

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790459

研究課題名(和文) スポロゾイト特異的ロプトリー蛋白質欠損原虫作出によるマラリアの宿主侵入機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of host invasion mechanisms of Plasmodium sporozoites focusing on rhoptry proteins.

研究代表者

徳永 順士 (Tokunaga, Naohito)

愛媛大学・総合科学研究支援センター・技術員

研究者番号：30596151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：マラリア原虫の標的細胞侵入の分子基盤を解明することを目的とし、先端部小器官「ロプトリー」に着目しその貯蔵タンパク質の機能解析を試みた。始めに、スポロゾイトで発現しているロプトリー分子の同定を行い、スポロゾイトの新規ロプトリー分子を8つ同定できた。これらの機能解析を行う為に、プロモーター置換によるスポロゾイト期特異的遺伝子発現抑制原虫の作製法を開発した。さらに、このシステムを用いることでRON2が蚊の唾液腺侵入に重要な役割を担うことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the molecular mechanisms of Plasmodium sporozoite invasion of the target cells, we attempted to identify rhoptry proteins in sporozoites. Gene expression, protein expression and localization analyses in sporozoites were performed, then 8 novel sporozoite rhoptry molecules were identified. Since these proteins are also expressed in merozoites, development of sporozoite stage-specific gene silencing system is required for functional analysis. To achieve this purpose, screening for suitable candidate promoters to swap was performed. By swapping the original promoter with the candidate promoter using homologous recombination system, we succeeded to generate sporozoite stage-specific gene silencing transgenic parasites. Using this system, it was indicated that one of the rhoptry proteins is involved in sporozoite salivary gland invasion.

研究分野：寄生虫学

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：マラリア原虫 スポロゾイト ロプトリー

## 1. 研究開始当初の背景

マラリアは、現代においても世界中では年間約 100 万人が死亡する脅威的な感染症である。蚊によって媒介されたマラリア原虫(スポロゾイト)は、まず始めに肝細胞に寄生・増殖し、最終的には赤血球へと侵入する。赤血球内で増殖した原虫(メロゾイト)が次の赤血球へと侵入を繰り返すことで、発熱、貧血などの症状を引き起こす。

赤血球への侵入ステージであるメロゾイトには、ロプトリーと呼ばれる先端部小器官が存在しており、赤血球侵入に際して、ロプトリーに含まれる分子が分泌されることが報告されているが、その分子機構の解析は全く手が付けられていない。その理由は、既存の遺伝子欠損マラリア原虫の作製法の限界の為である。

相同組換え法によるマラリア原虫のゲノムへの外来遺伝子の挿入技術が確立されたことによって、マラリア原虫分子の機能解析は飛躍的に進んだ。しかし、この方法は遺伝子組換え原虫の選択を赤血球ステージ原虫の薬剤抵抗性に基いて行う為、赤血球ステージ原虫の生存に必須な分子の欠損原虫が作製できないという制約がある。その為、赤血球期では必須でなく、蚊からほ乳類への感染を担うステージ(スポロゾイト)に特異的に発現する原虫分子においてのみ、機能解析が精力的に進められてきた。

一方で、申請者のグループでは、メロゾイトのロプトリー分子として知られる Rhoptry neck protein 2(ROn2) が、スポロゾイトのロプトリーにも局在することを初めて免疫電子顕微鏡法で明らかにした(投稿準備中)。この結果は、スポロゾイトのロプトリーにメロゾイトと共通の分子が存在するという可能性を初めて示したものである。すなわち、メロゾイトとスポロゾイトがそれぞれの標的細胞である赤血球/肝細胞へ侵入する際に、共通に働く機序が存在することを示唆している。しかしながら、上述の技術的限界の為に、細胞侵入の共通基盤についての解析は全く進んでいない。

## 2. 研究の目的

マラリア原虫は、宿主細胞に侵入しその中で発育することで寄生を成立させる。メロゾイトの赤血球侵入に際しては、ロプトリーに貯蔵されているタンパク質群が分泌され、関与することが示唆されてきたが、逆遺伝学法による機能解析は技術的な限界により行われて来なかった。本研究では、マラリア原虫の宿主細胞寄生に際して、ロプトリー分子が共通に重要な役割を担うのではないかと仮定し、特にスポロゾイトの肝細胞への侵入時に着目して解明することを目的とする。そのためまず、スポロゾイトのロプトリーに局在する分子の網羅的探索を実施する。免疫電顕法により、スポロゾイトロプトリーへの局在が示された物はその後、当該分子タンパク

質をスポロゾイト期特異的に欠損する原虫を作製することで、タンパク質機能の解析を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) スポロゾイトの新規ロプトリー関連分子の探索

スポロゾイトと同様にロプトリーを持ち宿主細胞への寄生能も有するマラリア原虫メロゾイトや、同属原虫であり同じくロプトリーを持ち細胞寄生能を有する *Toxoplasma gondii* でロプトリーへの局在が報告されているものを、文献やデータベース(PlasmoDB 等)を活用し複数選出する。これらの分子がスポロゾイトにおいても発現しているか否か、RT-PCR 法により解析する。スポロゾイトは蚊の中腸表面に形成されるオオシスト内で形成・発育し、その後体腔を通過して唾液腺に侵入することが知られている。そこで、ネズミマラリア原虫(*Plasmodium berghei*)を感染させた ICR マウスを媒介蚊(*Anopheles stephensi*)に吸血させた後、経時的に中腸と唾液腺から採取したスポロゾイトと、コントロールとしてメロゾイトを材料として用いて RT-PCR を行い、それぞれの分子がどのステージで発現されているのか解析する。

### (2) スポロゾイトの新規ロプトリー関連候補分子タンパク質の発現及び局在解析

上記の RT-PCR 法によるスクリーニングで選定された候補分子については、次いで、タンパク質の発現及び局在解析を行う。候補分子タンパク質に c-Myc タグを結合した融合タンパク質を発現する遺伝子改変マラリア原虫を作製し、そのスポロゾイトを感染蚊の中腸・唾液腺から採取する。これを抗原として抗 c-Myc 抗体を用いたウエスタンブロッティング法により、候補タンパク質のスポロゾイトにおける発現プロファイルを解析する。タンパク質発現が確認された候補分子については抗 c-Myc 抗体を用いた蛍光抗体法によりスポロゾイトでの局在を解析する。特にロプトリーへの局在に関しては免疫電顕法を用いて詳細に解析する。

### (3) スポロゾイト期特異的標的タンパク質欠損原虫の作製

ロプトリー分子の機能をスポロゾイトにおいて解析する為に、プロモーター置換法により標的分子の発現をメロゾイト時期に局限する「スポロゾイト期特異的発現抑制原虫(conditional knockdown 原虫、以下 cKD 原虫と記載)」の作出方法を開発する。すなわち、標的分子のプロモーター領域をメロゾイト時期にのみ発現する他の遺伝子のプロモーター領域と置換することによりスポロゾイト期特異的に標的タンパク質の発現を抑制することを目指す。マラリア原虫血液ステージにおける遺伝子発現のパターンと、タンパク質の局在に相関が認められるという報告

もあり、プロモーター選定に際しては、発現プロファイルが厳密にロブトリー分子と一致することが求められる。そこで、トランスクリプトームデータベース(PlasmoDB)から初期メロゾイトに発現のピークがあり、スポロゾイト期には発現しない発現プロファイルを持つ遺伝子を選択する。さらに、RT-PCR法により、候補遺伝子のスポロゾイトにおける発現を実際に検証する。置換に用いることのできる候補プロモーターが複数得られたら、相同組換え法により RON2 のプロモーターを候補プロモーターと置換した RON2-cKD 原虫を作製する。作製した cKD 原虫の赤血球期・スポロゾイト期における標的分子の遺伝子発現・タンパク質発現を解析し、スポロゾイト期特異的に発現抑制されていることを確認する。

#### (4) スポロゾイトにおける新規ロブトリー分子の機能解析

作製した cKD 原虫の表現型を野生型と比較することにより、標的タンパク質の機能解析を行う。スポロゾイトの標的細胞である蚊の唾液腺や、ほ乳類肝細胞への侵入効率を *in vivo* (蚊やねずみ)、*in vitro* (肝由来培養細胞) を用いて詳細に解析することにより、ロブトリータンパク質がスポロゾイトの標的細胞への侵入に関与するの否かを評価する。

### 4. 研究成果

#### (1) スポロゾイトの新規ロブトリー関連分子の探索

##### 遺伝子発現解析

データベースや文献から既知のメロゾイトのロブトリー分子を 13 個選定した。吸血後 9, 13, 17 日目の中腸、吸血後 17 日目の唾液腺からスポロゾイトを採取し、選定した 13 個の分子の経時的な遺伝子発現を RT-PCR 法で解析した。その結果、解析した 13 個全ての分子はスポロゾイトが形成されている吸血後 13, 17 日目の中腸で強く転写されている事が明らかとなった。一方で、肝細胞への寄生能を有する唾液腺のスポロゾイトにおける転写は検出されなかった。

##### タンパク質発現・局在解析

次にこれらの 13 個の分子のタンパク質としての発現・局在の解析を行った。解析対象の分子数が多い為、本研究では各分子の C 末端に c-Myc タグを付加した遺伝子組換え原虫を作出し、抗 c-Myc 抗体を用いて各分子の効率的なタンパク質発現と局在解析を行うことにした。13 分子の内、2 分子は C 末端側に GPI アンカーを持つことが予測された為、C 末端へのタグ融合が局在や機能に影響を与える可能性を危惧して、それぞれの特異抗体を作製し、解析を行うことにした。分泌シグナルと GPI アンカーシグナルを除いた全長組換えタンパク質をコムギ胚芽由来無細胞タンパク質合成系を用いて合成、精製した後、ウサギを免疫して抗血清を得た。11 分子につ

いて c-Myc タグを付加した遺伝子組換え原虫の作出を試み、最終的に 10 分子の遺伝子組換え原虫が作出できた。また 2 分子の特異抗体の作製にも成功した。これ以降は遺伝子組換え原虫が作出できた 10 分子と、特異抗体を作製した 2 分子について解析を継続した。

抗 c-Myc 抗体と特異抗体を用いて、各分子の中腸・唾液腺スポロゾイト及びメロゾイトにおけるタンパク質発現を western blotting 法で解析した。その結果、解析した 12 分子中、10 分子で中腸・唾液腺スポロゾイトの両方でタンパク質発現が起こっている事が確認された。RT-PCR による遺伝子発現解析の結果と合わせると、転写と翻訳はスポロゾイト形成時に行われ、スポロゾイトが唾液腺に侵入した後も翻訳されたタンパク質は保持されていることが示唆された。興味深いことに、メロゾイトとは異なるプロセッシングパターンを示す分子も認められた。

次に、蛍光抗体法、免疫電顕法でこれらの分子の局在を解析した。抗 c-Myc 抗体、特異抗体を用いた蛍光抗体法で 11 個の分子が中腸・唾液腺のスポロゾイトにおいてロブトリー様の先端部に限局した染色パターンを示した。1 分子についてはロブトリーとは全く異なる局在パターンを示した。更に、免疫電顕法で局在を詳細に解析した結果、スポロゾイトのロブトリーへの局在が 8 分子で認められた。ほとんどの分子はロブトリー全体に渡って存在していたが、ロブトリー膜周囲に限局する分子が 1 つ見いだされた。

スポロゾイトがメロゾイトと同様に形態学的にロブトリーと思われる小器官を持っていることは古くから知られていた。メロゾイトにおいてはこれまでに複数のロブトリー分子が見いだされており、これらの分子が宿主細胞への寄生に関与する事が示唆されてきた。一方でスポロゾイトのロブトリー分子に関しては今日まで着目されることがほとんどなかった。本研究結果から、肝細胞への感染能を有するスポロゾイト(唾液腺侵入後のスポロゾイト)では、ロブトリー分子の遺伝子発現が見いだされなかったことが、一因として挙げられる。すなわち、本研究では形成途中のスポロゾイトを含めて解析したことで、スポロゾイトで発現するロブトリー分子群のプロファイリングに成功したといえる。一方で、タンパク質発現解析では中腸だけでなく唾液腺スポロゾイトにおいてもロブトリー分子の発現が認められた事から、ロブトリー分子はスポロゾイト形成時に転写・翻訳され、そのタンパク質が標的細胞侵入時まで保持されることが明らかになった。以上の結果から、これら新規に見いだしたスポロゾイトロブトリー局在分子 8 種類について、標的細胞(蚊の唾液腺、ほ乳類肝細胞)侵入における役割を解析することにした。

#### (2) スポロゾイト新規ロブトリー分子の機能解析

本研究により同定されたスポロゾイトのロプトリー分子の機能解析を行う為には、スポロゾイト期のみ遺伝子発現が抑制された原虫の作製が必要であった。トランスクリプトームデータベースから赤血球期では発現し、スポロゾイト期では発現しないプロファイルを持つ分子を1つ選択した。ロプトリー分子の1つであるRON2のプロモーター領域を選択した分子のプロモーター領域と置換した組換え原虫を作出し、遺伝子発現及びタンパク質発現を解析したところ、一定の発現抑制効果は認められたものの、十分な抑制ではなかった。そこで、トランスクリプトームデータベースから更に12個の分子を選択し、まずはRT-PCRでスポロゾイトにおける遺伝子発現プロファイルを検証した。その結果、始めに用いた分子はスポロゾイト期においても僅かに発現している事が明らかとなり、その為に十分な発現抑制効果が得られなかった事が分かった。新たに選択した12分子の内、スポロゾイト期で遺伝子発現が認められない3分子を新たな候補置換プロモーターとした。これらの候補プロモーター領域とRON2のプロモーター領域を置換した組換え原虫の作出を改めて試みた。その結果、1つの分子で遺伝子組換え原虫を作出することができ、RON2の遺伝子・タンパク質発現を解析した結果、スポロゾイトにおいてRON2の遺伝子発現が野生型の1/50まで低下することを見いだした。また、スポロゾイトにおいてRON2タンパク質はwestern blotting法では検出できないレベルまで抑制されていた。従って、スポロゾイト期特異的な遺伝子発現抑制法が確立されたと判断した。また、RON2-cKD原虫の標的細胞侵入効率を解析したところ、蚊の唾液腺への侵入が野生型の約1/10程度に減少することを見いだした。以上の結果から、RON2が唾液腺侵入において重要な役割をしていることを初めて明らかにした。

### (3)総括

本研究により、新規のスポロゾイトロプトリー分子が8つ同定され、それらの分子の機能解析を行う為のスポロゾイト期特異的な遺伝子発現抑制原虫を作出する方法が確立された。さらに、スポロゾイトのRON2が唾液腺侵入に重要であることを初めて明らかにした。今後継続して、得られたスポロゾイト分子について、スポロゾイト期特異的な遺伝子発現抑制原虫を作出し、機能解析を行う予定である。スポロゾイトの肝細胞への寄生は、ほ乳類感染の入り口ともいえることから、その分子機構の解明は、感染阻止法開発に向けた基礎的知見を与えることが期待され、本研究の成果は学術的だけでなく、マラリア撲滅という側面からも非常に意義深いものである。

### 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0件)

[学会発表](計12件)

野崎守、徳永順土、坪井敬文、石野智子、鳥居本美 スポロゾイトによる蚊の唾液腺侵入においてRON複合体が機能する 第83回日本寄生虫学会大会 2014.3.27-28 松山

杉野友香、徳永順土、坪井敬文、石野智子、鳥居本美 マラリア原虫ロプトリータンパク質RON3はスポロゾイトの肝細胞寄生において重要である 第83回日本寄生虫学会大会 2014.3.27-28 松山

Tomoko Ishino, Yuka Sugino, Naohito Tokunaga, Mamoru Nozaki, Takafumi Tsuboi, and Motomi Torii. Functional analyses of sporozoite rhoptry proteins by stage-specific gene silencing system in Plasmodium berghei. The American society of tropical medicine and hygiene, 62th annual meeting, Washington DC, USA 2013. 11. 13-17

石野智子、杉野友香、野崎守、徳永順土、橘真由美、坪井敬文、鳥居本美 スポロゾイトの細胞侵入におけるロプトリータンパク質の機能分担 第82回日本寄生虫学会大会 2013.3.29-31 東京

野崎守、徳永順土、坪井敬文、石野智子、鳥居本美 ネズミマラリア原虫Rhoptry neck protein 4は蚊の唾液腺への侵入に必要である 第82回日本寄生虫学会大会 2013.3.29-31 東京

Naohito Tokunaga, Mamoru Nozaki, Eri Murata, Takafumi Tsuboi, Tomoko Ishino, and Motomi Torii Screening for sporozoite rhoptry proteins in Plasmodium. Keystone symposia, New Orleans, USA 2013. 1.20-25

Tomoko Ishino, Yuka Sugino, Naohito Tokunaga, Mamoru Nozaki, Takafumi Tsuboi, and Motomi Torii Functional analyses of sporozoite rhoptry proteins by stage-specific gene silencing system in Plasmodium berghei. Keystone symposia, New Orleans, USA 2013. 1.20-25

徳永順土、村田英理、坪井敬文、石野智子、鳥居本美 マラリア原虫スポロゾイトのロプトリータンパク質の同定と発現解析 第81回日本寄生虫学会

2012.3.23-24 兵庫

石野智子、村田英理、徳永順土、橘真由美、坪井敬文、鳥居本美 マラリア原虫先端部小器官（ロプトリー）に局在する分子のスポロゾイトにおける機能解析 第81回日本寄生虫学会 2012.3.23-24 兵庫

Tomoko Ishino, Eri Murata, Naohito Tokunaga, Mayumi Tachibana, Takafumi Tsuboi, Motomi Torii. Investigation of the mechanisms how malaria sporozoites invade salivary glands. Molecular Approach to Malaria 2012 Conference, Lorne, Victoria, Australia 2012. 2.19-23

徳永順土、村田英理、石野智子、鳥居本美 マラリア原虫スポロゾイトのロプトリー分子の探索及び発現プロファイル解析 第80回日本寄生虫学会、2011.7.17-18 東京

石野智子、Stephan Hegge、徳永順土、村田英理、杉野友香、鳥居本美 マラリア原虫スポロゾイトの肝細胞への侵入過程の Real time imaging 解析 第80回日本寄生虫学会、2011.7.17-18 東京

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

徳永 順土 (Tokunaga, Naohito)

愛媛大学・総合科学研究支援センター・  
技術員

研究者番号：30596151