMA プロモーター領域を *msp9* (merozoite surface protein 9) のプロモーター領域に置換したネズミマラリア原虫 (*Plasmodium berghei* ANKA) を相同組換え法により作出する。薬剤耐性マーカーとして *hDHFR* と *yFCU* の両方を挿入することで、次に、薬剤耐性カセットを GFP 発現カセットに置換する。さらに、別の遺伝子座 (*p230p*) に RAMA の発現コンストラクトを挿入することで、RAMA 機能を相補する原虫 (RAMA-comp) も合わせて作出した。

-RAMA は、N 末端側に 13 回の繰り返しペプチドを含み、成熟の過程でこれらが切断されることが知られている。繰り返し配列の領域と、成熟型 (P40) のいずれが RAMA 機能を担うのか、それぞれの領域を欠損させた変異型 RAMA 発現コンストラクトを、上記の RAMA-cKD 原虫ゲノムの *p230p* 遺伝子座に挿入する (RAMA- Δ rep, and RAMA- Δ P40)。さらに、切断認識サイトのアミノ酸残基を置換した変異型 RAMA 発現コンストラクトも、同様に RAMA-cKD 原虫ゲノムに挿入し、遺伝子改変原虫を作出した。(下図参照)



<図3 RAMA-conditional knockdown 原虫の作出と、さまざまな変異型RAMA強制発現コンストラクト>

(2) RAMA-cKD 原虫の蚊の体内での発育、唾液腺侵入効率の検証

作出した遺伝子改変原虫を腹腔投与にてネズミに感染させた 5 日後に麻酔をし、ハマダラカ (*Anopheles stephensi*) の雌 80 匹に吸血させる。血を吸った蚊を 20 度のインキュベーター内で、砂糖水を与えながら 21 日飼育を続ける。21 日目に唾液腺、および中腸を顕微鏡下で摘出し、それぞれ 30 匹分を培地を入れたチューブに回収する。また、体腔に 100 μ l の培地を注入し、カットした尾部から体液を回収する。それぞれに含まれるスポロゾイト数を計測し、中腸におけるスポロゾイト形成、体液への放出、唾液腺への侵入の効率を野生型、および RAMA 相補原虫と比較する。

(3) RAMA-cKD 原虫のマウス肝臓への感染性の評価

上記と同様に、遺伝子改変原虫の感染蚊の体液からスポロゾイトを回収し、2000 匹ずつ *c57bl/6* マウス (5 匹ずつ) の尾静脈より投与する。24 時間後に肝臓を灌流した後に回収し、

RNA を抽出、real time RT-PCR 法により肝臓内の原虫量を定量する。

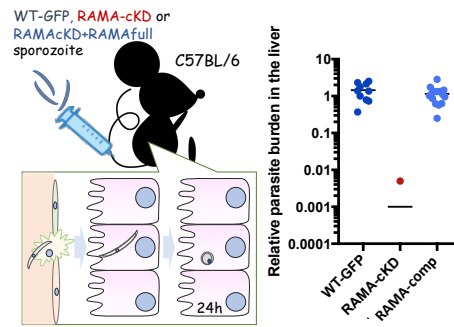
- (4) RAMA-cKD スポロゾイトにおける、他のロプトリタンパク質の局在解析

作出した遺伝子改変原虫を感染させた蚊の中腸を回収し、固定したのち、免疫電顕法により、RAMA, RON2, RON4, RON12 などの局在を解析する。

- (5) RAMA-AirID タグ融合型を発現させることで相互作用タンパク質の同定

RAMA の分泌シグナルの下流に近位ビオチン化酵素

素の一種である AirID を挿入した AirID-RAMA 発現カセットを、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集法により、p230p 遺伝子座に挿入する。これをマウスに感染させ、感染赤血球を回収し 16 時間培養することで分裂期(シズント)に同調し、密度勾配遠心法により回収する。培養中にビオチンと ATP を添加することで、AirID 依存的に RAMA と相互作用するタンパク質を、まずは streptavidin を用いて Western blotting 法により検出する。特異的なシグナルが得られたら、同様に調整した細胞懸濁液をトリプシン処理したのちに、Tamavidin beads を用いてビオチン化されたタンパク質を精製し、質量分析により相互作用タンパク質を同定する。



<図4 RAMA-cKD原虫の肝臓感染効率の評価>

体液から回収したスポロゾイト2000匹を静脈投与した24時間後に肝臓を灌流し、RNAを抽出。Real time RT-PCR法により、原虫ribosomal RNA量を測定する。マウスのgapdhのmRNA量で標準化したグラフを示す。RAMA-cKDスポロゾイトは5匹のマウスに投与したが、4匹は検出感度以下であった。

4. 研究成果

- (1) スポロゾイト時期特異的 RAMA 遺伝子発現抑制原虫の作出

プロモーター置換法によりスポロゾイトにおいて RAMA の発現が 1/50 程度に減少した RAMA-conditional knock down (RAMA-cKD) 原虫が 2 クローン得られた。薬剤耐性カセットを GFP 発現カセットに置換し、生活環のすべてで蛍光を発現するマーカフリーな RAMA-cKD 原虫を作出した。これを元に、RAMA-Full の発現コンストラクトを異なる遺伝子座に挿入した「RAMA 相補原虫 (RAMA-comp)」を作出した。RAMA の機能に関わる領域を同定する目的で、切断サイトに変異を導入したものや、P40 領域を欠いた変異型 RAMA の強制発現コンストラクトを導入しようとしたが、遺伝子改変原虫が得られなかった。血球感染ステージで変異型 RAMA が発現することが、原虫の増殖に抑制的に働くことが原因と考えられたので、スポロゾイト得意的に発現する csp (circumsporozoite protein)のプロモーターに変更し、新たに遺伝子改変原虫を作出した。(図3参照)

- (2) RAMA-cKD 原虫の蚊の体内での発育、唾液腺侵入効率の検証

RAMA-cKD 原虫は、中腸において正常に形成されたオーシスト内で、野生型と同程度のスポロゾイトを成熟させる。これらは、体腔に野生型と同レベルに放出されるものの、唾液腺への侵入はほとんどみられない。この表現型は、RAMA-Full を発現させることで相補されたため、RAMA は唾液腺への侵入に必須なタンパク質と示された。変異型 RAMA(Δ rep, Δ P40)の強制発現によって上記の表現型が回復されなかったことから、唾液腺侵入に関わる RAMA の機能は、成熟型の P40 だけでなく切断される繰り返し配列領域によっても担われることが判明した。なお、切断認識サイトと予想されるアミノ酸残基を置換しても、90%以上が野生型と同様に分解されることがわかった。さらに変異を導入することで、“切断されない” RAMA を強制発現させ、繰り返し配列領域の切断の意義について検証を重ねる。

- (3) RAMA-cKD 原虫のマウス肝臓への感染性の評価

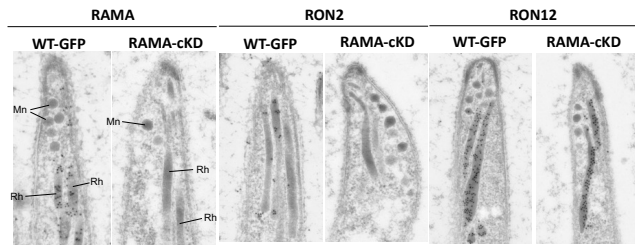
RAMA 発現抑制スポロゾイトをマウスに尾静脈より投与し、24 時間後の肝臓内の原虫量を検出したところ、5 匹中 4 匹で原虫 mRNA が検出されなかった。従って、RAMA は、蚊の

唾液腺のみならず、マウス肝臓への感染にも極めて重要な役割を担うことを明らかにした。同様に、肝臓感染にも、切断される繰り返し配列領域も重要な役割を担うことを見出した。

(4) RAMA-cKD スポロゾイトにおける、他のロプトリータンパク質の局在解析

免疫電顕法により、RAMA-cKD のオーシストスポロゾイトにおいて、RAMA の発現は認められない。RON2, RON4 も野生型に比べてロプトリーへのこれらのタンパク質の局在が大きく抑制されている。一方で、

RON12 については、RAMA-cKD のスポロゾイトにおいても野生型と同様に、ロプトリーに十分量 RON12 が貯蔵されているのが確認された。従って、RAMA は選択的に一部のロプトリー分子を正しく輸送する役割を担っていることが示唆された。



＜図5 RAMA-cKD スポロゾイトにおけるほかのロプトリータンパク質の局在解析＞
金コロイドでそれぞれのタンパク質の局在を示す。Mn:マイクロネーム、Rh:ロプトリー

(5) RAMA-AirID タグ融合型を発現させることで相互作用タンパク質の同定

RAMA を AirID 融合 RAMA と置換する組換え原虫は作出できなかったことから、分泌シグナルの下流に AirID を挿入することで、RAMA の機能を阻害することが予想された。そこで、もとの RAMA 遺伝子座は残したまま、p230p の遺伝子座に新たに、AirID-RAMA 発現カセットを挿入した。AirID-RAMA 発現組換え原虫のシゾントを回収し、Western blotting を実施したところ、N 末端側の AirID タグのほとんどが RAMA から切断されていることが予想された。今後は、切断認識配列に変異を導入して“切断されない” RAMA に AirID タグを融合する、あるいは、タグの挿入位置を変える、という工夫を行い、相互作用タンパク質の同定を行う。

(6) RAMA によってロプトリーに輸送される RON4 のスポロゾイトにおける役割解析

(1)と同様に RON4-cKD 原虫を作出し、その感染効率を解析したところ、RON4 は、RON2 や RAMA と同じように、唾液腺侵入と肝臓感染の両方で重要な役割を担うことがわかった (Nozaki et al., 2020, mSphere; Baba et al., 2023, mSphere)。スポロゾイトは自律的な運動能を有するが、スタートには基質との接着が必要である。RON4 は、基質への接着および動き始める際に機能することを明らかにした。また、肝臓感染の際には、RON4 はロプトリーから分泌されて機能することを、間接蛍光抗体法および、抗体による感染阻害評価により示した。RAMA は、RON2 や RON4 のロプトリーへの輸送に関わることで、これらのタンパク質が適切に運動や細胞侵入の際に分泌され機能することをサポートすると推測される。

マラリア原虫の細胞侵入メカニズムの解明は、喫緊の課題であるワクチンの開発に論理的基盤を付与するのみならず、寄生戦略の分子基盤の包括的な理解へと繋げられる観点からも注目されている。標的細胞侵入に関わる分泌型タンパク質の同定は、近年めざましく進められてきた一方で、これらが適切に順序よく分泌されるメカニズムや、その基盤となるそれぞれの先端部小器官に侵入関連タンパク質が正確に輸送される分子基盤については、ほとんど手がつけられてこなかった。本課題遂行により、RAMA がロプトリー貯蔵分子の適切な輸送に関わる可能性が示唆され、ステージ間で共通の感染基盤の一端の解明に向けて道を拓いた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nozaki Mamoru, Baba Minami, Tachibana Mayumi, Tokunaga Naohito, Torii Motomi, Ishino Tomoko	4. 巻 5
2. 論文標題 Detection of the Rhoptry Neck Protein Complex in Plasmodium Sporozoites and Its Contribution to Sporozoite Invasion of Salivary Glands	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 :e00325-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mSphere.00325-20	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 -

1. 著者名 Naohito Tokunaga, Mamoru Nozaki, Mayumi Tachibana, Minami Baba, Kazuhiro Matsuoka, Takafumi Tsuboi, Motomi Torii, Tomoko Ishino	4. 巻 9
2. 論文標題 Expression and localization profiles of rhoptry proteins in Plasmodium berghei sporozoites	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in cellular and infection microbiology	6. 最初と最後の頁 316
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2019.00316	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 -

1. 著者名 Baba Minami, Nozaki Mamoru, Tachibana Mayumi, Tsuboi Takafumi, Torii Motomi, Ishino Tomoko	4. 巻 -
2. 論文標題 Rhoptry neck protein 4 plays important roles during <i>Plasmodium</i> sporozoite infection of the mammalian liver	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 e0058722
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/msphere.00587-22	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 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 3件／うち国際学会 6件）

1. 発表者名 馬場みなみ、野崎守、鳥居本美、石野智子
2. 発表標題 RON4はマラリア原虫スポロゾイト肝臓感染の初期に役割を持つ
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 石野智子、野崎守、馬場みなみ、橘真由美、鳥居本美
2. 発表標題 スポロゾイトの唾液腺侵入におけるロプトリータンパク質の作用機序の解析
3. 学会等名 第89回 日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoko Ishino, Naohito Tokunaga, Mamoru Nozaki, Takafumi Tsuboi, Motomi Torii
2. 発表標題 Expression and localization profiles of rhoptry proteins in Plasmodium berghei sporozoites
3. 学会等名 67th Annual meeting of American Society of Tropical Medicine & Hygiene (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sirasate BANTUCHAI, 野崎 守、Amporn THONGKUKIATKUL, Natcha LORSUWANNARAT, 橘 真由美、松岡 和弘、坪井 敬文、鳥居 本美、石野 智子
2. 発表標題 マラリア原虫スポロゾイトの唾液腺および肝細胞侵入に関与する膜タンパク質RON11の同定
3. 学会等名 第92回日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Minami Baba, Mamoru Nozaki, Motomi Torii, Tomoko Ishino
2. 発表標題 The role of RON4 in Plasmodium sporozoite infection of the liver
3. 学会等名 67th Annual meeting of American Society of Tropical Medicine & Hygiene (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoko Ishino, Mamoru Nozaki, Minami Baba, Mayumi Tachibana, Takafumi Tsuboi, Motomi Torii
2. 発表標題 Detection of rhoptry neck protein complex in Plasmodium sporozoites and its contribution on sporozoite invasion of salivary glands
3. 学会等名 Molecular Approach to Malaria 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Minami Baba, Mamoru Nozaki, Motomi Torii, Tomoko Ishino
2. 発表標題 RON4 is involved in sporozoite motility and liver invasion
3. 学会等名 Molecular Approach to Malaria 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石野智子、馬場みなみ、野崎守、橘真由美、新澤直明、鳥居本美
2. 発表標題 マラリア原虫スポロゾイトにおけるRAMAの役割の解析
3. 学会等名 第92回 日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 窪田理恵、関根崇、Daniel Kweku Addo Gyan, 小迫英尊、澤崎達也、新澤直明、石野智子
2. 発表標題 新規ピオチン化酵素A1r1Dを用いたマラリア原虫のタンパク質インタラクトーム解析
3. 学会等名 第92回 日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tomoko Ishino.
2. 発表標題 Molecular mechanisms of malaria parasite transmission from mosquitoes to mammals.
3. 学会等名 第91回 日本寄生虫学会大会、シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomoko Ishino.
2. 発表標題 Molecular mechanisms of malaria transmission to mammals via mosquito vectors.
3. 学会等名 The 20th Awaji International Forum on Infection and Immunity.(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomoko Ishino.
2. 発表標題 Molecular mechanisms of malaria transmission to mammals via mosquitoes.
3. 学会等名 The 20th International Congress for Tropical Medicine and Malaria(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京医科歯科大学 大学院 医歯学総合研究科 寄生虫学・熱帯医学分野
<https://sites.google.com/view/tmdu-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
研究分担者	橋 真由美 (Tachibana Mayumi) (00301325)	愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・助教 (16301)	
研究分担者	馬場 みなみ (Baba Minami) (00814906)	愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・研究員 (16301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関