

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590428

研究課題名（和文） マラリア原虫リガンドの細胞内輸送機構の分子基盤

研究課題名（英文） Molecular basis of the intracellular trafficking of the malaria ligands

研究代表者

金子 修（KANEKO OSAMU）

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：50325370

研究成果の概要：

赤血球侵入型マラリア原虫の細胞内小器官には、多くのワクチン候補抗原が局在するが、これらの細胞内分子輸送機構の詳細は不明である。RhopH2 のプロモーターとシグナル配列を加えるだけでタンパク質が標的細胞内小器官に輸送されることに着目し、様々の分子について組換え熱帯熱マラリア原虫を作成し、解析した。また、EBL という分子はアミノ酸が一つだけ変化するだけで細胞内局在が変化し、病原性まで劇的に変化することを見出した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：原虫

## 1. 研究開始当初の背景

マラリアは世界中で年間 2 - 3 億人の感染者、150 万人の死者を出す重大な感染症である。マラリア原虫はヒト体内で赤血球に侵入増殖してこれを破壊することで病害を与えるが、マラリア感染成立には、赤血球への侵入型であるメロゾイトの先端部小器官に局在する原虫側リガンドが赤血球側レセプターを認識することが必須であるため、原虫リガンドは有望なワクチン候補抗原である。ところが、長年の研究にもかかわらず、マラ

リアのワクチン開発の成果はいまだに出していない。その理由として、マラリア原虫の機能分子について、生物学的役割を調べないまま盲目的に”抗原”として研究されてきた点が上げられる。そこで、有効な治療法を開発するためにも、マラリア原虫の赤血球侵入機構を詳細に解析することが必要だと考えられる。

このような観点から、代表者は赤血球侵入に関与する分子のうち、1980 年代末に特異抗体が原虫の増殖阻害効果を示したにもかかわらず、研究が遅れていたロプトリーに局

在する赤血球結合分子 RhopH 複合体や、マイクロネームから放出され、赤血球侵入中に密着接合と呼ばれる、原虫と赤血球との間に形成される構造物に局在する赤血球結合分子 EBL などの解析を行ってきた。解析の経緯で、RhopH 複合体の RhopH2 のプロモーターと N 末端側のシグナルペプチド配列を含む 24 アミノ酸を緑色蛍光タンパク質 (GFP) に付加するだけで、GFP がロプトリーに輸送されることを見出した。細胞内輸送シグナルはあまり詳しく解析されていないため、マラリア原虫が様々な分子を特定の細胞内小器官に輸送する機構を明らかにすることで、新たな創薬の標的を提供することができるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

(1) 赤血球侵入型マラリア原虫メロゾイトの細胞内小器官ロプトリーへの輸送シグナルとなるシグナル配列を明らかにし、輸送に関与するタンパク質群および輸送されるタンパク質群を網羅的に明らかにすることを目的とした。

(2) 研究の過程で細胞内小器官マイクロネームに局在する EBL の輸送シグナルと考えられる領域の Cys 残基が、ネズミマラリア原虫 *P. yoelii* 17X 弱毒株では、他の相合体と同様に保存されているが、17XL 強毒株では Arg 残基に置換しており、また、17XL 強毒株では EBL はマイクロネームに局在していないことを見出したため、Cys/Arg 置換が EBL の局在変化の原因かどうかを検証する。

## 3. 研究の方法

(1) ロプトリーへの輸送がロプトリータンパク質のシグナル配列の普遍的な特徴かどうかを検討するため、メロゾイト期に発現し、細胞内局在が異なる代表的な熱帯熱マラリア原虫のタンパク質のシグナル配列部の遺伝子と緑色蛍光タンパク質を結合して発現するコンストラクトを、Invitrogen 社のゲートウェイシステムを用いて作成し、熱帯熱マラリア原虫に遺伝子導入する。得られた組換え原虫で GFP がロプトリーに局在するかどうかを共焦点レーザー顕微鏡にて観察し、ロプトリー輸送に必要なシグナルを検討する。また、ロプトリータンパク質のプロモーターによりタグタンパク質を発現する熱帯熱マラリア原虫を作成し、タグタンパク質に対する特異カラムを用いて、ロプトリーへの輸送に関与するタンパク質群および輸送されるタンパク質群の同定を行う。

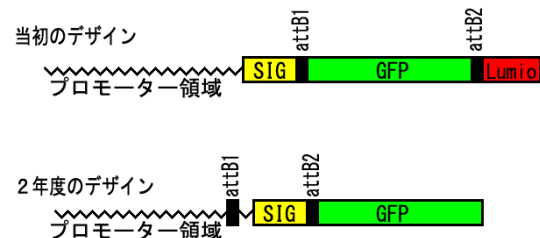
(2) ネズミマラリア原虫の 17X 株と 17XL 株

の間で異なっていた EBL の Cys 残基と Arg 残基を、遺伝子組換えの手法により相互に入れ換えることにより、EBL の細胞内局在が変化するかどうかを確認する。

## 4. 研究成果

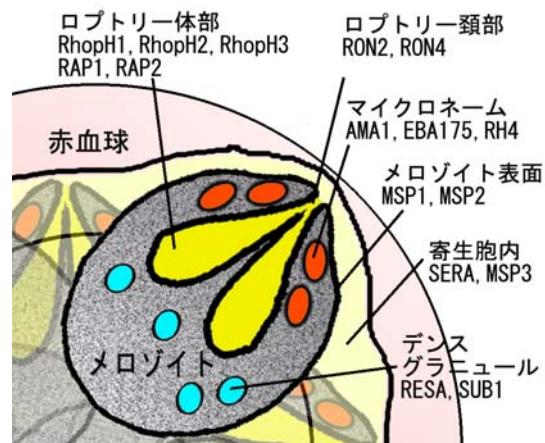
(1) メロゾイト期に転写活性を持つ複数のタンパク質のシグナル配列と GFP を融合して発現するコンストラクトを作成し、遺伝子導入により組換え熱帯熱マラリア原虫を作成することに成功した。得られた組換え熱帯熱マラリア原虫について、赤血球侵入型原虫を用いて GFP がロプトリーに局在するかどうか観察したところ、ライブイメージでも、間接蛍光抗体法でも GFP の発現が観察できなかった。種々の条件を検討した結果、ゲートウェイシステムの組換え部位の配列が転写を阻害している可能性に思い至った。そこで2年度にはプロモーター領域とシグナル配列の間にゲートウェイ組換え部位配列を入れるように、新しくコンストラクト群をデザインし直し、これらを作成した(図1にデザイン、図2に作成した対象原虫タンパク質を示す)。引き続き、各コンストラクトを熱帯熱マラリア原虫に遺伝子導入し、新しく遺伝子組換え原虫を作成しなおし、シグナル配列とロプトリーへの輸送の関係を探るための詳細な局在解析を行う準備を整えた。

図 1



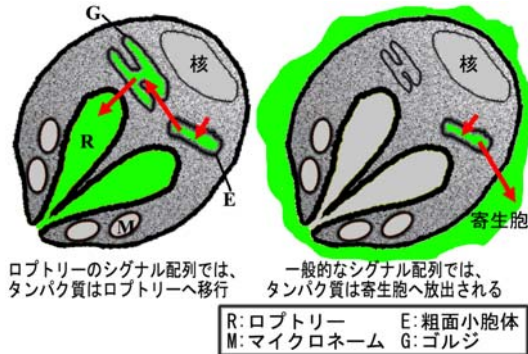
SIG: シグナル配列、GFP: 緑色蛍光タンパク質、Lumio: Lumioタグ  
attB1/attB2: Gateway法の組換え部位由来配列

図 2



(2) また、ロプトリータンパク質 RhopH2 のプロモーターとシグナル配列と融合したタグタンパク質 (Invitrogen 社の Lumio タグと GFP) を発現する熱帯熱マラリア原虫を作成した (図3左)。この原虫からタンパク質を抽出しカラムを作成し、タグタンパク質に結合するマラリア分子 (輸送に関与する分子候補) を精製する準備を整えた。

図3



(3) ネズミマラリア原虫の強毒 17XL 株と弱毒 17X 株の間で EBL の局在が異なっていたため (図4)、ネズミマラリア原虫強毒 17XL 株の EBL で変化していた Arg 残基を Cys 残基に置換したところ、EBL の局在はデングラニュールからマイクロネームに変化した。弱毒 17X 株の EBL を、強毒 17XL 株型にするよう特定の Cys 残基を Arg 残基に置換したところ、マイクロネームからデングラニュールに局在が変化した。ゆえに、Cys/Arg 置換が EBL の局在変化の原因であることが証明できた (図5)。

(4) さらに興味深いことに、この置換により、侵入する赤血球のタイプが変化した。EBL に Cys を持つ場合は幼弱赤血球にのみ侵入していたが、Arg を持つ場合は全ての赤血球に侵入できるようになった。また、Cys/Arg 置換により強毒株のマウスにおける感染コースは弱毒株と同一に変化した。ゆえに、EBL 分子は、弱毒・強毒の感染コースを決定する主要な因子であることがわかった。また、弱毒株はこの置換により、やや感染効率が增加したものの、強毒株ほどにはならず、中間的な感染コースを示した (図6)。このことから、EBL 分子以外の感染コース決定因子が、17X 株と 17XL 株の間に存在することがわかった。

ヒトに感染性する熱帯熱マラリア原虫や三日熱マラリア原虫の EBL (EBL175 と PvDBP) は赤血球認識に重要な役割を果たすリガンドであり、ワクチン候補抗原として研究が進んでいる。今回、見出した細胞内輸送

機序は、現在まで全く知られておらず、同様の変化が起きることにより、マラリア原虫の病原性が劇的に変化する可能性がある。EBL を標的にワクチンを開発する際には、この点を考慮する必要があると思われる。

図4

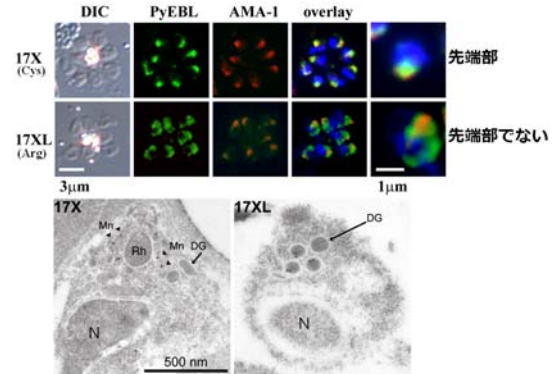


図5

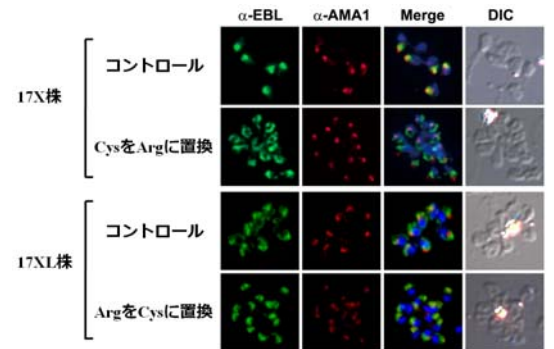
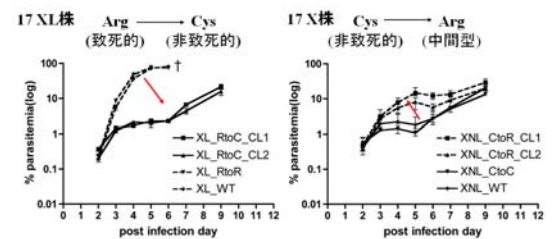


図6



## 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)

- Otsuki H, Kaneko O, Thongkukiattkul A, Tachibana M, Iriko H, Takeo S, Tsuboi T, Torii M. "Single amino acid substitution in *Plasmodium yoelii* erythrocyte ligand determines its localization and controls parasite virulence." *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.* (in press) 査読有

〔学会発表〕（計 5 件）

- ① **金子修**「マラリアは世界的な問題だけど、科学はどこまで追い詰めてるの？」第27回日本国際保健医療学会西日本地方会、大阪、平成21年2月28日
- ② **金子修**「マラリア原虫の赤血球侵入の分子基盤」第7回感染症沖縄フォーラム、那覇、平成21年2月12日－2月14日
- ③ Otsuki H, **Kaneko O**, Thongkukiatkul A, **Tachibana M**, Iriko H, Takeo S, Tsuboi T, Torii M "Erythrocyte-Binding-Like molecule and Virulence of *Plasmodium yoelii*" 43rd Annual U.S.-Japan Joint Conference of Parasitic Diseases, 東京、平成21年1月7日－1月8日
- ④ **Kaneko O**. "Erythrocyte ligand of the malaria parasite and virulence" The 3rd Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases, The 9th Nagasaki-Singapore Medical Symposium, 長崎、平成20年10月10日－11日
- ⑤ 大槻均、**金子修**、入子英幸、竹尾暁、坪井敬文、Thongkukiatkul A、鳥居本美「ネズミマラリア原虫の赤血球結合分子EBLの局在と病原性」第77回日本寄生虫学会大会、長崎、平成20年4月3日－4日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

金子 修 (KANEKO OSAMU)  
長崎大学・熱帯医学研究所・教授  
研究者番号：50325370

### (2) 研究分担者

橘 真由美 (TACHIBANA MAYUMI)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：00301325  
(2007年度のみ)