

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2021

課題番号：17H04073

研究課題名（和文）マラリア原虫のオーシスト形成期における原虫と媒介蚊の相互因子の解明

研究課題名（英文）Malaria and vector interaction in the Plasmodium oocyst formation

研究代表者

筏井 宏実 (Ikadai, Hiromi)

北里大学・獣医学部・准教授

研究者番号：80327460

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,300,000円

研究成果の概要（和文）：マラリア征圧に向けて抗原虫薬やワクチン開発、媒介蚊の数的コントロールなど対策が講じられてきた。しかしながら、薬剤耐性原虫や殺虫剤耐性媒介蚊が出現するなど、現在もその有効な方法は確立されていない。そこで、新規ワクチンおよび新規抗原虫薬開発には、マラリア原虫の生活環を鑑みた新たな生物学的特徴を明らかにする事が必要不可欠である。

本研究は、マラリア原虫の媒介蚊体内における原虫オーシスト壁構成蛋白質の探索、遺伝子組換え技術を用いたその蛋白質の発現動態および機能解析を行なった。それらの結果、新たに原虫オーシスト形成期におけるオーシスト壁構成蛋白質の生物学的特徴を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マラリア原虫オーシスト形成期のオーキネートからオーシスト壁に発現している原虫蛋白質について原虫および媒介蚊の生物学的特徴を明らかにすることは、将来、オーシスト形成期をターゲットとした新マラリア征圧戦略構築に発展すると考えられる。さらに、媒介蚊と原虫の相互因子の関係（寄生や感染を許す関係等）の理解、ひいては媒介蚊への侵入門戸である吸血時における媒介蚊の病原体認識因子の解析や病原体相互関係の包括的理解に繋がり、学術的な広がりが期待できると考えられる。以上の様に、様々な蚊媒介性の感染症研究に対して横断的に応用可能な基盤研究である事から、本研究成果の波及効果は非常に高いものであると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Plasmodium sp., which causes malaria, must first develop in mosquitoes before being transmitted. Upon ingesting infected blood, gametes form in the mosquito lumen, followed by fertilization and differentiation of the resulting zygotes into motile ookinetes. Within 24 h of blood ingestion, these ookinetes traverse mosquito epithelial cells and lodge below the midgut basal lamina, where they differentiate into sessile oocysts that are protected by a capsule. We identified three ookinete surface and oocyst capsule protein that is involved in ookinete motility as well as oocyst capsule formation.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア原虫 オーシスト オーカイネート 組換え

## 1. 研究開始当初の背景

マラリアは蚊によって媒介され、年間約 43 万人もの方が死亡する世界で最も重要な感染症の一つである。マラリア征圧に向けた戦略として、抗原虫薬やワクチン開発、媒介蚊の数的コントロールなど、様々な対策が講じられてきた。しかしながら、薬剤耐性原虫や殺虫剤耐性媒介蚊が出現するなど、現在もその有効な方法は確立されていない。そこで、新征圧戦略を基盤としたワクチンおよび新規抗原虫薬開発には、マラリア原虫の生活環を鑑みた新たな生物学的特徴を明らかにする事が必要不可欠である。

## 2. 研究の目的

マラリア原虫は、媒介蚊体内ステージにおいて形態が劇的に変化する。原虫は媒介蚊からの免疫応答によりオーキネートからオーシスト形成期にかけて原虫数が最も減少する。原虫はそのオーシスト形成時において、媒介蚊と相互作用する事により、オーシスト壁（殻）という特殊な構造物を形成する。

本研究は、オーシスト形成期における、①オーシスト壁構成蛋白質の探索、②オーシスト壁構成蛋白質の発現動態および機能解析、および③原虫オーシスト形成期と媒介蚊中腸細胞の相互因子の解析を行なう事によって、原虫および媒介蚊の生物学的特徴を明らかにし、マラリア原虫オーシスト形成期における原虫と媒介蚊の相互因子の解明を目的として実施される。将来、オーシスト形成期をターゲットとした新マラリア征圧戦略構築に発展する研究である。

## 3. 研究の方法

本研究は、ネズミマラリア原虫 *Plasmodium berghei* とハマダラカ *Anopheles stephensi* を用い、オーシスト形成期におけるオーシスト壁構成蛋白質の探索、オーシスト壁構成蛋白質の発現局在や動態および機能解析、遺伝子組み換え技術を用いた遺伝子欠損 (KO) 原虫作製などを行い、それら表現型の解析、原虫オーシスト形成期と媒介蚊中腸細胞の相互因子の解析を行なう事によって実施された。

### ① オーシスト壁構成蛋白質候補のスクリーニング

壁形成に重要と思われる蛋白質を PlasmoDB (<http://www.plasmodb.org>) データベー

ス上で5種スクリーニングした。さらに、スクリーニングした蛋白質に対する抗体をそれぞれ作製し、ガメートからオーシスト壁に発現していることを確認し、候補蛋白質を3種類 (PbCap93、PbCap494 および PbCap184) にした。

## ② オーシスト形成期の発現動態および機能解析

候補蛋白質が各ステージでどのようにしてオーシスト形成期に関与しているかを検討するために、野生型 (WT) 原虫を用いた以下の検討を行った。マラリア原虫をマウスに感染させる事により赤内型における増殖速度、雌雄ガメートサイト比および形態比較を行なった。さらに、*in vitro* 培養によりエクスフラジレーション、チゴート、オーキネートおよび初期オーシスト形成期について数や形態観察を行った。また、媒介蚊に吸血させる事によってオーシスト形成期から成熟期およびスポロゾイト形成数や形態比較を行った。さらに、経時的発現変化について定量 Real Time-PCR により mRNA の発現動態を調べた。作製された抗体を用いた免疫蛍光抗体解析によって経時的な蛋白質の発現局在や動態を明らかにした。

候補蛋白質の遺伝子について順次遺伝子欠損 (KO) 原虫、過剰発現 (OE) 原虫および Tag 蛋白質発現組換え原虫の作製を試みた。また、WT 原虫の結果を踏まえつつマウス体内および媒介蚊体内ステージにおける表現型、オーシスト形成過程、オーシスト形成数、オーシスト内のスポロゾイト数などの感染動態を比較検討した。

## ③ オーシスト形成抑制ワクチン抗原への検討

組換え蛋白質抗原作製やペプチド抗原作製をするなどして様々なエピトープに対する抗体を作製し、オーシスト形成抑制効果が高い最適エピトープのスクリーニングを行なった。

## ④ 統計解析

t 検定を群間の比較に使用した (赤血球内寄生率, ガメートサイト率, オーキネート形成率, オーキネート移動速度, オーシスト径)。カイ二乗検定を蚊への感染率の比較に用いた。マンホイットニー-U 検定をオーシスト形成数/中腸の比較に用いた。GraphPad Prism ソフトウェア (GraphPad, San Diego, CA, U.S.) を用いて行った。

## 4 研究成果

マラリア原虫オーシスト形成期のオーキネートからオーシスト壁に発現している原虫蛋白質3種類 (PbCap93、PbCap184 および PbCap494) についてそれぞれ原虫および媒介蚊の生

物学的特徴を明らかにしたので結果を下記に示す。

PbCap93 蛋白質の発現動態を、赤内型および蚊体内ステージについて蛍光抗体法を行い観察した結果、赤内型では反応しなかった。また、蚊体内ステージ 15 日目のオーシストにおいて反応が見られたが、スポロゾイトには反応しなかった。PbCap93 タンパク質は、スポロゾイト原形質膜への局在を伴わず、オーシスト壁に局在していた。野生型 (WT) 原虫と PbCap93 遺伝子欠損 (KO) 原虫を作製し蚊に吸血感染させたところ、WT 原虫と KO 原虫の蚊感染率とオーシスト形成数/中腸はそれぞれ 50%と 12、16.7%と 0.8 となり、オーシスト形成が有意に減少した。次に、透過型電子顕微鏡にて観察したところ、KO 原虫ではオーシスト壁の電子密度が低くなっており、オーシスト内でのスポロプラストの形成不全が確認された。

以上より、PbCap93 タンパク質はスポロゾイトが形成されるまでオーシスト内のスポロプラストから分泌されると考えられ、オーシスト壁の内部または壁膜の一部を構成し、スポロゾイト分化に重要な役割を担っていると推測された。

PbCap494 蛋白質について、抗 PbCap494 抗体を用いた免疫蛍光抗体法により PbCap494 のオーキネート細胞膜における局在解析を行った。オーキネートは PFA 固定/TritonX-100 処理および PFA 固定/未処理、生鮮状態のものを用いた。いずれも PbCap494 がオーキネートの細胞膜表面で強く反応していた。抗 PbCap494 抗体を原虫感染血液とともに蚊に吸血させると、2 日目からオーシスト形成数が少なくなった。このことから、抗 PbCap494 抗体と反応させたオーキネートと抗体未反応のオーキネートの運動性を比較したところ、抗 PbCap494 抗体と反応させたオーキネートの運動性は明らかに低下していた。

次に、PbCap494 遺伝子欠損 (KO) 原虫を作成し、野生型 (WT) 原虫と赤内型および蚊体内ステージについて比較したところ、赤内型における増殖速度、ガメートサイト形成率、雌雄ガメートサイト比、オーキネートの形態および形成数、唾液腺スポロゾイトの運動性およびマウスへの感染能は、差が見られなかった。しかしながら、KO 原虫と WT 原虫のオーキネートを培養し、その運動性について比較検討を行ったところ、明らかに移動速度が低下し、オーシストの大きさは小さく形成数は減少していた。透過型電子顕微鏡による観察では、KO 原虫のオーシストは WT 原虫に比べて発育が遅延し、オーシスト壁は菲薄化していた。

以上のことから、PbCap494 はオーキネートの細胞膜表面に発現して、中腸腔内から中腸基底膜への移動運動に関わる蛋白質として機能し、その後オーシスト壁を構成する蛋白質に機能が変化することが明らかとなった。

PbCap184 蛋白質について、抗 Pb184 抗体を作製し免疫蛍光抗体法を行ったところ、

Pb184 は雌雄ガメートとオーキネートに発現が見られた。オーキネートの *in vitro* 培養系に抗 Pb184 抗体を混和させるとエクスフラジュレーションには差がなく、ザイゴート形成数およびオーキネート形成数が減少した。抗 Pb184 抗体を原虫感染血液とともに蚊に吸血させると、2 日目からオーシスト形成数が少なくなった。以上のことから、Pb184 は雌雄ガメートに発現しているが、抗 Pb184 抗体は雌ガメートもしくはザイゴート形成に作用し蚊への伝搬を抑制することが示唆された。次に、N 末端から C 末端にかけて異なるエピトープ 5 種類の抗体を作製し、エピトープの違いによる伝搬阻止試験を実施したところ、C 末端側の抗体が最も伝搬阻止効果が見られた。

PbCap184 遺伝子の KO 原虫作製を試みたが、赤内型において lethal な遺伝子であることが明らかとなった。そこで、MSP9 プロモータを用いた、コンディショナル KO 原虫の作製を試みクローニングに成功し、赤内型および蚊体内ステージにおける表現型について解析中である。

以上のように、マラリア原虫オーシスト形成期のオーキネートからオーシスト壁に発現している原虫蛋白質について原虫および媒介蚊の生物学的特徴を明らかにすることができた。今後、マラリア原虫オーシスト形成期における原虫と媒介蚊の相互因子について更なる生物学的特徴を明らかにし、将来、オーシスト形成期をターゲットとした新マラリア征圧戦略構築に発展すると確信する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sasaki Hanae, Sekiguchi Harumi, Sugiyama Makoto, Ikadai Hiromi	4. 巻 10
2. 論文標題 Plasmodium berghei Cap93, a novel oocyst capsule-associated protein, plays a role in sporozoite development	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Parasites & Vectors	6. 最初と最後の頁 399
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13071-017-2337-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakayama Kazuhiko, Kimura Yuta, Kitahara Yu, Soga Akira, Haraguchi Asako, Hakozaiki Jun, Sugiyama Makoto, Kusakisako Kodai, Fukumoto Shinya, Ikadai Hiromi	4. 巻 14
2. 論文標題 Role of Plasmodium berghei ookinete surface and oocyst capsule protein, a novel oocyst capsule-associated protein, in ookinete motility	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasites & Vectors	6. 最初と最後の頁 373
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13071-021-04868-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中山和彦、北原優、木村勇太、箱崎純、曾我晃、福本晋也、筏井宏実
2. 発表標題 Plasmodium bergheiのOSCPはookineteの運動性とoocyst壁形成に関与する
3. 学会等名 第89回 日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福田歩夢、箱崎純、高野真、吉川泰永、筏井宏実
2. 発表標題 雌雄ハマダラカにおけるマラリア原虫の感受性
3. 学会等名 第89回 日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中山和彦、北原優、木村勇太、箱崎純、福本晋也、筏井宏実
2. 発表標題 Plasmodium berghei のPbCap494タンパク質はookineteの移動運動に関する
3. 学会等名 第162回 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大場裕輔、曾賀 晃、福本晋也、筏井宏実
2. 発表標題 Plasmodium berghei Cap184は蚊体内における唾液腺スポロゾイトの数に影響する
3. 学会等名 第65回 日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山和彦、北原優、木村勇太、箱崎純、曾我晃、福本晋也、筏井宏実
2. 発表標題 ネズミマラリア原虫PbCap494はオーカイネートの運動性およびオーシスト壁形成に関する
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野々垣雄介・箱崎 純・田邊太志・西山啓太・筏井宏実
2. 発表標題 ハマダラ蚊の腸内細菌叢の破綻が卵巣内の卵発育を抑制する
3. 学会等名 日本昆虫学会第78回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北原優、杉山真言、福本晋也、筏井宏実
2. 発表標題 Plasmodium berghei Cap494タンパク質はsporozoite形成には影響をしない
3. 学会等名 第87回日本寄生虫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北原優、杉山真言、福本晋也、筏井宏実
2. 発表標題 Plasmodium berghei Cap494タンパク質はsporozoite形成には影響をしない
3. 学会等名 日本寄生虫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤拓海、杉山真言、筏井宏実
2. 発表標題 in vitro培養法を用いたPlasmodium bergheiのoocyst 形成
3. 学会等名 日本獣医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 北原 優, 木村勇太, 田中佑佳, 筏井宏実
2. 発表標題 Plasmodium berghei Cap494の性状解析
3. 学会等名 日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部大会
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 筏井宏実
2. 発表標題 雌雄ハマダラカにおけるマラリア原虫コンピテンシーの比較
3. 学会等名 第72回日本衛生動物学会東日本支部大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原口麻子、高野真、箱崎純、中山和彦、中村咲蓮、吉川泰永、草木迫浩大、筏井宏実
2. 発表標題 Plasmodium原虫発育に対する雌雄ハマダラカの分子機構解析
3. 学会等名 第91回 日本寄生虫学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中山和彦、馬場海地、箱崎純、原口麻子、中村咲蓮、草木迫浩大、筏井宏実
2. 発表標題 Plasmodium bergheiの184 kDaのタンパク質に対する抗体はookineteの形成および蚊への伝搬を抑制する
3. 学会等名 第91回 日本寄生虫学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------