

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390118

研究課題名(和文) チオレドキシソキシダーゼがマラリア原虫の宿主寄生適応に果たす役割の解明

研究課題名(英文) Analysis of the roles of thioredoxin peroxidase family for adaptation to oxidative stresses in malaria parasites

研究代表者

河津 信一郎 (KAWAZU SHIN-ICHIRO)

帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授

研究者番号：60312295

研究成果の概要(和文)：チオレドキシソキシダーゼ 2-Cys 型 Prx 遺伝子を欠損するローデント(ネズミ)マラリア原虫について、これまでに観察された表現型発現のメカニズムを調べた。(1) 哺乳類赤血球内でのガメトサイト(生殖母体)の分化誘導・形成阻害について：赤内期原虫タンパク質の二次元電気泳動解析から、この表現型にタンパク質リン酸化が関与することが示唆された。また(2) スポロゾイト(感染型原虫)の哺乳類宿主への感染性の低下について：マウス感染モデルを用いた RT-PCR 解析から、この表現型が、スポロゾイトの障害ではなく、肝内型原虫の発育阻害に起因することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Phenotypes observed in the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei* carrying a targeted knockout of thioredoxin peroxidase, 2-Cys peroxiredoxin gene were investigated and have the following results: (1) Defect in the gametocyte (sexual stage for transition to mosquitoes) development: 2D-PAGE analysis of the blood-stage parasite proteins suggested that the defect is attributed to the protein phosphorylation; (2) Extension in the prepatent time in the sporozoite (infective stage to mammalian hosts from mosquitoes) infection: RT-PCR analysis of the experimental infections suggested that the knockout did not have any effect on the infectivity of the sporozoite, but it affects the development of the liver-stage (EEF) in the mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2009年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2010年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

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：感染症、マラリア、ストレス、レドックス、遺伝子改変原虫

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の肝臓・赤血球内、媒介蚊の体内など好気的環境に寄生し、自らも活発な DNA 合成、ヘム代謝の過程で多量の過酸化物を産生するマラリア原虫にとって、細胞内外から被る酸化ストレスへの応答、さらには細胞内酸化還元（レドックス）バランスのコントロールは、原虫細胞分化・増殖の調節、更にはその寄生適応の成否を左右する重要な機構である。マラリア原虫はカタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼといった主要な酸化酵素を欠損するので、細胞内での過酸化物の還元は主にチオレドキシニン系ペルオキシダーゼのペルオキシレドキシニン (Prx) family の分子が受け持つと考えられている。これまでに得られた成績から、細胞質に局在する 2-Cys 型 Prx がマラリア原虫の全発育環を通じて、様々なステージで、原虫に特有の生物現象と関連して機能する多機能なペルオキシダーゼであることが明らかになった。

2. 研究の目的

チオレドキシニンペルオキシダーゼ family 2-Cys 型 Prx 遺伝子を欠損するローデント(ネズミ) マラリア原虫について、これまでに観察された表現型発現のメカニズムを詳細に調べることで、細胞内でのレドックス（酸化・還元）バランス制御機構がマラリア原虫の（1）哺乳類宿主赤血球内での生殖母体（ガメトサイト）の分化誘導・形成過程（2）蚊中腸内でのオーシストの発育・スポロゾイトの形成過程（3）スポロゾイトの哺乳類肝細胞感染過程で果たす役割を明らかにする。これを以て、細胞に普遍的な生命維持装置、細胞内レドックスバランス制御機構のマラリア原虫での特性を明らかにし、マラリア制御法開発研究の場に新規基礎知見を提供する

ことを目的とした。

3. 研究の方法

（1）ガメトサイト分化誘導過程で 2-Cys 型 Prx が果たす役割の解析：

ローデントマラリア原虫には *Plasmodium berghei* ANKA 株を用いた。

2-Cys 型 Prx 遺伝子欠損ローデントマラリア原虫接種マウス、およびガメトサイト形成能変異原虫接種マウスから原虫細胞をサンプリングして、ガメトサイト分化誘導時期のタンパク質発現プロファイルを、二次元電気泳動法で、親株のそれと比較した。また、細胞内タンパク質リン酸化の様子についても、リン酸化タンパク質特異的蛍光プローブ（Pro-Q® ダイヤモンド）を用いた二次元電気泳動法を利用して、網羅的に比較解析した。差異が認められるスポットについて LC-MS/MS による質量解析を試みた。

（2）オーシスト発育過程で 2-Cys 型 Prx が果たす役割の解析：

細胞質 Prx の核への移行メカニズムの解明を試みた。2-Cys 型 Prx 分子内には既知の核移行シグナルが認められないことから、その核への移行には他の分子との相互作用が必要と考察された。そこで、緑色蛍光タンパク質 (GFP) タグ付きの Prx 分子を発現する遺伝子組換えローデントマラリア原虫を作製し、原虫発育ステージ毎の Prx 細胞内局在を観察した。

（3）スポロゾイトの哺乳類感染過程で 2-Cys 型 Prx が果たす役割の解析：

2-Cys 型 Prx 遺伝子欠損スポロゾイトのマウス接種試験と定量 RT-PCR 法を用いて、スポロゾイトの肝細胞への侵入と発育に Prx family が果たす役割を検証した。

スポロゾイト接種実験を *in vitro* 培養細

胞を用いておこなった。培養細胞には HepG2 細胞を用い、細胞内に侵入した原虫を特異抗体 (Circumsporozoite [CS] 抗体あるいは、2-Cys 型 Prx 抗体) を用いた間接蛍光抗体法で観察した。特にスポロゾイト接種後短時間での原虫の肝細胞内侵入について観察をおこない、前年度 *in vivo* 実験での成績とあわせて考察することで、2-Cys 型 Prx がスポロゾイトの肝臓細胞侵入に果たす役割の検証を試みた。

4. 研究成果

(1) ガメトサイト分化誘導過程で 2-Cys 型 Prx が果たす役割の解析：

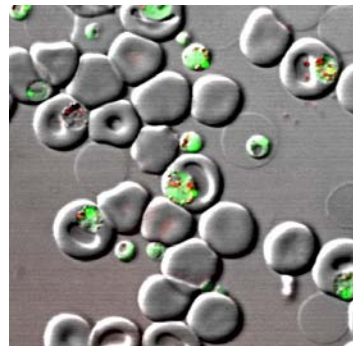
ローデントマラリア原虫をマウスで連続経代して、2-Cys 型 Prx 遺伝子欠損の表現型に類似して、ガメトサイト形成能が変異 (低下) した原虫を作製した。同原虫について、ガメトサイト分化誘導時期のタンパク質発現プロファイルを、二次元電気泳動法で親株のそれと比較した。差異が認められるスポットについて LC-MS/MS による質量解析をおこない、表現型関連タンパクの同定を試みた。その結果、ガメトサイト形成能変異 (低下) 原虫では、Glycerol-3-phosphate dehydrogenase、L-lactate dehydrogenase、Enolase および Elongation factor 1 alpha の発現上昇と HSP70 の発現低下が観察された。

2-Cys 型 Prx 遺伝子欠損ローデントマラリア原虫接種ローデントから原虫細胞をサンプリングして、赤内型原虫のタンパク質発現プロファイルを親株のそれと比較した。リン酸化タンパク質特異的蛍光プローブを用いた二次元電気泳動法を利用して、網羅的な比較解析をおこなったところ、両者でリン酸化タンパク質のスポットパターンが異なることを見出した。現在、差異が認められるスポットの再現性の検証、および LC-MS/MS による

質量解析を計画している。

(2) オーシスト発育過程で 2-Cys 型 Prx が果たす役割の解析：

2-Cys 型 Prx にはオーシスト核 DNA の保護作用が考察されるが、この分子自体は核移行シグナルを持たないため、その核への移行には他の分子との相互作用が必要と考えられる。Prx 核移行の確認と免疫沈降法を応用した Prx 相互作用タンパク質の同定を目的に、GFP タグ付きの Prx 分子を発現する遺伝子組換え原虫を作製した。融合タンパク質発現遺伝子とピリメタミン耐性変異型 *dhfrts* (mt)



マーカー遺伝子を野生型 *dhfrts* (WT) locus に挿入してトランスジェニック原虫を作製した (写真)。限外

希釈法でクローニングした、GFP タグ付きの Prx 分子トランスジェニックローデントマラリア原虫について、同分子の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。赤内型トランスジェニック原虫では GFP シグナルが原虫細胞質に観察され、以前に報告されたこの分子の細胞内局在が検証された。蚊中腸オーシストでは、GFP シグナルは主に原虫細胞質に観察され、核への 2-Cys 型 Prx の移行を観察することができなかった。GFP タグによる影響を考察して、現在、特異抗体を用いた昆虫ステージ全般での 2-Cys 型 Prx 発現プロファイル観察実験を計画している。

(3) スポロゾイトの哺乳類感染過程で 2-Cys 型 Prx が果たす役割の解析：

2-Cys 型 Prx 遺伝子欠損ローデントマラリア原虫 (Prx KO) スポロゾイトのマウス接種試験と定量 RT-PCR 法を用いて、スポロゾイ

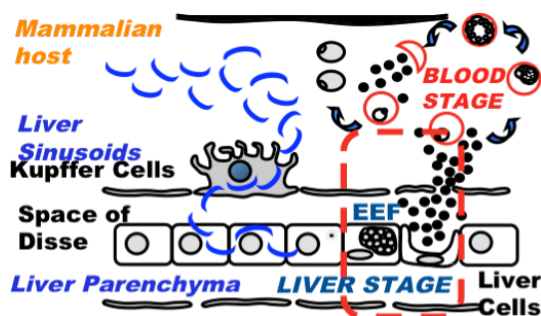
トの肝細胞への侵入と発育に Prx が果たす役割を検証した。その結果、Prx KO スポロゾイト接種マウスでは赤内型出現の潜伏期が延長した (挿入表: sporozoite infectivity)。

一方、RT-PCR を用いてスポロゾイト静脈内

Sporozoite infectivity

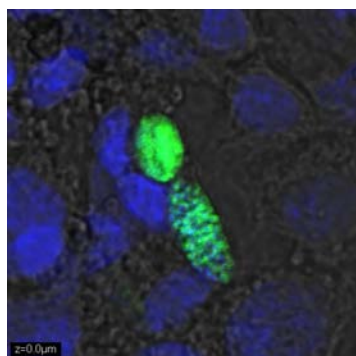
	No. of injected Sporozoites	0.5% Pre-patent Period (days)
WT	10000	4.2
	1000	5.0
	100	6.0
	20	7.0
KO1	1000	6.0
KO2	1000	6.1

接種直後のマウス肝臓内での原虫の分布を解析したところ、Prx KO スポロゾイトは野生型 (WT) と同等にマウス肝実質に侵入できることが明らかになった。また、Prx KO スポロゾイトは WT と同様に肝内型原虫に分化した。これらの成績から、Prx KO スポロゾイト接



種マウスで観察された潜伏期の延長は、その後の肝内型原虫の発育障害に起因すると考察された (挿入図の赤色点線の部分)。

Prx の肝臓型原虫の発育に果たす役割を更に詳細に調べるため、ローデントマラリア原



虫スポロゾイト接種実験を *in vitro* 培養細胞 (HepG2 細胞) を用いておこなった。細胞

内に侵入・寄生した原虫を特異抗体 (抗 Circumsporozoite [CS] 抗体あるいは、抗 Prx 抗体) を用いた間接蛍光抗体法で観察した。その結果、同原虫肝内型ステージでの 2-Cys 型 Prx、および 1-Cys 型 Prx (写真) の発現が確認された。現在 2-Cys 型 Prx KO 原虫の肝内型増殖について観察する実験を計画している。

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 20 件)

- ① Kawazu, S., Takemae, H., Komaki-Yasuda, K., and Kano, S. Target proteins of the cytosolic thioredoxin in *Plasmodium falciparum*. Parasitol. Int. 査読有 59: 298-302 (2010)
- ② Iwagami, M., Rivera, PT., Villacorte, EA., Escueta, AD., Hatabu, T., Kawazu, S., Hayakawa, T., Tanabe, K., and Kano, S. Genetic diversity and population structure of *Plasmodium falciparum* in the Philippines. Malar. J. 査読有 8: 96 (2009)
- ③ Tanaka, M., Sakurai, T., Yokoyama, N., Inoue, N., and Kawazu, S. Cloning and characterization of peroxiredoxin in *Babesia bovis*. Parasitol. Res. 査読有 105: 1473-1477 (2009)
- ④ Hatabu, T., Iwagami, M., Kawazu, S., Taguchi, N., Escueta, AD., Villacorte, EA., Rivera, PT., and Kano, S. Association of molecular markers in *Plasmodium falciparum crt* and *mdr1* with *in vitro* chloroquine resistance: A Philippine study. Parasitol. Int. 査読有 58: 166-170 (2009)
- ⑤ Saito-Nakano, Y., Tanabe, K., Kamei, K., Iwagami, M., Komaki-Yasuda, K., Kawazu, S., Kano, S., Ohmae, H., and Endo, T. Genetic evidence for *Plasmodium falciparum* resistance to chloroquine and pyrimethamine in Indochina and the Western Pacific between 1984 and 1998. Am. J. Trop. Med. Hyg. 査読有 79: 613-619 (2008)
- ⑥ Iwagami, M., Hatabu, T., Kawazu, S., Escueta, AS., Villacorte, EA., Tongol-Rivera, P., and Kano S. Phylogenetic relationship of *Plasmodium*

falciparum populations in the Philippines. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 査読有 39: 200-204 (2008)

⑦ Komaki-Yasuda, K., Okuwaki, M., Kano, S., Nagata, K., and Kawazu, S. 5' sequence- and chromatin modification-dependent gene expression in *Plasmodium falciparum* erythrocytic stage. Mol. Biochem. Parasitol. 査読有 162: 40-51 (2008)

[学会発表] (計 3 2 件)

① 河津信一郎、酸化ストレスとマラリア原虫：マラリア化学療法の標的、平成22年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会、2011年2月11日、長良川国際会議場

② Kawazu, S. *et al.* Target proteins of the cytosolic thioredoxin in *Plasmodium falciparum*. The XIIth International Congress of Parasitology. 第12回国際寄生虫会議 (ICOPA XII)、2010年8月17日、Melbourne Convention and Exhibition Centre (メルボルン、オーストラリア)

③ 河津信一郎、マラリアと酸化ストレス、第20回日本生体防御学会学術総会、2009年7月25日、東京医科歯科大学湯島キャンパス

④ Kawazu, S. *et al.* Disruption of 2-Cys peroxiredoxin TPx-1 gene in *Plasmodium berghei* hinders the sporozoite development. U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program Parasitic Diseases Panel Annual Meeting (第43回日米医学協力寄生虫疾患専門部会)、2009年1月7日、International Medical Center of Japan, Tokyo (国立国際医療センター、東京)

⑤ Kawazu, S. *et al.* Mosquito and liver stage developments of *Plasmodium berghei* carrying a targeted knockout of 2-Cys peroxiredoxin TPx-1 gene. XVIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria (第17回熱帯医学マラリア国際会議)、2008年10月2日、International Co

vention Center Jeju, Jeju Island, Korea (済州島国際会議場、韓国)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.obihiro.ac.jp/~tryp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河津 信一郎 (KAWAZU SHIN-ICHIRO)
帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授
研究者番号：60312295

(2) 分担研究者

嘉糠 洋陸 (KANUKA HIROTAKA)
帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授
研究者番号：50342770

(3) 連携研究者

鳥居 本美 (TORII MOTOMI)
愛媛大学・医学部・教授
研究者番号：20164072

(4) 連携研究者

新井 明治 (ARAI MEIJI)
香川大学・医学部・准教授
研究者番号：30294432