

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03476

研究課題名（和文）マラリア重症化に関わるメンブレントラフィック機構の解明

研究課題名（英文）Analyses on membrane trafficking mechanism related to severe malaria

研究代表者

加藤 健太郎（Kato, Kentaro）

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：30401178

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：マラリア原虫と宿主との相互作用の観点から病態発症のメカニズムに挑む研究アプローチはほとんどとられていない。つまり、マラリア感染赤血球内で形作られる赤血球蛋白質や原虫蛋白質の輸送システム、赤血球膜に提示された蛋白質と宿主の血管内皮蛋白質との相互作用、というマラリアの病態発症や重症化に直接関わるメカニズムの解明についてはなおさりの状態である。本研究では、マラリアの病態の重症化の原因となる感染赤血球のロゼット化と血管内皮との癒着、結合（シクエストレーション）を担当する原虫蛋白質群や宿主細胞蛋白質群が、感染赤血球内でのメンブレントラフィックによって輸送され、感染赤血球膜に提示される機構の解明を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が独自に開発したマラリアの赤血球感染レセプター同定を行ってきた。次に、我々の研究の主題はマラリアの重症化機構の解明へと移行してきた。熱帯熱マラリアを重症化へと導く感染赤血球のロゼット化とシクエストレーションのメカニズムを明らかとすることは、すなわち多臓器不全によって致死に至るメカニズムを解き明かすことである。従って、本研究の成果は、死に至るステージを回避することができる新規の抗マラリア薬や未だ存在しないワクチンの開発に直接つながるため、学術的独自性があり、創造性の高いものである。

研究成果の概要（英文）：The approach to study the malaria pathogenesis mechanism at the point of the interaction between Plasmodium and host erythrocytes has not been performed. The transportation system of erythrocyte and parasite proteins in Plasmodium-infected erythrocyte and the interaction between the erythrocyte surface proteins and vascular endothelium receptors are not clear. In this study we studied the membrane trafficking and presentation system to the erythrocyte surface for the proteins relating with rosette formation and binding and sequestration in vascular endothelium.

研究分野：感染症学

キーワード：マラリア メンブレントラフィック ロゼット化 シクエストレーション

1. 研究開始当初の背景

マラリアは、結核、エイズとともに世界三大感染症の一つに数えられる。蚊の吸血によってヒトに感染する原虫による循環器疾患であり、赤血球内での原虫の増殖・破壊による貧血を主症状とする。その感染者は、亜熱帯・熱帯地域に多く存在し、年間約2億人、死亡者は約43万人にのぼると報告され、その対策が急務とされている。既存の抗マラリア剤耐性株の出現のため、多くの新しい抗マラリア剤が開発され、また、マラリアワクチン開発の研究が世界規模で試みられているが未開発であり、マラリア撲滅には至っていない。

マラリアの病態発現の病因の一つとして赤血球破壊に伴う貧血があることから、赤血球への原虫侵入機構の研究が現在までさかに行われてきた。一方で、もう一つの病因として原虫感染赤血球どうしが結合し、塊をつくること(ロゼット化)とこれらが血管内皮細胞に癒着すること(シクエストレーション)が挙げられる。後者に関する研究は前者に比べると世界的にはまだ研究が始まったばかりである。つまり、マラリアの病態の原因は単に感染赤血球内で原虫が増殖することによる赤血球の破壊だけでない。その重症化の原因は原虫感染赤血球が互いに結合してロゼットを作り、様々な組織内の毛細血管に癒着することで血管閉塞(梗塞)を起こすこと(シクエストレーション)による。さらに、ロゼットやシクエストレーションを引き起こす感染赤血球の表面には var 遺伝子ファミリーと呼ばれる約60種類のヘテロな遺伝子ファミリーが PfEMP1 (*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1) と呼ばれる膜蛋白質を形成する。感染赤血球膜上への PfEMP1 の発現は、var 遺伝子ファミリーが mRNA の発現を調節し、出し入れすることで制御されている。このため、感染赤血球ごとに膜表面に発現される PfEMP1 が異なることから、免疫系からの攻撃を回避している。

赤血球を寄生ターゲットとするマラリア原虫は、内側から赤血球を様々に作り変え、自身の増殖を維持する。赤血球は無核細胞であることから、ミトコンドリアや小胞体などのオルガネラが存在しない。そのため赤血球に感染したマラリア原虫は、原虫内部で蛋白質を合成し、寄生細胞である赤血球の細胞質へと輸送する。さらに、赤血球内に“マウレル裂”と呼ばれる独自の小胞状のオルガネラを形成し、原虫由来の分泌蛋白質はこれらのオルガネラの中に放出される。マウレル裂は、原虫由来膜と原虫及び宿主の蛋白質からなる高次膜構造体であり、原虫の増殖に不可欠な栄養素の取り込みのみならず、原虫由来の病原性蛋白質 PfEMP1 の赤血球表面への輸送等、感染赤血球内でのメンブレントラフィック系として働く。このメンブレントラフィック系を使って感染赤血球膜上に提示された PfEMP1 等の原虫蛋白質は、毛細血管壁や他の感染赤血球、非感染赤血球に結合して“ロゼット”と呼ばれる細胞塊を形成することで血管を閉塞し、多臓器不全を引き起こすことで重症化へと導く。従って、本研究の核心をなす学術的「問い」は、「マラリアの重症化につながる感染赤血球内でのメンブレントラフィック系の形成機構と生物学的役割とは何か？」である。この「問い」の解明は直接マラリアの病態の重症化機構の解明につながる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マラリアの重症化に関わる感染赤血球内でのメンブレントラフィック機構とその結果生じる感染赤血球のロゼット化とシクエストレーションのメカニズムを解明することである。

3. 研究の方法

マラリア原虫は寄生細胞である赤血球に侵入後、原虫独自のオルガネラである寄生体胞(赤血球膜が裏返ったもの)を形成する。近年のマラリア研究での推定モデルでは、原虫の小胞体内で合成された蛋白質は寄生体胞に放出され、シャペロン等によって寄生体胞膜のトランスポータ

ーを通過することで赤血球内に誘導される。さらには赤血球内にマウレル裂や小胞状のオルガネラを形成し、原虫由来の分泌蛋白質はこれらのオルガネラの中に放出され、赤血球膜上のノブと呼ばれる突起状の構造体に運ばれ、赤血球外に提示される。赤血球膜上に提示された PfEMP1 ファミリーが、感染赤血球のロゼット形成と血管壁への接着に働くことで毛細血管の閉塞によって多臓器不全が引き起こされる。本研究では、マラリア原虫の独自のオルガネラであるマウレル裂の構成蛋白質についての精密なプロテオーム解析のデータを基にして、マラリア重症化に関わる寄生細胞内でのメンブレントラフィック機構とこの結果生じる感染赤血球のロゼット化と血管内皮との癒着、結合（シクエストレーション）のメカニズムの解析を行った。これまでに得られた研究シーズと独自の解析技術をフル活用し、以下の4つのステップの研究計画を実施した。

(1) マウレル裂構成蛋白質のプロテオーム解析で同定した原虫蛋白質の感染赤血球内における挙動解析

マウレル裂の質量解析で得られたプロテオーム解析データ (iScience (Cell press) 2019) を整理し、遺伝子オントロジー解析を行い、蛋白質の輸送関連因子の絞込みを行う。

輸送蛋白質が持つとされる PEXEL モチーフ (RxLx(D/E/Q)) をアミノ酸配列に保持する蛋白質とモチーフを持たない蛋白質 (non-PEXEL) に選別する。

、 で絞り込んだ原虫蛋白質が実際にマウレル裂へと輸送されるかを検証するため、GFP と目的の原虫蛋白質の融合蛋白質を発現するプラスミドを電気穿孔により、原虫内に導入し、赤血球内における挙動を解析する。

(2) 同定した原虫蛋白質をコードする遺伝子の欠損変異虫体の作出

同定した原虫蛋白質をコードする遺伝子について、熱帯熱マラリア原虫を用いて、遺伝子欠損変異虫体 (ノックアウト原虫) を作出する。

ノックアウト原虫の表現型(増殖効率、赤血球侵入効率、形態等)を野生株と比較解析する。

(3) 原虫由来リガンドである PfEMP1 の赤血球表面への輸送に必須な原虫及び宿主因子の同定

PfEMP1 に対応する血管内皮細胞レセプターである CD36 との結合性を各原虫蛋白質のノックアウト原虫と野生株の感染赤血球との間で比較して、CD36 への結合親和性が有意に低下するノックアウト原虫を選別する (CD36 結合親和性試験)。

選別したノックアウト原虫を感染させた赤血球内でのマウレル裂の形態や PfEMP1 の局在の変化について、金コロイド標識し、電子顕微鏡解析を行う。

4. 研究成果

(1) マウレル裂構成蛋白質のプロテオーム解析で同定した原虫蛋白質の感染赤血球内における挙動解析

プロテオーム解析データには、既知のマウレル裂構成蛋白質や寄生体胞膜上でトランスポーターとして働く Sec61 トランスロコン複合体も含まれていたため、細胞外への情報伝達に関わる蛋白質が含まれていた。non-PEXEL には配列から推測不可能な新規の輸送蛋白質が含まれていた。複数の原虫因子について局在観察に成功した。抗体に付加したサイズの異なる金コロイドを用いた電子顕微鏡観察において複数の蛋白質がマウレル裂に同時に局在していることを明らかとした。

(2) 同定した原虫蛋白質をコードする遺伝子の欠損変異虫体の作出

複数のノックアウト原虫の作出に成功した。

(3) 原虫由来リガンドである PfEMP1 の赤血球表面への輸送に必須な原虫及び宿主因子の同定

CD36 への結合親和性が有意に上昇するノックアウト原虫を選別することに成功した。この結果から、血管内皮への接着に関わる原虫因子を同定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Miyata Makoto, Robinson Robert C., Uyeda Taro Q. P., Fukumori Yoshihiro, Fukushima Shun ichi, Haruta Shin, Homma Michio, Inaba Kazuo, Ito Masahiro, Kaito Chikara, Kato Kentaro, et al.	4. 巻 25
2. 論文標題 Tree of motility ? A proposed history of motility systems in the tree of life	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 6~21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12737	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 該当する

1. 著者名 Goto Yukihiro, Kamihira Rie, Nakao Yoichi, Nonaka Motohiro, Takano Ryo, Xuan Xuenan, Kato Kentaro	4. 巻 107
2. 論文標題 The Efficacy of Marine Natural Products Against Plasmodium falciparum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Parasitology	6. 最初と最後の頁 284-288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1645/20-93	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 Jeje Temitope Olawale, Bando Hironori, Azad Md Thoufic Anam, Fukuda Yasuhiro, Oluwafemi Ibukun Emmanuel, Kato Kentaro	4. 巻 97
2. 論文標題 Antiplasmodial and interferon-gamma-modulating activities of the aqueous extract of stone breaker (Phyllanthus niruri Linn.) in malaria infection	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102789 ~ 102789
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2023.102789	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Azad Md Thoufic Anam, Sugi Tatsuki, Qulsum Umme, Kato Kentaro	4. 巻 12
2. 論文標題 Detection of Developmental Asexual Stage-Specific RNA Editing Events in Plasmodium falciparum 3D7 Malaria Parasite	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 137 ~ 137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms12010137	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 該当する

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Azad Md Thoufic Anam, Kentaro Kato
2. 発表標題 Detection of developmental stage specific RNA editing events in 28s ribosomal RNA gene of Plasmodium falciparum
3. 学会等名 第92回日本寄生虫学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kentaro Kato
2. 発表標題 The pathogenesis and clinical manifestations of and anti-parasitic drug development for malaria and toxoplasmosis
3. 学会等名 The symposium of the Korean society for parasitology 2021 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤健太郎、Jeje Temitope、伴戸寛徳、福田康弘
2. 発表標題 Phyllanthus niruri protects against severe malaria by blocking erythrocyte invasion
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤健太郎、Temitope Jeje、伴戸寛徳、福田康弘
2. 発表標題 Phyllanthus niruri protects against severe malaria by blocking erythrocyte invasion and modulating the host immune response
3. 学会等名 第90回日本寄生虫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Temitope Jeje、伴戸寛徳、福田康弘、加藤健太郎
2. 発表標題 Aqueous extract of Phyllanthus niruri protects against severe malaria by blocking erythrocyte invasion
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Jeje Temitope、伴戸寛徳、加藤健太郎
2. 発表標題 Assessment of anti-protozoan activity of some African plant extracts
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 Kentaro KATO, Ryo TAKANO, Hiroko KOZUKA-HATA, Daisuke KONDOH, Hiroki BOCHIMOTO, Masaaki OYAMA
2. 発表標題 Proteomic Dissection of Plasmodium falciparum Maurer's cleft Compartments Using SBP1
3. 学会等名 The 17th International Symposium on Integrated Field Science (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Temitope Jeje, Hironori Bando, Yasuhiro Fukuda, Kentaro Kato
2. 発表標題 A multifaceted analysis of the effect of medicinal plant Phyllanthus niruri on the improvement of severe malaria
3. 学会等名 The 17th International Symposium on Integrated Field Science (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Umme QuIsum, Kentaro Kato
2. 発表標題 Efficacy of the medicinal plants and their derived biomolecules against apicomplexan pathogen
3. 学会等名 第69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 2023年

1. 発表者名 Azad Md Thoufic Anam, Tatsuki Sugi, Kentaro Kato
2. 発表標題 Genome-wide detection of stage-specific RNA editing events for nuclear genes in <i>P. falciparum</i> 3D7 malaria parasite
3. 学会等名 第69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 2023年

1. 発表者名 Azad Md Thoufic Anam, Tatsuki Sugi, Kentaro Kato
2. 発表標題 Genome-wide detection of conserved stage-specific RNA editing events for nuclear genes in <i>P. falciparum</i> 3D7 malaria parasite
3. 学会等名 第93回日本寄生虫学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Umme QuIsum, Azad Md Thoufic Anam, Kentaro Kato
2. 発表標題 In vitro antiplasmodial activity of nine selected traditional medicinal plants from Bangladesh
3. 学会等名 第93回日本寄生虫学会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 マラリア原虫の赤血球への侵入阻害剤	発明者 加藤健太郎、伴戸寛徳、オラワレ ジェジェ	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-147434	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 抗マラリア薬	発明者 加藤健太郎、クルスム ウメ	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2024-67382	出願年 2024年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

東北大学大学院農学研究科動物環境管理学分野のホームページ https://www.agri.tohoku.ac.jp/health/index.html

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		
ナイジェリア	Federal University Oye-Ekiti	Federal University of Technology	
バングラデシュ	UNIVERSITY OF RAJSHAHI		