

令和元年7月23日現在

機関番号：72801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670204

研究課題名(和文) アフリカトリパノソーマ症における病原性制御機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of pathogenesis control for African trypanosomiasis.

研究代表者

二瓶 浩一 (NIHEI, Koh-ichi)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・研究員

研究者番号：40373344

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)： アフリカトリパノソーマの生活環特異的に細胞表層の表面抗原が劇的に変化することによって病原性を制御する生命現象を明らかにするために、申請者は原虫で未だ解っていない小胞体とゴルジ体間の選別輸送機構について解明すること、更にその部位に作用する天然物の探索を行うことによって、本課題を進めている。

申請者は、アフリカトリパノソーマにおいて、細胞表層の主要構成成分である表面抗原のGPIアンカー型タンパク質(GPI-AP)の積荷受容体p24ファミリーを発見した。さらに、トリパノソーマのゴルジ体に作用する天然物を発見した。本研究の成果は、アフリカトリパノソーマの病原性を理解する上で重要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原虫の生物学研究は、同じく真核生物の酵母、植物、動物等モデル生物が存在する生物種に比べて解析手段が限られる為、遅れているのが現状である。しかしながら、原虫の特徴的な細胞構造や代謝を解明することで、これまでの生命科学で解っていない新たな生物学的発見や知見が得られる可能性が多いにある。さらに新たな創薬研究にも繋がる、本研究成果は、その典型であり、これまでに他の生物種で機能が曖昧であったp24ファミリーの生理的意義、位置付けを明らかにした。その上で、p24ファミリー等が働く輸送系が原虫の有効な薬剤標的となる可能性を示した。輸送系の創薬は、今後の原虫薬開発において重要な役割を果たすことが期待できる。

研究成果の概要(英文)： To clear the mechanism of a life cycle-specific replacement of surface antigens and membrane proteins-cargo selection of African trypanosoma, an applicant researched about the selective transport/sorting receptors between the endoplasmic reticulum and the Golgi body in trypanosoma and other protozoan parasites did not elucidate yet. Therefore an applicant analyzed natural products which act on the intracellular transport systems of surface antigen of the trypanosoma.

In this research, I found that a membrane protein, GPI anchored protein (GPI-AP)-specific cargo receptor p24 family of protozoan parasites. I appeared that the trypanosome p24 family play role of physiological important functions. Furthermore, I found a natural product which act on Golgi body. These results is very important for the understanding of pathogenicity of African trypanosomiasis.

研究分野：病原微生物の分子細胞生物学，分子原虫学，ケミカルバイオロジー

キーワード：トリパノソーマ 選別輸送 小胞体 ゴルジ体 積荷受容体 表面抗原 病原性 天然物

1. 研究開始当初の背景

アフリカトリパノソーマは中枢神経系に向性を示す寄生性原虫であり、ヒトにおけるアフリカ睡眠病、家畜におけるナガナ病の病原体である。その感染は、媒介昆虫のツェツェバエによって成立する。アフリカトリパノソーマは宿主の免疫機構を回避する為に表面抗原を変換する機構を備えている。さらに、生活環によって表面抗原が劇的に入れ替えられる(文献1)。アフリカトリパノソーマの細胞表面を構成する表面抗原の約90%がglycosylphosphatidylinositol (GPI)と言う糖脂質修飾されることによって細胞膜に局在化している(Figure 1)。この糖脂質の基本骨格の修飾は小胞体で進行する。GPI修飾された膜タンパク質はゴルジ体に運ばれ、さらに細胞膜へ運ばれるべきものが選別される。この細胞膜へ運ばれるべき表面抗原分子の運命は、小胞体とゴルジ体間の選別輸送によって決定されることが考えられる。しかしながら、原虫において、小胞体およびゴルジ体の輸送システムの実態については殆ど解っていないのが現状である。その上、向神経性を示す病原性微生物の感染成立における原理についても未だ理解されていない。

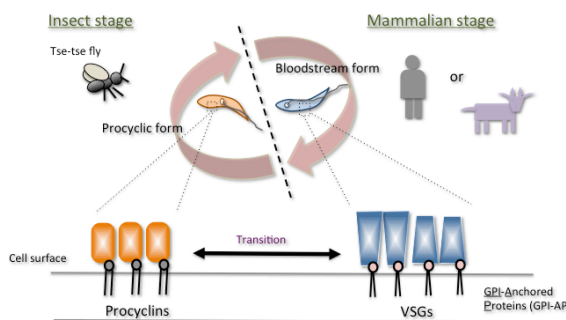


Figure 1. アフリカトリパノソーマの生活環と細胞表面分子群の構成。

2. 研究の目的

本研究では、アフリカトリパノソーマの表面抗原の入れ替えにおける選別輸送の制御に着目し、GPIアンカー型タンパク質(GPI-AP)の選別輸送における基本原理を寄生虫側から解明することを目的とする(Figure 2)。

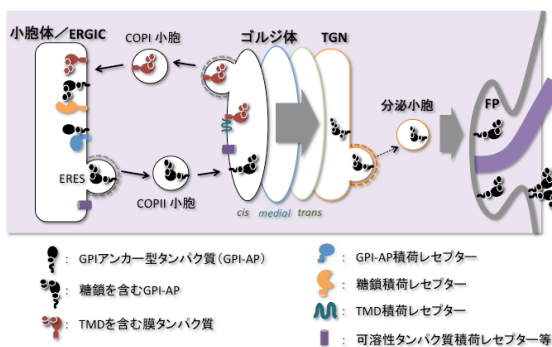


Figure 2. 小胞体およびゴルジ体間における選別輸送監視システム。

3. 研究の方法

上記目標を達成するために以下の解析を行った。

(1) アフリカトリパノソーマ (Tb) 由来 GPI-AP 積荷レセプターの探索, クローニングおよび酵母変異株を用いた機能相補性の確認。

(2) Tb GPI-AP 積荷レセプターの遺伝子欠損株の作成及び表現型の解析。

(3) 微化研化合物ライブラリーを用いたアフリカトリパノソーマの表面抗原タンパク質の輸送系を標的にする天然物の探索。

4. 研究成果

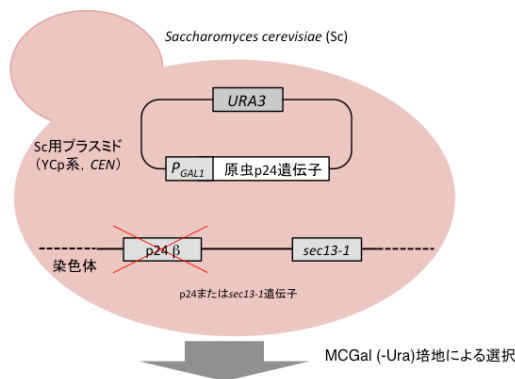
(1) Tb 由来の関連レセプターの探索, クローニングおよび酵母変異株を用いた機能相補性の確認。

GPI-AP 積荷レセプターの一つ p24 ファミリーは、真核生物において広く分布しており、酵母において9種類、ヒトにおいて10種類存在することがこれまでの研究から示されている(文献1)。本研究において、Tbのp24 ファミリーに該当する因子が少なくとも9種類、同じく原虫の赤痢アメーバにおいて5種類、マラリア原虫、トキソプラズマが属するアピコンプレクサ類原虫において4種類のp24 ファミリー候補因子が存在し、生物種によってその数が異なることが示唆された(Table 1)。p24におけるαからδで構成される4種のサブファミリー間の分布も生物種により様々であるものの、βサブファミリーは、酵母、ヒト、赤痢アメーバおよびトリパノソーマにおいて1種類のみであった。一方、我々の酵母を用いた先行研究から生育環境の変化によって使い分けられることが解っているδサブファミリー(文献2)はヒトのみ1種類であり、異なる複数の生活環を持つ原虫において2~4種類存在する可能性が示された。これが原虫の環境適応機構もしくは宿主内生存戦略に関わる積荷の選別輸送において重要な役割を果たすことが考えられる。

Table 1. 原虫における p24 ファミリーの分布。

Species	Sub-family			
	α	β	γ	δ
Yeast (<i>S. cerevisiae</i>)	Erp1 Erp5 Erp6	Emp24	Erp2 Erp3 Erp4	Erv25 Rrt6/Erp7
Mammals	TMED11(α1) TMED9(α2) TMED4(α3)	TMED2	TMED1(γ1) TMED5(γ2) TMED7(γ3) TMED3(γ4) TMED6(γ5)	TMED10
Trypanosoma (<i>T. b. brucei</i>)	Tbp24-219	Tbp24-228	Tbp24-205 Tbp24-203 Tbp24-225g	Tbp24-232 Tbp24-253 Tbp24-225d Tbp24-247
Amoeba (<i>E. histolytica</i>)	Ehp24-216	Ehp24-194	Ehp24-193	Ehp24-203 Ehp24-208
Apicomplexa (<i>P. falciparum</i>)	Pfp24-214			Pfp24-211 Pfp24-206 Pfp24-358

申請者が構築した酵母変異株を用いた p24 の機能相補検出システム (Figure 3) を用いて原虫のβサブファミリーのクローニングおよび同定を行った。



sec13-1 p24Δ二重変異による温度非感受性の抑圧活性を指標

Figure 3. 原虫 p24 遺伝子の同定システム.

その結果、アフリカトリパノソーマおよび赤痢アメーバにおいて分布が予想される p24βが酵母を用いた本システムにおいて機能することが明らかとなり、原虫において p24 ファミリーが機能的に働くことが示された。トリパノソーマにおいて、表面抗原 VSG, プロサイクリンが主要な GPI-AP である。それ以外にトランスフェリンレセプターがトリパノソーマでは宿主哺乳類由来のトランスフェリンレセプターと異なり、GPI-AP であり、p24 ファミリーのカーゴとして機能することも考えられる (文献 3)。

(2) Tb GPI-AP 積荷レセプターの遺伝子欠損株の作成及び表現型の解析。

これまでに行ってきた我々の研究結果から、p24 ファミリーの積荷に対する認識機構において、サブファミリー間でオリゴマー形成し、βサブファミリーが中心的役割を果たすこと、そのオリゴマーが生育環境の変化により再編されることを酵母を用いて明らかにしている (文献 3)。その上、Tb において、βサブファミリーは 1 種類だけであり、この Tb p24βがトリパノソーマの GPI-AP の選別輸送における監視または生育に重要な役割を果たすことが考えられる。一方、酵母において p24βの欠損によって顕著な表現型は示されないことがこれまでの研究で明らかである (文献 4)。

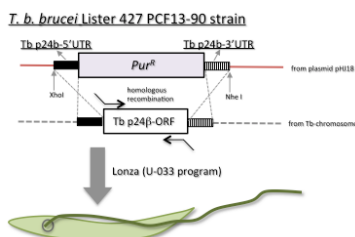


Figure 4. Tb 遺伝子欠損原虫の作成法.

申請者は、p24βサブファミリーに該当する遺伝子の欠損原虫を作成した。

その結果、p24β欠損原虫が増殖遅延の表現型を示した。Tb は二倍体なので、もう一对の染色体の同遺伝子を欠損させた原虫を調製する必要がある。今後は、p24β完全欠損株の表現型の解析、VSG, プロサイクリンまたはトランスフェリンレセプター等、p24 ファミリーのカーゴの輸送に対する影響について解析する必要がある。

(3) 微化研化合物ライブラリーを用いたアフリカトリパノソーマの表面抗原タンパク質の輸送系を標的にする天然物の探索。

原虫創薬を目指し、微化研化合物ライブラリーを整備、構築している。実際に、本ライブラリーを用いて抗原虫剤を見出せる可能性を照証明している (特願 2017-243872)。化合物ライブラリーの抗原虫活性を示した化合物のうち約 30%が輸送系を標的とすることが考えられた。従って、輸送系が原虫における優れた薬剤の標的であることを示唆している。本システムを用いて Tb に対する抗原虫活性を示す天然化合物探索を行った結果、ゴルジ体を経由する輸送系を標的とするモネンシン誘導体を同定した。今後、本化合物における表面抗原の輸送および局在化機構に対する詳細を解析していく必要がある。

本結果は、輸送系が抗原虫薬の優れた標的であることを示した上に、原虫のゴルジ体が薬剤標的となる可能性を示唆している。今後、本研究で発見された化合物が新たな抗トリパノソーマ薬もしくは原虫創薬のリード化合物として発展することが期待できる。従って、本研究から今後の新たな医薬品開発に展開する重要な成果が得られたと言える。

以上、本研究成果から向神経性を示す病原微生物の感染成立における基本原理の解明に向けて他の病原微生物における機構 (文献 4) との比較によってさらに証明が進むことが期待できる。

<文献>

1. Field M, Natesan SKA, Gabernet-Castello C, Koumandou VL. Intracellular trafficking in the trypanosomatids. *Traffic*, 8, pp629-39.
2. Pastor-Cantizano Juan N, Montesinos JC, Bernat-Silvestre C, Marcote MJ, Aniento F. p24 family proteins: key players in the regulation of trafficking along the secretory pathway. *Protoplasma*, 253, pp967-85 (2016).
3. Mizutani T, Ishizaka A, Nihei C. Transferrin receptor 1 facilitates

poliovirus permeation of mouse brain capillary endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **291**, pp2829-36 (2016).

4. Hirata R, Nihei C, Nakano A. Isoform-selective oligomer formation of *Saccharomyces cerevisiae* p24 family proteins. *J. Biol. Chem.* **288**, pp37057-70 (2013).

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 1 件)

Mizutani T, Ishizaka A & Nihei C. Transferrin Receptor 1 Facilitates Poliovirus Permeation of Mouse Brain Capillary Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry.* **291**. pp2829-2836. (2016). 査読あり
DOI: 10.1074/jbc.M115.690941

[学会発表] (計 4 件)

1. 二瓶浩一, 中西雅之, 高橋良和, 梅沢洋二, 柴崎正勝 「原虫における小胞体-ゴルジ体間の膜タンパク質選別レセプターの解析」 第 68 回日本細胞生物学会大会 2016 年 6 月 16 日 京都テレサ (京都府京都市)

2. 二瓶浩一, 高橋良和, 梅沢洋二, 柴崎正勝 「トリパノソーマにおける小胞体選別輸送システムの解析」 第 85 回日本寄生虫学会大会 2016 年 03 月 19 日 宮崎市民プラザ (宮崎県宮崎市)

3. 二瓶浩一, 平田龍吾, 高橋良和, 梅沢洋二, 柴崎正勝 「原虫 GPI アンカー型タンパク質選別レセプターの解析」 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会 2015 年 12 月 01 日 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

4. 二瓶浩一, 平田龍吾, 高橋良和, 梅沢洋二, 柴崎正勝 「キネトプラスト類の小胞体における選別輸送に関わる分子装置の解析」 第 75 回日本寄生虫学会東日本支部大会 2015 年 09 月 26 日 LEN 貸会議室(東京都千代田区)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 抗アピコンプレクサ類原虫剤、アピコンプレクサ類原虫感染症に対する予防又は治療用医薬組成物、及び流産又は死産防止剤
発明者: 西川善文, 二瓶浩一, 他 9 名
権利者: 公益財団法人微生物化学研究会, 国立大学法人帯広畜産大学
種類: 特許 (実用新案権)
番号: 特願 2017-243872
出願年月日: 平成 29 年 12 月 20 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 1 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
<http://www.bikaken.or.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二瓶 浩一 (NIHEI, Coh-ichi)
公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・研究員
研究者番号: 40373344