

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790094

研究課題名（和文）種間の小胞輸送による熱帯熱マラリア原虫の赤血球内寄生維持機構の解明

研究課題名（英文） Proteolipid of vacuolar H⁺-ATPase of *Plasmodium falciparum*.

研究代表者

八代 聖基（ YATSUSHIRO SHOUKI ）

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究センター・研究員

研究者番号：90399155

研究成果の概要（和文）：

本研究課題は「熱帯熱マラリア原虫における膜輸送蛋白質の同定と機能解析」と題し、特にヒト・マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) の赤血球内寄生時における原虫外膜系の形成機構と血球膜へのタンパク輸送機構を分子（蛋白質）レベルで解明することを目的として研究を遂行してきた。

平成 20 年度はその中でも特にこれまで明らかにしている N-ethylmaleimide -sensitive factor のマラリアホモログ (*Pf NSF*) が原を足がかりにいくつかの原虫由来の膜融合装置関連蛋白質について同定することを目指した。昆虫細胞を用いた強制発現系を用いてマラリア NSF (*Pf NSF*) を大量に発現させ、特異的抗体を駆使し膜融合装置関連蛋白質の候補を選び出した。これらの蛋白質の同定、生化学的、構造生物学的解析を行っていくことを考えている。さらに、赤血球内に寄生維持するマラリア原虫をこれら小胞輸送系を用いて簡便に検出できないかと考え、血中の特定蛋白質（バイオマーカー候補）の検出を念頭におき、簡便なバイオマーカー検出系の確立を試みた。その結果、極微量の全血をから血中のアミラーゼ活性を測定する方法を確立するにいたった (Maeda et al. 2008 *Electrophoresis*)。

平成 21 年度は昨年度より解析を進めている N-ethylmaleimide-sensitive factor のマラリアホモログ (*Pf NSF*) が原を足がかりに昆虫細胞を用いた強制発現系と特異的抗体を用いていくつかの原虫由来の膜融合装置関連蛋白質についていくつか候補タンパク質を見いだした (sec23 ホモログ等)。これらが本当に原虫とヒトの種の間の行き来に関与するのか？またその小胞輸送をコントロールしているのか？さらに今後はこれらの蛋白質の遺伝子と GFP を融合した遺伝子をマラリアに発現させる系を構築し、蛍光顕微鏡下で可視化する。合わせてマラリアに特定のプラスミド遺伝子を発現するプラスミドを把持したものを簡便に検出できないかと考え、プラスミドへのライゲーションをマイクロチップ電位泳動装置を用いて確認する方法を確立した (Umemoto et al. 2010 *J Pharm Biomed Anal.*)。今後これらの原理を応用しつつ特定の遺伝子（プラスミド）を保持したマラリア原虫の検出を行いたい。

研究成果の概要（英文）：

V-ATPase is a multisubunit protein complex and is composed of two different sectors, a catalytic V1 sector comprising eight subunits and a membranous V0 sector comprising at least three subunits, in various endomembrane systems in eukaryotes and in the plasma membranes of some bacteria. V-ATPase is an electrogenic proton pump, and forms an electrochemical gradient of protons across membranes at the expense of ATP hydrolysis, which plays important roles in various physiological and pathological processes, such as storage of neurotransmitters in synaptic vesicles, maturation of peptide hormones in secretory granules, digestion of bone matrix by osteoclasts, infection by viruses and so on.

Plasmodium falciparum is the parasitic unicellular protozoan that causes malaria, one of the most serious infectious diseases for human beings. *P. falciparum* highly expresses VATPase in food vacuoles, counterparts of mammalian lysosomes and yeast vacuoles, small clear vesicles and the plasma membrane. V-ATPase energizes these organelles through active transport of protons, and the resultant acidic pH of the limited area of extracellular space and membrane potential across the membrane are responsible for the digestion of hemoglobin, and accumulation of ions and antimalarial agents in food vacuoles, and uptake of nutrients through the plasma membrane. For instance, pantothenate is taken up by the parasite through H⁺-coupled active transport. The uptake of choline through the plasma membrane is driven by a membrane potential. Although these findings indicate the essential role(s) of VATPase in the life of the malaria parasite, little is known about the overall features of the V-ATPase in the malaria parasite. It is unknown whether or not subunits other than subunits A and B are actually expressed in the malaria parasite. The details of the subunit composition, gene organization of the individual subunits, biogenesis and sorting are also unknown.

To elucidate all the features of the V-ATPase in the malaria parasite, we have tried to clone cDNAs of the individual subunits of the V-ATPase from *P. falciparum*. Here, we report cDNA cloning of the proteolipid, the smallest hydrophobic subunit comprising the V0 proton channel, of *P. falciparum*. To our surprise, the cDNA of *P. falciparum* without any codon usage modification complements a yeast null mutant.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎薬学

キーワード：感染症、マラリア原虫

1. 研究開始当初の背景

マラリア原虫は全世界において感染地域 100 ヶ国以上であり、年間感染者 3 億人そのうち 200 万人以上が死亡するという人類史上最も重篤な寄生虫感染症である。これほど重大な感染症マラリア撲滅のために多くの研究者がワクチンに代表される抗マラリア薬開発に力を注いでおり多くの知見が得られているが、いまだ原虫に対する特效薬は 1920 年に発見されたキナクリン以来見つかっていないのが現状である。また深刻な事態として地球温暖化によるマラリア原虫を媒介するハマダラ蚊の生息域拡大や、キナクリン耐性の原虫の出現といった原因により感染者数の増加・感染地域の拡大を引き起こしている。実際、日本においてもこのままのペースで温暖化が進むと仮定しても数十年後には日本全域が感染可能地域となるとまで言われており、危機感が増している。マラリア原虫撲滅の為にはキナクリンに変わる新しい薬のターゲットを見つけ出すことが急務であるが、マラリア原虫の生物学的知見は他の生物（動物細胞、昆虫細胞、酵母、大腸菌等）に比べ乏しいのが現状である。そこで私は、あえて生物学的アプローチから抗マラリア薬のターゲットを見いだそうと考えた。

2. 研究の目的

マラリア原虫の感染成立機構を考える上で、マラリア原虫の赤血球内での動態を理解することは重要である。マラリア原虫は赤血球に侵入後、自身の外側に膜系（原虫外膜・寄生胞膜）を形成し、その膜系を介して栄養を吸収し、老廃物を排出している。同時に、原虫はある種の膜タンパク（EMP1 and 3 等）を合成・分泌し、血球膜上にノブ状構造体を形成する（図 1）。

この構造体は、抗体の攻撃をかわしたり、原虫が脳実質へ侵入し、脳マラリアを発症する際重要である。従って、原虫外膜系の形成と赤血球膜へのタンパク輸送は、マラリア原虫における寄生を支える重要な膜分子基盤を構成すると考えられるが、その形成機構は不明である。そこで本研究の目的は、ヒト・マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) の赤血球内寄生時における原虫外膜系の形成機構と血球膜へのタンパク輸

送機構を分子（蛋白質）レベルで解明することである。

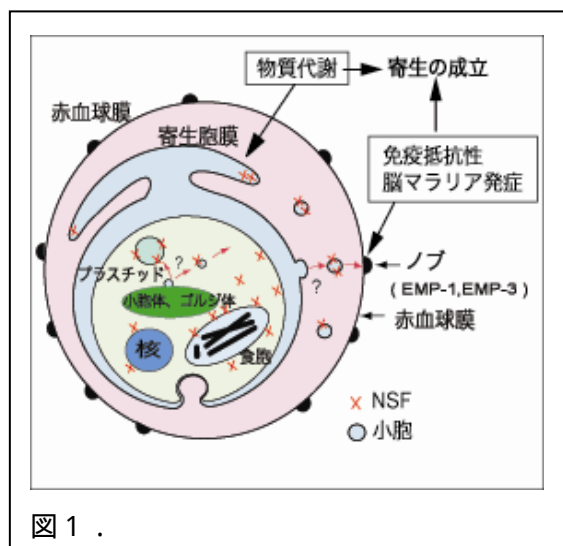


図 1 .

3. 研究の方法

感染赤血球膜の特徴であり原虫の病原性発現に重要なノブ状構造体は、Erythrocyte Membrane Protein 1,3 (EMP-1,3)等の原虫由来タンパクが血球膜に輸送されたものである。赤血球には小胞輸送系のような輸送装置は含まれていないため、原虫外膜の形成や血球膜へのタンパク輸送には原虫由来の何らかの装置により行われている、もしくは赤血球膜上のタンパク質が原虫のタンパク質と相互に機能して行われているのではと考えられていた。これまでの解析から、真核生物で膜融合に重要なSNARE複合体の構成サブユニット一つとして知られているNSFの原虫ホモログ (Pf NSF) をクローン化した。また、Pf NSF は蛋白質レベルで原虫に発現していることも明らかにしている。さらに驚いたことに、一部のPf NSF は原虫外に存在しており、外膜系である寄生胞膜の一部分とノブ構造体の構成タンパクである EMP-1を輸送している小胞と似た小胞に局在することを見いだした。これらの結果は、原虫のSNARE様複合体が外膜系やノブ構造の形成に関与することを示唆している。本研究において、まず第一に原虫のNSFをプローブとしてマラリア原虫由来のSNARE様複合体（特にt-SNAR, v-SNAR）を形成する因子を生化学・分子生物学的手法を用いて同定しPf NSF

とともに機能解析する。さらに赤血球上のタンパク質が原虫由来のタンパク質と相互作用の可能性を追求することを目的とし、原虫のNSFをプローブとして非感染赤血球をサンプルとして原虫由来の輸送装置と相互機能するタンパク質を同定、機能解析を行う。

マラリア原虫は、栄養物を取り込み、抗マラリア薬を排出するための膜系（原形質膜と寄生胞膜）を発達させている。原形質膜上に存在する V-ATPase が、薬剤排出や栄養物の取り込むエネルギーを供給するための一次ポンプとして重要らしい(Hayashi, et al. J. Biol. Chem. (2001)276, 15249-15255)と考えられている。真核生物において V-ATPase は、十数個のサブユニットから構成されていることが知られているが、マラリア原虫においては申請者がクローニングしたものを含め数種類のサブユニットしか同定されていない。そこで本研究においてマラリア V-ATPase の不明なサブユニットを同定し、その機能を解析する。

4. 研究成果

平成 20 年度はその中でも特にこれまで明らかにしている N-ethylmaleimide-sensitive factor のマラリアホモログ(*Pf* NSF)が原を足がかりにいくつかの原虫由来の膜融合装置関連蛋白質について同定することを目指した。昆虫細胞を用いた強制発現系を用いてマラリアNSF(*Pf* NSF)を大量に発現させ、特異的抗体を駆使し膜融合装置関連蛋白質の候補を選び出した。これらの蛋白質の同定、生化学的、構造生物学的解析を行っていくことを考えている。さらに、赤血球内に寄生維持するマラリア原虫をこれら小胞輸送系を用いて簡便に検出できないかと考え、血中の特定蛋白質(バイオマーカー候補)の検出を念頭におき、簡便なバイオマーカー検出系の確立を試みた。その結果、極微量の全血をから血中のアミラーゼ活性を測定する方法を確立するにいたった(Maeda et al. 2008 *Electrophoresis*)

平成 21 年度は昨年度より解析を進めている N-ethylmaleimide-sensitive factor のマラリアホモログ(*Pf* NSF)が原を足がかりに昆虫細胞を用いた強制発現系と特異的抗体を用いていくつかの原虫由来の膜融合装置関連蛋白質についていくつか候補タンパク質を見いだした(sec23 ホモログ等)。これらが本当に原虫とヒトの種の間に行き来に関与するのか？またその小胞輸送をコントロールしているのか？さらに今後はこれらの蛋白質の遺伝子と GFP を融合した遺伝子をマラリアに発現させる系を構築し、蛍光顕微鏡下で可視化する。合わせてマラリアに特定のプラスミ遺伝子を発現するプラスミドを把持

したものを簡便に検出できないかと考え、プラスミドへのライゲーションをマイクロチップ電位泳動装置を用いて確認する方法を確立した(Umemoto et al. 2010 *J Pharm Biomed Anal.*)。今後これらの原理を応用しつつ特定の遺伝子(プラスミド)を保持したマラリア原虫の検出を行いたい。

またさらに液胞型 ATPase (Vtype-ATPase)についてデータベースを用いた解析を行った。その結果、熱帯熱マラリア原虫の V-ATPase のサブユニット構成は他の真核生物同様 13 個のサブユニットからなっている事を明らかにした(図 2)。それら構成サブユニットのうちの幾つかにはホモログが存在するが、それがゲノム上に見あたらないものがあった(例:VoのC”サブユニット)。これは、マラリアの V-ATPase のサブユニット構成一部が他の真核生物(特にヒト)とは異なる可能性があることを示しており、抗マラリア薬開発の糸口になる可能性が高い。

V-ATPase genes in *Plasmodium falciparum*

Subunit	<i>P. falciparum</i>				Verte			
	Accession No. (GenBank)	Gene number	Chromosome	Accession No. (GenBank)	Gene	MW (kDa)		
V1	A	71.6	PF13 0388	13	66.2	VAM 1	66	
	B	55.7	PF13 0394	8	49.8	VAM 2	47	
	C	46.2	PF13 0395	7	38.8	VAM 3	42	
	D	31.1	PF13 0327	13	47.3	VAM 4	33	
	E	28.9	PF13 0391	8	30.7	VAM 5	27	
	F	61.2	PF13 0410	6	41.2	VAM 7	19	
	G	44.2	PF13 0330	13	32.0	VAM 10	15	
	H	61.6	PF13 0334	13	25.8	VAM 12	34	
	V6	a	32.0	PF13 0315	8	28.6	SPH 127v1	36
		b	47.6	PF13 0316	14	34.8	VAM 6	35
		c	11.0	PF13 0396	8	11.9	VAM 3	17
v		-	-	-	-	HSA 11	17	
v'		22.1	MAL1P 1271	13	68.8	VAM 13	23	

kDa = molecular weight

図 2 .

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 5 件)

1. Umemoto Y, Kataoka M, Yatsushiro S, Yamamura S, Ooie T, Kido J, Yamamoto T, Shinohara Y, Baba Y. "Analysis of DNA ligation by microchip electrophoresis." *J Pharm Biomed Anal.* (2010) 査読有り **52(2)**:323-328.
2. Akamine R, Yatsushiro S, Yamamura S, Kido J, Shinohara Y, Baba Y, Kataoka M. "Direct endonuclease digestion and multi-analysis of restriction fragment length polymorphisms by microchip electrophoresis." *J Pharm Biomed Anal.* (2009) 査読有り **50(5)**:947-953.

3. Umemoto Y, Kataoka M, Yatsushiro S, Watanabe M, Kido J, Kakuhata R, Yamamoto T, Shinohara Y, Baba Y. " Sequential analysis of RNA synthesis by microchip electrophoresis. " *Anal Biochem.* (2009) 査読有り **388(1)**:161-163.
4. 八代聖基、片岡正俊 「マイクロチップ電気泳動の臨床検査への応用」*電気学会誌(C)*(2009) 査読有り **192(2)**:282-287.
5. Maeda E, Kataoka M, Yatsushiro S, Kajimoto K, Hino M, Kaji N, Tokeshi M, Bando M, Kido J, Ishikawa M, Shinohara Y, Baba Y. " Accurate quantitation of salivary and pancreatic amylase activities in human plasma by microchip electrophoretic separation of the substrates and hydrolysates coupled with immunoinhibition. " *Electrophoresis* (2008) 査読有り **29(9)**:1902-1909.

〔学会発表〕(計4件)

1. 八代 聖基、山村 昌平、山口 裕加、片岡 正俊 「細胞チップによるマラリア迅速検出法の構築」第50回日本熱帯医学会 (沖縄)2009年10月
2. 八代 聖基、山村 昌平、山口 裕加、片岡 正俊 「細胞チップによるマラリア迅速検出基礎技術の確立」第17回分子原虫ワークショップ (群馬)2009年8月
3. 八代聖基、山村昌平、山口裕加、堀井俊宏、片岡正俊 「熱帯熱マラリア迅速検出のための細胞チップシステムの開発」第129回 日本薬学会大会 (京都)2009年3月
4. 八代聖基、山村昌平、片岡正俊 「熱帯熱マラリアの細胞チップを用いた迅速検出系の構築」第3回ナノバイオデバイスワークショップ(筑波)2008年12月

〔図書〕(計1件)

1. 八代 聖基、山村 昌平、片岡 正俊 「マラリア原虫の迅速診断法を開発」産総研 TODAY (2010) 3:6-7

〔産業財産権〕

出願状況(計4件)

- 1.名称:細胞検出法及び該方法に用いるマイクロアレイチップ
発明者:山村昌平、八代聖基、片岡正俊
権利者:産業技術総合研究所

種類:特許
番号:PCT/JP2009/065370
出願年月日:2009.09.02
国内外の別:国外

2.名称:抗原抗体反応を利用した標的物質検出用流路チップ
発明者:田中正人、大家利彦、片岡正俊、八代聖基、中原伴徳、山瓶子勇次、日野真美

権利者:産業技術総合研究所
種類:特許
番号:特願 2008-334179
出願年月日:2008.12.26
国内外の別:国内

3.名称:感染症における感染血液細胞の検出法
発明者:山村昌平、八代聖基、片岡正俊
権利者:産業技術総合研究所
種類:特許
番号:特願 2008-225193,
出願年月日:2008.09.02
国内外の別:国内

4.名称:抗原抗体反応を利用した標的物質検出用チップ
発明者:田中正人、大家利彦、片岡正俊、八代聖基、中原伴徳、山瓶子勇次、日野真美

権利者:産業技術総合研究所
種類:特許
番号:特願 2008-165059
出願年月日:2008.06.24
国内外の別:国内

〔その他〕
ホームページ等
<http://unit.aist.go.jp/htrc/>
(産業技術総合研究所・健康工学研究センター)

6.研究組織
(1)研究代表者
八代 聖基(YATSUSHIRO SHOUKI)
独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究センター・研究員
研究者番号:90399155