

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461515

研究課題名(和文) マラリア原虫の侵入時における赤血球側でのPKAリン酸化イベントの全容解明

研究課題名(英文) Studies on PKA phosphorylation events in host red cells during invasion by Plasmodium falciparum

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：仮説「PKAリン酸化による宿主赤血球側のPf受容体蛋白質の、膜骨格からの解離はマラリア原虫の赤血球侵入の必要条件となる」について検証し、膜骨格蛋白質デマチンの、未同定の結合相手(マラリア原虫の受容体の可能性がある)はPKAリン酸化により膜骨格から解離すること、一方、Pf受容体であることが知られているグリコフォリンA、グリコフォリンCはPKAリン酸化による膜骨格からの解離が起らないこと、を明らかにした。
また、アンタゴニストを用いた解析ならびにRNAseq解析から、Gsを介したPKAシグナリングに加えてGqを介する経路もマラリア原虫による赤血球侵入に関与している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, the hypothesis that dissociation of the receptor from the host red cell membrane skeleton via PKA phosphorylation is the prerequisite for successful invasion of red cells by malaria parasite Plasmodium falciparum was tested. It was demonstrated that an unidentified binding partner (a possible receptor for malaria parasite) of membrane skeletal protein dematin, was dissociated from membrane skeleton upon PKA activation, while well known receptors for malaria parasite, glycofhorins A and C were not. Dematin is the best substrate of PKA in red cells. Studies utilizing several antagonists for purine nucleotide receptors and RNAseq data suggested that Gq-mediated signaling pathway might also be involved in the invasion process as well as Gs-mediated PKA signaling pathway.

研究分野：生化学

キーワード：マラリア 赤血球 膜蛋白質 リン酸化

1. 研究開始当初の背景

世界三大感染症の1つであるマラリアは、熱帯・亜熱帯地域を中心に約2億人が罹患し、年間数十万人を死に至らしめる重大な感染症である。近年の地球温暖化を背景に、日本を含めた世界中の非流行地域への拡大が懸念されている。

ヒトマラリアの原因原虫のうち、最も重篤な症状をもたらす熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*, 以下 Pf) はヒト体内における生活環のほとんどを宿主細胞である赤血球内で過ごし、赤血球内の Pf が貧血・発熱・昏睡などの全ての重篤な症状を惹起する。したがって、赤血球への Pf の侵入を阻止する事ができれば、マラリアの新規治療法の開発に繋がると期待されるが、Pf による赤血球侵入の分子メカニズムには不明な点が多く、特に宿主赤血球側で起る分子イベントは全く分かっていなかった。

我々は研究開始までに、1) Pf の赤血球侵入には脂質ラフトを介した GPCR シグナル経路の活性化、すなわち PKA の活性化が必要である事、2) 活性化された PKA は赤血球膜骨格蛋白質のデマチンをリン酸化し、膜骨格の網目構造を緩めること、3) この一連のシグナルを惹起する GPCR アゴニストとして宿主赤血球内の ATP を利用していること、を明らかにしてきた。これらの知見は、Pf が宿主赤血球の PKA リン酸化を巧みに操って侵入のための必要条件を整えていることを示している。

2. 研究の目的

上記の知見に基づき、Pf の赤血球侵入における赤血球膜蛋白質の PKA リン酸化の意義について、その全容解明を目的に、仮説「PKA リン酸化による宿主赤血球側の Pf 受容体蛋白質の膜骨格からの離脱は Pf 侵入の必要条件となる」を、既に Pf 受容体であることが報告されているグリコフォリン A (GPA)、グリコフォリン C (GPC)、ならびにデマチンが結合しているであろう未同定の膜貫通蛋白質 (X) に焦点を絞って実証し、宿主赤血球の蛋白質を標的とした多角的・多段階の新規マラリア治療法開発のための分子レベルでの基盤を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) PKA リン酸化による GPA、GPC の離脱

非イオン性界面活性剤により赤血球膜を可溶化して調製した膜骨格 (Triton shell) を調製した。Triton shell に PKA を添加してリン酸化反応を行った後、遠心により膜

骨格 (沈殿) と、離脱した蛋白質 (上清) とを分離した。上清と沈殿は SDS-PAGE/イムノブロット解析を行い、GPA ならびに GPC の分布を検討した。

(2) X の同定ならびに PKA リン酸化による X の離脱

赤血球膜ゴーストの低張・アルカリ処理により調製した反転膜小胞 (IOV) に PKA を添加してリン酸化反応を行った後、遠心により IOV (沈殿) と、離脱した蛋白質 (上清) とを分離した。上清と沈殿は SDS-PAGE/イムノブロット解析を行い、デマチンが PKA リン酸化により X から解離するかを検討した。

さらに、(1) と同様に Triton shell を用いた検討を行い、PKA リン酸化によって膜骨格から離脱して上清中に回収された蛋白質について質量分析を行い、蛋白質 X の同定を試みた。

4. 研究成果

(1) 赤血球膜ゴーストから調製した Triton shell をイムノブロット解析した結果、GPC は大部分が膜骨格に結合しているものの、GPA はほとんど膜骨格への結合が認められず、上清に回収された (図 1)。したがって、PKA リン酸化による影響は GPC のみを対象として行った。

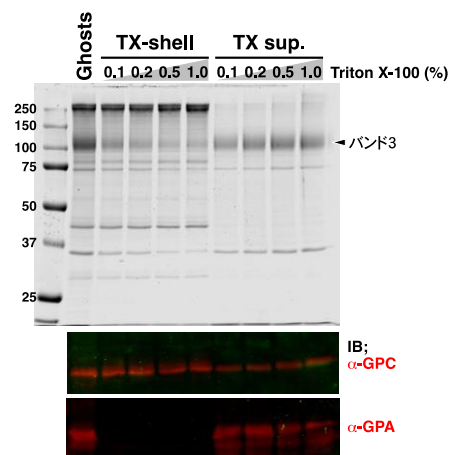


図 1 Triton shell ならびに上清中の GPA ならびに GPC の分布

Triton shell の PKA リン酸化後に分離した上清画分には GPC は認められず、膜骨格画分にのみ検出されたことから、GPC は PKA リン酸化によっては膜骨格から離脱しないことが明らかとなった (図 2)。

(2) IOV を用いた解析から、デマチンは IOV に結合していること、その結合は PKA リン酸化により弱まり、解離することが確認された (図 3)。

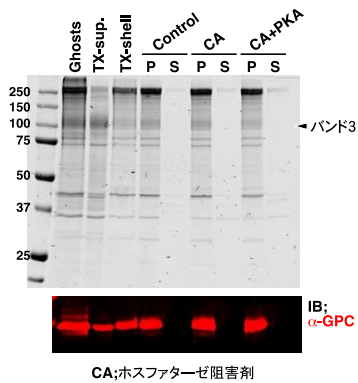


図 2 PKA リン酸化後の Triton shell ならびに上清中の GPA の分布

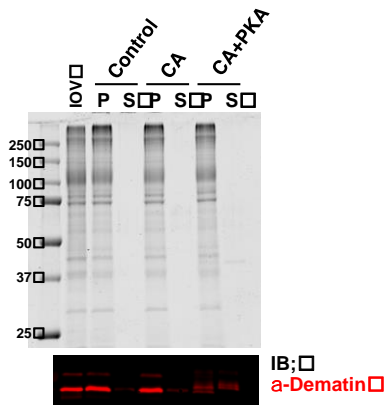


図 3 PKA リン酸化後の IOV ならびに上清中のデマチンの分布

さらに、赤血球に cAMP を封入して内因性 PKA を活性化した後に IOV を調製した場合も、IOV に結合して残るデマチンの量が減少したことから (data not shown)、デマチンは未同定の膜貫通蛋白質 X に結合しており、その結合はデマチンの PKA リン酸化により弱まることが明らかとなった。

このことを利用し、Triton shell の PKA リン酸化により膜骨格から解離する膜貫通蛋白質を解析し、膜貫通蛋白質 X の同定を試みた。十分なシグナル/ノイズ比を得ることが難しく、解離した蛋白質の中には細胞質蛋白質しか同定することができなかった。現在、解離する蛋白質の回収法・解析法を改良して検討中である。

ここまでは、1. 研究開始当初の背景で述べた自らの知見に基づき、PKA リン酸化をターゲットとして検討を行ってきたが、ATP 受容体の同定を試みる検討の結果、プリンヌクレオチド受容体を広く阻害するス

ラミンは、おそらく PKA リン酸化の抑制を介して Pf の赤血球侵入を完全に抑制したのに対して、P2Y(11)受容体 (Gs と共役し、PKA を活性化することが分かっている唯一のプリンヌクレオチド受容体) に特異的なアンタゴニストである NF157 は部分的な阻害効果しか示さないことが分かった

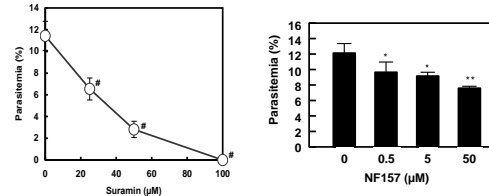


図 4 P2Y アンタゴニストによる Pf の赤血球侵入阻害効果

(図 4)。

この結果は、P2Y(11)以外のプリンヌクレオチド受容体が赤血球内の PKA リン酸化シグナリングに関与していることを示唆するものであった。

臍帯血ならびに末梢ケツから調製した CD34 陽性細胞を in vitro で分化誘導し得られた各分化段階の赤芽球系前駆細胞を用いた予備的な RNAseq 解析の結果、P2Y(11)に加えて P2X(1)、P2X(4)、P2X(7)ならびに P2Y(1)も発現が認められることが分かった。このうち、P2Y(11)と P2Y(1)は分化が進むにつれて発現量が増加することが明らかとなり (data not shown)、P2Y(1)も何らかの関与をしている可能性が示唆された。P2Y(1)は Gq を介して Ca(2+)の流入と PLC の活性化を誘導することが知られており、これまで想定していた Gs/PKA リン酸化経路に加え、Gq を介した経路も Pf の赤血球侵入に関与している可能性についても検討していく必要があると考えられた。

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 8 件)

- (1) 武崎紗恵子、越野 一朗、高桑 雄一、赤血球膜機能に対する甲状腺ホルモン作用、日本膜学会第 39 年会、2017 年 5 月 26～27 日、早稲田大学西早稲田キャンパス (東京都新宿区)
- (2) 越野 一朗、高桑 雄一、赤血球膜骨格構造への PKA/PKC リン酸化による影響、第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月 25～27 日、仙台国際センター (宮城県仙台市)
- (3) 越野 一朗、高桑 雄一、ATP released from host erythrocyte is important in invasion of red cells by Plasmodium

- falciparum、第 88 回日本生化学会大会、2015 年 12 月 2 日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）
- (4) Ichiro Koshino, Yuichi Takakuwa, ATP derived from host red cells plays an important role in red cell invasion by Plasmodium falciparum, Gordon Research Conference, 2015 年 6 月 28 日～7 月 3 日、New Hampshire (USA)
- (5) Yuichi Takakuwa, Nobuto Arashiki, Ichiro Koshino、Maintenance, regulation and disorder of asymmetric distribution of phospholipids in the bilayer of human erythrocyte membranes, Gordon Research Conference, 2015 年 6 月 28 日～7 月 3 日、New Hampshire (USA)
- (6) 越野一朗、高桑雄一、赤血球膜骨格-膜貫通蛋白質結合への PKA リン酸化の影響、日本膜学会第 37 年会、2015 年 5 月 14～15 日、早稲田大学西早稲田キャンパス（東京都新宿区）
- (7) 越野一朗、高桑雄一、PKA リン酸化による赤血球膜骨格の膜への結合の変化、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 15～18 日、京都国際会館（京都府京都市）
- (8) 越野一朗、高桑雄一、マラリア原虫の赤血球侵入における ATP の役割に関する検討、日本膜学会第 36 年会、2014 年 5 月 12～13 日、早稲田大学西早稲田キャンパス（東京都新宿区）

〔図書〕（計 0 件）

〔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 一朗 (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

田中 正太郎 (TANAKA, Shotaro)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：90380667

新敷 信人 (ARASHIKI, Nobuto)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：80569658

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()