

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16235

研究課題名（和文）マラリア原虫スポロゾイトの哺乳類への伝搬におけるRON4の作用機序の解明

研究課題名（英文）Investigation of the molecular mechanism of RON4 in Plasmodium berghei sporozoite infection of mammalian hosts

研究代表者

馬場 みなみ（Baba, Minami）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：00814906

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、肝細胞感染型であるスポロゾイトの、ロブトリーに存在するRON4の役割を明らかにすることであった。スポロゾイト時期特異的にRON4の発現を抑制した原虫（RON4-cKD）を用いることで、RON4が蚊の唾液腺への侵入、細胞通過、肝細胞への寄生に重要であることがわかった。RON4-cKDスポロゾイトでは、これらのステップに重要な接着能・運動能が抑制されていたことから、RON4は分泌され、スポロゾイトの接着・運動に関わることで唾液腺侵入及び肝臓感染に影響していると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スポロゾイトが有しているロブトリーの分子の多くは、もう一つの感染型であるメロゾイトで必須であるためにノックアウト原虫の作出ができず、逆遺伝学手法による機能解析が困難であった。本研究では、RON4をプロモーター置換法を用いてスポロゾイト時期特異的に発現抑制することで、スポロゾイトにおけるRON4の機能解析を可能にした。本研究課題ではスポロゾイトは移動中にRON4を分泌し、分泌されたRON4が肝細胞への感染に役割を有することを示唆する結果を得た。このことからRON4がスポロゾイト期を標的とした新たなワクチン候補となりうると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Rhoptry neck protein 4 (RON4) is one of rhoptry proteins which are conserved between infective stages, merozoite and sporozoite. The attempts to generate RON4 knockout parasites have failed possibly due to its essentiality for parasite proliferation during the blood stage. Therefore, until now, the function of RON4 in sporozoites remains unelucidated. To elucidate RON4 function during the sporozoite stage, we applied the sporozoite stage-specific knockdown system by promoter swapping in the rodent malaria parasite strain, Plasmodium berghei. RON4-cKD sporozoites suppressed invasion of mosquito salivary glands. In addition, cell traversal and infection of hepatocytes were also inhibited in RON4-cKD parasites. In RON4-cKD sporozoites, attachment and motility, which are important for these steps, were suppressed, suggesting that RON4 is involved in salivary gland invasion and liver infection by mediating the attachment and motility of sporozoites.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア 侵入 RON4 rhoptry neck protein liver stage sporozoite Plasmodium スポロゾイト 細胞

1. 研究開始当初の背景

マラリア原虫スポロゾイトは蚊から哺乳類への伝搬を担う感染ステージである。スポロゾイトは媒介蚊の体内で発育し、蚊の唾液腺へ侵入する。吸血に伴って哺乳類の皮内に打ち込まれたスポロゾイトが皮内を能動的に移動し、血行性に肝臓へと到達、類洞壁を通過し肝細胞に侵入することで、哺乳類への感染が成立する(図1)。このようにスポロゾイトは全く異なる種類の細胞に侵入するが、一連の分子メカニズムの多くは解明されていない。

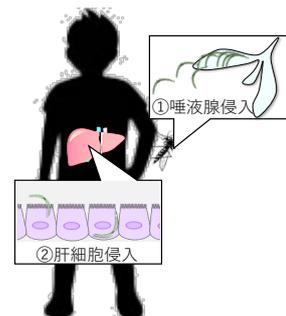


図1 スポロゾイトの侵入段階

メロゾイトはもう一つの感染型原虫であり、赤血球に感染する。培養可能であることから、細胞侵入に関与する分子の多くはメロゾイトを対象とした研究で発見されてきた。メロゾイトは赤血球侵入時に先端部小器官から複数のタンパク質を分泌する。Rhoptry neck protein 4 (RON4)はその一つであり、先端部貯蔵小器官の一つ、ロプトリーに貯蔵され、RON2/RON5との複合体として赤血球膜に輸送される。これらがメロゾイト膜上に局在するAMA1と結合して感染時に足場となる、というモデルが提唱されている(図2)。RON4は赤血球ステージで欠損できないことから、赤血球侵入時にRON4が担う役割はメロゾイトにとって必須であると推測されている。

申請者の所属する研究グループは、ネズミマラリア原虫(*Plasmodium berghei*)を用いて、RON4をはじめメロゾイトのロプトリー貯蔵分子の多くはスポロゾイトでも発現し、ロプトリーに局在することを報告した。加えてスポロゾイトを用いた共免疫沈降法では、メロゾイト同様にRON4はRON2、RON5と複合体を形成することを見出した。このことから**スポロゾイト侵入の分子メカニズムにはメロゾイトと共通する機構があるのではないかと考えた。**

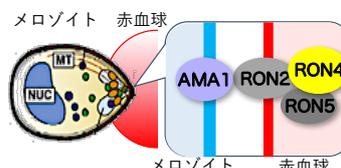


図2 メロゾイトは侵入時にタンパク質を分泌し足場を形成する

2. 研究の目的

本研究は、スポロゾイトが、全く異なる種類の細胞に侵入・感染するためのメカニズムを明らかにするための足がかりとして、双方への関与を見出した分泌型タンパク質RON4の各ステージにおける作用機序を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) モスquitoステージにおけるRON4の機能時期の特定

RON4がスポロゾイト形成から唾液腺への侵入に関与するかを明らかにするために、作出済みであったスポロゾイト時期特異的RON4発現抑制原虫(RON4-cKD)およびコントロール原虫を蚊に吸血させ、中腸・体液・唾液腺からスポロゾイトを回収し、数を比較した。

(2) 肝細胞感染におけるRON4の機能時期の特定

① in vivo におけるRON4機能時期の特定

RON4がスポロゾイトの肝臓感染に関与するかを明らかにするために、RON4-cKD原虫およびコントロール原虫の唾液腺スポロゾイトをマウスに静注し、42時間後に全身灌流を行って肝臓を取り出した。RNAを抽出後、逆転写物を用いたリアルタイムPCR法により、RON4-cKD原虫およびコントロール原虫の肝臓内原虫量を比較した。更に肝臓への集積(血流から肝実質側への侵入)に関与するか明らかにするために、スポロゾイト接種1時間後の肝臓を用いて同様の解析を行なった。

② in vitro におけるRON4機能ステップの詳細な解析

血行性に肝臓へと到達したスポロゾイトは、肝類洞壁を通過し肝細胞に寄生胞膜を伴った侵入、すなわち寄生を行い、肝細胞内で急速に発育、メロゾイトへと分化する。これらのどのステップにRON4が関与するか明らかにするために、(1)FITC含有デキストランを用いたスポロゾイトの細胞通過アッセイ、(2)培養肝細胞(HepG2)にRON4-cKD原虫およびコントロール原虫スポロゾイト感染6時間後の寄生胞膜形成を指標としたスポロゾイトの寄生能力の評価、(3)感染48時間後の肝内型原虫の大きさと数を指標とした肝内型原虫の発育の比較を行なった。

加えてスポロゾイトの唾液腺侵入、肝臓感染には接着能・運動能が重要であると報告されているため、RON4-cKD原虫の唾液腺由来スポロゾイトで接着能・運動能を観察した。

③ RON4発現時期と局在の特定

RON4C末端にmCherryを融合させた原虫(RON4-mCherry)及び抗RON4抗体を用いて、スポロゾイトから肝内型原虫でのRON4タンパク質の発現パターンを観察した。さらに虫体外に分泌されたRON4が肝細胞への感染に機能するかを調べるため、抗RON4抗体処理によりスポロゾイトの肝細胞感染が抑制されるかを検討した。

4. 研究成果

(1) モスquitoステージにおけるRON4の機能時期の特定

RON4-cKD 原虫感染蚊では、中腸・体液スポロゾイト数はコントロールと同程度であったが、唾液腺スポロゾイト数はコントロールの 1/30 程度まで減少していた (図 3)。このことから RON4 はスポロゾイトの唾液腺侵入に重要であることがわかった。

(2) 肝細胞感染における RON4 の機能時期の特定

① in vivo における RON4 機能時期の特定

唾液腺由来の RON4-cKD 及びコントロール原虫をマウスに静注し、42 時間後の肝内原虫量を比較したところ、RON4-cKD 接種群ではコントロール接種群の 1/20 まで減少した (図 4 左)。スポロゾイト接種 1 時間後の肝内原虫量は、RON4-cKD 接種群ではコントロール接種群の 1/3 程度まで減少していた (図 4 右)。以上の結果から、RON4 は、スポロゾイトの肝臓への集積に関与し、さらに肝細胞への寄生から肝細胞内での増殖のどこかで機能していることが示唆された。

② in vitro における、RON4 機能ステップの詳細な解析

次に RON4 がスポロゾイトの肝臓感染のどのステップに関与するかを明らかにするため、肝類洞の通過に必要な細胞通過から肝内型原虫の発育までの各ステップを in vitro で検証した。(1)RON4-cKD スポロゾイトの細胞通過はコントロールの 1/7 程度まで (図 5A)、(2) 寄生胞膜を伴った寄生効率はコントロールの 1/10 程度まで (図 5B)、(3) 感染 48 時間後の肝内型原虫数は 1/10 まで減少していた (図 5C)。感染 48 時間後の肝内型原虫の大きさはコントロールと同程度であった (図 5D)。これらのことから、RON4 は肝類洞の通過と肝細胞への寄生、両方に重要な役割を持つことが明らかとなった。その一方で肝細胞内での発育には必須でないことが示唆された。さらにスポロゾイトの接着能・運動能を観察したところ、RON4-cKD 原虫スポロゾイトはコントロールと比較して、接着能・運動能ともに低下していた (図 6)。このことから、RON4 はスポロゾイトの接着・運動に作用することで唾液腺侵入及び肝臓感染に影響していると示唆された。

次に RON4 がスポロゾイトの細胞通過はコントロールの 1/7 程度まで (図 5A)、(2) 寄生胞膜を伴った寄生効率はコントロールの 1/10 程度まで (図 5B)、(3) 感染 48 時間後の肝内型原虫数は 1/10 まで減少していた (図 5C)。感染 48 時間後の肝内型原虫の大きさはコントロールと同程度であった (図 5D)。これらのことから、RON4 は肝類洞の通過と肝細胞への寄生、両方に重要な役割を持つことが明らかとなった。その一方で肝細胞内での発育には必須でないことが示唆された。さらにスポロゾイトの接着能・運動能を観察したところ、RON4-cKD 原虫スポロゾイトはコントロールと比較して、接着能・運動能ともに低下していた (図 6)。このことから、RON4 はスポロゾイトの接着・運動に作用することで唾液腺侵入及び肝臓感染に影響していると示唆された。

さらにスポロゾイトの接着能・運動能を観察したところ、RON4-cKD 原虫スポロゾイトはコントロールと比較して、接着能・運動能ともに低下していた (図 6)。このことから、RON4 はスポロゾイトの接着・運動に作用することで唾液腺侵入及び肝臓感染に影響していると示唆された。

③ RON4 発現時期と局在の特定

RON4 タンパク質の発現パターンを観察した。RON4-mCherry はスポロゾイトで虫体先端部にシグナルが観察された。培養肝細胞 HepG2 へ接種後 1 時間では半数以上の原虫に RON4 のシグナルが観察されたが、接種後 6 時間では 8 割以上の原虫で検出限界以下となり、24 時間の時点では全く観察されなくなった。その後赤血球感染型原虫形成に伴い、48 から 72 時間の間でメロゾイト虫体先端部に RON4 のシグナルが観察された。さらに滑走運動中のスポロゾイト体外に RON4 シグナルが観察された。スポロゾイトが滑走運動中に RON4 を分泌していることが示唆されたことから、抗 RON4 抗体処理により、スポロゾイトの肝細胞感染が抑制されるかを検討した。その結果、抗 RON4 抗体群ではコントロール抗体処理群と比較して、スポロゾイトの肝細胞への感染が 1/3 程度まで抑制されていることがわかった (図 7)。また、この感染抑制効果は抗 RON4 抗体濃度依存的であった。これらのことから、RON4 は肝細胞への感染時に虫体外へ分泌され、機能していることが示唆された。

一連の研究成果をまとめ、投稿した論文が mSphere に受理された。

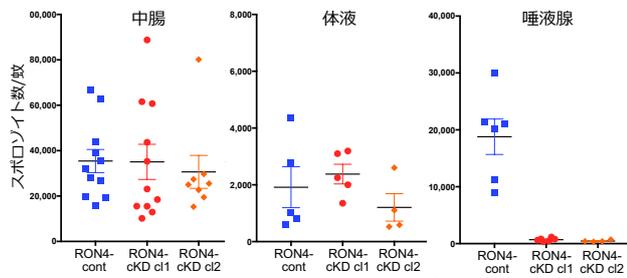


図 3 RON4-cKD とコントロール原虫スポロゾイト数の比較

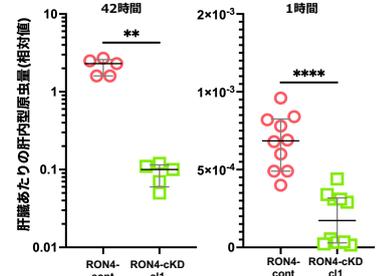


図 4 肝内型原虫量の比較

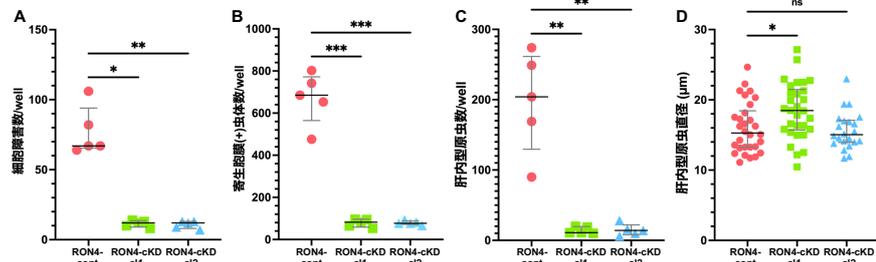


図 5 in vitro における RON4 機能ステップの解析

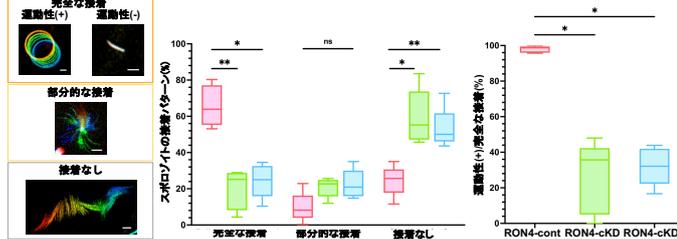


図 6 スポロゾイトの接着能・運動能の解析

左はスポロゾイトの接着パターンを模式図、中央は各接着パターンの割合、右は完全に接着したスポロゾイトのうち、運動性を示したものの割合を示す。

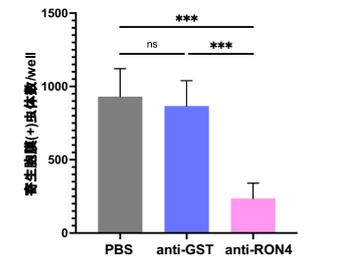


図 7 RON4 抗体による感染抑制効果

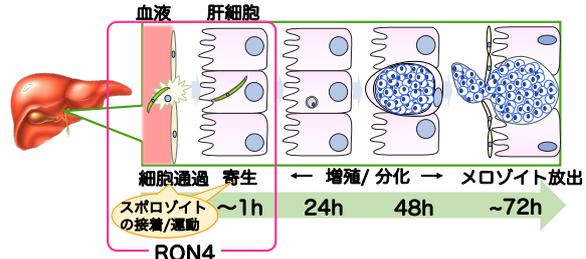


図 8 肝臓感染における RON4 の機能ステップ

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 Baba Minami, Nozaki Mamoru, Tachibana Mayumi, Tsuboi Takafumi, Torii Motomi, Ishino Tomoko	4. 巻 8
2. 論文標題 Rhoptry neck protein 4 plays important roles during <i>Plasmodium</i> sporozoite infection of the mammalian liver	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/msphere.00587-22	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 Nozaki Mamoru, Baba Minami, Tachibana Mayumi, Tokunaga Naohito, Torii Motomi, Ishino Tomoko	4. 巻 5
2. 論文標題 Detection of the Rhoptry Neck Protein Complex in Plasmodium Sporozoites and Its Contribution to Sporozoite Invasion of Salivary Glands	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 00325-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mSphere.00325-20	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 馬場みなみ、野崎守、橘真由美、鳥居本美、石野智子
2. 発表標題 マラリア原虫 <i>Plasmodium berghei</i> スポロゾイトにおけるAMA1の役割
3. 学会等名 第91回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Minami Baba, Mamoru Nozaki, Mayumi Tachibana, Motomi Torii, Tomoko Ishino
2. 発表標題 RON4 is involved in attachment ability and motility of Plasmodium sporozoites necessary for invasion of hepatocyte and cell traversal
3. 学会等名 The 20th Awaji International Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 馬場みなみ、野崎守、橘真由美、鳥居本美、石野智子
2. 発表標題 RON4発現抑制Plasmodium bergeiスポロゾイトを用いた肝臓感染におけるRON4の役割の解析
3. 学会等名 第90回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Minami Baba, Mamoru Nozaki, Mayumi Tachibana, Motomi Torii, Tomoko Ishino
2. 発表標題 RON4 is required for the efficient hepatocyte invasion and gliding motility by Plasmodium sporozoites
3. 学会等名 The 19th Awaji International Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 馬場 みなみ、野崎 守、鳥居 本美、石野 智子
2. 発表標題 RON4はマラリア原虫スポロゾイト肝臓感染の初期に役割を持つ
3. 学会等名 第89回日本寄生虫学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 馬場 みなみ、野崎 守、鳥居 本美、石野 智子
2. 発表標題 マラリア原虫スポロゾイトの肝臓感染におけるRON4作用機序の解析
3. 学会等名 第163回獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 馬場 みなみ、野崎 守、鳥居 本美、石野 智子
2. 発表標題 RON4発現抑制Plasmodium bergheiスポロゾイトを用いた肝臓感染におけるRON4の役割の解析
3. 学会等名 第90回日本寄生虫学会
4. 発表年 2021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
---------	---------