

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590506

研究課題名(和文)蚊中腸内マラリア原虫の虫体表面に発現する分子の機能解析

研究課題名(英文)Analysis of the molecules localized on surface of malaria parasites in the mosquito

研究代表者

橘 真由美 (Tachibana, Mayumi)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・助教

研究者番号：00301325

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、蚊の中のマラリア原虫ステージで発現している分子であるPyGM75は、雄性生殖母体の細胞小器官(osmiophilic body)、及び、雄性生殖体の表面に特異的に発現しており、雄の鞭毛放出(Exflagellation)の際に機能していることを明らかにした。また、原虫感染赤血球と共にPyGM75特異抗体を媒介蚊に吸血させると、原虫感染効率が顕著に減少したことから、PyGM75は新たな伝搬阻止ワクチンの候補抗原として有望であることが示された。現在ヒトマラリアへの応用を検討している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we demonstrated that PyGM75 in *Plasmodium yoelii* is localized to the osmiophilic bodies in the cytoplasm of male gametocyte then released to the surface of microgamete by immune electron microscopy using specific antibodies against PyGM75. By gene disruption strategy, it was shown that PyGM75 plays a crucial role during exflagellation after ingestion by mosquito. In addition, to examine whether anti-PyGM75 antibodies can prevent parasite transmission to mosquito, we mixed the specific antibodies and parasitized RBCs, then let them feed on *Anopheles* mosquitoes using membrane-feeding system. As a result, the numbers of oocysts formed on the mosquito midgut were greatly reduced by adding anti-PyGM75 antibodies. This result strongly suggests that GM75 is a novel candidate target of transmission-blocking vaccine.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア 寄生虫 雄性生殖体 鞭毛放出 伝搬阻止ワクチン

1. 研究開始当初の背景

マラリアワクチンは、これまで中心であったスポロゾイトを標的とする感染阻止ワクチン、メロゾイトを標的とする発病阻止ワクチンのいずれも、思わしい成果が上がっておらず、その結果、これまで着目されなかった媒介蚊体内の原虫を標的とする伝搬阻止ワクチンが再評価されている。

媒中腸内においてマラリア原虫は、雌雄の生殖体から、接合体、オーキネートへと発育し、中腸上皮を穿通して基底膜でオーシストへと発育する。蚊中腸内におけるこれら各ステージの原虫表面に発現する分子が伝搬阻止ワクチンの標的抗原として着目されている。しかし、伝搬阻止ワクチン候補抗原の中で、臨床試験

まで進んでいるのはオーキネート表面タンパク質の P25 のみで、新規の候補抗原の開発が期待されている。

この P25 に次ぐ新たな候補抗原を探索するために、ネズミマラリアをモデルとしたスクリーニングの過程で、虫体表面に局在する 6 種の新規分子を確認した。

興味深いことに、このうち一つの分子 (PyGM75) は雄の早期生殖体及び鞭毛様の雄性生殖体に発現していた。これまで、このステージの原虫に対する分子レベルでの解析はほとんど進んでおらず、この虫体表面抗原はワクチン候補としてだけでなく、研究が進んでいない蚊ステージマラリア原虫の中腸内発育の分子機序を解明する標的分子としても興味深いと考え、これらの分子の機能解析を行うことを計画した。

2. 研究の目的

ネズミマラリア原虫を用いた新規マラリアワクチン候補抗原の探索を行う過程で、媒介蚊中腸内の虫体表面に発現する新規分子を複数見出した。本研究は、新たに同定した 6 分子の中腸内における発現時期や局在などの詳細なプロファイリングを行う共に、

これらの分子の遺伝子欠損原虫を作製して、その表現型の変化を野生型原虫と比較検討することにより、標的分子の機能解析を行

うことを目的に実施する。併せて、これらの分子に対する特異抗体を用いて伝搬阻止活性の評価を行い、ワクチン候補としての可能性についても検討する。

3. 研究の方法

予備的な研究から媒介蚊内の原虫ステージの表面に発現が確認された 6 個の新規分子を対象として、生殖体の分化、受精、オーキネートへの発育、中腸細胞の侵入まで一連の発育過程における各分子の機能解析をおこない、更にワクチン候補としての可能性を検討することを目的に以下の研究を行った。

(1) 標的分子に対する特異抗体の作製

虫体表面タンパク質のスクリーニングの為に、これまでマウスで作製した抗体を用いていた。量が限られていること、ウサギ抗体の方が力価が高い場合が多いことから、候補の 6 分子については新たにウサギ抗体を作製し、局在の確認と抗体による阻害効果の解析を行うことにした。無細胞タンパク合成系を用いて 6 分子の GST 融合組換えタンパク質を作製する。組換えタンパク質をウサギに 3 回免疫し、6 分子に対するウサギ抗血清をそれぞれ作製する。

(2) 標的分子の蚊ステージにおける発現プロファイルと局在解析

Plasmodium yoelii 感染マウスから得られた赤内型ステージ (分裂体、生殖母体) および、pH8.3 の培養液で培養した蚊体内ステージ (生殖体、接合体、オーキネート) を用いて、間接蛍光抗体法、ウェスタンブロッティング法、免疫電顕法で詳細な局在解析や発現プロファイリングを行う。

(3) 標的遺伝子欠損原虫の作出

相同組換え法により、標的遺伝子座に薬剤耐性遺伝子を組み込むことで、目的遺伝子を欠損させる。組換え原虫は、抗マラリア薬 (ピリメサミン) を用いてネズミ体内で選択した後、クローン化する。作製に成功した遺伝子欠損原虫を用いて、各ステージ原虫の形成能や運動能等に注目して、表現型を詳細に解析する。

(4) 抗血清の伝搬阻止活性の測定

Plasmodium yoelii 感染赤血球に、一定の割合でウサギ血清、及び特異抗体を混合し、血液成分を再構築する。

図 2 に示す人工吸血装置のガラスチャンパー内に再構

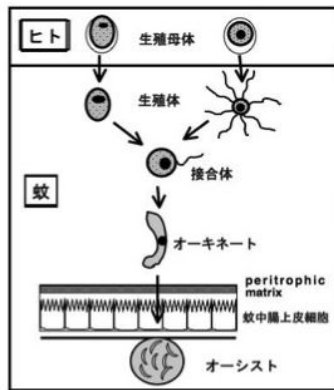


図1 蚊ステージ原虫の発育



図2 メンブレンフィーディング法

築した血液を入れ、26 度に保温した状態で約 30 分間吸血させ、4 日後に蚊を解剖して中腸外に付着したオーシストの数を数える。免疫前血清を添加したコントロール群と抗血清を添加した実験群の中腸オーシスト数を比較し、抗血清による伝搬阻止活性を評価する。

4. 研究成果

(1) 発現プロファイル, 及び局在解析

新たに作製したウサギ特異抗体を用いて、生殖母体 / 生殖体を多く含む原虫抗原に対してウエスタンブロッティング法を行い、得られた抗体が特異的に原虫標的タンパク質を認識できることを確認した。これらの特異抗体を用いて、間接蛍光抗体法、免疫電顕法による詳細な局在解析を行ったところ、4 分子について、生殖母体からオーキネートのいずれかのステージにおいて、表面に発現していることが確認できた。そのうちの 1 つである PyGM75 は、雄の生殖母体および生殖体で特異的に発現することが確認され、更に詳細な解析により、PyGM75 は、生殖母体では、osmiophilic body と呼ばれるステージ特異的な細胞小器官に局在すること、鞭毛放出が誘導されると、その鞭毛の表面に移行することを見出した (図 3)。

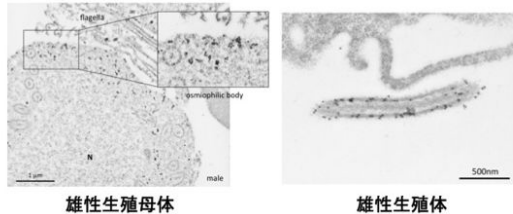


図3 PyGM75は、雄生殖母体のosmiophilic body及び生殖体表面に局在

(2) 逆遺伝学的手法による遺伝子の機能解析
6 分子それぞれの遺伝子欠損原虫を作製することを試みた結果、3 分子について遺伝子欠損原虫の作製に成功した。2 分子については、蚊への感染が野生型と同程度に見られ、生殖母体形成から中腸壁上のオーシスト形成に至るまでに大きな障害は認められなかった。一方で、PyGM75 欠損原虫では、雄の生殖母体および生殖体の osmiophilic body が形成されず、鞭毛放出 (Exflagellation) する原虫数

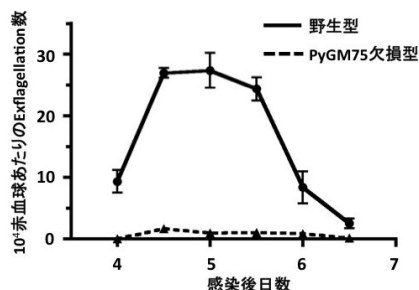


図4 PyGM75欠損原虫はExflagellation数が有意に減少する

が顕著に減少していた(図 4)。この結果から、PyGM75 は、鞭毛放出 (Exflagellation) の際に役割を持つことがわかった。

(3) 抗血清を用いた伝搬阻止活性の測定
作製した 6 分子に対するウサギ抗血清を *Plasmodium yoelii* 感染赤血球と混合し、これを人工吸血装置を用いて媒介蚊に吸血させる。4 日後、感染蚊の中腸壁にあるオーシスト形成を確認することで、伝搬阻止活性を評価した。PyGM75 を除いた 5 分子に対する抗血清では、安定的な伝搬阻止効果は得られなかったが、PyGM75 に対する抗血清を用いた際には、30 匹程度の蚊全てに於いてオーシストがほとんど検出されなかった(図 5)。更に、PyGM75 組換えタンパク質を免疫したマウスに、*Plasmodium yoelii* を感染させた後、蚊に吸血させてオーシスト形成を比較したところ、免疫マウスから吸血した蚊のオーシスト形成はコントロール群に比べ著しく低下していた。以上のことから、PyGM75 は新規伝搬阻止ワクチンの候補抗原であることが示唆された。この分子は、熱帯熱マラリア、三日熱マラリアにおいて相同体が存在することから、ヒトマラリア原虫への応用が期待できる。

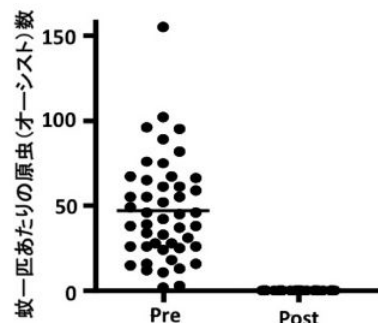


図5 抗PyGM75は蚊体内に於ける原虫発育を阻害する

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 5 件)

(1) 橘真由美、鳥居本美、須藤萌、坪井敬文、石野智子 雄性生殖体表面に局在する PyGM75 は受精に重要である 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) 石野智子、橘真由美、須藤萌、坪井敬文、鳥居本美 Identification of the novel transmission-blocking vaccine target

expressing on the surface of male gametes
2014年11月2日-6日 American society of
tropical medicine & hygiene 63rd Annual
meeting New Orleans, USA

(3) 橘真由美、鳥居本美、須藤萌、坪井敬文、
石野 智子 Novel molecule that is
specifically expressed on male gametocyte
and microgamete has potential role on
exflagellation 2013年11月13日-17日
American society of tropical medicine &
hygiene 62nd Annual meeting Washinton DC,
USA

(4) 橘真由美、鳥居本美、須藤萌、新澤直明、
横内ゆき、坪井敬文、石野智子 雄性生殖母
体の osmiophilic body および雄性生殖体表
面に局在する新規分子の同定 2013年3月
29日-31日 第82回日本寄生虫学会 東京
医科歯科大学湯島キャンパス, 東京都文京区

(5) 橘真由美、須藤萌、新澤直明、横内ゆ
き、石野智子、坪井敬文、鳥居本美
Identification of novel molecule that is
specifically expressed on the osmiophilic
bodies of male gametocyte and microgamete
surface 2013年1月20日-25日 Malaria
keystone symposia on Molecular and
cellular biology New Orleans, 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

<http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/parasitology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橘 真由美 (Tachibana, Mayumi)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・
助教

研究者番号: 00301325