

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590380

研究課題名（和文） アフリカトリパノソーマ原虫の「動き」に着目した形態形成とアポトシス解析

研究課題名（英文） Functional analysis of motility-related genes of *Trypanosoma brucei*: relationship with cellular morphology and apoptosis

研究代表者

鈴木 高史（SUZUKI TAKASHI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・特任教授

研究者番号：70305530

研究成果の概要（和文）：

TbUNC119 分子とその結合分子を共にノックダウンすると、アフリカトリパノソーマ原虫細胞に、アポトシス、「動き」減少に先んじて細胞伸張がおこることが明らかになった。さらにこの細胞伸張の少なくとも一部の原因はエンドサイトシスの亢進によることが示され、両分子の機能にエンドサイトシスの抑制(制御)があることが明らかになった。さらに、血流型原虫では TbUNC119 分子は主として鞭毛で発現するが、細胞質並びにトリパノソーマ原虫において唯一エンドサイトシスが行われる Kinetoplast (flagella pocket) 周辺でも発現していることが明らかになったことから、これら分子の重要な役割の一つがエンドサイトシスの制御だと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Double knock-down analysis of TbUNC119 and its binding molecule showed cellular apoptosis, morphological change (extended cell shape), and reduced motility in insect-form trypanosome cells. Among those phenotypes, extended cell shape was firstly observed. This was revealed to be at least in part by up-regulated endocytosis. In bloodstream-form trypanosome cells, TbUNC119 was expressed in flagellum and an area around flagella pocket, only in which endocytosis occurred. Functions of TbUNC119 and its binding protein were thus considered to include regulation of cellular endocytosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：アポトシス、鞭毛、アフリカトリパノソーマ原虫

1. 研究開始当初の背景

アフリカトリパノソーマ原虫はツェツェ蠅によって伝播され、ヒトにアフリカ睡眠病、家畜にナガナ病を引き起こす病原原虫である。有効なワクチンは存在せず、治療がな

れないと致死であるが、満足な治療薬が存在しない現状である。本原虫はツェツェ蠅体内では中腸から唾液腺と局在をかえるため、「動き」能力は必須であるが、さらに哺乳類感染型でも、「動き」の源であるオルガネラ、

鞭毛の一部の遺伝子ノックダウンにより致死が誘導されることが明らかになっており、哺乳類宿主体内での増殖、病原性の発現においても「動き」の能力が必須であると考えられている。

研究代表者は以前より、アフリカトリパノソーマ原虫の新規薬剤標的の同定を目指した解析を行ってきており、その一貫として、アフリカトリパノソーマ原虫の「動き」に着目して解析を進めてきた。その結果、研究開始時点で以下のことが明らかになっていた。

- (1) アフリカトリパノソーマ原虫全遺伝子と、モデル生物である *Caenorhabditis elegans* 線虫に「動き」異常を引き起こす遺伝子群(UNC 遺伝子群)との相同性検索を blast2 アルゴリズムを用いて行ったところ、88 種類のアフリカトリパノソーマ原虫遺伝子が UNC 遺伝子群に高い相同性を示した。
- (2) それらの中に他生物でシグナル伝達機能を担う UNC119 相同遺伝子(TbUNC119)が見いだされた。本遺伝子をノックダウンしたが、「動き」、増殖、形態いずれの変化も見られなかったが、TbUNC119 に結合する分子 (Yeast Two Hybrid 法により見いだした(TbUNC119BP)) とともにノックダウンしたところ、「動き」減少、形態異常(細胞伸張)、細胞死が誘導された。さらにこの細胞死は AnnexinV 解析によりアポトシスであることが明らかになった。
- (3) TbUNC119 分子の細胞内局在を調べたところ、昆虫型(procyclic form)原虫では鞭毛に特異的局在が見られた。

2. 研究の目的

上記の予備的解析の結果、「両分子のノックダウン誘導 → 形態形成異常、「動き」減少、細胞死 (アポトシス)」という現象が観察された。そこで本研究では単細胞生物であるアフリカトリパノソーマ原虫のアポトシスの分子メカニズム機構解明を最終的な目標に以下の目的で具体的解析を行った。

- (1) 両分子のノックダウン誘導後、細胞のどの部分が伸張し、形態形成異常がおこるのか、また、「動き」の減少と形態変化との関連はあるのかを明らかにする。具体的には、まず蛍光顕微鏡を用いて細胞構造と「動き」の詳細な経時的形態解析を行う。また、FACS 解析により経時的に細胞周期がどのように変化し、アポトシスに至るのかを明らかにする。
- (2) TbUNC119/TbUNC119BP 両分子の結合が原虫細胞の正常な形態、増殖に必要なであると考えられるので、結合ドメインのみを有するタンパク質を原虫細胞内で発現させることにより、両分子の結合インターフェースを阻害し、アポトシスが誘導されるかの検討を行う。
- (3) TbUNC119 分子の哺乳類血流型原虫にお

ける発現プロファイルを明らかにし、TbUNC119 分子を標的とした治療の可能性を探る。

(4) 「動き」関連でリストアップされた他の分子に関しても、アフリカトリパノソーマ原虫の増殖の面から明らかにする。

3. 研究の方法

(1) アフリカトリパノソーマ原虫昆虫型

Trypanosoma brucei 29-13 株を用い、pZJM vector に TbUNC119/TbUNC119BP 遺伝子を組みこみ、*T. brucei* ゲノムに導入した。ノックダウン誘導後、経時的にサンプリングを行った。「動き」解析は顕微鏡下で 30 秒間細胞の「動き」を 3次元の動きを 2次元の動きとして捕捉した。VideoPoint アプリケーションで細胞の動きをトレースした。各条件の細胞 30 個をランダムに選択し本解析に用いた。FACS 解析は Annexin V-FITC と PI の二重染色を行い、アポトシス解析を行った。エンドサイトシス解析は Lucifer Yellow (3 μ g/ml) で培地中に添加し、2 時間後に細胞を回収し、破碎後に、428nm の波長光で励起し、532nm の蛍光を検出することによった。細胞内に取り込まれた Lucifer Yellow の量でエンドサイトシスを定量化した。

(2) アフリカトリパノソーマ原虫血流型

Trypanosoma brucei Gutat3.1 株を用いた。TbUNC119 分子の全長アミノ酸に His タグをつけて大腸菌で発現させた。コバルトカラム(Clontech)を用いて精製し、ウサギに免疫を行った。抗体価の上昇を確認した後に、全採血を行い、アフィニティ精製を行った。得られた抗体を用いて血流型原虫の抗体染色と DAPI 染色を行い蛍光顕微鏡による解析を行った。

得られた抗体とコントロール抗体を血流型原虫の培養液に添加し、24 時間後に Alamar blue assay を行った。

- (3) *Trypanosoma brucei* 29-13 株を用い、Plew100 vector に TbUNC119BP 分子の 200 アミノ酸 (492-1089 番塩基) を組み込み、エレクトロポレーションにより原虫ゲノムに組み込み、発現を誘導した。コントロールとして EGFP を Plew100 ベクターに組み込み、同様に強制発現を誘導した。それぞれ細胞を回収し、RT-PCR による RNA レベルの発現解析と、蛍光顕微鏡による解析を行った。
- (4) pZJM vector に「動き」関連遺伝子、TbUNC68 を組みこみ、*T. brucei* ゲノムに導入した。ノックダウンを誘導し、経時的にサンプリングを行い、増殖を解析した。Annexin V-FITC と PI の二重染色を行い、FACS を用いたアポトシス解析を行った。また、DAPI 染色の後に蛍光顕微鏡による解析を行った。

4. 研究成果

(1) ノックダウン誘導 0、2、5、7、9 日後に細胞を回収し、その一部で「動き」解析を行った。その結果、図 1 に示すように、7 日目以降で「動き」の抑制が観察された。

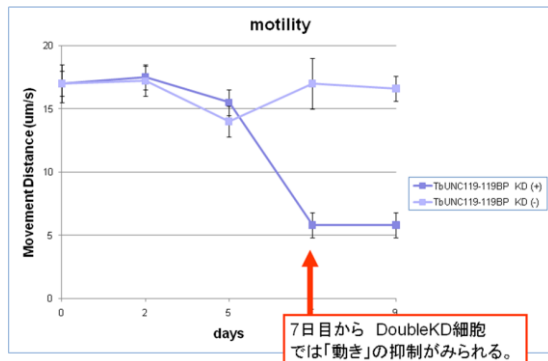


図 1. ダブルノックダウン誘導後の経時的「動き」解析

KD(+): ダブルノックダウン誘導細胞。ダブルノックダウン誘導 0、2、5、7、9 日後に細胞を回収し、「動き」解析を行った。ダブルノックダウン非誘導細胞 (KD(-)) もコントロールとして同様に解析した。

また、同サンプルを用いて FACS 解析を行った結果が図 2 である。前方散乱光 FSC よりノックダウン誘導細胞の細胞サイズをモニターし、PI negative、Annexin V-FITC positive でアポトシス細胞の割合をモニターしたのが、それぞれ図 4 と図 5 である。その結果、ダブルノックダウン誘導 2 日後と早い段階から、細胞形態変化 (細胞伸張) が観察された (図 3)。一方、アポトシスは 7 日目から誘導されていることが明らかになった (図 4)。

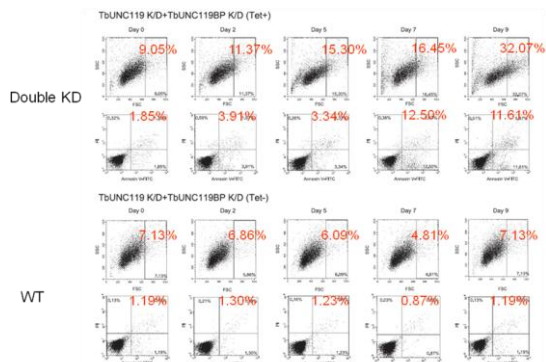


図 2. ダブルノックダウン誘導後の経時的「動き」解析

Double KD: ダブルノックダウン誘導細胞。ダブルノックダウン誘導 0、2、5、7、9 日後に細胞を回収し、FACS 解析を行った。ダブルノックダウン非誘導細胞 (WT) もコントロールとして同様に解析した。

コントロールとして同様に解析を行った。

以上の結果から、表現型出現のタイミングは細胞形態変化 (細胞伸張) → アポトシス、「動き」減少、であることが明らかになった。そこで、この細胞伸張がどのような機構で引き起こされるのかを検討した。細胞容積が著しく増大していることから、エンドサイトシスの亢進が推定されたので、fluid phase エンドサイトシスを Lucifer Yellow を用いて解析した。その結果、予想通りダブルノックダウン誘導細胞でエンドサイトシスが亢進していることが明らかになった (図 5)。

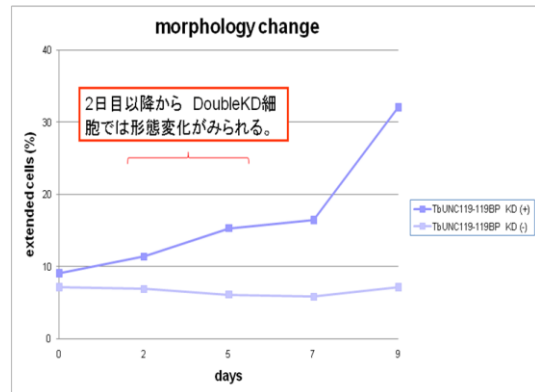


図 3. 経時的細胞形態 (細胞伸張) 変化: 図 2 の FACS 解析の前方散乱光 FSC の値をプロットした。

KD(+): ダブルノックダウン誘導細胞。KD(-): 非誘導細胞。

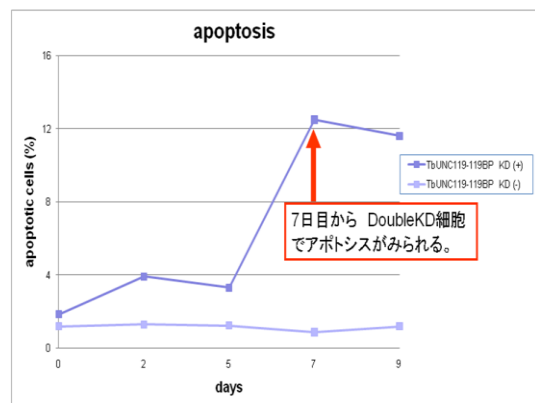


図 4. 経時的アポトシス細胞数変化: 図 2 の FACS 解析の PI negative、Annexin V-FITC positive の値をプロットした。KD(+): ダブルノックダウン誘導細胞。KD(-): 非誘導細胞。

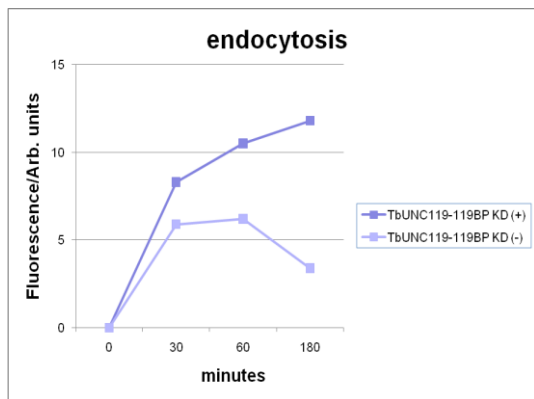


図 5. エンドサイトシス解析
ダブルノックダウン誘導 7 日後の細胞 (KD(+)) と非誘導細胞 (KD(-)) に、2 時間 Lucifer Yellow を取り込ませ、細胞を回収し、細胞内に取り込まれた Lucifer Yellow を 532nm の蛍光で検出した。

以上により、ダブルノックダウン誘導による表現型の中で、細胞伸張はアポトシス、「動き」減少に先んじて観察されることが明らかになった。さらにダブルノックダウン誘導細胞における細胞伸張の少なくとも一部の原因は fluid phase エンドサイトシスの亢進によることが示された。従って、両分子の機能にエンドサイトシスの抑制(制御)があることが明らかになった。

(2) TbUNC119 分子の細胞内局在解析を行うために、大腸菌でリコンビナント TbUNC119 分子を発現、精製した。リコンビナント分子を用いてポリクロナール抗体を作製し、この抗体でアフリカトリパノソーマ原虫の細胞局在解析を行ったところ、TbUNC119 分子は昆虫型原虫では鞭毛で特異的に発現するのに対し、血流型では主として鞭毛で発現するが、細胞質並びに kinetoplast (flagella pocket) 周辺でも発現していることが明らかになった (図 6)。さらに抗 TbUNC119 分子抗体は血流型培養原虫の増殖を濃度依存的に阻害することが明らかになった。Flagella pocket はトリパノソーマ原虫において唯一エンドサイトシスが行われる部位である。また(1)の結果より TbUNC119 分子がエンドサイトシスと関連することが示された。従って TbUNC119 分子が抗体によりマスクされた結果、エンドサイトシス異常が生じ細胞死につながった可能性が示唆された。今後、血流型原虫の TbUNC119 分子をノックダウンすることにより TbUNC119 分子の血流型原虫での機能解析をより詳細に行う予定である。次に、TbUNC119 分子の血流型原虫の増殖に対する影響を明らかにするために、上記の TbUNC119 分子に対するポリクロナール抗体を培養液中に濃度を振って添加したとこ

ろ、他分子に対するコントロール抗体の場合と異なり、濃度依存的にアフリカトリパノソーマ血流型原虫の増殖が阻害された (図 7)。また、FACS 解析の結果、この際にアポトシスが誘導されていると推察された。

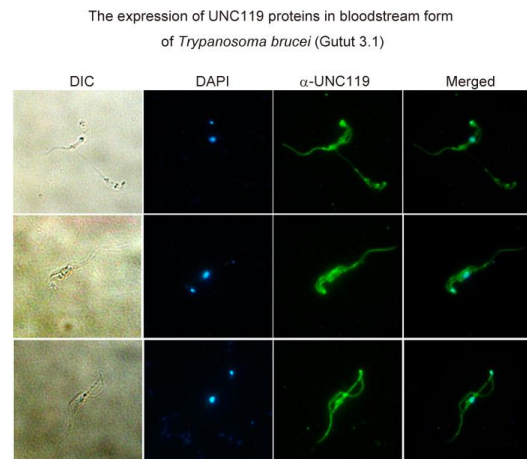


図 6. TbUNC119 遺伝子の細胞局在解析
抗 TbUNC119 分子ポリクロナール抗体を X 500 倍希釈、FITC-conjugated 抗 rabbit IgG 二次抗体を X 1000 倍希釈で用いて、アフリカトリパノソーマ血流型原虫の抗体染色を行った。DAPI 染色を同時に行った結果、DAPI の小さい方のシグナル (kinetoplast) と UNC119 抗体のシグナルが重なっているのが観察された。

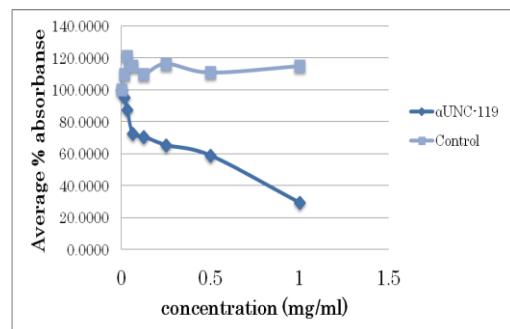


図 7. 抗 TbUNC119 ポリクロナール抗体の血流型原虫の増殖に与える影響

抗 TbUNC119 ポリクロナール抗体を 1mg/ml から 500µg/ml、250µg/ml、125µg/ml、60µg/ml、30µg/ml、15µg/ml まで振り、Alamor blue assay により増殖解析を行った。コントロール抗体を用いて同様の解析を行った。その結果、15µg/ml でもコントロール抗体に比べて増殖の有意な低下が観察された。

(3) TbUNC119BP の TbUNC119 との相互作用部位 200 アミノ酸をコードする DNA(TbUNC119BP(200))を pZJM ベクターに組み込み、強制発現を行った。RT-PCR の結果、TbUNC119BP(200)の RNA レベルでの発現は確認できたが、同時に行った、コントロールの蛍光タンパク質 EGFP の蛍光を顕微鏡下で観察することができなかつたため、翻訳されていないと推定され、タンパク質発現システムの再検討を要することが明らかになった。

(4) TbUNC68 のノックダウンが mRNA レベルで起きていることを RT-PCR により確認し、細胞増殖解析を行った。若干の増殖抑制が観察されたので、形態変化とアポトシスの詳細解析を行った。図 8 に示すように、ノックダウン誘導 7 日後のアフリカトリパノソーマ原虫を用いて、アポトシス解析を行ったところ、ノックダウン誘導細胞ではアポトシスが 3.7% から 8.0% と増加していた。また、細胞形態の解析を蛍光顕微鏡で行ったところ、ノックダウン誘導細胞では細胞質がずんぐりした形態を示すものが多数見られた(図 9)。TbUNC68 分子は「動き」関連分子としてリストアップされた 88 遺伝子の一つで、ryanodine receptor のオルソログである。ryanodine receptor は動物細胞において筋細胞や神経細胞などの興奮性の動物組織細胞でカルシウムチャンネルとして機能することが知られているが、単細胞生物であるアフリカトリパノソーマ原虫における機能は不明であり、「動き」との関係が示されたのは今回の解析が初めてである。

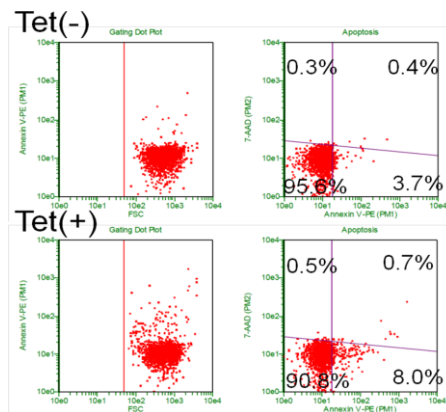


図 8. TbUNC68 遺伝子ノックダウン誘導細胞のアポトシス解析
TbUNC68 遺伝子ノックダウン誘導 7 日後に細胞を回収し、PI、Annexin V-FITC 染色を行い、FACS 解析を行った。ノックダウン非誘導細胞もコントロールとして同様に解析を行った

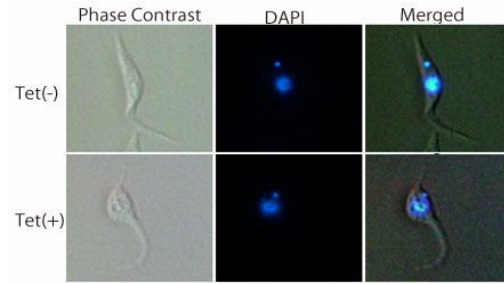


図 9. ノックダウン誘導 7 日後の形態観察
TbUNC68 遺伝子ノックダウン誘導 7 日後に細胞を回収し、固定、DAPI 染色を行い、蛍光顕微鏡解析を行った。ノックダウン非誘導細胞もコントロールとして同様に解析を行った。

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 4 件)

① Yamamoto T, Suzuki Y, Kojima K, Suzumori N, Suzuki T. The biological investigation of prostacyclin in preeclamptic women seen reduced endothelial function. *Hypertens Pregnancy*. 29(4): 484-91 (2010). 査読有

② Ohashi-Suzuki M, Yabu Y, Ohshima S, Nakamura K, Kido Y, Sakamoto K, Kita K, Ohta N, Suzuki T. Differential Kinetic Activities of Glycerol Kinase among African Trypanosome Species: Phylogenetic and Therapeutic Implications. *J Vet Med Sci*. 73(5): 615-21 (2011). 査読有

③ Kwansa-Bentum B, Ayi I, Suzuki T, Otchere J, Kumagai T, Anyan WK, Asahi H, Akao N, Wilson MD, Boakye DA, Ohta N. Administrative practices of health professionals and use of artesunate-amodiaquine by community members for treating uncomplicated malaria in southern Ghana: implications for artemisinin-based combination therapy deployment. *Trop Med Int Health*. 10. doi: 10.1111n (2011). 査読有

④ Kwansa-Bentum B, Ayi I, Suzuki T, Otchere J, Kumagai T, Anyan WK, Osei JH, Asahi H, Ofori MF, Akao N, Wilson MD, Boakye DA, Ohta N. *Plasmodium falciparum* isolates from southern Ghana exhibit polymorphisms in the SERCA-type PfATPase6 though sensitive to artesunate in vitro. *Malar J*. 10:187 (2011). 査読有

〔学会発表〕(計7件)

① Alhassan A, Nakayima J, Nakao R, Suzuki T, Sugimoto C. Detection of Trypanosoma species from Tsetse flies and domestic animals in the Central and Volta regions of Ghana. SATREPS Joint Workshop . Accra (Ghana), 4 Dec 2011.

② Suzuki T, Ohshima S, Boakye D, Alhassan A, Bosompem K, Ohta N. Molecular biological and epidemiological study of African trypanosomiasis. SATREPS Joint Workshop. Accra (Ghana), 3 Dec 2011.

③ Kwansa-Bentum B, Ayi I, Suzuki T, Otchere J, Kumagai T, Anyan WK, Osei JH, Asahi H, Ofori MF, Akao N, Wilson MD, Boakye DA, Ohta N. Plasmodium falciparum isolates from southern Ghana exhibit polymorphisms in the SERCA-type PfATPase6 though sensitive to artesunate in vitro. SATREPS Joint Workshop. Accra (Ghana), 4 Dec 2011.

④ Dadzie S, Adu-Acheampong S, Kyerematen R, Williams J, Suzuki T, Ohta N, Appawu M, Boakye DA. Bio-efficacy, user perception and acceptability of some selected pyrethroid-based mosquito coils in controlling An. gambiae s.l., a malaria vector in some parts of the Greater Accra region of Ghana. Asian African Research Forum for on Emerging and Reemerging Infections. Kobe (Japan) 11 Jan 2012.

⑤ Suzuki T, Ohshima S, Ohashi-Suzuki M, Dadzie S, Boakye D, Ohta N. Molecular cloning and functional analysis of Trypanosoma brucei motility-related genes. Asian African Research Forum for on Emerging and Reemerging Infections. Kobe (Japan), 11 Jan 2012.

⑥ Kwansa-Bentum B, Ayi I, Suzuki T, Otchere J, Kumagai T, Anyan WK, Osei JH, Asahi H, Ofori MF, Akao N, Wilson MD, Boakye DA, Ohta N. Plasmodium falciparum isolates from southern Ghana exhibit polymorphisms in the SERCA-type PfATPase6 though sensitive to artesunate in vitro. Asian African Research Forum for on Emerging and Reemerging Infections. Kobe (Japan), 11 Jan 2012.

⑦ Suzuki T. Finding a Novel Drug Target for African Trypanosomiasis, Asian-African

Research Forum on Emerging and Reemerging Infections, Tokyo (Japan), 23 Jan 2013.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木高史 (Takashi Suzuki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・特任教授

研究者番号：70305530

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：