

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670202

研究課題名(和文)マラリア原虫雄特異的に発現するプロテアーゼの機能解析

研究課題名(英文)The functional analysis of Plasmodium male gametocyte/gamete specific protease

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、雄の生殖母体特異的に発現するプロテアーゼ様新規分子(PyGM75)の機能解析を通じて、有性生殖の分子基盤の一端を明らかにしようとする。PyGM75遺伝子欠損原虫の詳細な解析を通じて、PyGM75が雄生殖体の鞭毛放出の段階に重要な役割を担うことを明らかにした。プロテアーゼ活性を介して鞭毛放出に関与するかどうか、現在、活性アミノ酸残基と想定される部位に変異を導入した不活性型PyGM75発現遺伝子改変原虫を作成し、解析中である。

研究成果の概要(英文)：In this project, our aim is to elucidate the molecular mechanisms of sexual reproduction of malarial parasites, by performing the functional analyses of a novel male gametocyte/gamete specific protein (PyGM75), in rodent malaria parasite, Plasmodium yoelii. Using PyGM75 gene disrupted parasites, it was demonstrated that PyGM75 is required for exflagellation from male gamete prior to mating. Since PyGM75 contains an expected protease domain, we are now analyzing whether its function is mediated by protease activity or not by generating the active site residue substituted transgenic parasites.

研究分野：分子寄生虫学

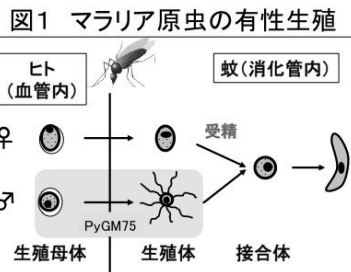
キーワード：マラリア 寄生虫 熱帯病 感染症 受精

1. 研究開始当初の背景

マラリア原虫は、媒介蚊の消化管内で有性生殖を行う(図1)。原虫は、蚊の体内に入るや否や雌雄の生殖母体が生殖体へと分化し、極めて短時間のうちに受精する。特に雄の生殖体分化には、活発な DNA 合成 / チュープリンの重合 / 運動能の獲得 / 赤血球膜の崩壊と、劇的な変化が見られるが、カルシウム放出とリン酸化酵素の関与が示唆されるのみで、分子基盤はほとんど解明されていない。申請者らは、雄の生殖母体特異的に発現する分泌型プロテアーゼ様タンパク質(PyGM75と命名)を独自に同定し、細胞内小胞(Osmiophilic body)に貯蔵され、鞭毛放出に関わることを見出した。そこで、PyGM75の作用機序の解明が雄生殖体分化機構解明の切り口になると考え本課題を着想した。

2. 研究の目的

本研究課題は、独自に同定した雄の生殖母体特異的に発現する分泌型プロテアーゼ様新規分子(PyGM75)の機能解析を通じて、これまで明らかにされてこなかったマラリア原虫の有性生殖の分子基盤の解明に迫ることを目的として行う。プロテアーゼ活性の検出や生体内基質同定といった生化学的解析を、従来の逆遺伝学的解析法と融合させることで、in vivo での作用機序の解析を目指す点が斬新であり、寄生性原虫の有性生殖メカニズム解析に向けての突破口となることが期待される。



3. 研究の方法

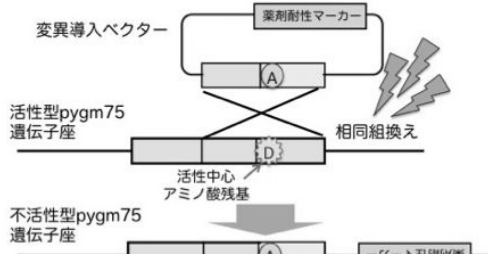
遺伝子改変原虫が短時間に作成でき、さらに有性生殖ステージの解析が容易であるネズミマラリア原虫(*Plasmodium yoelii*)を用いて行う。始めに、*pygm75* 遺伝子欠損原虫の表現型を解析することで PyGM75 の有性生殖における役割を明らかにする。さらに、特異抗体を用いて、機能阻害ができるか否か検証することで、PyGM75 の作用機序の解析を行う。次に、組換えタンパク質を合成し、プロテアーゼ活性を検出する。さらに、切断認識ペプチド配列・活性中心アミノ酸残基を特定する。次いで、不活性型 PyGM75 発現組換えマラリア原虫を作出し、プロテアーゼ活性と in vivo 機能の相関を検証する。プロテアーゼ活性が検出できたら、生体内基質を同定し、雄生殖体分化におけるプロテアーゼカスケードを明らかにする。

それぞれの実験方法の詳細を以下に示す。

PyGM75 欠損原虫の表現型の解析による機能の解明

- A) 既に作成済みの *pygm75* 欠損原虫をマウスに感染させ、生殖母体を含んだ感染血液の培養(20% FCS 含有 RPMI 1640(pH 8.2)を用いて、25 度で 6-12 時間培養)により、生殖体への分化・受精を行わせ、接合体の形成効率を野生型原虫と比較する。
  - B) 生殖体形成に関してさらに詳細に個別に評価を行う。チュープリン重合 / 赤血球膜の崩壊は、透過型電子顕微鏡を用いて形態学的に評価する。特に、細胞内小胞(osmiophilic body)の形成、移動について、野生型と比較しながら詳細に観察する。DNA 複製は、核酸染色色素を用いて FACS による解析を、運動能力は、顕微鏡下の観察により測定する。以上により、PyGM75 が雄生殖体分化のいずれのステップに関わるのかを明らかにする。
  - C) N 末端側のシグナル配列と、C 末端側の膜貫通ドメインを除いたほぼ全長のアミノ酸を組換えタンパク質として、コムギ胚芽由来無細胞タンパク質合成系を用いて発現させる。これをウサギに免疫し、特異抗体を作成する。特異抗体を、マラリア原虫の生殖母体 / 生殖体に添加することで、あるいは原虫と一緒に蚊に吸血させることで、原虫の生活環に阻害的に働くか否か調べる。上述 B) の項目に加え、原虫の蚊への感染に関わるか否かも、人工吸血法を用いて解析する。
- PyGM75 のプロテアーゼ活性の検出と性状解析
- A) PyGM75 の分泌シグナルと C 末端側の膜貫通ドメインを除いた全体の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で合成する。他の酸性プロテアーゼとのアミノ酸配列の比較から、活性中心と予想されるアスパラギン酸残基(2カ所)をアラニン残基に置換した不活性型 PyGM75 も同時に合成し、以降の実験のコントロールとする。
  - B) 最初に、PyGM75 の活性化に必要なタンパク質濃度や温度、pH 等の条件検討を行う。牛血清アルブミン(BSA)や、ヘモグロビンを基質候補として用いて、タンパク質分解活性が検出される条件をスクリーニングする。切断が検出されたら、ペプチドシーケンスにより、PyGM75 の認識配列を決定する。タンパク質を基質としてもプロテアーゼ活性が検出されなかった場合には、種々の蛍光標識合成ペプチド基質を用いることで、認識配列、活性化の条件などを調べる。
- 非活性型 PyGM75 発現組換え原虫の作出による、プロテアーゼ活性と機能の相関の検証
- A) PyGM75 の活性中心アミノ酸残基に変異を導入し、不活性型 PyGM75 発現組換えマラリア原虫を作出する(図4)。遺伝子導入は相同組換えにより行い、薬剤耐性獲得を指標に組換え原虫を選択する。

図2 不活性型PyGM75発現遺伝子組換え原虫の作出



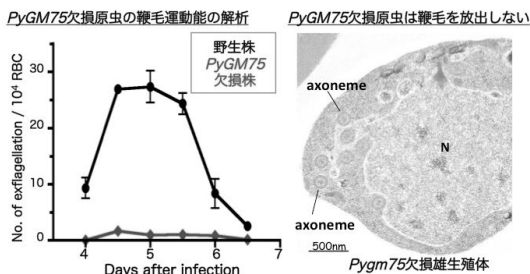
B) 不活性型 PyGM75 発現原虫の有性生殖の効率を、野生型 / *pygm75* 欠損原虫と比較し、PyGM75 の雄生殖体分化における機能は、プロテアーゼ活性により担われているのか検証する。

#### 4. 研究成果

*pygm75* 遺伝子欠損原虫の表現型の解析による機能の解明

既に、*pygm75* 遺伝子欠損原虫が蚊に感染できないことは見いだされていたので、本研究ではどのステップが顕著に阻害されているのか、詳細に解析することにした。野生型と *pygm75* 遺伝子原虫をネズミに感染させ、感染赤血球の割合を経時的に測定したところ、大きな違いが見られなかった。一方で、赤血球内で一部の原虫が、雌雄の生殖母体へと分化し、成熟する。感染血液を、25度で Ph8.2 の培地に添加することで、鞭毛放出を誘導することができる。放出鞭毛の運動能を経時的に測定したところ、*pygm75* 遺伝子欠損原虫ではほとんど検出されないことがわかった。すなわち、PyGM75 は鞭毛の放出あるいはその運動能に重要な役割を担うことが示された。さらに、詳細に解析する為に、鞭毛放出を誘導した後の原虫を電子顕微鏡によって観察した。その結果、*pygm75* 遺伝子欠損原虫では、原虫内に鞭毛が形成されているものの、刺激に応じて外に放出されないことがわかった。すなわち、PyGM75 は鞭毛放出に関わることを明らかにした。

図3 PyGM75は雄生殖体の鞭毛放出に重要な役割を持つ



PyGM75 特異抗体を用いた機能阻害の結果  
次いで、作出した PyGM75 特異抗体を用いて機能阻害できるかどうか調べた。野生型原虫の鞭毛放出を誘導する際に、特異抗体を添加したところ、抗体量依存的に鞭毛運動が顕著に抑制された。この結果から、PyGM75 は雄の生殖体から放出された鞭毛表面に局在し、運動に関与することが示唆された。

PyGM75 プロテアーゼ活性検出と性状解析  
PyGM75 がプロテアーゼとして機能するのかが調べる為に、N 末端と C 末端側の配列を除いたほぼ全長の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で作成した。コントロールとして、活性アミノ酸残基と予想される 2 つのアスパラギン酸を両方ともアラニンに置換した不活性型 PyGM75 を同時に合成した。生体内基質が不明なため、まずは BSA を基質として用いて、SDS-PAGE で分離したところ、野生型 PyGM75 添加依存的に消化されるバンドは検出されなかった。そこで、ペプチド基質として、ユニバーサルプロテアーゼ基質 (ロシュ・ライフサイエンス) を用いて同様の解析を行ったが、こちらも、特異的な切断は検出できなかった。以上から、PyGM75 がプロテアーゼとして働くか否か、組換えタンパク質を用いた場合には明らかな結果は得られなかった。

PyGM75 プロテアーゼ活性アミノ酸残基に変異を入れた遺伝子改変原虫の作出とその表現型解析

そこで、プロテアーゼ活性に関与することが推測されるアスパラギン酸をアラニンに置換した不活性型 PyGM75 を野生型のかわりに発現させた遺伝子改変原虫を作出することにした。図2に示すように、シングルクロスオーバーによる相同組換えにより、一塩基置換をおこさせ、結果として活性アミノ酸残基に変異を導入する。遺伝子導入を行う為のプラスミドベクターの調整まで終了した。これまで、2回遺伝子導入を試みたが、いずれも外来 DNA のゲノムへの取り込みが検出されなかったが、最近3回目を行い、ようやくゲノムへの挿入が確認できたところである。今後は、確かに活性アミノ酸残基が置換されたか、DNA シークエンスにより明らかにした後、遺伝子改変原虫を単離し、その表現型が *pygm75* 遺伝子欠損原虫と一致するか否か解析する。

#### 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 3 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. 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) Tachibana M., Torii M., Sudo M., Tsuboi T, Ishino T. Identification of the novel transmission-blocking vaccine target expressing on the surface of male gametes.

ASTMH 63<sup>rd</sup> Annual Meeting, 2014年11月  
02-06日, New Orleans, USA.

3) Tachibana M, Torii M, Sudo M, Yokouchi  
Y, Tsuboi T, Ishino T. Novel molecule that  
is specifically expressed on male  
gametocyte and microgamete has potential  
role on exflagellation. ASTMH 62nd  
Annual Meeting, 2013年11月13-17日,  
Washington, GA, 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

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