

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：10105

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870021

研究課題名(和文)マラリア重症化に關する原虫由来タンパク質の網羅的同定

研究課題名(英文)A high-resolution map of SBP1 interactomes in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes.

研究代表者

高野 量 (Takano, Ryo)

帯広畜産大学・原虫病研究センター・研究員

研究者番号：90722588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：熱帯熱マラリア原虫は、その感染標的である赤血球内に、種々の原虫由来タンパク質を分泌する。これらの原虫由来分泌タンパク質は、ヒトにおけるマラリア重症化と密接に關与しており、その全容解明は喫緊の課題である。本研究では、重症マラリアに關する原虫由来分泌タンパク質の網羅的同定を行った。感染赤血球内に高次構造体マウレル裂を構築するSBP1を標的としたインタラクトーム解析により、マウレル裂の構造や維持に關与すると考えられる新規原虫、及び宿主因子を同定した。

研究成果の概要(英文)：Plasmodium falciparum parasites, a causative agent of human malaria, export numerous proteins to the host erythrocyte membrane and cytosol. These exported proteins, sometimes referred to as the exportome, facilitate host cell remodeling and are directly associated with the pathology and pathogenesis of severe malaria. Therefore, to understand the molecular basis of severe malaria, it is essential to clarify the exportome. Here, I conducted FLAG-tag-based immunoprecipitation with cell lysates of erythrocytes infected with parasites that expressed FLAG-tagged SBP1, a known Maurer's cleft component, and analyzed the precipitated proteins by using high-sensitive mass spectrometry. The precipitated proteins were predominantly host cytoskeleton and Maurer's cleft components. I further identified novel host and parasite proteins that were recruited to and localized in Maurer's clefts, suggesting the involvement of these proteins in the severe malaria caused by Plasmodium falciparum.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：熱帯熱マラリア 病原性 インタラクトーム マウレル裂 輸送タンパク質 分泌タンパク質 重症マラリア 免疫沈降

1. 研究開始当初の背景

熱帯熱マラリア原虫は、感染赤血球を自身の寄生に適した環境に変えるため、赤血球内部に種々のタンパク質を分泌する(リモデリング機構)。このようにして分泌されたタンパク質は、副次的に、感染赤血球表面や細胞質に、ノブやマウレル裂と呼ばれる特徴的な構造体を作り出す(図1)。

マウレル裂は、脂質膜で外部から隔離された高次膜構造体であり、原虫から分泌されたタンパク質を、赤血球内部の目的地へ輸送することで、感染赤血球の生化学的・物理学的性質を変える。なかでも、ノブの中心へ輸送され、赤血球膜表面に提示されるEMP1(erythrocyte membrane protein 1)は、血管内皮細胞レセプター(CD36等)と結合し、感染赤血球の血管内皮細胞への接着を引き起こす。これが脳や胎盤等の毛細血管で起きると、正常な血流が阻害され、昏睡や死産等の重症化につながる。

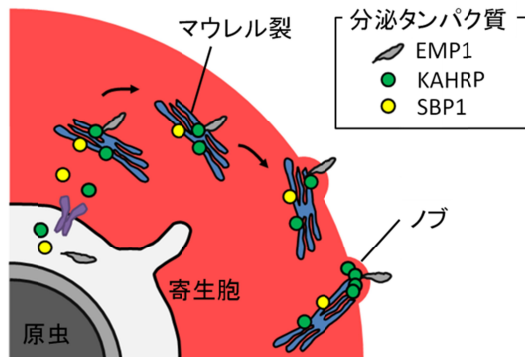


図1. 原虫感染赤血球内部の模式図

ノブやマウレル裂には、KAHRP(knob-associated histidine-rich protein)やSBP1(skeleton-binding protein 1)といった、特定の原虫由来分泌タンパク質がそれぞれ局在しており、その正常な機能に必須であるとされている。

原虫由来タンパク質が、赤血球細胞質へ分泌されるには、そのタンパク質に特定の5アミノ酸で構成されるPEXEL配列(Protein Export Elements)が必要であると考えられてきた。しかし近年、このような配列を持たないタンパク質でも、赤血球細胞質へ分泌されることが明らかとなり、未知の原虫由来分泌タンパク質が数多く存在することが示唆された。未知の原虫由来分泌タンパク質を同定することは、マラリア重症化メカニズムを明らかにする上で、極めて重要である。

2. 研究の目的

本研究は、原虫由来分泌タンパク質を網羅的に同定し、マラリア重症化に関与する新規分泌タンパク質を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 原虫由来分泌タンパク質を網羅的に同定することを目的として、感染赤血球内で高次構造体を形成するKAHRP、及びSBP1に着目した。熱帯熱マラリア原虫野生株3D7を基に、これらのタンパク質のC末端側にFLAGタグを付加したタンパク質を発現する遺伝子組換え原虫を作出し、その局在や発現を確認した。

(2) 上述の野生株、ならびに遺伝子組換え原虫を感染させた赤血球ライセートに対し、抗FLAGアフィニティービーズを用いて穏やかな条件で共免疫沈降を行い、免疫沈降されたタンパク質を高性能質量分析器を用いて解析した。組換え原虫感染赤血球の免疫沈降後サンプルにおいて同定されたタンパク質を、野生株のそれと比較解析することで、分泌タンパク質候補因子を同定した。

(3) 同定したタンパク質群に、どのような機能や局在を持つタンパク質が含まれているかを調べるために、遺伝子オントロジー解析(GO解析)、及びCytoscape 3.30を用いた機能別遺伝子分類解析を行った。

(4) 上述の結果を基に、8つの原虫因子、及び3つの宿主因子を選別し、それぞれのタンパク質に対する特異的抗体を用いて、免疫沈降の再現検証、ならびに、感染赤血球におけるその局在を解析した。原虫因子に対する抗体は、小麦胚芽無細胞タンパク質翻訳システムを用いて各タンパク質抗原を発現させた後、マウスへ免疫することにより得た。

(5) 同定したタンパク質の中から、感染赤血球におけるその局在が不明な17遺伝子について、赤血球の細胞質へ分泌されるか解析した。各タンパク質をコードする遺伝子の3'末端側に、緑色蛍光タンパク質(GFP)をコードする遺伝子を付加し、目的タンパク質とGFPが結合したタンパク質を発現する遺伝子組換え原虫を作出し、蛍光を指標とした局在解析を行った。

4. 研究成果

(1) KAHRP-, SBP1-FLAG発現原虫の作出
FLAGタグKAHRP、及びSBP1を発現する遺伝子組換え原虫を得た。いずれの組換え原虫感染赤血球においても、野生株感染のそれと比較して、FLAGタグを付加したことによる当該タンパク質の赤血球内局在に、変化は見られなかった。しかしながら、KAHRP-FLAGは、SDSを除いた種々の界面活性剤(TritonやNP40等)に対して著しく低い溶解性を示したため、後述の共免疫沈降実験には、SBP1-FLAG発現原虫の使用が最適であると判断した。

(2) 分泌タンパク質候補因子の網羅的同定
 野生株 3D7, 及び SBP1-FLAG 発現原虫感染赤血球ライセートに対する免疫沈降後サンプルには, バイトである SBP1-FLAG 以外, 目視で確認できる程の特異的なタンパク質バンドは検出されなかった (図 2A). そこで, 高性能質量分析器を用いて, 両サンプルに含まれる全タンパク質を定量的に同定し, 比較解析することで, SBP1-FLAG サンプルにおいてのみ特異的に検出された 256 因子 (原虫由来 205 因子, 宿主由来 51 因子) を同定した (図 2B). また, 両サンプル間における Mascot Protein Score の比較から, SBP1-FLAG サンプルにおいて著しく高いスコアを記録した 106 因子 (原虫由来 88, 宿主由来 18 因子) を, 分泌タンパク質候補因子として同定した (図 2C).

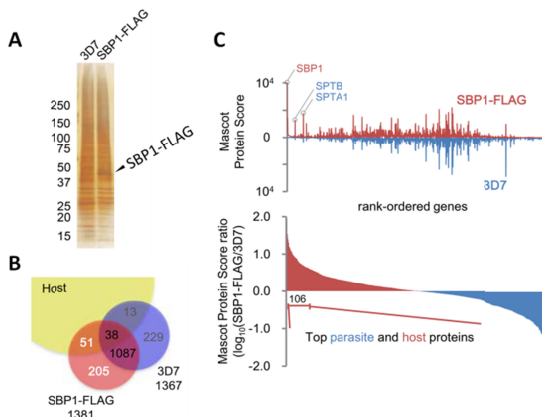


図 2. ショットガンプロテオーム解析

(3) バイオインフォマティクス解析
 GO 解析 (図 3A, B), 及び機能別遺伝子分類解析 (図 3C)の結果から, SBP1 と特異的に共沈降された原虫由来 88 因子, 及び宿主由来 18 因子には, 既知のマウレル裂構成因子, 及び赤血球細胞骨格に關与する因子が有意に多く含まれていることを明らかにした. この結果は, SBP1 がマウレル裂において赤血球骨格タンパク質スペクトリンと結合し, マウレル裂構造維持を担うという先行研究と合致するものであり, 実験系の成功を担保するものであると考えられた.

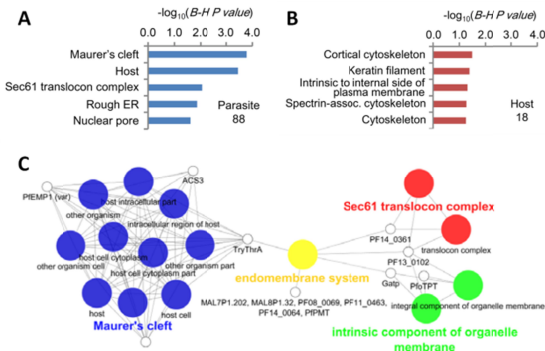


図 3. SBP1 と免疫沈降された因子に対する機能別遺伝子分類解析

(4) プロテオーム解析結果の検証
 上述の解析結果を基に, SBP1-FLAG と共免疫沈降された既知の分泌タンパク質 8 因子, ならびに宿主 3 因子に対する抗体を用いて, SBP1 との相互作用を確認した. いずれの因子についても, SBP1-FLAG と特異的に免疫沈降され, 原虫感染赤血球の細胞質において SBP1 と共局在することを明らかにした (図 4).

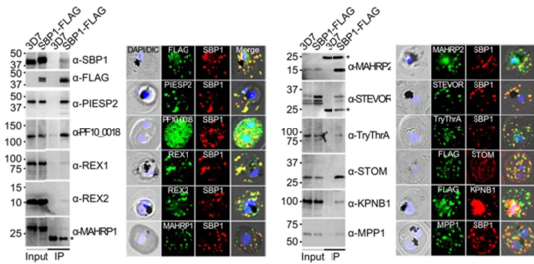


図 4. SBP1 との相互作用解析

(5) 新規分泌タンパク質の同定
 遺伝子組換え原虫感染赤血球に対するライブセルイメージングにより, 局在不明の 17 原虫由来因子のうち, 4 因子が赤血球の細胞質, 及びマウレル裂へ効率良く分泌されることを明らかにした (図 5). また, Tetanolysin と Saponin を用いた, 原虫感染赤血球に対する連続的膜透過解析 (Sequential Permealization assay) によって, 各因子の赤血球細胞質への分泌を確認した.

また, 同定された 4 種の新規原虫由来分泌タンパク質のうち, 2 種 (図 5, rank19 及び rank62 遺伝子) は, そのアミノ酸配列内に PEXEL 配列を持たないことから, PEXEL 非依存的に赤血球細胞質へ分泌される新規 PNEPs (PEXEL-negative exported proteins) であることを明らかにした.

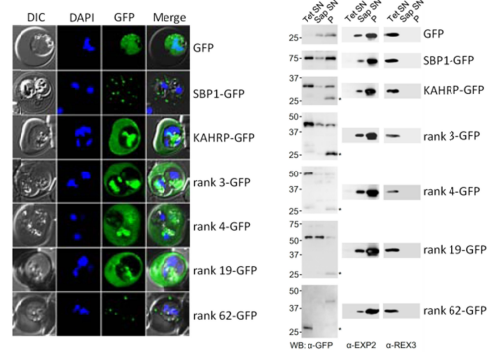


図 5. 原虫由来分泌タンパク質の局在解析

この成果の位置づけとして, 本研究で考案した実験系により, 原虫由来分泌タンパク質を “直接的” かつ “網羅的” に同定することができたと考えられ, 重症マラリアに關与する分子マーカーを世界に提供できたと考えられる.

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7件)

Muramoto Y, Shoemaker JE, Mai LTQ, Itoh Y, Tamura D, Sakai-Tagawa Y, Imai H, Uraki R, Takano R, *et al.*, Disease severity is associated with differential gene expression at the early and late phases of infection in non-human primates infected with different H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses. **Journal of Virology**. 88(16):8981-97. 2014.
doi: 10.1128/JVI.00907-14. 査読有

Watanabe T, Kawakami E, Shoemaker JE, Lopes TJS, Matsuoka Y, Tomita Y, Kozuka-Hata H, Gorai T, Kuwahara T, Takeda E, Nagata A, Takano R, *et al.*, Influenza virus-host interactome screen as a platform for antiviral drug development. **Cell Host & Microbes**. 16(6):795-805. 2014.
doi: 10.1016/j.chom.2014.11.02. 査読有

Recuenco FC, Takano R, *et al.*, Lambda-carrageenan treatment exacerbates the severity of cerebral malaria caused by Plasmodium berghei ANKA in BALB/c mice. **Malaria Journal**. 13:487. 2014.
doi: 10.1186/1475-2875-13-487. 査読有

Inomata A, Murakoshi F, Ishiwa A, Takano R, *et al.*, Heparin interacts with elongation factor 1 of Cryptosporidium parvum and inhibits invasion. **Scientific Reports**. 5:11599. 2015.
doi: 10.1038/srep11599. 査読有

Terkawi MA, Takano R, Kato K. Isolation and co-cultivation of human macrophages and neutrophils with Plasmodium falciparum-parasitized erythrocytes: An optimized system to study the phagocytic activity to malarial parasites. **Parasitology International**. 65(5 Pt B):545-548. 2015.
doi: 10.1016/j.parint.2016.03.005. 査読有

Kato K, Sugi T, Takemae H, Takano R, *et al.*, Characterization of a Toxoplasma gondii calcium calmodulin-dependent protein kinase homolog. **Parasites & Vectors**. 9(1):405. 2016.
doi: 10.1186/s13071-016-1676-1. 査読有

Terkawi MA, Takano R, *et al.*, Involvement of α -defensin 130 (DEFB130) in the macrophage microbicidal mechanisms for killing Plasmodium falciparum. **Scientific Reports**. 7:41772. 2017.

doi: 10.1038/srep41772. 査読有

〔学会発表〕(計6件)

高野 量, 尾山 大明, 秦 裕子, 加藤 健太郎. 熱帯熱マラリア原虫分泌タンパク質の探索. 第22回分子寄生虫学ワークショップ/第12回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会. 2014年8月. 帯広畜産大学原虫病研究センター, 北海道帯広市. 口頭発表.

高野 量, 秦 裕子, 竹前 等, 尾山 大明, 加藤 健太郎. 熱帯熱マラリア原虫寄生赤血球にみられるマウレル裂を構成する因子の網羅的同定. 第84回日本寄生虫学会大会. 2015年3月. 杏林大学三鷹キャンパス, 東京都三鷹市. 口頭発表.

高野 量, 秦 裕子, 竹前 等, 尾山 大明, 加藤 健太郎. マウレル裂プロテオミクスによる熱帯熱マラリア原虫赤血球寄生メカニズムの解析. 第85回日本寄生虫学会大会. 2016年3月. 宮崎市民プラザ, 宮崎県宮崎市. 口頭発表.

Ryo Takano, Hiroko Kozuka-Hata, Masaaki Oyama, Kentaro Kato. Targeted proteomic dissection of Plasmodium falciparum Maurer's cleft compartments using SBP1. 第24回分子寄生虫ワークショップ/第14回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会. 2016年8月. 帯広畜産大学原虫病研究センター, 北海道帯広市. 口頭発表.

Ryo Takano, Hiroko Kozuka-Hata, Masaaki Oyama, Kentaro Kato. A high-resolution map of SBP1 interactomes in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity, September 2016. Awaji Yumebutai International Conference Center, Hyogo, Japan. (***selected as an oral presentation***). 口頭およびポスター発表.

Ryo Takano, Hiroko Kozuka-Hata, Masaaki Oyama, Kentaro Kato. A high-resolution map of SBP1 interactomes in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. Japan-Brazil Malaria Research Workshop: fostering new partnerships, March 2017. University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil. (***selected as an oral presentation***). 口頭およびポスター発表.

高野 量, 秦 裕子, 尾山 大明, 加藤 健太郎. 熱帯熱マラリア原虫感染赤血球におけるSBP1インタラクトーム解析. 第86回日本寄生虫学会大会. 2017年5月. 北海道大学学術交流会館, 北海道札幌市. 口頭発表.

〔図書〕(計2件)

Takano R, Alaa TM, Kato K: Gene expression analysis of human peripheral blood-derived macrophages exposed to Plasmodium-falciparum infected erythrocytes. 寄生虫学研究 ; 材料と方法 . 三恵社 . 2014 .

Alaa TM, Takano R, Kato K: Co-culture of human peripheral blood-derived macrophages and Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. 寄生虫学研究 ; 材料と方法 . 三恵社 . 2014 .

〔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 なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高野 量 (TAKANO, Ryo)
帯広畜産大学・原虫病研究センター・研究員
日本学術振興会・特別研究員 (PD)
研究者番号 : 90722588

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号 :

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号 :

(4)研究協力者

なし ()