

機関番号：32653

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659485

研究課題名(和文) 宿主由来ATPを悪用したマラリア原虫の赤血球侵入戦略の解明—治療を目指して—

研究課題名(英文) Studies on the mechanism by which malaria parasites invade erythrocytes using host erythrocyte-derived ATP

研究代表者

越野 一郎 (Koshino, Ichiro)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：80328377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：1) 原虫感染赤血球の破裂に伴い十分な濃度のATPが虫体とともに放出されること、2) 細胞外ATP刺激は赤血球膜骨格タンパク質デマチンをリン酸化し、膜骨格を緩めること、3) P2Y11受容体アンタゴニストは原虫の侵入を抑制すること、4) ATP分解酵素の存在下では原虫の侵入が抑制されること、を明らかにした。

以上の結果から、マラリア原虫の赤血球侵入には「感染型虫体とともに放出される宿主赤血球由来のATPが、赤血球膜上のP2Y11受容体を介した情報伝達を活性化し、膜骨格を緩めることが必須である」ことが強く示唆された。この一連の情報伝達経路を遮断することによる新規の治療法の確立が期待できる。

研究成果の概要(英文)：It was demonstrated that: i) ATP was released from infected erythrocytes upon burst. ii) ATP-stimulation resulted in phosphorylation of dematin, leading to loosening of membrane skeleton. iii) P2Y11 receptor antagonists inhibited malaria parasite invasion of erythrocytes. iv) The parasite invasion was inhibited in the presence of ATP-hydrolyzing enzymes. Altogether, it was strongly implicated that invasion process of erythrocytes by Plasmodium falciparum requires host erythrocyte-derived ATP, which then stimulates P2Y11-mediated signaling pathway, leading to phosphorylation of dematin, and loosening of erythrocyte membrane skeleton. Drugs which shut down the above-mentioned signaling pathway might provide a novel strategy to protect humans from malaria.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：マラリア原虫 膜骨格 ATP

1. 研究開始当初の背景

我々は局所麻酔薬リドカインが G タンパク質共役受容体シグナルを遮断して細胞内 cAMP 濃度の上昇を抑制し、マラリア原虫の赤血球侵入を抑制することを明らかにしていた (Kamata et al., *Am. J. Hematol* (2008), Koshino&Takakuwa, *Exp. Parasitol* (2009))。他方、赤血球内 cAMP 濃度の上昇は PKA による膜骨格タンパク質デマチンのリン酸化を引き起こし、赤血球膜骨格の網目を緩めることを明らかにしつつあった。これらのことと、原虫の赤血球侵入完了には膜骨格の網目を通り抜ける必要があること、原虫は網目より遥かに大きいこと、ATP は赤血球内に豊富に存在し、原虫とともに細胞外へ放出されると予想されること、ATP をリガンドとし細胞内 cAMP 濃度を上昇させる G タンパク質共役受容体 (P2Y11) が存在すること、から仮説「原虫とともに放出される宿主由来の ATP が、赤血球膜上の P2Y11 受容体を介した情報伝達経路を活性化し、膜骨格の網目を緩めることが赤血球侵入に必須である」に至った。

2. 研究の目的

仮説「熱帯熱マラリア原虫の赤血球侵入には、原虫とともに放出される宿主赤血球由来の ATP が、赤血球膜上の P2Y11 受容体を介した情報伝達経路を活性化し、膜骨格の網目を緩めることが必須である」を実証する。その上で P2Y11 受容体に対する中和抗体を作製して侵入抑制試験を行い、赤血球膜を標的とした新規の高マラリア療法確立のための基礎データを得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ATP の重要性に関して

アンタゴニスト (スラミン、NF157) および ATP 分解酵素 (アルカリホスファターゼ、アピラーゼ) の存在下、in vitro 培養系での侵入試験を行った。

(2) ATP の由来に関して

原虫を放出する直前の感染赤血球 (シゾン) 中に ATP が存在すること、その ATP が原虫とともに培養上清中に放出されること、をルシフェリン/ルシフェラーゼによる ATP 測定キットを用いて検証した。

(3) ATP 刺激による膜骨格への作用に関して

赤血球を ATP で刺激した後、低張溶血により膜ゴーストを作製、膜骨格タンパク質デマチンのリン酸化をイムノプロット解析で確認するとともに膜骨格の網目が緩むことを自作のレーザー回折装置により検証した。

(4) 中和抗体の効果に関して

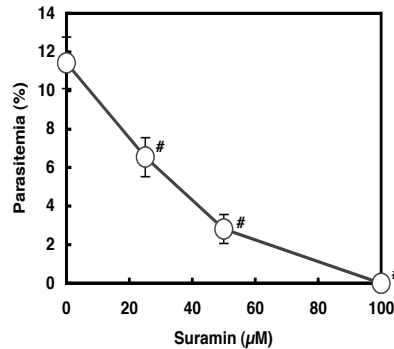
P2Y11 受容体の ATP 結合部位に対するモノクローナル抗体を作製した。得られた数クローンについてフローサイトメトリーによる結

合能試験を行うと同時に侵入抑制試験を行った。

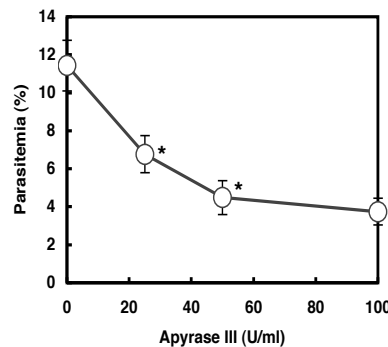
4. 研究成果

(1) ATP の重要性

P2Y 受容体のアンタゴニストであるスラミンは濃度依存的に原虫の赤血球侵入を阻害した (下図)。P2Y11 特異的なアンタゴニストである Nf157 も同様に濃度依存的に赤血球侵入を抑制した。



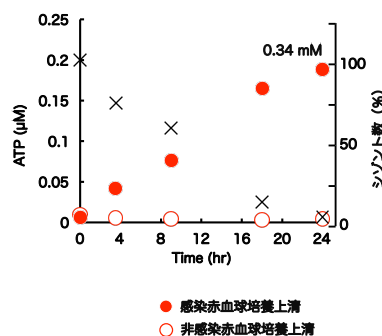
ATP 分解酵素であるアピラーゼの存在下では、原虫の赤血球侵入が濃度依存的に阻害された (左図)。おなじく ATP を加水分解するアルカリホスファターゼを用いた侵入実験でも同様に濃度依存的な侵入阻害が認められた。



以上の結果から、マラリア原虫の赤血球侵入には ATP が必要であることが明らかとなった。

(2) ATP の由来

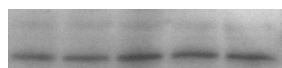
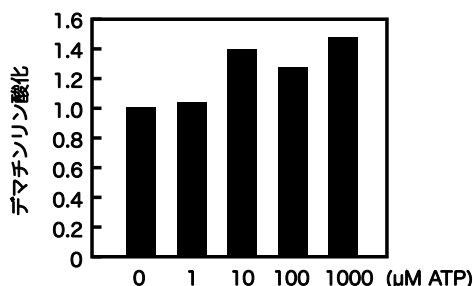
感染赤血球の培養上清中の ATP 濃度を経時的に測定したところ、原虫の放出による感染赤血球率 (下図中×) の低下に伴って ATP 濃度 (下図中●) が上昇した。全ての感染赤血球



が破裂した 24 時間後には培養上清中の ATP は 0.2  $\mu\text{M}$  に達し、理論上、感染赤血球内には 0.34 mM の ATP が存在したと推測された。破裂した赤血球のごく近傍では 0.2  $\mu\text{M}$  より数オーダー高い濃度で ATP が存在したと考えられ、デマチンのリン酸化とそれによる膜骨格の網目の緩みを惹起するに十分な濃度 (10  $\mu\text{M}$ 、(3) で後述) に達していたと推測された。

### (3) 膜骨格への作用

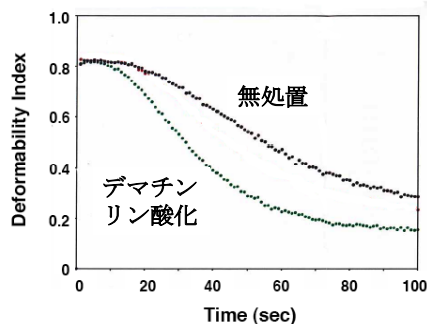
リン酸化デマチン特異的抗体を用いた解析から、赤血球を ATP で刺激するとデマチンのリン酸化が亢進することが明らかとなった (下図)。ATP によるリン酸化は 10  $\mu\text{M}$  以上で認められた。



IB: 抗リン酸化デマチン

レーザー回折装置による検討では、ATP 刺激により膜骨格の網目が緩む傾向が認められた。装置の感度の問題で統計的に有意な差として検出することはできなかったものの、別の実験ではデマチンのリン酸化により膜骨格が緩むことを確認している (下図。カーブの左方へのシフトは膜骨格の網目の緩みを表す。Koshino et al., J. Biol. Chem. (2012))。

以上の結果から、細胞外 ATP 刺激により膜骨格が緩むことが確認された。



### (4) 中和抗体

Zylberg らの報告 (Biochem. J. (2007)) に基づき、P2Y<sub>11</sub> 受容体の ATP 結合部位 2 箇所のペプチドを合成し、それらに対する合計 11 クローンのモノクローナル抗体を作製した。

ハイブリドーマの培養上清を用いた予備実験では、これらの抗体の赤血球への結合は検出されず、したがって in vitro 培養系に

おける原虫の侵入に対する抑制効果も認められなかった。抗体を濃縮し、その中和効果について検討中である。

### 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 2 件)

- (1) Koshino I, Mohandas N, and Takakuwa Y. Identification of a novel role for dematin in regulating red cell membrane function by modulating spectrin-actin interaction. J. Biol. Chem. (2012) 287:35244-35250 査読あり doi: 10.1074/jbc.M111.305441
- (2) Arashiki N, Kimata N, Manno S, Mohandas N, Takakuwa Y. Membrane peroxidation and methemoglobin formation are both necessary for band 3 clustering: mechanistic insights into human erythrocyte senescence. Biochemistry (2013) 52:5760-5769 査読あり doi: 10.1021/bi400405p

[学会発表] (計 5 件)

- (1) 越野一朗、Possible involvement of ATP derived from infected erythrocytes in invasion by Plasmodium falciparum、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 14 日～16 日、福岡
- (2) 越野一朗、マラリア原虫の赤血球侵入に利用される GPCR アゴニストに関する検討、日本膜学会第 34 年会、2012 年 5 月 8 日～9 日、東京
- (3) 越野一朗、局所麻酔薬リドカインによる抗ウイルス効果の検討、日本膜学会第 35 年会、2013 年 5 月 20 日～21 日、東京
- (4) 越野一朗、Anti-viral effects of lidocaine on feline immunodeficiency virus (FIV)、第 86 回日本生化学会大会、横浜
- (5) 高桑雄一、生体膜の本質に迫る、日本膜学会第 35 年会、2013 年 5 月 20 日～21 日、東京 (招待講演)

[図書] (計 1 件)

- (1) 越野一朗、高桑雄一、マラリア原虫の赤血球侵入メカニズム、血液フロンティア (医薬ジャーナル社)、(2014) 24: 90-95

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

越野 一郎 (KOSHINO Ichiro)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：80328377

### (2) 研究分担者

高桑 雄一 (TAKAKUWA Yuichi)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：40113740

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：