

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390101

研究課題名(和文) マラリア原虫スポロゾイトの蚊唾液腺侵入を担う分子群の解析

研究課題名(英文) Rhoptry proteins are involved in sporozoite invasion of the mosquito salivary gland

研究代表者

鳥居 本美 (TORII, MOTOMI)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授

研究者番号：20164072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、これまで研究が進められて来なかったマラリア原虫スポロゾイトのロプトリータンパク質に着目し、蚊の唾液腺侵入における機能を解析することを目的とした。RT-PCR法と免疫電子顕微鏡法によりスポロゾイトのロプトリーに局在する8分子を同定することができた。これらの分子がスポロゾイト時期特異的に発現抑制される遺伝子改変原虫を作出し、その表現型の変化を観察することによってスポロゾイトにおける機能解析を行ったところ、この内の5分子が媒介蚊の唾液腺侵入において重要な役割を果たすことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this project, we intended to elucidate the function of secretory proteins localized to sporozoite rhoptries during the host invasion process. We identified that 8 secretory proteins are expressed in sporozoites and localized to rhoptries by immuno-electron microscopic analysis. Since most of rhoptry proteins have been believed to be essential for blood stage parasite proliferation, we generated "sporozoite stage-specific gene silencing parasites" by promoter swapping technique in order to analyze their functions during sporozoite development and/ or invasion of the mosquito salivary glands. As a result, we demonstrated that 5 rhoptry proteins play an important role in the mosquito salivary gland invasion by sporozoites.

研究分野：寄生虫学

キーワード：寄生虫 マラリア 感染 侵入 スポロゾイト 媒介蚊

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100万人が死亡する人類にとって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)が、まず肝細胞に寄生・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、発熱などの症状を引き起こす。マラリア予防法開発の観点から、原虫の宿主細胞への侵入機構の解明が待たれているが、ほとんど明らかにされていないのが現状である。

マラリア原虫の宿主細胞への侵入型原虫であるメロゾイトとスポロゾイトの先端部には、ロプトリーと呼ばれる先端部小器官が存在しており、宿主細胞侵入に際して、貯蔵されたタンパク質が分泌されることが報告されている。そのためにロプトリー分子が宿主細胞侵入に重要な役割を果たすことが強く示唆されているが、研究が比較的進んでいるメロゾイトにおいてもその機能解析は全く手が付けられていない。理由の一つは、遺伝子破壊マラリア原虫作成によるタンパク質の機能解析という既存の手法の限界のためである。近年になって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の技術が確立され、特に蚊から哺乳類への感染を担うステージ(スポロゾイト)に発現する原虫分子の機能解析が画期的に進められてきた。しかしながら、組換え原虫の薬剤添加による選択は、赤血球感染ステージでしか行えないため、メロゾイト先端部小器官に局在する分子のように赤血球感染に必須な分子の欠損原虫が得られないというジレンマがあった。

このような状況の中、申請者らはメロゾイトのロプトリー分子である RON (Rhoptry neck protein)の一つが、スポロゾイトのロプトリーにも局在していることを初めて免疫電子顕微鏡法で見いだした。この所見は2つの異なる感染ステージ原虫(メロゾイトとスポロゾイト)が、共通の分子を利用して宿主細胞に侵入する可能性を示す所見である。一方で、我々はプロモーターを置換することで、両ステージに発現している分子の、スポロゾイトでの発現のみを欠損させる「スポロゾイト時期特異的タンパク質欠損原虫」の作出法の開発に着手した。次項に示すように、RON2を例に挙げれば、メロゾイトでの発現はそのままなので、赤血球に正常に感染し、後に蚊の体内でスポロゾイトを形成させたときに、RON2の発現を欠損させることで、スポロゾイトの宿主細胞侵入への影響を解析できるというものである。

その結果、RON2をステージ特異的に欠損させたスポロゾイトの蚊唾液腺への移行が著しく阻害されることが判明した。このことはスポロゾイトのロプトリータンパク質が肝細胞への侵入前に、蚊体内での移動(特に唾液腺への移行)にも機能している可能性を強

く示唆するものである。

2. 研究の目的

以上の所見から、我々はマラリア原虫スポロゾイトの唾液腺侵入にロプトリー分子の関与があるのではないかと、本研究の着想に至った。実際に、RT-PCR法を用いて、スポロゾイト期に発現するロプトリー分子を探索したところ、RONを含む13個の分子がスポロゾイトにおいて転写されていることを確認した。本研究では、ネズミマラリア原虫(*Plasmodium berghei*)を用いて、これらの分子について、スポロゾイトのロプトリーにおけるタンパク質発現を確認した後に、スポロゾイト時期特異的に遺伝子発現を抑制する遺伝子改変原虫を作成して、蚊の唾液腺侵入における各分子の機能の解析をおこなうことを目的とした。

スポロゾイトにおいて転写が確認された分子が、ロプトリーにおいてタンパク質として発現することをウエスタンブロット法および免疫電子顕微鏡法によって確認する。

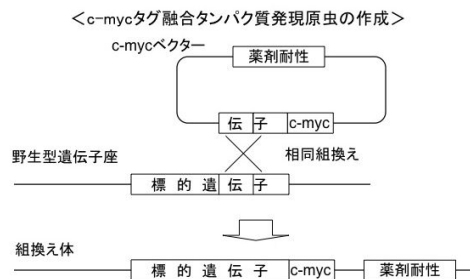
候補タンパク質全てについて、スポロゾイト特異的機能欠損原虫を作成して、媒介蚊内でのスポロゾイトの形成および唾液腺への侵入能に対する影響を観察する。

3. 研究の方法

1)ロプトリー分子候補タンパク質のスポロゾイトにおけるタンパク質発現及び局在の解析

c-myc 標識ロプトリー蛋白質遺伝子改変マラリア原虫の作製

RT-PCR法によるスクリーニングで選定された候補分子タンパク質の発現及び局在解析を行うために、候補分子タンパク質それぞれにc-myc エピトープ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する。遺伝子改変原虫の作製は候補分子遺伝子座のC末端領域にc-myc エピトープをコードする遺伝子をシングルクロスオーバーの相同組換えで導入することにより行う。遺伝子導入の際にマラリア薬剤耐性遺伝子も共に導入し、遺伝子改変原虫は抗マラリア薬剤耐性を指標に選抜する。



抗 c-myc 抗体を用いた候補分子タンパク質の発現および局在の解析

作製した遺伝子改変原虫を媒介蚊に感染させ、中腸壁上で形成されたスポロゾイト、あるいは、唾液腺に侵入後のスポロゾイトを

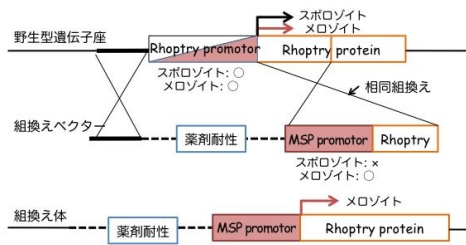
回収し、抗 c-myc 抗体を用いたウエスタンブロッティング法により候補分子タンパク質の発現プロファイリングを行う。候補分子がスポロゾイトで発現しているか否か、発現しているならどの発達段階で発現しているのかを確認する。

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 抗体を用いて蛍光抗体法によりスポロゾイトでの局在解析を行う。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。

## 2) スポロゾイトの蚊唾液腺侵入におけるロプトリー分子候補タンパク質の機能解析

ロプトリータンパク質をスポロゾイト期特異的に欠損する原虫の作製

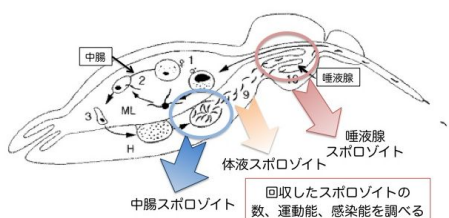
ロプトリー分子は、一般的に赤血球侵入の際に重要な役割を担うと考えられているため、標的遺伝子を欠損させた原虫を作出するのではなく、スポロゾイトでのみ発現を抑制させる、「時期特異的の遺伝子発現抑制原虫」を作出して、それぞれの分子の機能解析を行う。即ち、各分子をメロゾイトでは発現するが、スポロゾイトでは欠損するという遺伝子改変原虫の作出するために、それぞれのプロモーター領域をメロゾイトでのみ発現する分子のプロモーター領域に相同組換え法で置換する。特異抗体を作成し、ウエスタンブロッティング法を行うことで、標的分子がスポロゾイト特異的に発現抑制されていることを確認する。



<スポロゾイト期特異的のタンパク質欠損原虫の作出>

## 遺伝子改変原虫スポロゾイトの唾液腺侵入を含む蚊体内移行能の検討

作製したスポロゾイト期特異的の遺伝子発現抑制原虫の表現型を野生型と比較することにより、標的タンパク質が唾液腺へのスポロゾイト移行に関わるか否か評価を行う。そのために遺伝子改変原虫またはコントロール原虫をマウスに接種した後に媒介蚊 (*A. stephensi*) に吸血させる。20 で 24 日間飼育した後に、各群 20~40 匹の蚊を解剖して、



<スポロゾイト形成、侵入能の解析>

中腸、体液、唾液腺を採取し、それぞれの部位のスポロゾイト数を算定し、スポロゾイト期特異的の発現抑制原虫とコントロール原虫におけるスポロゾイトの分布の差異を検討する。

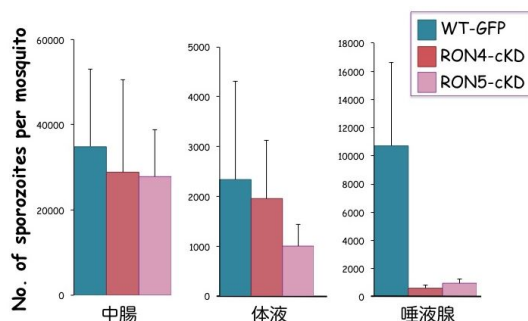
## 4. 研究成果

【24年度】 12の候補分子について発現解析を行った。RON(rhoptry neck protein) 3、RON4、RON5、RON6およびRALP1、RAP1、RhopH1、RhopH1A、RhopH2、RhopH3については、それぞれのタンパク質のC末端側にc-mycタグを融合させた組換えタンパク質発現原虫を作出した。RAMA、RON1については、C末端側の修飾が重要であることが推測されたので、組換えタンパク質を合成し特異抗体を作成した。それぞれの組換え原虫を蚊に感染させた後、15、24日後に中腸と唾液腺を回収し、スポロゾイトにおけるタンパク質の発現を抗c-myc抗体あるいは各タンパク質に対する特異抗体を用いたウエスタンブロッティング法によって確認した。その結果、RON1、RON3、RON 4、RON 5、RON 6、RAP1、RALP1、RhopH2、RAMAがスポロゾイトにおいても発現していることを見いだした。そこで、これらのタンパク質の局在を免疫電子顕微鏡法により解析した。その結果、RON3、RON 4、RON 5、RAP1、RALP1、RAMAがスポロゾイトのロプトリーに局在することが明らかになった。

次に、これらの分子のスポロゾイトにおける機能を明らかにする為に、まず始めにRON4 のスポロゾイト時期特異的の発現抑制原虫の作出を行った。具体的には、ron4 のプロモーター領域をメロゾイト特異的に発現する遺伝子のプロモーターに相同組換えにより置換する。発現抑制の確認の為に、RON4 の組換えタンパク質を合成し、特異抗体を作成した。抗 RON4 抗体を用いて、ron4 発現抑制スポロゾイトを抗原にしてウエスタンブロッティング法を行ったところ、スポロゾイトにおける RON4 の発現が極めて抑制されていることが確認された。そこで、遺伝子改変原虫を媒介蚊に感染させた後、中腸、唾液腺からスポロゾイト回収して数を計測した結果、RON4 発現抑制原虫では、唾液腺から回収されるスポロゾイトの数が顕著に減少していることが判明した。すなわち、RON4 がスポロゾイトの唾液腺侵入に重要な役割を果たすことを始めて明らかにできた。

【25年度】 スポロゾイトのロプトリーに局在することを確認した RON3、RON5、RAMA について、それぞれのタンパク質の機能解析を行うためにスポロゾイト時期特異的の発現抑制原虫を作成した。RON3、RON5 の特異抗体を前年度と同様に作成し、ウエスタンブロッティング法および間接蛍光抗体法により、遺伝子改変原虫において標的分子がスポロゾイト特異的に発現抑制されてい

ることの確認をおこなった。その結果、スポロゾイトにおける RON3、RON5 および RAMA の発現がきわめて抑制されていることが確認された。そこで、これらの遺伝子改変原虫を媒介蚊に感染させ、蚊体内で原虫を発育させた後に、中腸、胸腹部体腔液、唾液腺から回収したスポロゾイトの数を計測し、遺伝子改変原虫と野生型原虫のそれとを比較したところ、RON3 発現抑制原虫は野生型と同程度に唾液腺への侵入を示したのに対し、RON5、RAMA の発現抑制原虫において、唾液腺から回収されるスポロゾイトの数が顕著に減少していることがあきらかとなった。すなわち、RON2、RON4 に加えて RON5、RAMA がスポロゾイトの唾液腺侵入に重要な役割を果たすことを初めて明らかにすることができた。一方で、スポロゾイトタンパク質すべてが同じ機能を担うわけではなく、役割分担されていることが示唆された。



<RON4, 5の発現抑制スポロゾイトは唾液腺侵入能が低下する>

【26年度】ロプトリーに局在する別の2分子について解析を行った。前年度同様に選定した2つの候補タンパク質の機能解析を行う為に、スポロゾイト時期特異的遺伝子発現抑制原虫を作出した。それぞれの組換えタンパク質を合成し、特異抗体を作成後、標的分子がスポロゾイト特異的に発現抑制されていることをウエスタンブロッティング法により確認した。作製した遺伝子発現抑制原虫と野生型の表現型とを比較し、標的タンパク質がスポロゾイトの蚊唾液腺への侵入にどの程度に関与するかについての評価を行った。遺伝子改変原虫またはコントロール原虫を媒介蚊 (*A. stephensi*) に吸血させ、20で24日間飼育した後に、中腸、体液、唾液腺を採取し、それぞれの部位のスポロゾイト数を算定し、スポロゾイト期特異的発現抑制原虫とコントロール原虫におけるスポロゾイトの分布の差異を検討した。その結果、1つの遺伝子発現抑制原虫では唾液腺への侵入が著しく抑制されることが示され、スポロゾイトの蚊唾液腺侵入に重要な役割を果たすことが明らかになった。

これまでの結果と合わせると、本研究課題においてスポロゾイトのロプトリーに局在する分子を8つ同定し、そのうち5つが唾液腺への侵入に際して重要な役割を果たすこと

を明らかにした。また、スポロゾイトの侵入に関して、全てのロプトリー分子が協調的に働く訳ではなく、例えば標的細胞の種類に応じて役割分担している可能性を示唆した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 11件)

1) 石野智子、杉野友香、鳥居本美. ネズミは乳類の感染における Rhopty neck protein 2 の役割. 第 84 回日本寄生虫学会大会, 2015 年 3 月 21-22 日, 杏林大学三鷹キャンパス(東京都三鷹市)

2) 野崎守、徳永順士、坪井敬文、石野智子、鳥居本美. ネズミマラリア原虫 Rhopty-associated membrane antigen (RAMA) はスポロゾイトのロプトリーにおいて RON 複合体の蓄積に必要である. 第 84 回日本寄生虫学会大会, 2015 年 3 月 21-22 日, 杏林大学三鷹キャンパス(東京都三鷹市)

3) Nozaki M, Ishino T, Tokunaga N, Tsuboi T, Torii M. Rhopty proteins are involved in sporozoite invasion of the salivary gland. 63<sup>rd</sup> Annual Meeting, of ASTMH, 2014 年 11 月 02-06 日, New Orleans, USA.

4) 野崎守、坪井敬文、石野智子、鳥居本美. マラリア原虫スポロゾイトにおける RON 複合体タンパク質の機能解析. 分子寄生虫学ワークショップ&分子寄生虫・マラリア研究フォーラム, 2014 年 8 月 31 日-9 月 3 日, 帯広畜産大学原虫病研究センターPK ホール(北海道帯広市)

5) 野崎守、徳永順士、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 年 3 月 27-28 日, 愛媛大学城北キャンパス(愛媛県松山市)

6) 杉野友香、徳永順士、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 年 3 月 27-28 日, 愛媛大学城北キャンパス(愛媛県松山市)

7) Ishino T, Sugino Y, Tokunaga N, Nozaki M, Tachibana M, Tsuboi T, Torii M. Functional analysis of sporozoite rhopty proteins by stage specific gene silencing system in Plasmodium berghei. 62<sup>nd</sup> Annual Meeting, of ASTMH, 2013 年 11 月 13-17 日, Washington DC, USA.

8) 石野智子、杉野友香、野崎守、徳永順士、橋真由美、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 年 3 月 30 日, 東京医科歯科大学湯島キャンパス(東京都文京区)

9) 野崎守、徳永順士、坪井敬文、石野智子、鳥居本美. ネズミマラリア原虫 Rhopty

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 年 3 月 30 日, 東京医科歯科大学島キャンパス (東京都文京区)

10) Ishino T, Sugino T, Tokunaga N, Nozaki M, Tsuboi T, Torii M. Functional analyses of sporozoite rhoptry proteins by stage-specific gene silencing system in *Plasmodium berghei*. Keystone symposium, 2013 年 1 月 20-25 日, New Orleans, USA.

11) Ishino T, Murata E, Tokunaga N, Tachibana M, Tsuboi T, Torii M. Rhoptry neck protein 2 is produced in oocyst-derived sporozoites and required for salivary gland invasion. 61<sup>st</sup> Annual Meeting, of ASTMH, 2012 年 11 月 11-15 日, Atlanta, USA.

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鳥居 本美 (Torii, Motomi)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・  
教授

研究者番号 : 20164072

### (2) 研究分担者

石野 智子 (Ishino, Tomoko)

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 : 40402680