

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07525

研究課題名(和文) マラリア原虫の赤血球侵入期における滑走運動の役割

研究課題名(英文) Gliding motility in malaria parasites during erythrocyte invasion

研究代表者

矢幡 一英 (YAHATA, KAZUHIDE)

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：40467965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マラリアの病原体であるマラリア原虫は、宿主赤血球に感染して致死的な病原性を示す。したがって、赤血球感染を食い止めることはマラリアによる致死的な状況を脱する手段となる。本研究は、マラリア原虫が赤血球に侵入する現象のうち、未だ明らかとなっていない赤血球侵入の鍵となるスイッチとそれに関わるメカニズムを解明することを目的とし、申請者が最近発見した赤血球接着期のマラリア原虫の滑走運動に着目し、赤血球接着とマラリア原虫の滑走運動の関わり、滑走運動の活性化メカニズムについてマラリア抑制に資する情報を集積した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの知見では、赤血球に侵入するマラリア原虫は赤血球に能動的に侵入する際に滑走運動を使っていると考えられてきた。しかしながら、本研究で発見した赤血球接着時の滑走運動現象は、マラリア原虫が赤血球侵入に必要な分子の活性化や局在移行といった現象を解明するための鍵となる。マラリア原虫の赤血球接着から赤血球侵入における滑走運動のメカニズムを理解していくことで、マラリア克服のための新たな切り口を提供できると考えている。

研究成果の概要(英文)：Plasmodium invades host erythrocytes and exhibits lethal pathogenicity. To escape this situation, one possible strategy is to prevent the infection of erythrocytes. The objective of this study is to elucidate the key switch for erythrocyte invasion and the mechanism involved in the phenomenon of malaria parasite invasion into erythrocytes. Focusing on gliding motility of Plasmodium falciparum merozoites, we accumulated information on the relationship between erythrocyte adhesion and gliding motility of malaria parasites, and on the activation mechanism of gliding motility that would contribute to the control of malaria.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア 赤血球侵入 滑走運動

1. 研究開始当初の背景

マラリアは未だ世界中で年間 40 万人以上の死者を出しているが、有効なワクチンは未だ実用化されておらず、薬剤耐性原虫の拡大も問題となっている。マラリアは、マラリア原虫が赤血球に侵入することによって発症し宿主に対して深刻な症状を引き起こす。したがって、マラリア原虫の赤血球侵入機構の解明は、マラリアを引き起こす赤血球感染を食い止めるためには重要な研究課題である。マラリア原虫を含むアピコンプレクサ原虫は、宿主細胞に侵入するためには滑走運動を必要とする。マラリア原虫では蚊から媒介されるマラリア原虫の滑走運動について研究されてきたが、赤血球侵入期におけるマラリア原虫 (メロゾイト) は滑走運動がスライド上では見られなかったことから、赤血球侵入期の滑走運動に関しては殆んど知られていない。しかしながら、我々はメロゾイトの赤血球侵入時のライブイメージング解析の際に、メロゾイトがスライド上を滑走運動するという現象を発見した。メロゾイトの感染赤血球放出後から見られる滑走運動現象は、メロゾイトが赤血球侵入に必要な分子の活性化や局在移行といった現象を解明するための鍵となる。そこで本研究では、学術的な「問い」として、「マラリア原虫の赤血球侵入の鍵となるスイッチは何か?」を設定し、メロゾイトの赤血球接着から赤血球侵入における滑走運動のメカニズムの解明により、マラリア克服のための新たな標的とシーズを創出する。

2. 研究の目的

マラリア原虫を含むアピコンプレクサ原虫は、同じアルベオラータ群を構成する繊毛虫 (繊毛運動) や渦鞭毛藻 (鞭毛運動) とは異なり、「滑走運動」と呼ばれるユニークな運動機構を使って宿主細胞に能動的に侵入することが知られている。滑走運動は、原虫側分子と宿主側分子が接着し、原虫側分子に繋がったアクチン-ミオシン系モーターが働くことにより推進力が発生する。マラリア原虫メロゾイトは、赤血球に接着した際に原虫の赤血球侵入関連分子が活性化され、赤血球膜上の受容体と結合し、滑走運動により能動的に赤血球に侵入するというモデルが提唱されている。近年、我々はメロゾイトが感染赤血球から放出後、赤血球上を滑走運動し赤血球に侵入するという現象を世界で初めて発見したことから、メロゾイトの滑走運動と赤血球侵入に関する新しい知見を得ることができると考えている。赤血球侵入関連分子は原虫内部から細胞表面に移行することが必要であるが、これが滑走運動と関わっている可能性が考えられ、滑走運動に焦点を当てることで赤血球侵入関連分子の局在移行を含めた活性化の理解に繋がると考えられる。本研究では、赤血球に侵入するマラリア原虫の滑走運動を評価するシステムを構築し、赤血球侵入の際に活性化されて移行すると考えられる原虫分子と滑走運動の関連性、さらにそれに伴う滑走運動を制御するスイッチについて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 滑走運動を評価するためのハイスループットシステムの構築：熱帯熱マラリア原虫から MACS カラムでシズント期原虫を精製し、ibidi スライドに播種した後、倒立顕微鏡 (TiE、Nikon) と従来の CCD カメラの 4 倍の視野を誇る CCD カメラ (ORCA-Fusion、浜松ホトニクス) によるライブイメージングでメロゾイトの滑走運動を評価した。また、ローデントマラリア原虫よりスポロゾイト、トキソプラズマからタキゾイト、パベシア原虫よりメロゾイトを同様に ibidi スライド上に播種し、ライブイメージングにより滑走運動能を評価した。
- (2) 滑走運動の活性化機構の解明：シズント期原虫を MACS カラムで精製し ibidi スライドに播種した後、各種薬剤 (DMSO、Cytochaladin D、Jasplakinolide、BAPTA-AM、A23187、U73122、U73343、R59022、Propranolol、アジスロマイシン) を添加して 17°C (1 時間)、その後 37°C (1 時間) インキュベートした。ホルムアルデヒドで細胞固定した後、DAPI で感染赤血球から放出されたメロゾイト DNA を染色した。固定スライドは倒立顕微鏡 (TiE) と CCD カメラ (ORCA-Fusion) で透過光と DAPI 像を取得し、感染赤血球のヘモゾインとメロゾイト DNA の距離を測定し滑走運動として評価した。

4. 研究成果

- (1) メロゾイトの感染赤血球からの放出距離を測定するため、広視野 CCD カメラを導入し、マニュアル解析を行ったところ、従来と比べ解析処理能力を 4 倍に増やすことができた (図 1)。その後、ハイコンテンツスクリーニングシステムでデータ解析を行なったが、AI による自動解析でのサンプル認識がうまく出来なかったことから、ハイスループットでの解析はプログラミングも含めて改善していかなければならない。

(2) メロゾイト滑走運動の滑走運動は各種阻害剤の結果から、原虫内のホスホリパーゼ C (PLC)-ジアシルグリセロール (DAG)-ホスファチジン酸 (PA) からなる経路と PLC-カルシウムシグナル伝達経路によって制御されていることが示唆された。更にマラリア原虫の赤血球侵入を阻害すると報告されているアジスロマイシンにより滑走運動が阻害されることを発見した (図2)。

(3) 同条件におけるメロゾイトとスポロゾイトの滑走運動能と比較したところ、メロゾイトはスポロゾイトより 1/10 の速度で運動し、メロゾイトの運動可能時間は1分以内、スポロゾイトは2分以上であることがわかった (図3)。他のアピコンプレクサ原虫と比較してメロゾイトの滑走運動の速度は非常に遅く、かつ短時間であることがわかった。メロゾイトは赤血球侵入能を1, 2分以内に失うが、これは滑走運動と関わっていることが示唆された。

(4) マラリア原虫の赤血球侵入現象に滑走運動が関わっていることを世界で初めて発見した事例としてPNAS誌に報告した (Yahata K et al. PNAS 2021)。

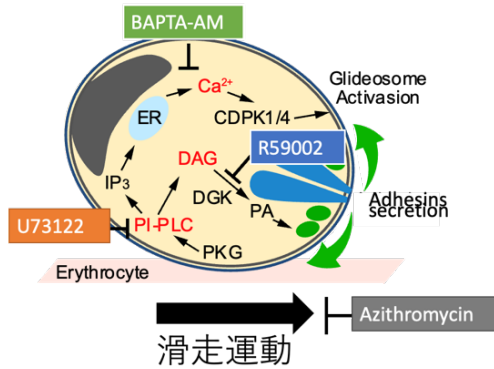


図2. マラリア原虫メロゾイトの滑走運動に関わるシグナルカスケード

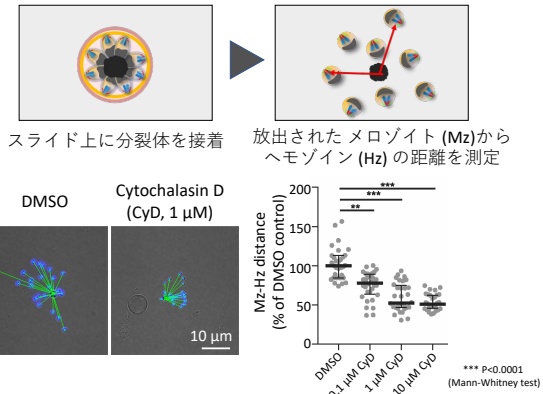


図1. メロゾイトの滑走運動能の数値化

他のアピコンプレクサ原虫と比較してメロゾイトの滑走運動の速度は非常に遅く、かつ短時間であることがわかった。メロゾイトは赤血球侵入能を1, 2分以内に失うが、これは滑走運動と関わっていることが示唆された。

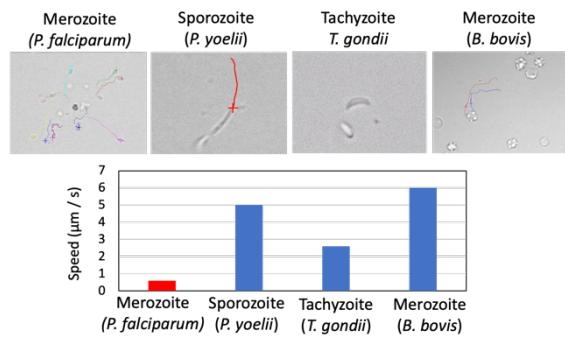


図3. アピコンプレクサ原虫の滑走運動能

<引用文献>

Yahata K, Hart MN, Davies H, Asada M, Wassmer SC, Templeton TJ, Treeck M, Moon RW, Kaneko O. Gliding motility of *Plasmodium* merozoites. Proc Natl Acad Sci U S A. 118(48):e2114442118 (2021).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 8件）

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	6. 最初と最後の頁 -
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 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 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 -
1. 著者名 Miyazaki Shinya, Chitama Ben-Yeddy Abel, Kagaya Wataru, Lucky Amuza Byaruhanga, Zhu Xiaotong, Yahata Kazuhide, Morita Masayuki, Takashima Eizo, Tsuboi Takafumi, Kaneko Osamu	4. 巻 83
2. 論文標題 Plasmodium falciparum SURFIN4.1 forms an intermediate complex with PTEX components and Pf113 during export to the red blood cell	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102358 ~ 102358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2021.102358	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 Hakimi Hassan, Templeton Thomas J., Sakaguchi Miako, Yamagishi Junya, Miyazaki Shinya, Yahata Kazuhide, Uchihashi Takayuki, Kawazu Shin-ichiro, Kaneko Osamu, Asada Masahito	4. 巻 16
2. 論文標題 Novel Babesia bovis exported proteins that modify properties of infected red blood cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1008917	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 Sulistyowaty Melanny Ika, Uyen Nguyen Hoang, Suganuma Keisuke, Chitama Ben-Yeddy Abel, Yahata Kazuhide, Kaneko Osamu, Sugimoto Sachiko, Yamano Yoshi, Kawakami Susumu, Otsuka Hideaki, Matsunami Katsuyoshi	4. 巻 26
2. 論文標題 Six New Phenylpropanoid Derivatives from Chemically Converted Extract of Alpinia galanga (L.) and Their Antiparasitic Activities	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 1756 ~ 1756
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules26061756	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 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 -
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 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 ~ 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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 矢幡一英
2. 発表標題 マラリア原虫の赤血球侵入と滑走運動
3. 学会等名 第28回分子寄生虫学ワークショップ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuhide Yahata
2. 発表標題 Gliding motility in Plasmodium falciparum
3. 学会等名 The 14th NUS-Nagasaki Joint Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢幡一英, Heledd Davies, 麻田正仁, Thomas Templeton, Moritz Treeck, 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
4. 発表年 2019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
研究協力者	モリッツ トリーク (Moritz Treeck)		

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	麻田 正仁 (Asada Masahito)		
研究協力者	金子 修 (Kakeko Osamu)		

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	LSHTM	