

## 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6月14日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590472

研究課題名（和文） マラリア肝内型原虫のメロゾイトへの分化に必須な分子の探索  
と機能の解析研究課題名（英文） Malarial parasite molecules essential for development from  
sporozoite to merozoite in the liver stage.

研究代表者

鎮西 康雄 (Chinzei Yasuo)

鈴鹿医療科学大学・医用工学部・教授

研究者番号：60024709

研究成果の概要（和文）：

肝内型原虫調整の方法を研究し、短時間で効率的調整する方法を確立した。この調整原虫を用いて感染初期（スポロゾイト）から末期（メロゾイト）までの間に発現するすべての遺伝子を解析しデータベースを作成した。この研究ではその中から転写因子の一つに注目してその機能を解析し、この分子がスポロゾイトからメロゾイトへの分化に重要な働きをしていることを明らかにした。また、ワクチンターゲットとして有望であることも示した。

研究成果の概要（英文）：

We established the procedures for isolation of exoerythrocytic form parasites from the infected liver preparations by the cell sorter. We also established the expressed sequence tags database of the exoerythrocytic form parasites in the liver stage from sporozoites to merozoites. We analyzed a parasite molecule which functions to regulate the expression of the genes for development to merozoites in the liver. We found this molecule is a transcription factor. We also showed the possibility of this molecule to be a candidate for development of EEF vaccine.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：病理学・寄生虫学（衛生動物を含む）

キーワード：マラリア、スポロゾイト、肝内型原虫、遺伝子発現、ワクチン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) マラリアは毎年数億人が感染し数百万人が死亡する世界一級の感染症であるが、いまだ効果的な対策が確立されていない。ワクチン開発に期待が寄せられてはいるが、まだ有効なものは完成していない。

(2) 多くの研究者は実験のやり易さ(培養が出来る)や症状が出る臨床的に重要なメロゾイト(血液中の原虫)を対象としたワクチン開発を手掛けている、しかしこの時期の原虫を対象としたワクチンは症状を和らげたり、治療には使えても感染そのものを阻止することができず、耐性が出来やすい時期であると考えられ、実験室での成果が実際に現場で通用しないことが多い、実際いくつかの試みは、その段階で失敗した。

(3) 我々は感染そのものを阻止し耐性が出来にくいと考えられる肝内型原虫をターゲットとしたワクチンの開発を目指し、ワクチン候補分子を探索している。この時期の原虫(肝内型原虫)が実験的に扱うのが困難で、取り組む研究者がおらず未解明のことが多い。そのため自ら基盤作りからやらなければならないのが3年前のそして今の状況でもある。

(4) 我々は以下の述べる如く、肝内型原虫調整の方法を研究し、短時間で効率的調整する方法を確立できた。この調整原虫を用いて感染初期(スポロゾイト)から末期(メロゾイト)までの間に発現するすべての遺伝子を解析しデータベースを作成した。この研究ではその中から転写因子の一つに注目してその機能を解析し、この分子がスポロゾイトからメロゾイトへの分化に重要な働きをしていることを明らかにした。また、ワクチンターゲットとして有望であることも示した。

## 2. 研究の目的

この研究の目的は、肝内型原虫のスポロゾイトからメロゾイトへの発育分化の間に発現しているすべての遺伝子を網羅的に解析すること、その分化を制御する(もともと)重要な分子を見つけ出すこと、この分子を用いて免疫したときに、感染を阻止することが出来るかを明らかにすることが目的である。す

なわち肝内型原虫をターゲットとしたワクチン候補分子を見つけることが目的である。

## 3. 研究の方法

この研究では、モデルとしてネズミマラリア *Plasmodium berghei* 及びマウスを用いて以下の実験をおこなった。

(1) 研究基盤の確立のため肝内型原虫の単離精製: GFP (green fluorescent protein) 遺伝子を組み込み、GFP を発現する原虫を作成しネズミに感染させて肝臓細胞を調整し、セルソーターにより肝内型原虫の精製をおこなった。短時間に効率よく肝内型原虫の長セ医できる方法を確立した。

(2) 肝内型原虫の EST (expressed sequence tags) の解析とデータベースの作成: 精製した原虫から RNA を抽出し、リバーストランスクリプターにより DNA とし、網羅的に塩基配列を解析して、EST データベースを構築した。

(3) ターゲット分子の探索: データベースから、発現量・吉遺伝子の機能ドメイン等との相同性、熱帯熱マラリア原虫ゲノムの相同遺伝子の有無等を指標にして、複数の遺伝子を選抜した。

(4) ターゲット遺伝子のノックアウト原虫の作製: ターゲット遺伝子の配列とミリメサミン耐性遺伝子から、DNA コンストラクトを作製し、これをメロゾイトステージの原虫にエレクトロポレーションに手導入し、形質転換を起こし、ターゲット遺伝子が破壊されピリメサミン耐性が出来た原虫を薬剤処理により選抜し、さらに限界希釈によりクローン化した。

(5) 遺伝子ノックアウト原虫の表現系の解析: ノックアウト原虫をマウスに感染させ、肝臓内での原虫の発育について観察し、正常原虫との比較を行って、表現系の解析を行った。特に遺伝子ノックアウトによって感染あるいは増殖阻害が起こるかどうかを中心に調べた。その結果、全く増殖が抑制される遺伝子が見つかった。この遺伝子について構造昨日の解析を行ったところ、点 s h 調節因子であることが判明した。

(6) 転写調節因子としての構造と機能の解析: このターゲットとする遺伝子につい

て、遺伝子配列から想定されるタンパク質構造を明らかにし、発現させて作成したペプチドについて DNA との結合能等その機能解析を行った。

(7) この分子のワクチン候補分子としての可能性の検討：発現したタンパク質を用いてマウスを免疫し、これにネズミマラリア原虫をチャレンジさせて、マウスの感染性やマウス体内での動向を調べた。特に肝臓内での原虫の発育分化について詳細な検討を行った。

#### 4. 研究成果

ネズミマラリア原虫 *Plasmodium berghei* において、肝臓に侵入するステージであるスポロゾイトの転写因子 AP2-Sp (AP2 in sporozoites) を同定した。マラリア原虫の肝臓侵入ステージであるスポロゾイトとそれに続く肝細胞内寄生ステージは感染阻止免疫を誘導できるきわめて重要なステージである。しかしながらその感染機構はまだまだ多くの点で明らかになっていない。我々はこの研究で Apetala2 (AP2) ファミリーの遺伝子群がマラリア原虫の転写因子をコードしていることを明らかにした。特にマラリア原虫のオオキネートステージで発現される AP2 ファミリー転写因子 AP2-0 (AP2 in ookinetes) が中腸感染に関わる遺伝子群を誘導していることを明らかにした。

またスポロゾイト及び肝細胞内寄生ステージの転写因子 AP2-Sp (AP2 in sporozoites) と AP2-E (AP2 in exoerythrocytic forms) を同定した。AP2-Sp はほとんど全てのスポロゾイト期の感染関連遺伝子の発現を制御するマスター転写因子であった。AP2-Sp はスポロゾイト期を通じて発現され、その核に局在していた。AP2-Sp 遺伝子を破壊した原虫ではオオシスト内でのスポロゾイトの形成が観察されなかった。さらに AP2-0 とのキメラ転写因子をオオキネート期に発現させたところその標的遺伝子の一部をオオキネート期に発現させることができた。

これらの内にはスポロゾイトの肝臓感染にとって重要な役割を有している遺伝子が含まれていた。一方 AP2-E は肝細胞感染後早期の肝内型原虫の発育、増殖を制御する転写因子

である。AP2-E を破壊した原虫は肝内ステージが正常に形成されなくなった。今後これらの転写因子を手掛かりとしてマラリア原虫の肝臓感染機構を明らかにしたい。

この研究によって AP2-Sp はスポロゾイト期特異的に発現し、スポロゾイトの侵入、感染に必要な遺伝子群のほぼすべてを誘導するマスター転写因子であることを明らかにした。我々は、AP2-Sp の DNA 結合ドメインを有するキメラ転写因子を蚊侵入ステージであるオオキネートに発現させること研究を継続し、多数の AP2-Sp 標的遺伝子をオオキネート期に誘導することに成功した。

新たに同定された AP2-Sp 標的遺伝子の一つ *ASAI* (AP2-Sp activated gene 1) は細胞膜結合蛋白質をコードしている遺伝子であり、肝臓感染ステージである唾液腺スポロゾイトで特異的に発現される。*ASAI* 遺伝子ノックアウト原虫は正常にマウスの血液、蚊の唾液腺に感染したが、肝臓への感染性が数千分の一に低下することを明らかにした。HepG2 細胞を用いた *in vitro* 侵入アッセイでは、*ASAI* ノックアウト原虫の肝細胞侵入能が十分の一以下に低下していることが分かった。さらに HepG2 細胞に侵入した少数の原虫もその後の細胞内での EEF (exoerythrocytic form) への development に異常が認められた。一方、HepG2 細胞通過 (障害) 活性は野生型の約三倍に増加していた。以上の結果は、*ASAI* が肝実質細胞の認識に必要であること、*ASAI* を介したコミットメントがその後の肝細胞内ステージへの移行に重要な役割を担っていることを示すことができたと考えている。またこの分子をターゲットとしてワクチン開発にもっていける可能性があることも示すことが出来た。

#### 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 4 件)

Kimura D., Miyakoda M., Honma K., Yuda M., Chinzei Y., and Yui K., Production of IFN- $\gamma$  by CD4<sup>+</sup> T cells in response to malaria antigens is IL-2-dependent. *Int.*

Immunol., 25. 2345—2356 2012

Iwanaga S, Khan SM, Kaneko I, Christodoulou Z, Newbold C, Yuda M, Janse CJ, Waters AP Functional Identification of the *Plasmodium* Centromere and Generation of a *Plasmodium* Artificial Chromosome. Cell,

Host & Microbe. 7. 1215—1223 2010

Yuda M, Iwanaga S, Shigenobu S, Kato T, Kaneko I. Transcription Factor AP2-Sp and its Target Genes in Malarial Sporozoites. Mol. Microbiol. 75. 854—863 2009

Ishino T, Boisson B, Orito Y, Lacroix C, Bischoff E, Loussert C, Janse C, Ménard R, \*Yuda M, LISP1 is important for the egress of *Plasmodium berghei* parasites from liver cells. Cell. Microbiol. 11. 1329—1339. 2009

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計3件)

①名称：マラリア原虫人工染色体を用いた薬剤耐性遺伝子の迅速同定法および組換えマラリア原虫作製法

発明者：岩永史朗・油田正夫・金子伊澄

権利者：国立大学三重大学

種類：特許

番号：PCT/JP2011/001781

出願年月日：23年3月26日

国内外の別：PCT (国際)

②名称：マラリア原虫人工染色体を用いた薬剤耐性遺伝子の迅速同定法

発明者：岩永史朗・油田正夫

権利者：国立大学三重大学

種類：特許

番号：特願 2010—071688

出願年月日：22年3月26日

国内外の別：国内

③名称：マラリア原虫人工染色体

発明者：岩永史朗・油田正夫

権利者：国立大学三重大学 (90%)・国立大学鳥取大学 (10%)

種類：特許

番号：特願 2009—051454

出願年月日：21年3月5日

国内外の別：国内

○取得状況 (計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鎮西 康雄 (Chinzei Yasuo)

研究者番号：60024709

(2) 研究分担者

油田 正夫 (Yuda Masao)

研究者番号：90293779

岩永 史朗 (Iwanaga Shiro)

研究者番号：20314510

大槻 誠 (Ootsuki Makoto)

研究者番号：60367878

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：