

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390124

研究課題名（和文） マラリア原虫スポロゾイト肝細胞侵入関連分子に対する肝細胞側レセプター分子の同定

研究課題名（英文） Screening of sporozoite receptor molecule(s) on hepatocytes

研究代表者

鳥居 本美 (TORII MOTOMI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20164072

研究成果の概要（和文）： スポロゾイトにおいて発現される分泌型分子 P36p のタンパク質動態を詳細に解析した。肝細胞侵入後に P36p の貯蔵量が減少することから、P36p が細胞侵入に際して分泌されて機能することが示唆され、肝細胞認識／侵入に関わるという知見が強く支持された。P36p と相互作用する肝細胞膜分子は検出できなかったが、メロゾイトの細胞侵入関連分子が新たに6種類、スポロゾイトでも発現していることを見出した。

研究成果の概要（英文）： Characterization of P36p, the sporozoite secreted proteins involved in hepatocyte infection, was performed using monoclonal antibody. It was revealed that P36p starts expression after sporozoites released into hemolymph and stored in microneme, the apical organelle, until they are secreted before or during hepatocyte invasion. Moreover, 6 rhoptry molecules commonly expressed in target cell infective stages (merozoite and sporozoites) were identified.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2010年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：寄生虫学

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：マラリア原虫、スポロゾイト、細胞侵入

## 1. 研究開始当初の背景

マラリア原虫のヒトへの侵入型であるスポロゾイトは、皮下静脈の血管に侵入し、血流に乗って肝臓に至り、肝血管類洞壁に存在するクッパー細胞を通過した後、肝細胞内に寄生胞を形成して侵入し、肝細胞期の発育を開始する。これまでの研究によって、類洞

壁のクッパー細胞の通過には SPECT1、SPECT2、CeITOS などの分子が関与することが判明している (Ishino et al, 2004、Kariu et al, 2006)。肝細胞への侵入には、スポロゾイト表面の主要抗原である circumsporozoite protein (CSP) の肝細胞表面のプロテオグリカン (HSPG) への結合が重要で

あることが報告されているが、HSPG は他の細胞表面にも広く分布する分子であることから、スポロゾイトの肝細胞への特異的侵入との関連性は明らかにされていない。一方、スポロゾイトの先端部小器官の一つであるマイクロネームに局在する P36p、TRAP 等の分子がスポロゾイトの肝細胞侵入に重要な役割を果たすことが、ノックアウト原虫を用いた研究によって明らかにされてきた。この他にスポロゾイトの肝細胞侵入に関与する可能性が示唆される分子として SPATR、EBA-175、STARP、PfEMP3 などが挙げられている。しかし、これらの分子の肝細胞侵入における機能解析は全く進んでいない。

マラリア原虫の標的細胞侵入機序に関連する研究として、申請者らはネズミマラリアを用いて、メロゾイトの先端部小器官に局在する分子 (PyRhopH 複合体) が、赤血球表面の GPI アンカー型タンパク質に結合することを見いだした (Rungruang et al., 2005)。さらに、*in vitro* のタンパク質相互作用アッセイ法 (AlphaScreen 法) を改良して検討した結果、PyRhopH 複合体に結合する 1 分子を同定することに成功した。コムギ胚芽無細胞タンパク質合成法を用いて同様のシステムを利用することで、ネズミマラリア原虫スポロゾイトの肝細胞侵入関連分子に結合する肝細胞側レセプター分子についても検出が可能になったと考えられる。

## 2. 研究の目的

マラリア原虫スポロゾイトが、蚊の唾液腺からほ乳類の皮下に打ち込まれ、さらに血管を通過して肝細胞に寄生するのが、ほ乳類への感染の最初のステップである。スポロゾイトがどうやって肝細胞を認識し、どのようなメカニズムで寄生を成立させるのかほとんど明らかにされていない。そこで、既に肝細胞への到達に関わることが知られている原虫の分泌性タンパク質を足がかりに、肝細胞寄生の仕組みを解明することを本課題の目的とする。さらに、新しく肝細胞侵入に関与する分子の同定を試みた。

## 3. 研究の方法

(1) P36p, P36 と相互作用する肝細胞膜表面上の分子の探索

コムギ胚芽由来無細胞タンパク質合成系を用いて、GST を N 末端側に融合させた組換え P36p/P36 タンパク質を合成した。得られた組換えタンパク質は、GST タグを利用して精製した。次に、肝由来培養細胞 (HepG2) を 24 well plate に撒き、メタノール固定後、組換えタンパク質を添加し、結合が検出されるか否か ELISA を用いて検討した。その結果、いずれのタンパク質も陽性コントロールに比較して、有意に肝細胞表面への結合が認められなかった。

(2) P36p、P36 のスポロゾイト形成時/肝細胞感染時における発現量の変動解析

### ①モノクローナル抗体の作成

(1)で作成した GST 融合 P36p, P36

組換えタンパク質をマウスに免疫し、脾臓細胞からモノクローナル抗体を作成した。唾液腺から回収したスポロゾイトを抗原とした蛍光抗体法でスクリーニングし、それぞれ 3 種類、

1 種類のモノクロー

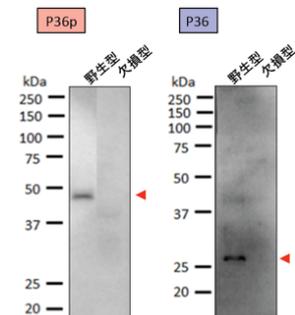
ナル抗体が得られた。唾液腺から回収したスポロゾイトを抗原とした western blotting を行ったところ (図 1)、予想されるサイズに特異的なシグナルが検出された。

②スポロゾイト形成時の P36p のタンパク質動態

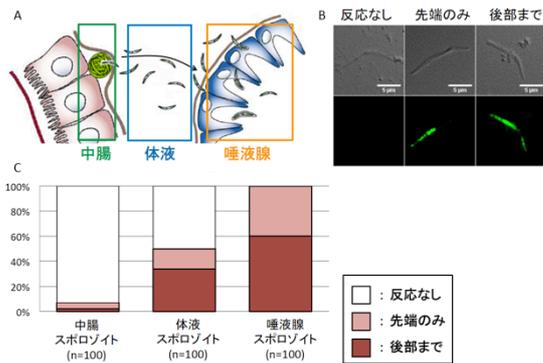
蚊の体内でのスポロゾイトの形成、発育に伴い P36p の発現や局在について解析した。感染蚊の中腸、体液、唾液腺からスポロゾイトを回収し (次項図 2A 参照)、アセトンで固定した後、モノクローナル抗体を用いて蛍光抗体法を行った。

③スポロゾイトの肝細胞侵入前後での P36p のタンパク質発現量の変動

肝由来培養細胞 (HepG2) にスポロゾイトを添加後、5 分、15 分、30 分後に細胞をホルマリンで固定する。各スポロゾイトが侵入前か後か、スポロゾイトの表面タンパク質



<図 1>抗体作成 唾液腺スポロゾイトを抗原とした western blotting。予想長の位置に特異的なシグナルが得られた。



＜図2＞スポロゾイトの形成および発育過程におけるP36pの発現パターン解析

(CSP)に対する抗体を用いた蛍光抗体法を行い明らかにする。すなわち、抗CSP抗体で認識されるものは(図3A;マゼンダで標識)細胞外におり、認識されないものは細胞内と判断する。用いるスポロゾイトはGFPを発現しているため、この場合緑でスポロゾイトが検出される。さらに、抗P36pモノクローナル抗体を用いてP36pの発現パターン/量を解析した。

### (3) 肝細胞侵入に関わる新規原虫分泌タンパク質のスクリーニング

#### ①ロプトリー関連分子の探索

メロゾイトが赤血球に侵入する際に、ロプトリーと呼ばれる先端部小器官に貯蔵されているタンパク質群が分泌され機能すると考えられている。肝細胞侵入ステージであるスポロゾイトにおいても、形態的にロプトリーが認められるため、これらのロプトリー分子がスポロゾイトにも存在し細胞侵入に際して役割を担う可能性を検討する。最初に、メロゾイトが赤血球に侵入するのに関わると考えられているロプトリー貯蔵タンパク質群(13種類)が、スポロゾイトでも発現しているか否か、RT-PCR法により解析した。赤血球ステージ原虫、中腸、唾液腺から回収したスポロゾイトからRNAを抽出して鋳型として用いた。

#### ②スポロゾイトにおけるタンパク質局在の解析

スポロゾイトで遺伝子発現が確認された分子について、タンパク質の局在を解析するために、c-mycタグと融合させたタンパク質を発現させる遺伝子組み換え原虫を作出し

た。得られた組換え原虫を蚊に感染させ、スポロゾイトを回収し、抗c-myc抗体を用いた免疫電顕法により、それぞれのタンパク質の局在を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) P36p, P36 と相互作用する肝細胞膜表面の分子の探索

GST融合P36p/P36組換えタンパク質は特異的にヒト肝由来培養細胞に結合することが見出されなかった。これらの原虫分子が、

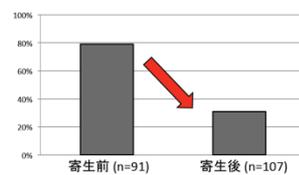
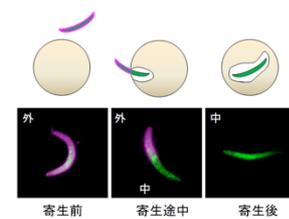
直接肝細胞上の分子を認識して機能する可能性が低いと考え、

他のligandとなる分泌性分子の検索を行うこととした(図3参照)。

さらに、肝細胞侵入時のP36pの役割を解

明するために、スポロゾイトの侵入前後での

P36pタンパク質動態を詳細に解析した。



＜図3＞スポロゾイトの肝細胞侵入時のP36pタンパク質の動態解析

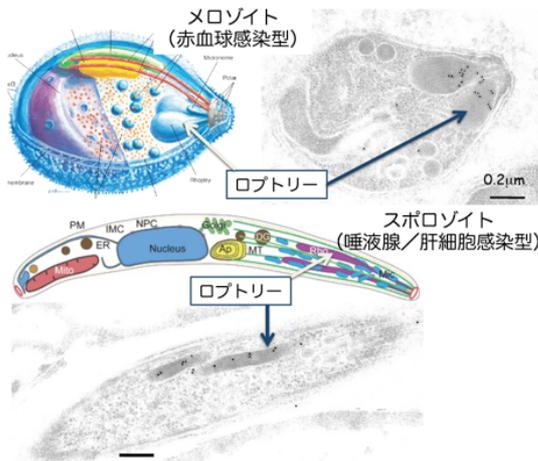
#### (2) P36p, P36のスポロゾイト形成時/肝細胞感染時における発現量の変動解析

P36pのシグナルパターンを3つに分類し、それぞれのステージのスポロゾイトを100匹ずつ観察した結果をグラフに示す。P36pは成熟したスポロゾイトが体液中に放出された後に、タンパク質発現が始まり、唾液腺に侵入するまでそのタンパク質が増加し続けることがわかった。このことは、P36pが肝細胞寄生に必要なという知見を裏付けるものである。さらに、肝細胞侵入前後におけるP36pの発現量、局在を比較した。細胞侵入後のスポロゾイトにおけるP36p量が顕著に減少していることから、侵入に際してP36pが分泌され機能することが強く支持される結果が得られた。

#### (3) 肝細胞侵入に関わる新規原虫分泌タン

## パク質のスクリーニング

赤血球感染ステージでロプトリーに局在が予想されている分子13種類について、スポロゾイトでも遺伝子が発現されているのか、RT-PCRを用いて解析した。その結果、調べたすべての遺伝子について、中腸で形成されたスポロゾイトにおいて強い発現が認められた一方で、唾液腺に侵入後のスポロゾイトにはmRNAはほとんど検出されなかった。Western blottingを行ってタンパク質発現を解析したところ、中腸および唾液腺から回収したスポロゾイト両方に発現が認められたことから、ロプトリー分子群は、スポロゾイト形成時に転写・翻訳され、そのタンパク質が肝細胞侵入時まで保持されることが明らかになった。また、免疫電顕法で詳細な局在を解析し、6つの分子がスポロゾイトにおいてもロプトリーに局在していることが判明した。これらの分子が、スポロゾイトの唾液腺あるいは肝細胞への侵入に関わるのか否か、今後解析を続ける。さらに、標的細胞膜上に、相互作用分子があればその探索を行い、スポロゾイトの細胞侵入機構の分子基盤の解明を目指す。



<図4>メロゾイト・ロプトリー共通にロプトリーに局在する分子の同定

## 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0件)

[学会発表] (計10件)

- ① 石野智子、村田英理、徳永順士、橘真由美、坪井敬文、鳥居本美 マラリア原虫先端部小器官(ロプトリー)に局在する分子のスポロゾイトにおける機能解析 第81回 日本寄生虫学会大会(シンポジウム「寄生虫におけるオルガネラ進化と寄生適応」) 兵庫県 3月23-24日 2012年
- ② 徳永順士、村田英理、坪井敬文、石野智子、鳥居本美 マラリア原虫スポロゾイトのロプトリータンパク質の同定と発現解析 第81回 日本寄生虫学会大会 兵庫県 3月23-24日 2012年
- ③ 伊藤大輔、長谷川倫之、三浦憲豊、Thongkukiatkul Amporn、竹尾暁、鳥居本美、坪井敬文 熱帯熱マラリア原虫 RALP1 はロプトリー頸部に局在し密着接合形成に關与する 第81回日本寄生虫学会、西宮市、2012年3月23-24日
- ④ 石野智子、村田英理、徳永順士、橘真由美、坪井敬文、鳥居本美 Investigation of the mechanisms how malaria sporozoites invade salivary glands Molecular Approach to Malaria 2012 オーストラリア、ローン(ビクトリア州) 2月19-20日 2012年
- ⑤ 石野智子 Investigation of liver stage parasite development using rodent malaria parasite. Joint International Tropical Medicine Meeting 2011 (招待講演) タイ王国、バンコク 12月1-2日 2011年
- ⑥ 徳永順士、村田英理、石野智子、鳥居本美 マラリア原虫スポロゾイトにおけるロプトリータンパク質群の性状解析 第19回分子寄生虫学ワークショップ、神戸、2011年10月21日
- ⑦ 徳永順士、村田英理、石野智子、鳥居本美 マラリア原虫スポロゾイトのロプトリー分子の探索及び発現プロファイル解析 第80回日本寄生虫学会、東京都、2011年7月17日~18日
- ⑧ 石野智子、Hegge Stephan、徳永順士、村田英理、杉野友香、鳥居本美 マラリア原虫スポロゾイトの肝細胞への侵入過程の real time imaging 解析, 第80回日本寄生虫学会、東京都、2011年7月17~18日
- ⑨ 伊藤大輔、韓銀澤、竹尾暁、Thongkukiatkul Amporn、大槻均、鳥居本美、坪井敬文 熱帯熱マラリア原虫 rhoptry neck protein 3 は AMA1 非存在下で RON2 および RON4 と複合体を形成する 第80回日本寄生虫学会、東京都、2011年7月17日~18日

- ⑩ Stephan Hegge、徳永順士、石野智子、鳥居本美 マラリア原虫スポロゾイトの肝細胞への侵入過程の real time imaging 解析 第 18 回 分子寄生虫学ワークショップ、群馬県、2010 年 8 月 2-5 日

[その他]

ホームページ等

<http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/parasitology/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鳥居 本美 (TORII MOTOMI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20164072

### (2) 研究分担者

石野 智子 (TOMOKO ISHINO)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40402680