

令和 4 年 6 月 11 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07522

研究課題名（和文）希少糖はいかなる機序でハマダラカ体内でのみマラリア原虫の発育を阻止するのか？

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism how rare sugars inhibit growth and development of malaria parasites only in the mosquito vector

研究代表者

新井 明治 (Arai, Meiji)

香川大学・医学部・准教授

研究者番号：30294432

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）：ハマダラカの体内でD-アロースがD-アロース6リン酸（A6P）に代謝されるか否かを確かめるために、D-アロースを吸わせたハマダラカのホモジネートについてHPLC分析を行ったところ、A6Pは検出されなかった。これにより、蚊の体内で生成されたA6Pこそがマラリア伝播阻止の真のエフェクター物質かもしれないという仮説は否定された。また、アフリカツメガエルの卵母細胞にPlasmodium bergheiのヘキソース・トランスポーター（PbHT）を発現させることに成功した。今後D-アロースによるPbHT活性阻害をin vitro実験で証明することで、作用機序の解明につながることを期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マラリア原虫の糖代謝経路を標的とした薬剤標的探索研究は盛んに行われているが、実用化には至っていない。我々は食品として市販されている希少糖含有シロップが十分なマラリア伝播阻止効果を示すことを確認しており、コストと安全性の両面で実用化に近い段階にある。本研究で得られた成果は、希少糖をベースとしたマラリア伝播阻止エサ（Transmission-blocking antimalarial rare sugar bait）実用化のための理論的基盤を提供するとともに、マラリア原虫の糖代謝系への干渉に基づく新規抗マラリア薬の開発に道を開くものである。

研究成果の概要（英文）：In order to confirm whether D-allose is metabolized to D-allose 6-phosphate (A6P) in the body of Anopheles mosquito, we performed HPLC analysis on the homogenate of mosquitoes which had been fed on D-allose. As a result, A6P was not detected, denying the hypothesis that A6P produced in the mosquito's body might be the true effector for transmission-blocking. We also expressed the hexose transporter of Plasmodium berghei (PbHT) in the oocytes of Xenopus laevis. We expect that showing the inhibition of PbHT activity by D-allose in an in vitro experiment will lead to the elucidation of the mechanism of action for transmission-blocking.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア ハマダラカ 伝播阻止 希少糖 D-アロース ヘキソース・トランスポーター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マラリア伝播阻止は媒介蚊体内で原虫の発育分化を抑制することにより新たな感染者・患者の発生を防ぐ手法である。我々は自然界に微量しか存在しない希少糖の一種であるD-アロースが、マラリア原虫の赤血球内発育ステージの増殖には影響を及ぼさず、ハマダラカ体内での発育ステージのみを特異的に阻害することを見出しているが、その作用機序は明らかになっていない。本研究ではマラリア原虫、ハマダラカ、ハマダラカ中腸内細菌という3つの生物・細胞について、希少糖の取込み、代謝・変換、代謝産物による原虫発育への作用を調べることで、D-アロースが蚊体内発育ステージ特異的に原虫発育を抑制する機序を明らかにする。本研究で得られる成果は、希少糖をベースとしたマラリア伝播阻止エサ (Transmission-blocking antimalarial rare sugar bait) 実用化のための理論的基盤を提供するとともに、マラリア原虫の糖代謝系への干渉に基づく新規抗マラリア薬の開発に道を開くものである。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、希少糖の一種であるD-アロースを含む糖液をハマダラカに吸わせると、マラリア原虫の蚊体内での発育分化が著しく阻害されることを見出した。さらに市販の希少糖含有シロップを希釈して蚊に吸わせた場合にも、D-アロースと同等の著明な伝播阻止効果を示すことを確認した (PCT 特許審査中)。マラリア原虫はグルコースとフルクトースの両方を通すヘキソーストランスポーター (HT) を有していることから、当初我々はD-アロースの作用機序はHTへの競合阻害によるものと考えていた。しかしD-アロースが赤血球内発育ステージ原虫に対する増殖阻害効果を示さなかったことから、蚊体内環境に特異的な要因が関与している可能性を考えた。すなわち、本研究課題における「問い」は、「いかなる機序によってD-アロースはハマダラカ体内でのみマラリア原虫の発育を阻害するのか」であり、これを明らかにするために、「D-アロースはHTを通して細胞に取り込まれ、細胞内で生じた代謝産物が直接あるいは間接的に、抗原虫効果を発揮する」という作業仮説に基づいて研究を行う。蚊体内発育ステージでは、宿主である蚊の自然免疫応答によって原虫発育が大きく影響を受けることが知られており、D-アロースが蚊の細胞や蚊の中腸内細菌に取り込まれることで、原虫発育を阻害する応答を誘導する現象を確かめることができれば、蚊体内でのみ原虫発育が阻害される機序を説明することができる。

3. 研究の方法

(1) 希少糖のマラリア伝播阻止効果に関する確認実験：これまでの研究で得た知見は、希少糖のマラリア伝播阻止効果は、希少糖含有糖液を吸わせたステフェンスハマダラカ (*Anopheles stephensi*) の体内においてローデントマラリア原虫 (*Plasmodium berghei*) の発育・増殖が100%阻害されるというものであり、糖液としては440 mMのD-フルクトースに100 mMのD-アロースを添加した場合に最大の効力を発揮することがわかっている。これに対してD-アロースの伝播阻止効果はD-アロース単独による作用ではなく、D-フルクトースとの特殊な組合せでのみ生じるのではないかという可能性が提示された。我々はこれまで長年にわたりハマダラカの飼育管理に440 mM D-フルクトースを使用してきたため、D-フルクトースを使用することについて疑問を感じていなかったが、自然界でハマダラカが植物から得るエネルギー源としての糖 (= 資化性糖) はD-グルコースも含まれることから、D-フルクトース以外の資化性糖についても検討を行った。具体的にはステフェンスハマダラカに8種の糖液 (: D-グルコースのみ、 : D-グルコース + D-アロース、 : D-グルコース + D-プシコース、 : D-グルコース + D-ガラクトース、 : D-フルクトースのみ、 : D-フルクトース + D-アロース、 : D-フルクトース + D-プシコース、 : D-フルクトース + D-マンノース) を吸わせてP. berghei 感染マウスを吸血させ、感染吸血10日後に中腸オオシスト数のカウントを行った。結果としては、 : D-フルクトース + D-アロースと同様に、 : D-グルコース + D-アロースでも強力なオオシスト形成抑制効果が認められた。 : D-フルクトースのみ、 : D-フルクトース + D-マンノース、 : D-グルコースのみ、 : D-グルコース + D-ガラクトースではオオシスト抑制効果は認められず、オオシスト抑制効果はD-アロースによるものであることが確認された。一方で、 : D-フルクトース + D-プシコースでは若干のオオシスト抑制効果が認められたものの、 : D-グルコース + D-プシコースではオオシスト抑制効果は認められなかった。D-プシコースの伝播阻止効果はD-アロースに比べると弱い、D-フルクトースと併用することで一定の効果を発揮すると考えられる。

(2) 蚊の体内でD-アロースがA6Pに代謝されるか否かの検討：植物を用いた実験で、D-アロースが代謝されてD-アロース6リン酸 (A6P) を生じ、この物質が核のシグナル伝達系に影響して各種の生理機能を発揮することが報告されている (Kano et al., J. Exp. Botany, 2013)。我々は同様の現象が蚊の体内で起こっているのではないかと考えた。すなわち、蚊に与えたD-アロースが蚊の細胞に吸収・代謝されてA6Pを生じ、これがマラリア原虫に対する防御活性を誘導するのではないかという作業仮説を立てた。これを確かめるために、蚊の虫体ホモジネートサンブ

ル中のD-アロースとA6Pの分析を行った。高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による分析については、香川大学国際希少糖研究教育機構の望月進博士に依頼した。具体的にはAn. stephensiに440 mM D-フルクトースのみを与えた群と、440 mM D-フルクトース+100 mM D-アロースを与えた群を設定し、3日後に蚊を回収してピーズ破碎によりホモジネートを調製し、フィルター濾過した液体をサンプルとした。結果は、蚊虫体ホモジネート中にD-フルクトース、D-アロースのピークは検出されたが、A6Pのピークは検出されなかった。蚊の吸血の有無によって異なる可能性を考え、吸血蚊と非吸血蚊についても同様の実験を行ったが、吸血蚊でもA6Pのピークは検出されなかった。これにより、蚊に投与されたD-アロースは、蚊の体内でA6Pに代謝されることはないと考えられる。D-アロースの代謝に関しては、蚊の腸内細菌によってA6Pに代謝される可能性も想定していたが、今回調製したサンプルでは腸内細菌も含まれていたことから、その可能性は低いと考えられる。

(3) アフリカツメガエル卵母細胞でのPbHT発現：D-アロースそのものがマラリア伝播阻止作用の主体をなすことが確認されたことから、再びヘキソーストランスポーターへの干渉作用を検討することとした。我々はこれまでにP. bergheiのヘキソース・トランスポーター（PbHT）を組換えタンパクとして人工脂質膜（リポソーム）に発現させる実験を行ったが、安定的な発現を得られず頓挫している。そこで今回は、アフリカツメガエルの卵母細胞にPbHTを発現させる実験系を構築することにした。PbHT遺伝子にc-myc配列を付加したものを合成（外注）し、これをアフリカツメガエル用の発現ベクターに挿入し、mMESSAGE mMACHINE T7 Transcription Kit（Thermo Fisher社）を用いてin vitroでcRNAを合成した。これをアフリカツメガエルの卵母細胞にインジェクションし、3日後の卵母細胞のライセートを調製し、ウェスタンブロッティング（抗c-myc抗体を使用）により発現を確認したところ、40kDaの位置にバンドが認められた。目的タンパクの大きさは計算上59kDaであるため、何らかのプロセッシングが起こったものと考えられる。次に、上記の方法でPbHTのcRNAをインジェクションしたアフリカツメガエル卵母細胞を固定し、パラフィンに包埋後、薄切標本を作成した。抗c-myc抗体を使用して免疫染色を行ったところ、卵母細胞の細胞膜にPbHTが発現していることが確認された。

4. 研究成果

(1) 希少糖のマラリア伝播阻止効果に関する確認実験：D-アロースの伝播阻止効果について、D-アロース単独の効果ではなく、D-フルクトースとの何らかの協調作用によって効果を発現するのではないかと疑問に対して、今回の研究で一定の解答を得られた意義は大きい。また、資化性糖のみの実験群で比較した場合、D-フルクトースのみを与えた群とD-グルコースのみを与えた群でオオシスト数に差がなかったことも、重要な知見と言える。Anopheles stephensiを用いてマラリア伝播に関する研究を行っている研究グループは世界に多数あり、蚊の維持管理にD-フルクトースを用いるグループと、D-グルコースを用いるグループが併存していることから、コントロール実験として、D-フルクトースとD-グルコースでは形成されるオオシスト数に差がないことを示しておくことは前述の両グループに対して説得力をもつ。

(2) 蚊の体内でD-アロースがA6Pに代謝されるか否かの検討：D-アロースが蚊の体内ステージでのみ抗マラリア活性を発揮する理由について、蚊の体内でD-アロースが代謝されて生じるA6Pが役割を演じているとの作業仮説を設定したが、今回の実験結果によりその仮説は否定された。今回の実験方法から、蚊の腸内細菌によるA6P産生の可能性が完全に否定されたとは言えないが、HPLCで検出できるレベルのA6Pは検出されなかったことから、マラリア伝播阻止活性の主体としては考慮対象からはずして良いと考えられる。すなわち、D-アロースのマラリア伝播阻止作用は、その代謝産物ではなく、D-アロースそのものによる作用であることが示唆される。

(3) アフリカツメガエル卵母細胞でのPbHT発現：アフリカツメガエル卵母細胞にPbHTを発現させることができたことにより、今後機能解析の実験へと進むことができる。今後の予定としては、PbHT発現卵母細胞とC14標識レベルしたD-グルコースあるいはD-フルクトースと共培養し、卵母細胞に取り込まれた放射カウントを評価することで、PbHTの糖取り込み活性を確認する。次いで同様の実験系にD-アロースを添加することで、糖の取り込みが阻害されることを確認する。D-アロースによりPbHTの糖取り込みが阻害されれば、D-アロースがマラリア原虫の糖取り込みを阻害することで発育・増殖を抑制するという基盤的データが得られることになる。この実験系が確立されれば、今後各種希少糖のPbHT阻害活性を評価することで、D-アロースよりも強力な伝播阻止活性を有する希少糖を見出すことが期待される。

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 1件）

1. 発表者名 Arai M, Hirai M, Tanaka TQ, Tokuda M, Izumori K
2. 発表標題 Rare sugar-containing syrup inhibits malaria transmission
3. 学会等名 The 7th International Symposium of International Society of Rare Sugars (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新井明治
2. 発表標題 希少糖によるマラリア伝播阻止
3. 学会等名 第38回日本糖質学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新井明治
2. 発表標題 希少糖によるマラリア伝播阻止：実用化に向けての課題
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 新井明治, 平井 誠, 田中 健Q, 徳田雅明, 何森 健
2. 発表標題 希少糖によるマラリア伝播阻止：実用化に向けての課題
3. 学会等名 第75回日本寄生虫学会西日本支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新井明治, 平井 誠, 田中 健Q, 徳田雅明, 何森 健
2. 発表標題 希少糖をベースとしたマラリア伝播阻止エサの開発
3. 学会等名 第60回日本熱帯医学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水島大貴, Ahmed Tabbabi, 山本大介, 新井明治, 加藤大智
2. 発表標題 ハマダラカの中腸環境を変化させる糖類のスクリーニング
3. 学会等名 第90回日本寄生虫学会・第32回日本臨床寄生虫学会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水島大貴, 山本大介, Tababbi Ahmed, 新井明治, 加藤大智
2. 発表標題 キサンチンデヒドロゲナーゼ (XDH) は希少糖アロースのハマダラカ中腸におけるマラリア原虫の発達抑制機構に関与する
3. 学会等名 第91回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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