

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24500992

研究課題名(和文)生活習慣病を伴った血中の高コレステロールがもたらすマラリアの感染と治療への影響

研究課題名(英文)The effect of cholesterol in the blood on malaria parasites viability

研究代表者

早川 枝李 (Hayakawa H., Eri)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：00383753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：赤内期のマラリア原虫はコレステロール(Chol)の生合成系を持たない。しかしCholや脂質は、原虫のタンパク質輸送に重要な役割を持つMaurer's cleft(MC)の膜形成に重要と考えられていることから、原虫がどのようにCholや脂質等を外部環境から取り込んでいるか、またMCの微細構造の3次元的検討はタンパク質輸送機構を解明する上で重要な課題であった。本研究の結果から、原虫はリポタンパク質を介して肝臓 感染細胞間におけるCholの輸送・取り込みを行っており、またMCは微細なフィラメントを多数伸長しながら赤血球膜の裏打ち構造と結合し、タンパク質輸送を行っている可能性が初めて示された。

研究成果の概要(英文)：Intraerythrocytic stages of malaria parasite do not have a de novo biosynthesis pathway for cholesterol. However, lipids and cholesterol are essential to build up the Maurer's cleft (MC), which has been considered to provide a critical role for protein transportation. It was important to study how parasites can access extracellular cholesterol and lipids and take them into the infected erythrocyte. In addition, revealing 3-dimensional structure of MC with nano-scale level to clarify the details of the final step of parasitized-protein transport to host erythrocyte membrane. We found co-culture system with HepG2 human hepatocyte leads us to conclude malaria parasites take cholesterol and/or fatty acids into parasitized-erythrocyte. Furthermore, main body of MCs elongates fine filaments and connects to the cytoskeletal network of erythrocyte membrane. These results suggest that MC physically transports parasite proteins to the surface of erythrocyte membrane.

研究分野：マラリア、生物物理

キーワード：マラリア コレステロール 脂質膜 Maurer's cleft 電子顕微鏡 リポタンパク質 タンパク質輸送

1. 研究開始当初の背景

マラリアは蚊により媒介されたマラリア原虫が肝臓を経て赤血球へ侵入することにより赤内ステージの感染が確立する。赤内型ではリング→トロフォゾイト→スカイゾンとステージの進行過程において原虫を包んでいる PVM (寄生胞膜) の膜表面サイズが増加する。この PVM の増大には膜を構成する脂質分子の供給が必須であるが、赤内期のマラリア原虫では *de novo* の脂肪酸合成経路 (FAS II) が活発に働いてはいないと同時にコレステロールの生合成系を持たないため、自己の生育・増殖に必要なリン脂質をはじめ各種の脂肪酸やコレステロール、アミノ酸などを、ヒト血液や培養環境から取り込んでいると考えられている。また熱帯熱マラリア原虫は、内在性のタンパク質輸送システムを持たない赤血球に寄生し、原虫由来の数百種以上のタンパク質を宿主である赤血球膜へ輸送・発現させるが、このタンパク質輸送には Maurer' s Cleft (MC) という複雑な膜がマラリア感染赤血球内部に構築されることがわかってきた。しかし、この MC 膜の構築に関わる脂質分子の供給源や構築機序、MC の正確な立体構造や機能等についての報告例はない。マラリア原虫がどのようにして自己の生存・増殖に必須なコレステロールや脂質等を外部環境から取り込んでいるか検討することは、原虫の増殖抑制のみならずタンパク質輸送阻害機構の解明など、マラリア原虫感染赤血球をシステムティックに解析することにつながる。

2. 研究の目的

(1) マラリア原虫由来のタンパク質の輸送に重要な Maurer' s cleft (MC) の微細構造について、電子顕微鏡観察により 3 次元立体構造の検討と赤血球内部における局在について検討を行う。

(2) 熱帯熱マラリア原虫は自己のタンパク質を感染赤血球膜上に輸送・発現し、重篤な臨床症状を示す。しかしヒト以外の宿主ではマラリア感染後、臨床症状が現れないものや自然治癒する場合がある。そこで異なる宿主におけるマラリア感染赤血球の膜構造や膜の物性の検討を行う。

(3) 熱帯熱マラリア原虫が外部環境からどのようにしてコレステロールを取り込んで

いるか、また熱帯熱マラリア原虫のコレステロールの取り込みについてコレステロール合成阻害剤などの薬剤を使用して検討する。

3. 研究の方法

(1) 熱帯熱マラリア原虫; *P. falciparum* (3D7 株) を赤血球に感染させて培養し、原虫由来タンパク質の複合体であるノブ (knob) を発現しているトロフォゾイト/スカイゾン期の感染赤血球を磁気カラムで分離する。その感染細胞と非感染細胞を用いて、通常の切片作成法による透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察と、超音波を用いた unroofing 法 (細胞膜剥離法) によって赤血球の内部を露出させて TEM で観察する方法を用いて MC 構造について比較検討した。

(2) 熱帯熱マラリア原虫は感染赤血球膜上に knob を形成することにより血管内皮細胞と接着し、最終的に血管内で梗塞を引き起こす。これに対し梗塞を発症しない宿主としてマウス (Balb/c) に *P. chabaudi* を感染させた場合において、MC 構造の有無、感染赤血球の膜表面構造や膜の物性と感染細胞の接着性との関連性について、熱帯熱マラリア原虫感染赤血球と比較検討した。膜表面構造の検討は走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて、膜の接着性/凝集能については表面電位 (Z 電位) 測定により評価を行った。

(3) マウスマラリアの種の違いが、マラリア感染赤血球の膜表面構造に違いをもたらすかどうか検討するため、2 種のマウス (Balb/c、C/Black57) に 3 種のマウスマラリア原虫 (*P. berghei*, *P. yoelii*, *P. chabaudi*) をそれぞれ感染させ、マラリア感染赤血球の膜表面構造を走査型電子顕微鏡 (SEM) により比較検討した。

(4) SEM を用いたマラリア感染赤血球の表面構造観察を、より簡便に観察するための技術開発の 1 つとして、イオン液体を用いた新たな観察法の検討を行った。赤血球は膜の外側と内側とで膜構成脂質に非対称性分布がみられること、赤血球特有のしなやかな形状変化を示すことなど、他の細胞では見られない膜の特徴を持つ。このような赤血球膜に利用可能なイオン液体の探索の 1 つとして、イオン液体の新しい物性について検討した。

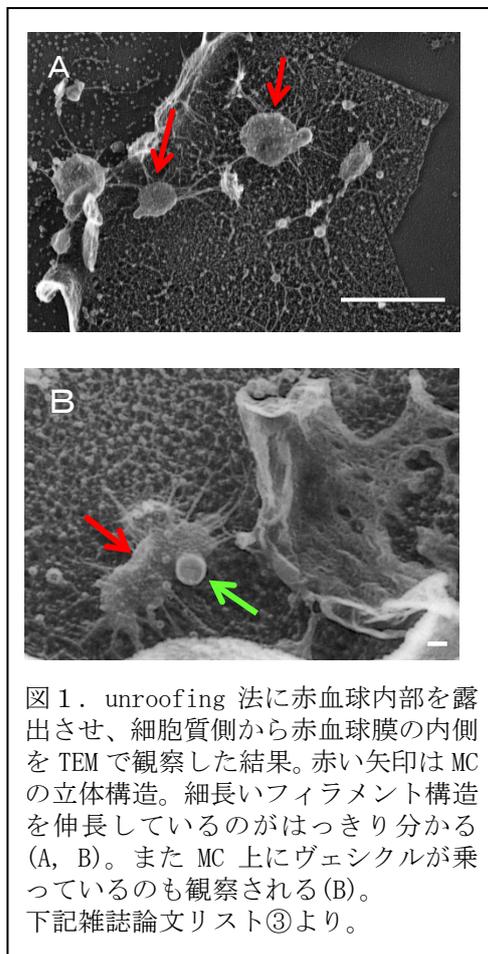
(5) 熱帯熱マラリア原虫が感染した人では

血中のコレステロールが低下している。そこで、人/培養環境からコレステロールがどのようにして感染赤血球に取り込まれているのか検討するために、人のリポタンパク質に着目し、マラリア原虫の増殖に対するリポタンパク質の影響、コレステロール合成阻害剤の影響を検討した。さらに肝臓がリポタンパク質の供給源として貢献している可能性を検討するため、肝細胞 (HepG2) とマラリア感染赤血球を共培養させ、各種薬剤の影響についても検討を行った。

4. 研究成果

(1) Maurer's cleft (MC) 膜の超微細構造の解明

Unroofing 法により作成したマラリア感染赤血球のサンプルを透過型電子顕微鏡 (TEM) により観察した結果、MC は直径 50-100 nm の球状/楕円円盤状の立体構造をとり、幅 10 nm 以下、長さ 170-450 nm のフィラメントを多数伸長させていることがわかった。このフィラメントは赤血球膜の膜骨格まで伸長し、また隣接した MC 同士をも結合させていた。また MC は赤内型感染ステージの進行とともに、



最終的には感染赤血球膜直下まで移動し局在していることも突き止めた。さらに MC から発芽するように形成している小胞も確認された。次に MC、小胞、タンパク質輸送の関係を検討するため小胞輸送阻害剤である四フッ化物アルミニウム処理を行ったところ、MC の数は減少し小胞とフィラメント構造は消失した。以上の結果から小胞と超微細フィラメントを持つ MC の立体構造が unroofing 処理により初めて確認され、熱帯熱マラリア原虫の赤血球内におけるタンパク質輸送に深く関与していることが示された。

(2) 異なる宿主におけるマラリア感染赤血球膜の物性・構造の検討

P. chabaudi 感染赤血球の内部構造の検討のため、通常の切片サンプル作成により TEM で観察した結果、*P. falciparum* 感染赤血球でみられた MC 構造のようなものは観察されなかった。次に、感染赤血球の凝集能・接着性を検討するために *P. falciparum* 感染赤血球、*P. chabaudi* 感染赤血球を用いて膜の表面電位測定 (Z-電位測定) と SEM 観察による膜表面構造の検討を行った。*P. chabaudi* 感染赤血球膜の Z-電位はマラリア原虫感染により「負側」に増加していた。この結果は *P. falciparum* 感染による人の赤血球膜の「正側」への電位値変化と逆の傾向を示しており、特に *P. falciparum* 感染赤血球の表面電位はゼロ (mV) 付近にシフトしていたことから、感染により凝集能が高くなっていることが膜の物性面からも明らかになった。また、*P. chabaudi* 感染赤血球の膜表面構造には *P. falciparum* 感染赤血球表面でみられた knob の形成はまったく認められなかった。さらに、マラリア原虫の感染が赤血球膜へ与える影響を検討するために、膜構成脂質の1つであるコレステロールのドメイン構造 (ラフト様ドメイン) について、マラリア原虫感染の有無、及び、*P. falciparum* 感染、*P. chabaudi* 感染赤血球に対し検討した。用いた方法は、各赤血球膜のラフト画分を調整後、ラフトに存在する Flotillin-1 の抗体をマーカーとしてウェスタンブロッティングを行い、ラフトのパターンを解析した。その結果、人赤血球、マウス赤血球のどちらも原虫感染の前後で異なるラフトパターンを示した。また *P. falciparum* 感染、*P. chabaudi* 感染赤血球の比較から、両者では原虫感染によるラフトパターンが異なっていることも明らかになった。これらの結果は赤血球膜中のコレステロールがマラリア原虫の生存になんらかの方

法で関わっていることを示唆しており、Z 電位測定、膜表面構造の解析の結果とあわせて、血管内梗塞の予防、及び脳マラリア症を誘導する原因解明や治療法へと応用できる結果と期待される。

(3) マウスマラリア原虫の違いによる感染赤血球の表面構造の検討

2 種のマウス (Balb/c、C/Black57) と 3 種のマウスマラリア原虫 (*P. berghei*、*P. yoelii*、*P. chabaudi*) を組み合わせて感染させた赤血球に対し、走査型電子顕微鏡 (SEM) で表面構造を比較検討した。その結果、全ての感染の組み合わせにおいて、感染赤血球膜表面に knob、もしくは突起状の構造物の形成は認められなかった。これらの結果は、熱帯熱マラリア感染赤血球が人の血管内皮細胞との接着性を示すのとは異なり、マウスマラリア感染赤血球がマウス体内において (熱帯熱マラリアとは) 異なる sequestration パターンを示すことを示唆している。

(4) SEM 観察への応用を目指したイオン液体に対する新しい物性の検討

熱帯熱マラリア原虫は自己のタンパク質を赤血球膜表面に輸送・発現することから、原虫感染赤血球の表面構造を正確に検出することは、感染赤血球の膜構造、物性、蛋白質輸送のメカニズム等を解明する上で非常に

重要である。形態/構造観察において電子顕微鏡は構造の精密さ、分解能の高さにおいて他の観察装置・技術の追随を許さない。近年、新たな電子顕微鏡技術としてイオン液体の利用が盛んになってきた。イオン液体とは、カチオンとアニオンのみで構成された物質で、100°C以下で液体になる不揮発性の物質の総称である。イオン液体の種類はその組み合わせにより数百種以上ともいわれており、特に近年、多様な生物学領域への利用が研究されている。その1つとして、金属蒸着なしにチャージアップを防いで細胞などを電子顕微鏡で直接観察可能とする材料としてイオン液体を利用する方法が研究されているが、赤血球膜へ及ぼす物理化学的影響についてはまったくわかっていない。そこで本研究では赤血球膜構成脂質のうち、[ホスファチジルコリン+スフィンゴミエリン+コレステロール]を用いて作成した人工リポソーム膜に対しイオン液体の影響について検討を行った。イオン液体は 1-ethyl-3-methylimidazolium lactate ([EMI][Lac]) と choline lactate ([Ch][Lac]) を用いた。その結果、これらのイオン液体は濃度依存的に人工脂質膜に対し膜融合を引き起こしていることが初めて示された。またリポソーム膜に上記のイオン液体を乗せて透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察したところ、金属蒸着なしでもチャージアップを起こすことなくリポソームを電顕で観察することに成功した。これらの結果は、膜融合を引き起こさないイオン液体の開発を行うことにより、今後、赤血球にも簡便に利用できる電子顕微鏡技術の開発につながるものと期待される。

(5) 熱帯熱マラリア原虫の外部環境からのコレステロールの取り込みについて

マラリア感染者の血中コレステロール値は、非感染者よりも顕著に低下していることが様々な研究から報告されている。人とは異なる脂肪酸合成経路を持つ熱帯熱マラリア原虫の培養には、コレステロールの存在が必須である。また、赤血球膜に存在するコレステロール量は原虫感染後に微増しているという報告もある。これらを踏まえて本実験では、ヒト体内ではマラリア原虫が血液からコレステロールを取り込み、自己の生存に利用している可能性を考えた。さらに、このコレステロールの輸送手段として血液中に存在するリポタンパク質がマラリア感染赤血球への中性脂質やコレステロール等の供給に

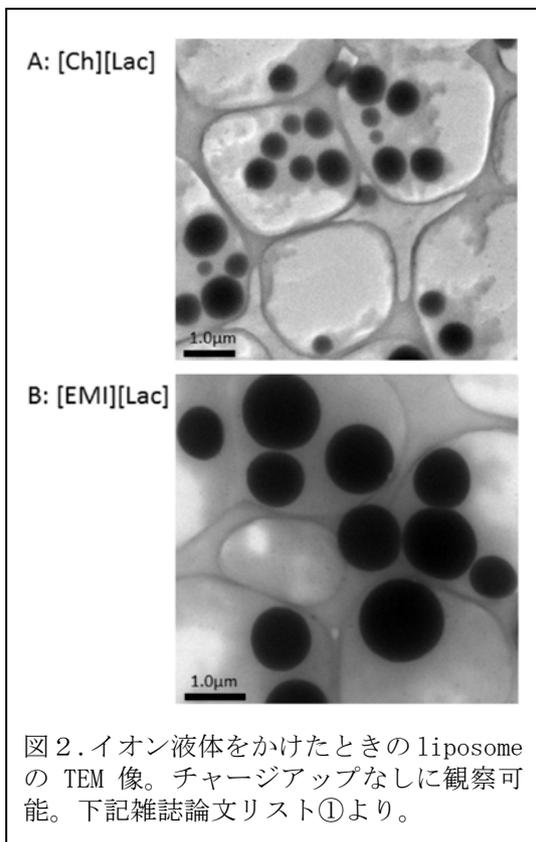


図2. イオン液体をかけたときの liposome の TEM 像。チャージアップなしに観察可能。下記雑誌論文リスト①より。

関わっている可能性を考え検討を行った。実験系としてマラリア感染細胞と肝細胞 (HepG2 細胞) を共培養し、simvastatin(コレステロール合成阻害剤)、ciprofibrate(脂肪酸合成阻害剤、VLDL の合成阻害剤/分解促進剤)、ezetimibe(コレステロールの吸収阻害剤)のマラリア原虫の増殖能等について検討した。この結果、マラリア原虫-HepG2 の共培養系に HDL を添加した系ではマラリア原虫の増殖能が著しく低下していた。この現象は、マラリア原虫単独の培養系に HDL を加えたときには見られなかった現象である。次に simvastatin を共培養系に加えたところ、原虫の増殖能にはめだつた変化はなかった。この結果は原虫がイソプレノイド合成に非メバロン酸系路を利用しているという過去の報告に一致するものである。共培養系に対する薬剤処理の実験では ezetimibe 添加において原虫の増殖率がもっとも低かった。Ezetimibe は本来、小腸におけるコレステロール吸収阻害剤であることから、本実験単独のデータからは ezetimibe の赤血球に対する影響は不明である。しかし本実験では HepG2 とマラリア原虫の共培養系を用いていることから、ezetimibe が HepG2 細胞をフィーダーとするリポタンパク質に積み込まれるコレステロールの量に影響を与えている可能性が考えられる (data not shown)。今後は他のリポタンパク質の原虫への影響も検討し、さらにリポタンパク質共存下での原虫由来タンパク質の輸送・発現、Maurer's cleft の形成などについても総合的に検討を行うことで準備をしている。本研究で得られた結果については、現在、論文作成作業に入っている。

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5件)

- ① Hayakawa EH, Mochizuki E, Tsuda T, Akiyoshi K, Matsuoka H, Kuwabata S: The effect of hydrophilic ionic liquids 1-ethyl-3-methylimidazolium lactate and choline lactate on lipid vesicle fusion. *PLoS One*. 2013(査読有).
 - ② 島田瑞穂、山本大介、早川枝李、松岡裕之: 自治医科大学医動物学部門で4年間(2011-2014)に経験した寄生虫・衛生動物関連症例の検討. *自治医科大学紀要* 2015, Vol 38, p 7177 (査読有)
 - ③ Hayakawa EH, Tokumasu F, Usukura J, Matsuoka H, Tsuboi T, Welles TE: Imaging of the subsurface structures of "unroofed" *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Exp. Parasitol.* 2015(査読有).
 - ④ Hayakawa EH, Matsuoka H: Detailed methodology for high resolution scanning electron microscopy (SEM) of murine malaria parasitized-erythrocytes. *Parasitol Int.* 2016 (査読有).
 - ⑤ Hayakawa EH, Kobayashi S, Matsuoka H: Physicochemical Aspects of the *Plasmodium chabaudi*-Infected Erythrocyte. *Biomed Res Int.* 2015 (査読有).
- [学会発表] (計17件)
- ① 津田哲哉、根本典子、望月衛子、岸田祥子、早川枝李、石垣靖人、阪上宏樹、新垣篤史、桑畑進: 電子顕微鏡技術への展開を志向したイオン液体の開発。第28回医学生物学電子顕微鏡学会 2012年5月11日~13日(盛岡市)
 - ⑩ 望月衛子、早川枝李、岸田祥子、川上皓史、津田哲哉、桑畑進: イオン液体を用いた高分子および生物試料の電子顕微鏡観察 第61回高分子学会 2012年5月29日~5月31日(横浜市)
 - ③ 松岡裕之、山本大介、早川枝李: 三日熱マラリア原虫 18S rRNA 遺伝子の地域間における変異について. 第72回日本寄生虫学会 東日本支部大会 第10回分子寄生虫・マラリアフォーラム合同大会 2012年10月12-13日(前橋市)
 - ④ Eri H. Hayakawa, Eiko Mochizuki, Tetsuya Tsuda, Kazunari Akiyoshi, Koshi Kawakami, Hiroyuki Matsuoka and Susumu Kuwabata: Vesicles fusion induced by concentrated hydrophilic ionic liquids. Biophysical society annual meeting (Feb 02-06th, 2013 Philadelphia, USA)
 - ⑤ 松岡裕之、山本大介、早川枝李: 日本人大学生における抗トキソプラズマ抗体の保有率. 日本寄生虫学会大会 2013年3月29-31日(東京)
 - ⑥ Eri H. Hayakawa, Eiko Mochizuki, Tetsuya Tsuda, Kazunari Akiyoshi, Hiroyuki Matsuoka and Susumu Kuwabata: The

effect of hydrophilic ionic liquids on lipid vesicles. Biophysical society 58th Annual Meeting (Feb15-19th, 2014, San Francisco, USA).

- ⑦松岡裕之, 山本大介, 島田瑞穂, 早川枝李, 富田 奨: 蚊の刺咬により皮膚に侵入したスプロゾイトを皮膚内で殺滅できないか? 第83回日本寄生虫学会大会 2014年3月27-28日(松山市)
- ⑧松岡裕之, 早川枝李, 山本大介, 島田瑞穂: 我が国における回虫症について 第74回日本寄生虫学会東日本支部大会 2014年9月27日(下野市)
- ⑨松岡裕之, 早川枝李, 山本大介, 島田瑞穂: 自治医科大学における医動物学の授業および実習の変遷について 第74回日本寄生虫学会東日本支部大会 2014年9月27日(下野市)
- ⑩ Eri H. Hayakawa, Fuyuki Tokumasu, Jiro Usukura, Hiroyuki Matsuoka, Takafumi Tsuboi, and Thomas E. Wellems: Three dimensional structure of Maurer's cleft with tiny filaments in *Plasmodium falciparum*-infected Erythrocytes by "unroofing" method. American Society for Cell Biology (ASCB) (Dec 6-10th, 2014, Philadelphia, USA)
- ⑪ Eri H. Hayakawa, Fuyuki Tokumasu, Jiro Usukura, Hiroyuki Matsuoka, Takafumi Tsuboi, and Thomas E. Wellems: The steric fine structure of Maurer's cleft in "unroofed" *Plasmodium falciparum*-infected Erythrocytes. Biophysical society 59th annual meeting, (Feb7-11th, 2015, Baltimore, USA)
- ⑫ 早川枝李, 徳外富由樹, 臼倉治郎, 坪井敬文, Thomas E. Wellems, 松岡裕之: 細胞膜剥離法を用いたマラリア感染赤血球の内部微細構造の解析. 第84回日本寄生虫学会 2015年3月21-22日(東京)
- ⑬島田瑞穂, 廣瀬芳江, 清水和彦, 山本大介, 早川枝李, 松岡裕之: *Plasmodium berghei* 感染による BALB/c と C57BL/6 マウスに共通した致死性腸管病態の検討. 第85回日本寄生虫学会. 2015年3月19-20日(宮崎市).
- ⑭島田瑞穂, 山本大介, 早川枝李, 松岡裕之: 地域医療の現場における glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) 欠損者スクリーニングの意義. 第30回日本国際保健医療学会 東日本地方会. 2015年

6月2日(佐久市)

- ⑮菅原琴美, 小林五十鈴, 荒木克哉, 浅沼研, 鶴生川久美, 山下順助, 早川枝李, 涌井秀樹, 高橋直人, 望月秀樹, 澤田賢一, 布村 渉: ヒト赤血球系細胞の α -synuclein. BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会, 第88回日本生化学会大会. 2015年12月1~4日(神戸市))
- ⑯ Kotomi Sugawara, Katsuya Araki, Ken Asanuma, Junsuke Yamashita, Eri H. Hayakawa, Isuzu Kobayashi, Kumi Ubukawa, Sawada, Hideki Mochizuki, and Wataru Nunomura: Biological significance of α -synuclein in human erythroid cells. American Society for Cell Biology (ASCB) (Dec 6-10th, 2015, Philadelphia, USA).
- ⑰ Eri H. Hayakawa, Fuyuki Tokumasu, Jiro Usukura, Hiroyuki Matsuoka, Takafumi Tsuboi, and Thomas E. Wellems. Super resolution imaging of Maurer's cleft in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes by unroofing-TEM observation. Molecular Approaches to Malaria Conference 2016 (MAM 2016) (Feb21- 25th, 2016, Lorne, Australia).

[図書] (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

早川枝李 (Eri H. Hayakawa)
自治医科大学・医学部・助教
研究者番号: 00383753

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

臼倉治郎 (Jiro Usukura)
名古屋大学・理学部理学研究科構造生物学
研究センター・名誉教授
研究者番号: 30143415