

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06994

研究課題名(和文) マラリア原虫ガメトサイト期トランスロコンの分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of translocation complex in *P. falciparum* gametocytes

研究代表者

宮崎 真也 (Miyazaki, Shinya)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：40637435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的はマラリア原虫ガメトサイト期におけるトランスロコン関連分子の役割を明らかにすることである。本研究を通して、ガメトサイト形成株であるNF54株の遺伝子改変ノウハウに関する知見を得た。さらにガメトサイト形成に關与するマラリア感染赤血球のヒト骨髓間葉系幹細胞への接着現象に着目した。赤内期およびガメトサイト期の感染赤血球の不死化ヒト骨髓間葉系幹細胞への接着評価系を構築し、その現象に關与する原虫の接着リガンド候補分子を複数同定した。この接着現象は赤内期のみならずガメトサイト期においても保存されている可能性があるため、今後は同定した分子群のガメトサイト期での役割に着目して本研究を展開する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ガメトサイト期への性分化に深く關与する生物現象である骨髓間葉系幹細胞への接着現象を評価するための分子基盤が整った。骨髓細胞への接着にはトランスロコン複合体を介したタンパク質輸送が必須であると予想される。当初の計画とは異なるアプローチではあったが、目的のトランスロコン複合体が担う現象に着目し研究を進展させることができた。本研究は熱帯熱マラリア原虫のガメトサイト期がどのように分化を進めていくか、その分子基盤の一端を明らかにしガメトサイト生物学・抗マラリア薬開発における新たな知見を提供する。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the role of translocon-associated molecules in the gametocyte stage of *Plasmodium falciparum*. Through this study, we have gained knowledge on the genetic modification know-how using the gametocyte-producing strain NF54. Furthermore, new insights were obtained into the cytoadhesion of *P. falciparum*-infected erythrocytes to human bone marrow mesenchymal stem cells. We established an assay system to assess the cytoadhesion of *P. falciparum*-infected erythrocytes in the asexual blood stage to immortalised human bone marrow mesenchymal stem cells, and several candidate parasite adhesion ligand molecules were identified that could be involved in this phenomenon. This cytoadhesion phenomenon may be conserved not only in the asexual blood stage but also in the gametocyte stage. Future work will focus on the role of the identified molecules in the gametocyte stage.

研究分野：寄生虫学、分子生物学

キーワード：マラリア ガメトサイト 骨髓間葉系幹細胞 タンパク質輸送

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

熱帯熱マラリア原虫は赤血球内で増殖するとともにガメトサイトへ性分化し蚊へ伝播する。マラリアは熱帯地域で蚊により媒介され、甚大な数の感染者・死者を出す原虫感染症である。病因となる熱帯熱マラリア原虫はヒト赤血球の中で増殖し、発熱等のマラリア症状を引き起こす。一方で一部の原虫はガメトサイトへ性分化し、ヒトから蚊へ伝播する。

熱帯熱マラリア原虫は多種類の病原性タンパク質を赤血球へと輸送する。熱帯熱マラリア原虫は、数百種類にも及ぶ病原性タンパク質を赤血球へと輸送することで増殖する。一方で、ガメトサイト期でも赤血球へと輸送される病原性タンパク質が数十種類同定されている (Silvestrini F et al. 2010)。ガメトサイト期の病原性タンパク質群は赤内期のものと異なっているため、性分化と関連があると推察される。

本研究の核となる問いは「ガメトサイト性分化には、ガメトサイト期に特有の原虫トランスロコンが必要なのではないか？」である。赤内期の病原性タンパク質の輸送には、原虫の周囲を覆う寄生胞膜上のトランスロコン・PTEX (Plasmodium translocon of exported protein) 複合体が必要である (de Koning-Ward TF et al. 2009)。また PTEX 複合体と相互作用する原虫タンパク質 (Pf113, PV1) が複数同定され、輸送を調節すると推察されている (Elsworth B et al. 2016)。このように赤内期トランスロコン複合体は精力的に研究されており、その構成タンパク質の一部はガメトサイト期でも発現している。しかしながら、ガメトサイト期トランスロコン複合体の全体像やその性分化における役割は不明である。ガメトサイト期では赤内期とは異なる遺伝子発現パターンを示すこと・輸送される病原性タンパク質群が赤内期と異なることから、ガメトサイト期に特有のトランスロコン構成タンパク質が存在すると代表者は着想した。

また、近年の研究によりガメトサイト期への性分化はヒト骨髄の中で起こると考えられてきた。そこで本研究ではマラリア感染赤血球とヒト骨髄の細胞がどのように相互作用しているか、その分子メカニズムの解明も目指すことにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、熱帯熱マラリア原虫のガメトサイト期におけるタンパク質輸送を担うトランスロコン関連分子の役割を明らかにすることである。また、タンパク質輸送はガメトサイト感染赤血球のヒト骨髄細胞への接着に関与する可能性があるが、その接着現象に関する分子群はよくわかっていない。これらの不明点を明らかにするために本研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) ガメトサイト期におけるタンパク質輸送機構の解析

熱帯熱マラリア原虫のガメトサイト形成株である NF54 株を使って、ガメトサイト期トランスロコンの構成タンパク質のノックダウン原虫の作出を試みた。ノックダウン用の gImS タグを導入するためのプラスミドを複数作出し、NF54 株へとトランスフェクションした。その後、抗マラリア薬を使った薬剤選択を実施してプラスミドを保持する原虫を得た。上記の計画と並行して、ガメトサイト期の原虫を対象として原虫の病原性タンパク質への抗体を使った免疫染色を実施した。

(2) NanoLuc 発現原虫を用いたガメトサイト期の解析および創薬研究

本研究を行う過程で代表者がこれまでに作出した NanoLuc 発現原虫を用いてガメトサイト期の基礎研究や創薬研究が行えるのではないかとこの着想を得た。NanoLuc 発現原虫を用いてガメトサイトを形成し、NanoLuc 由来の生物発光量を基盤とした原虫数の定量系を構築した。さらに、この NanoLuc 発現系を使ってガメトサイト期の原虫への抗マラリア薬評価系を立ち上げた。

(3) マラリア感染赤血球の骨髄間葉系幹細胞への接着機構の解析

ヒト細胞へと接着する熱帯熱マラリア原虫を研究室で樹立する方法が確立されている (Azasi Y, Rowe JA. 2022)。本法を用いて、ガメトサイト形成能を持つ熱帯熱マラリア原虫の標準株 NF54 株を使いヒト骨髄間葉系幹細胞への接着能を有する原虫株を樹立した。その後、接着株とコントロール株の比較トランスクリプトーム解析を行い、骨髄間葉系幹細胞への接着に關与するリガンド分子の探索を行った。

4. 研究成果

(1) ガメトサイト期におけるタンパク質輸送機構の解析

本研究を通して、ガメトサイト形成株である NF54 株を使った遺伝子改変ノウハウに関する知見を得た。ガメトサイト形成株である NF54 株を使ったノックダウン原虫の作出に着手したが、成功率が低く目的の遺伝子改変原虫の作出ができなかった。その原因は、薬剤による選択の条件が最適化されていないことであった。異なる薬剤選択プロトコルが重要であることが代表者の共同研究者の手によりわかったため、今後はそのプロトコルを用いる。本申請計画を通して、コンディショナルノックダウン原虫作出のための基盤を整えることができたため、本研究を継続し目的を達成する。

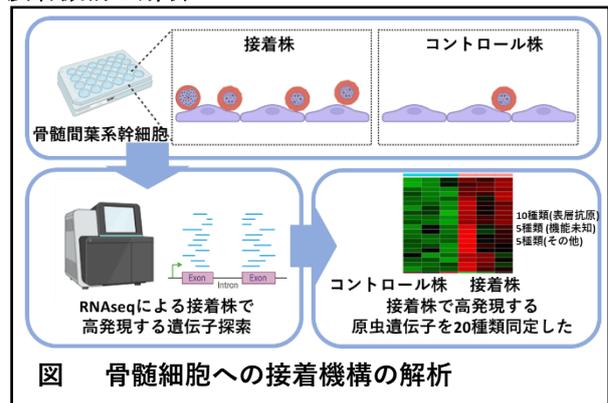
またガメトサイト期感染赤血球を用いた免疫染色により、このステージで病原性タンパク質である SBP1 や MAHRP2 が原虫から感染赤血球へと輸送されていることが分かった。この知見はガメトサイト期においてもトランスロコンを介したタンパク質輸送が起こっていることを示唆している。

(2) NanoLuc 発現原虫を用いたガメトサイト期の解析および創薬研究

本研究の過程で、NanoLuc 発現原虫を用いた抗ガメトサイト薬評価系の構築を行った。本原虫はガメトサイト期のみならず全てのステージで NanoLuc を発現するため、この原虫を使うことでヒト・蚊二種類の宿主内ステージを対象とした創薬研究が実施できることを示した。本成果を基にすることで今後さらなる抗マラリア薬の開発研究へとつなげることができる。NanoLuc 発現原虫に関する本成果を Communications Biology 誌に発表した (Miyazaki Y et al. 2023)。

(3) マラリア感染赤血球の骨髄間葉系幹細胞への接着機構の解析

マラリア感染赤血球のヒト骨髄間葉系幹細胞への接着現象に関する新たな知見を得た (右図)。具体的には、赤内期のマラリア感染赤血球が不死化したヒト骨髄間葉系幹細胞への接着を評価する系を構築し、その現象に關与する原虫の接着リガンド候補分子を複数同定した。この接着現象は赤内期のみならず、ガメトサイト期においても保存されている可能性があるため、今後は同定した分子群のガメトサイト期における役割に着目して本研究を展開する。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kollu Surendra Kumar, Salman Ahmed M., Ramesar Jai, Chevalley-Maurel Severine, Kroeze Hans, Geurten Fiona G. A., Miyazaki Shinya, Mukhopadhyay Ekta, Marin-Mogollon Catherin, Franke-Fayard Blandine, Hill Adrian V. S., Janse Chris J.	4. 巻 16
2. 論文標題 Screening of viral-vectored P. falciparum pre-erythrocytic candidate vaccine antigens using chimeric rodent parasites	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0254498 ~ 0254498
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0254498	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 Tokumasu Fuyuki, Hayakawa Eri H., Fukumoto Junpei, Tokuoka Suzumi M., Miyazaki Shinya	4. 巻 83
2. 論文標題 Creative interior design by Plasmodium falciparum: Lipid metabolism and the parasite's secret chamber	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102369 ~ 102369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2021.102369	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyazaki Yukiko, Vos Martijn W., Geurten Fiona J. A., Bigeard Pierre, Kroeze Hans, Yoshioka Shohei, Arisawa Mitsuhiro, Inaoka Daniel Ken, Soulard Valerie, Dechering Koen J., Franke-Fayard Blandine, Miyazaki Shinya	4. 巻 6
2. 論文標題 A versatile Plasmodium falciparum reporter line expressing NanoLuc enables highly sensitive multi-stage drug assays	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	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) 10.1038/s42003-023-05078-5	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 Fukumoto Junpei, Yoshida Minako, Tokuoka Suzumi M., Hayakawa Eri Saki H., Miyazaki Shinya, Sakura Takaya, Inaoka Daniel Ken, Kita Kiyoshi, Usukura Jiro, Shindou Hideo, Tokumasu Fuyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Pivotal roles of Plasmodium falciparum lysophospholipid acyltransferase 1 in cell cycle progression and cytotome internalization	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 BioRxiv	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) 10.1101/2024.01.13.575495	査読の有無 無
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 0件)

1. 発表者名 宮崎真也
2. 発表標題 創薬・ワクチン開発のための遺伝子組み換えマラリア原虫レポーターライン
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shinya Miyazaki, Catherin Marin-Mogollon, Yukiko Miyazaki, Fiona J.A. Geurten, Jai Ramesar, Surendra Kumar Kolli, Severine Chevalley-Maurel, Chris J. Janse, Blandine Franke-Fayard
2. 発表標題 A critical role of the apicoplast protein PALM for Plasmodium falciparum sporozoite development in the mosquito
3. 学会等名 日本寄生虫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮崎真也, 田中萌, Ben-Yeddy Abel Chitama, 福本準平, 吉田益奈子, 徳舩富由樹
2. 発表標題 熱帯熱マラリア原虫感染赤血球の多様なヒト細胞への細胞接着を評価するためのプラットフォーム
3. 学会等名 第93回 日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2024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			
オランダ	ライデン大学	TropIQ		
フランス	ソルボンヌ大学			