

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03461

研究課題名(和文) マラリア原虫メロゾイト細胞内小器官からの分子分泌シグナル機構の解明

研究課題名(英文) Signaling mechanism of the apical organelle discharge by malaria parasites during erythrocyte invasion

研究代表者

金子 修 (KANEKO, Osamu)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：50325370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：マラリア原虫の赤血球侵入時に必須である細胞内分泌器官からの分子分泌に関わるシグナル伝達分子を明らかにすることを主目的として研究を行った。その結果、2種の偽リン酸化酵素が赤血球侵入だけでなく、雄性生殖母体の鞭毛放出センター形成に寄与していることを見出した。また、2種あるジアシルグリセロールキナーゼがそれぞれを破壊しても致死的不是だが、同時に破壊すると致死となることを見出した。ジアシルグリセロールキナーゼを介したシグナル伝達の下流に位置するAPHと呼ばれる分子がAMA1とMTRAPと呼ばれる分子分泌に関わることを明らかにした。また、動画解析を行う過程でメロゾイトが滑走運動を有することを見出した。

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に当たり、細胞内分泌小器官から分泌される種々のワクチン候補抗原の分泌トリガーとそれらをつなぐシグナル伝達に関わる分子を明らかにすることにより、生物学的には、理解が進んでいない赤血球侵入期のシグナル伝達経路の全体像に迫ることができ、明らかとなる分子機能の深い理解に立脚した新たなワクチン構想や創薬が可能となる。特に本研究で見出したメロゾイトの滑走運動は、新たな創薬標的の機序となることも期待できる。

研究成果の概要(英文)：The main objective of the study was to identify the signaling molecules involved in molecular secretion from the microorganelles of the Plasmodium parasites for erythrocyte invasion. We found that two pseudokinases contribute not only to erythrocyte invasion but also to the exflagellar center formation by the male gametes. We also found that the two diacylglycerol kinases are not essential when each is destroyed, but parasites' viability was severely impaired when destroyed simultaneously. We found that a molecule called APH, which is located downstream of signaling through diacylglycerol kinase, was involved in the secretion of molecules called AMA1 and MTRAP. In the process of video analysis, we also found that merozoites have gliding motility.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア 病原性原虫 赤血球 細胞侵入 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

マラリアは世界中で年間約2億人の感染者、50万人弱の死者を出す重大な感染症である。マラリア原虫はヒト体内では赤血球で発育増殖してこれを破壊することで病害を与えるが、感染成立にはマラリア原虫の赤血球への侵入が必須であるため、赤血球侵入期原虫メロゾイトで発現する分子はワクチンや薬剤開発の標的となっている。ところが、長年の研究にもかかわらず、メロゾイトを標的とするワクチンの開発は遅れており、それはワクチン標的分子の生物学的役割の理解が進んでいないことが原因の一つである。より有効なワクチンや薬剤の開発には、赤血球侵入に用いられる種々の原虫分子の生物学的役割を理解し、それを基盤とした機能阻害の方法を考える事が重要である。

2. 研究の目的

本研究では、赤血球侵入期に発現する種々の分子を誘導的に遺伝子座破壊もしくは転写抑制し、寄生赤血球からの原虫放出～赤血球侵入の種々のステップ、原虫分子の表面分泌等に対して、各種分子を除いた際の影響を検討することで、マラリア原虫の赤血球侵入に当たり、細胞内分泌小器官から分泌される種々のワクチン候補抗原の分泌トリガーとそれらをつなぐシグナル伝達に関わる分子を明らかにすることを目的とした。これにより、赤血球侵入期のシグナル伝達経路の全体像に迫り、分子機能の深い理解に立脚した新たなワクチン構想や創薬が可能となる。

3. 研究の方法

本研究ではネズミマラリア原虫 *Plasmodium yoelii* を主に用いて研究を進める。pPK1 と DGK1 のノックアウト (KO) 原虫は既に作製済みである。さらに、赤血球侵入期に発現する一連の分子群を対象に、条件下ノックアウト (iKO) 原虫を作製した。原虫の増殖率、赤血球からの放出と赤血球侵入の効率の評価はマウスを用いて *in vivo* で行った。赤血球からの放出から赤血球侵入の間で各分子が関与するステップの解析は、タイムラプスイメージング法により行った。各種細胞内小器官からの分子分泌への影響は、AMA1、MTRAP、EBL、RON2、y235 などの分泌タンパク質が、精製したメロゾイトの表面で間接蛍光抗体法により検出されるか否かを検討することで行った。KO 原虫の解析の際には、標的分子を myc エピトープタグで標識した組換え原虫を作製し、Western blot 解析や局在解析を行った。iKO 原虫についても、標的分子に付与した myc エピトープタグを用いて Western blot 解析および局在解析を行った。

交配実験は、2株の *P. yoelii* をそれぞれ単独か、混ぜてハマダラカに吸血させ、蚊から得たスポロゾイト型原虫をマウスに注入し、二つの株の増殖速度の差により、増殖速度の速い原虫クローンが選択されるようにデザインをした。交配により得られたマラリア原虫子孫株集団を増殖速度による選択圧下で維持した後、遺伝子を抽出し、ゲノムワイドに一塩基多型頻度を検討した。

4. 研究成果

(1) 偽リン酸化酵素の解析

ノックアウトにより、赤血球侵入能力と赤血球期増殖速度が低下し、雌性生殖体の赤血球への接着も著減する偽リン酸化酵素 pPK1 の解析結果について学術誌にて論文発表した (Ishizaki et al. *Parasitol Int*, 2020)。さらに pPK1 と同様に分裂体期と生殖母体期に転写される2つの偽リン酸化酵素 (pPK3 と pPK4 と呼ぶ) に着目し、それぞれについてノックアウト原虫とタグを付与した組換え原虫を作製した。解析の結果、pPK3 ノックアウト原虫については、赤血球期での表現型は観察されなかった。一方、pPK4 ノックアウト原虫では、赤血球侵入能力の低下、および、赤血球期増殖速度の低下、雌性生殖体の赤血球への接着が著減するなど pPK1 と似た表現型を示す事を見出し、国際フォーラムにて発表した (Too et al. *The 21th AIFII*, 2022)。

(2) ジアシルグリセロールキナーゼの解析

ノックアウトによりマイクロネーム分子である AMA1 の局在が変化したジアシルグリセロールキナーゼ DGK1 のより詳細な解析を行うため、マラリア原虫が有するもう一つのジアシルグリセロールキナーゼ DGK3 とともに条件下ノックアウト原虫および条件下ダブルノックアウト原虫を作製した。赤血球期増殖、赤血球侵入能力、細胞小器官の局在、分子分泌能力に関する解析を行い、単独のノックアウトでは致死ではないが、両者をノックアウトすると原虫が生存できないことを明らかにし、タイムラプスイメージング解析を行った。

(3) *Plasmodium yoelii* の EBL と相補的に働く赤血球侵入関連原虫分子の解析

全てのマラリア原虫種は EBL と呼ばれる赤血球認識分子を持ち、その第 6 領域と呼ばれる領域には種を越えて保存した 8 つの Cys 残基が存在する。ネズミマラリア原虫 *P. yoelii* の非致死株 17XNL では、8 つの全てが保存されているが、致死株 17XL では一つが Arg 残基に置換されており、この置換により非致死株の増殖速度が増加するが致死株ほどは速くならないことから、EBL 以外に病原性を規程する第二の因子が存在する可能性を代表者らは以前の研究により報告した (Otsuki et al. Proc Natl Acad Sci USA, 2009)。本研究では、この第二因子を同定するため、非致死株 17XNL を背景とし EBL を致死株 17XL 型に変えた組換え原虫 17XNL-CtoR と 17XL 株の間で遺伝子交配実験を行い、連鎖解析の手法で、第二の因子の同定を試みた。しかし、第二因子をコードしていると思われる明らかな候補遺伝子座は見出されなかった。

(4) フォスファチジン酸が結合する 2 つの分子の解析

ジアシルグリセロールキナーゼが関与するステップの下流の分子機序を明らかにするため、ジアシルグリセロールキナーゼにより作られるフォスファチジン酸が結合する APH と呼ばれる分子の条件下ノックアウト原虫を作製し、解析したところ、赤血球侵入能力と赤血球期増殖速度の著しい低下、細胞内小器官マイクロネームからの AMA1 と MTRAP と呼ばれる分子の分泌障害を見出した。しかし、APH がなくとも赤血球に接着することでメロゾイトから MTRAP が分泌されることを見出し、同じマイクロネームからの分泌でも AMA1 と MTRAP の分泌には異なる分子が関与していることが示唆された (Chaiyawong et al. Parasitol Int, 2021)。

(5) マラリア原虫赤血球侵入型メロゾイトの滑走運動の発見

マラリア原虫の赤血球侵入過程のタイムラプスイメージング解析を行う過程で、世界で初めて、顕微鏡下で熱帯熱マラリア原虫がスライドガラス上を滑走していることを見出した。マラリア原虫内のシグナル伝達によって調節されるアクチンモーターにより滑走運動を行なっていることも明らかにした。さらに、薬剤スクリーニングのために、簡便にメロゾイトの滑走運動を評価する系を構築した (Yahata et al. Proc Natl Acad Sci USA, 2021)。また、熱帯熱マラリア原虫メロゾイトのアクチンモーターの機能に必要なアクチン脱重合因子 Actin-Depolymerizing Factor 1 (ADF1) の機能を解析するために、組換え ADF1 タンパク質を合成し、高純度で精製することに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Ishizaki Takahiro, Chaiyawong Nattawat, Hakimi Hassan, Asada Masahito, Tachibana Mayumi, Ishino Tomoko, Yahata Kazuhide, Kaneko Osamu	4. 巻 76
2. 論文標題 A novel Plasmodium yoelii pseudokinase, PypPK1, is involved in erythrocyte invasion and exflagellation center formation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102056
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2020.102056	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 Peng Yu-chih, Qi Yanwei, Zhang Cui, Yao Xiangyu, Wu Jian, Pattaradilokrat Sittiporn, Xia Lu, Tumas Keyla C., He Xiao, Ishizaki Takahiro, Qi Chen-Feng, Holder Anthony A., Myers Timothy G., Long Carole A., Kaneko Osamu, Li Jian, Su Xin-zhuan	4. 巻 11
2. 論文標題 Plasmodium yoelii Erythrocyte-Binding-like Protein Modulates Host Cell Membrane Structure, Immunity, and Disease Severity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e02995-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mBio.02995-19	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 Tiburcio Marta, Yang Annie S. P., Yahata Kazuhide, Suarez-Cortes Pablo, Belda Hugo, Baumgarten Sebastian, van de Vegte-Bolmer Marga, van Gemert Geert-Jan, van Waardenburg Youri, Levashina Elena A., Sauerwein Robert W., Treck Moritz	4. 巻 10
2. 論文標題 A Novel Tool for the Generation of Conditional Knockouts To Study Gene Function across the Plasmodium falciparum Life Cycle	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e01170-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mBio.01170-19	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 Chaiyawong Nattawat, Ishizaki Takahiro, Hakimi Hassan, Asada Masahito, Yahata Kazuhide, Kaneko Osamu	4. 巻 86
2. 論文標題 Distinct effects on the secretion of MTRAP and AMA1 in Plasmodium yoelii following deletion of acylated pleckstrin homology domain-containing protein	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102479 ~ 102479
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2021.102479	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 Yahata Kazuhide, Hart Melissa N., Davies Heledd, Asada Masahito, Wassmer Samuel C., Templeton Thomas J., Treeck Moritz, Moon Robert W., Kaneko Osamu	4. 巻 118
2. 論文標題 Gliding motility of Plasmodium merozoites	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	6. 最初と最後の頁 e2114442118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2114442118	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 Ishizaki Takahiro, Asada Masahito, Hakimi Hassan, Chaiyawong Nattawat, Kegawa Yuto, Yahata Kazuhide, Kaneko Osamu	4. 巻 85
2. 論文標題 cAMP-dependent protein kinase regulates secretion of apical membrane antigen 1 (AMA1) in Plasmodium yoelii	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102435 ~ 102435
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2021.102435	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17件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 9件)

1. 発表者名 Chaiyawong N, Hakimi H, Asada M, Yahata K, Kaneko O
2. 発表標題 Erythrocyte-Binding-Like (EBL) protein is the exclusive determinant to explain the difference in the growth speed and the virulence between Plasmodium yoelii 17XL and 17XNL lines
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 Yahata K, Davies H, Asada M, Templeton TJ, Treeck M, Kaneko O
2. 発表標題 Gliding motility of Plasmodium falciparum merozoites
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 Ishizaki T, Chaiyawong N, Hakimi H, Asada M, Tachibana M, Ishino T, Yahata K, Kaneko O
2. 発表標題 A novel Plasmodium yoelii pseudokinase, PypPK1, is involved in erythrocyte invasion and exflagellation center formation
3. 学会等名 US-Japan Cooperative Medical Sciences Program: Parasitic Diseases Panel Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石崎隆弘、Nattawa Chaiyawong、Hakimi Hassan、麻田正仁、橘真由美、石野智子、矢幡一英、金子修
2. 発表標題 ネズミマラリア原虫Plasmodium yoeliiの新規シュードキナーゼ (pPK1) は原虫のexflagellation center (EC)形成に関与する
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 Yahata K
2. 発表標題 Gliding motility of Plasmodium merozoites.
3. 学会等名 National University of Singapore-Nagasaki University Joint Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢幡一英, Davies H, 麻田正仁, Templeton T, Treck M, 金子修
2. 発表標題 マラリア原虫メロゾイトの滑走運動
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 石崎隆弘, 麻田正仁, 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 Suzuki M, Ishizaki T, Asada M, Yahata K, Kaneko O
2. 発表標題 Uncovering the mechanism of erythrocyte invasion through phenotypic characterization of undefined malaria parasite proteins for their roles in host cell invasion
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 Suzuki M, Yahata K, Kaneko O, Uyeda TQP
2. 発表標題 Characterizing actin-binding behaviors of malaria parasite actin depolymerizing factor
3. 学会等名 The 18th Awaji International Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ishizaki T, Chaiyawong N, Tachibana M, Ishino T, Yahata K, Asada M, Kaneko O
2. 発表標題 Characterization of a novel Plasmodium yoelii serine threonine kinase related to exflagellation center formation
3. 学会等名 The 18th Awaji International Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ishizaki T, Chaiyawong N, Asada M, Yahata K, Culleton R, Kaneko O
2. 発表標題 A novel Plasmodium yoelii serine threonine kinase related to exflagellation center formation
3. 学会等名 30th Annual Molecular Parasitology Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Peng YC, Qi Y, Zhang C, Yao X, Wu J, Lu X, Tumas K, He X, Qi C-F, Holder A, Kaneko O, Myers T, Long C, Li J, Su X
2. 発表標題 Plasmodium yoelii erythrocyte binding-like protein modulates host cell membrane, immunity and virulence
3. 学会等名 The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 68th annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kaneko O
2. 発表標題 Erythrocyte Invasion by Malaria Parasites
3. 学会等名 International Joint Forum on Infectious Disease Research 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kaneko O, Ishizaki T, Asada M, Hakimi H, Chaiyawong N, Kegawa Y, Yahata K.
2. 発表標題 Secretion of apical membrane antigen 1 (AMA1) is regulated by cAMP-dependent protein kinase in Plasmodium yoelii.
3. 学会等名 第62回日本熱帯医学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ishizaki T, Asada M, Hakimi H, Chaiyawong N, Kegawa Y, Yahata K, Kaneko O.
2. 発表標題 cAMP-dependent protein kinase regulates secretion of apical membrane antigen 1 (AMA1) in Plasmodium yoelii.
3. 学会等名 The 19th Awaji International Forum on Infection and Immunity
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Too EK, Chaiyawong N, Ishizaki T, Hakimi H, Asada M, Yahata K, Kaneko O.
2. 発表標題 Phenotypic characterization of Plasmodium yoelii in which a pseudokinase pPK4 is disrupted.
3. 学会等名 The 19th Awaji International Forum on Infection and Immunity
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石崎隆弘、Nattawat Chaiyawong、坂口美亜子、徳舩富由樹、麻田正仁、矢幡一英、金子修
2. 発表標題 マラリア原虫が有する2種のジアシルグリセロールキナーゼの解析
3. 学会等名 第90回日本寄生虫学会大会・第32回日本臨床寄生虫学会合同大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 杉田隆、安齊洋次郎、石川淳、小田真隆、金子修、河村好章、高松宏治、増澤俊幸、松本靖彦、三隅将吾、森田雄二	4. 発行年 2021年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 312
3. 書名 第7版 薬科微生物学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

長崎大学熱帯医学研究所原虫学分野
<http://www.tm.nagasaki-u.ac.jp/protozoology/>

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	矢幡 一英 (Yahata Kazuhide) (40467965)	長崎大学・熱帯医学研究所・助教 (17301)	機関変更日：2021年12月31日 愛媛大学へ転出
研究分担者	石崎 隆弘 (Ishizaki Takahiro) (40880810)	長崎大学・熱帯医学研究所・助教 (17301)	
研究分担者	麻田 正仁 (Asada Masahito) (40587028)	長崎大学・熱帯医学研究所・助教 (17301)	機関変更日：2019年11月1日 帯広畜産大学へ転出

	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
研究協力者	チャイヤウォン ナッタワット (Chaiyawong Nattawat)	長崎大学・医歯薬学総合研究科・博士課程大学院生 (17301)	
研究協力者	トー エドウィン キメリ (Too Edwin Kimeli)	長崎大学・医歯薬学総合研究科・博士課程大学院生 (17301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	トゥン タン ジン (Tun Thant Zin)	長崎大学・医歯薬学総合研究科・博士課程大学院生 (17301)	
研究協力者	鈴木 真耶 (Suzuki Maya)	長崎大学・医歯薬学総合研究科・博士課程大学院生 (17301)	
研究協力者	晴希生 ハッサン (Hakimi Hassan)	長崎大学・熱帯医学研究所・助教 (17301)	
研究協力者	坂口 美亜子 (Sakaguchi Miako)	長崎大学・熱帯医学研究所・助教 (17301)	
研究協力者	馬場 みなみ (Baba Minami)	長崎大学・熱帯医学研究所・助教 (17301)	
研究協力者	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 (16301)	
研究協力者	橘 真由美 (Tachibana Mayumi)	愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・助教 (16301)	
研究協力者	スー チン・シュアン (Su Xin-zhuan)	米国国立アレルギー感染症研究所・Laboratory of Malaria & Vector Research・セクション・チーフ	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	ムーン ロバート (Moon Robert W.)	英国ロンドン大学衛生熱帯医学大学院・助教	
研究協力者	ハート メリッサ (Hart Melissa N.)	英国ロンドン大学衛生熱帯医学大学院・博士課程大学院生	
研究協力者	トレック モーリツ (Treeck Moritz)	英国フランス・クリック研究所・シニア・グループ・リーダー	

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		
	英国	The Francis Crick Institute	London Sch Hyg & Trop Med
米国	NIAID, NIH		