

機関番号：82603

研究種目：若手研究B

研究期間：2009～2010

課題番号：21790411

研究課題名（和文） 寄生性アピコンプレキサ特異的な細胞内輸送の解析

研究課題名（英文） Apicomplexa specific traffic pathway in protozoa

研究代表者 中野 由美子（齊藤）(NAKANO YUMIKO SAITO)

国立感染症研究所・寄生動物部・主任研究官

研究者番号：30321764

研究成果の概要（和文）：

マラリア原虫の赤血球細胞質のエンドサイトーシスには低分子量GTPaseのPfRab5aが関与することが報告されていた。本研究で、PfRab5には3つのアイソタイプが存在し、その中のPfRab5bは膜への結合がN末端のミリストイル化に依存するモチーフを持つことが分かった。Rab5bはマラリア全種とトキソプラズマに存在した。PfRab5bの赤内期での発現を確認した。PfRab5bの細胞内局在や機能を解析するために大腸菌でリコンビナントタンパク質の発現を試みたところ、コドンが大腸菌K12株に最適した人工遺伝子を使用することで、発現効率が上昇した。

研究成果の概要（英文）：

One of the small GTPase, PfRab5a, was previously reported that involvement of endocytosis of erythrocyte cytosol. This work shows that another Rab5 isotype, Rab5b, possesses conserved motif with myristoylation site in N-terminus. Rab5b homologue is presented in *Plasmodium* and *Toxoplasma* but not in *Cryptosporidium*, *Paramecium* and *Tetrahymena* in protozoa classified in Alveolata. Although expression of PfRab5b was low among three Rab5 isotypes, PfRab5b was expressed in erythrocytic stage. Expression of recombinant protein of PfRab5b was effective when an artificial gene appropriate for *E. coli* K12 codon was used.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	0	1,700,000
2010年度	1,600,000	0	1,600,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	0	3,300,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・

キーワード：原虫

1. 研究開始当初の背景

赤内期のマラリア原虫は寄生胞膜を介して赤血球細胞質中のヘモグロビンを取り込み、原虫自身の栄養源として生育する。その取り込みの機構は、真核生物に保存された膜を介する物質輸送（メンブ

レントラフィック）が担う。マラリア原虫では、宿主赤血球細胞質中にマラリア独自の取り込み機構を新規に構築することが報告されている等、マラリア原虫の特殊なメンブレントラフィックが明らかになりつつある。マラリア原虫内でのメ

ンブレントラフィックは未だに未解明な部分が多いが、最近、エンドサイトーシスでヘモグロビンを取り込むステップには低分子量GTPaseのPfRab5aが関与しており、その後マラリア原虫のエンドソーム (cytostome) は成熟して食胞 (food vacuole) となることが報告されていた。

2. 研究の目的

ゲノムデータベースの検索より、申請者はマラリアには Rab5 に3つのアイソタイプが存在することを発見した。Rab はC末端のシステインがガラノルゲラニルの脂質修飾を受けることで、膜への局在を決定するが、別のアイソタイプ (Rab5b) はC末端修飾を決めるシステインは存在せず、N末端にミリストイル化の修飾をうけるグリシンのコンセンサスがあるのを見いだした。また Rab5b のN末ミリストイル化コンセンサスは全てのマラリア原虫種 (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. berghei*) に存在するだけでなく、他のアピコンプレキサ (*Toxoplasma gondii*) にも保存されていた。よって、Rab5b を介するアピコンプレキサ特有の膜輸送経路が存在すると推測した。本研究では Rab5b の機能解析を行うための基盤的研究をおこなった。

3. 研究の方法

(1) 他種原虫における Rab5b の保存性 Rab5b が他の apicomplexa 門原虫や、Alveolata 生物群に共通して存在するかを確認するために、ゲノムの解読が終了している Alveolata 原虫の Rab5 の検索を行った。使用したデータベースは、Tetrahymena Genome Database (<http://ciliate.org/index.php/home/welcome>)、Paramecium database (<http://paramecium.cgm.cnrs-gif.fr/db/index>)、Cryptosporidium DB (<http://cryptodb.org/cryptodb/>) である。Rab はヒトの Rab1 と酵母の Ypt1 のアミノ酸配列を元に blastp を行い、得られた hypothetical GTPase について、Rab 特異的な switch region と GTP-binding consensus 配列の存在を (Pereira-Leal, 2001) マニュアルで確認した。得られた Rab はヒトと酵母の Rab を対象として系統樹を書くとともに全長のアミノ酸の相同性が 40% 以上のものを Rab のホモログとした。

(2) マラリアにおける Rab5b の発現 熱帯熱マラリア原虫における Rab5b の機能を解析するために、FCR3 株のトロフォ

ゾイト/スカイゾント期より cDNA を合成し、3種のアイソタイプの発現量を調べた。用いたオリゴヌクレオチドの配列を下記に記す。Rab5a; 5' - TGG GAT CCA TGG AAA AGA AAA GTA GTT ATA AAA CA-3' and 5' - GCC TCG AGT TAT CTT CTT CCT TTT TTT GAA AG-3' , Rab5b; 5' -TGG GAT CCA TGG GAT GTT CAT CAA GCA CCG AA-3' and 5' - GCC TCG AGT CAA GGA TTG TTA TAA TAT AAA AG-3' , Rab5c; 5' - TGG GAT CCA TGG CTT ATT ATT TAT CAA ATT TA-3' and 5' - GCC TCG AGT CAA CAA CAT TTT TTT TTG GTT TC-3' 。

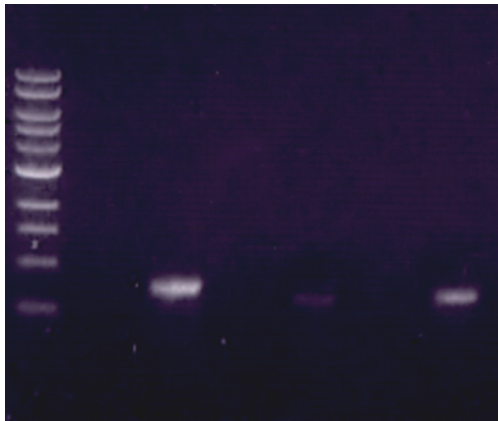
(3) リコンビナントタンパク質の発現 AT リッチな codon usage を有するマラリア原虫のリコンビナントタンパク質を発現するために、発現ベクターにはシャペロンドメインを組み込んだ pCold1, pColdTF (Takara) を使用した。大腸菌には One Shot BL21 (Stratagene) ならびにシャペロンプラスミドを独立に有する Chaperon competent cell BL21 (Takara) を使用した。大腸菌 K12 株にコドン最適した人工合成遺伝子は Operon Biotechnologies に外部委託した。

4. 研究成果

(1) 他種原虫における Rab5b の保存性 細胞内の Rab のレパートリーが酵母並みに単純化したアピコンプレキサ (*Cryptosporidium parvum*) には9種の Rab が存在し、Rab5 は1つであったが Rab5b のホモログではなく Rab5a であった。Alveolata 生物群に分類される繊毛虫 (*Tetrahymena thermophila*, *Paramecium tetraurelia*) には Rab の多様化が存在し、それぞれ 85 個と 229 個の Rab がゲノムに存在した。Rab5 ホモログは3個と4個であったが、どれも Rab5a のホモログであった。よって、Rab5b ホモログはゲノムの解読が終了している原虫の中では、*Plasmodium* と *Toxoplasma* に共通して存在していることがわかった。

(2) マラリアにおける Rab5b の発現 FCR3 株のトロフォゾイト/スカイゾント期では、最も発現の高い PfRab5 アイソタイプは 5a であり、次に PfRab5c の発現が高かった。PfRab5b は最も発現量が少ないもののトロフォゾイト/スカイゾント期に発現していることが確認された。下記に電気泳動写真を示す。

1000bp
ladder Rab5A, Rab5B, Rab5c



PlasmoDB での発現プロファイルでは Rab5a は赤内期を通して constitutive に発現しているが、Rab5b は後期スカイゾント期に発現が上昇する。Rab5c の発現は PlasmoDB に掲載されていない。Rab5b は赤内期の後期で特異的に機能することが推測された。

(3) リコンビナントタンパク質の発現抗体作製と生化学実験のために大腸菌内でリコンビナント蛋白質の発現を試みた。GST や His 融合蛋白質等、複数の発現条件を検討した結果、pCold1-TF ベクターによる低温条件下でのタンパクの発現誘導、かつ大腸菌内でのシャペロンとの共発現 (groES, groEL) によって、可溶性画分に組換え蛋白質を発現させることに成功した。しかし、可溶性画分に分画されるタンパク質量が十分ではなく、抗体を作製するには不十分であった。最終的に、コドンで大腸菌 K12 株に最適した人工合成遺伝子 PfRab5b を合成し、シャペロン能を持つ pColdTF ベクターで発現を試みた。人工合成遺伝子とゲノム配列のヌクレオチドレベルでの相同性は 75% であった。ヌクレオチド配列を下記に記す。

```

PFRab5b-Ec  ATGGGCTGTTGGAGTAGTACGGAGCGCTTAACCGACGCAAAACATCAATATAGTAACC
PFRab5b      ATGGGATGTTTCATCAAGCACCGGAAGGTTAAACATCTACCAAAATATTAATATGTTACA
*****

PFRab5b-Ec  TCACCGCACAGCAGCAGAAAGAATCCGANGATACCAANGTCAAGTCTGTTACTC
PFRab5b      TCTCTGCACACACAAAAAATAATGCTCAGGATCTAAGTGAAATAGTTTTATTA
*****

PFRab5b-Ec  GGAGATTGAGGCTGGGAAAGCTATTGCTTGTATTGTGTCATGGCCGTTTTCAGC
PFRab5b      GGTGACAGTGGTGTGGAAATCAAGTATTGCTTGTATTGTGTCATGGTCCCTTTCT
*****

PFRab5b-Ec  GAAAAACATCAGGTGACTATTGGGCTGCGTTTCCATCAACATGGAATGAAGAAC
PFRab5b      GAAAAACATCAAGTTACTATAGGTGCGCATTTTACATCAATATGGAATTAAGAAAT
*****

PFRab5b-Ec  GGTGCTACCATGAACATGACATTTGGGATACGTTGGCCAGAACGGTTTCGACGATG
PFRab5b      GGTGCAACATGAATACATATTTGGGATACGTTGGGCGCAGAACGGTTTCGACGATG
*****

PFRab5b-Ec  GCACCTCTGTATTACCGTGATGCTATGGTCCGTTGGTCTATGACTCGAACATGTT
PFRab5b      GCTCCTTATATTTATCGTACGCGATATGGAGCAGTTGCTGTTATGACTCAAAATGTC
*****

PFRab5b-Ec  GAGAGCTTTGACTCTCTGAATACTGGATTAACGAGATCAATCCAATGGTCCGCTAAT
PFRab5b      GAATCCCTTGTACTTTAAATACTGGATAACGAATAAATCAATGGTCCAGAAAT
*****

PFRab5b-Ec  TGTGTCATCATGGTTGTGGCGAACAAAAGACCTTCCGCGAAGCTGACTGGGAATG
PFRab5b      TGTGTTATCATGGTAGTTGCCAATAAAGAGGCTTACCCCAAACTGAACTCAGAGATG
*****

PFRab5b-Ec  GTGATGAAATCTGCGAACAGGAAAGTATCTTCAATGAATGTTCTGGAAACAGGC
PFRab5b      GTCATGAAGTTTTGTGAACAGGAAATGTATCATTTATTGAACTGCTCAGCTAAGCAGGA
*****

PFRab5b-Ec  GAAAAATTACCAGCTGTTTGGAAACTGGCAAGTCCGATCTATTCCGCTTCAAGAA
PFRab5b      GAGAAATTTACTACTTTTATTTGAAATAGCTAGTCCGATTTATCCCGATTAAGAA
*****

PFRab5b-Ec  GTCCTGTACTACAAATCCGTAA
PFRab5b      GTTTTATATTATAAATCCCTTGA
*****

```

大腸菌は One Shot BL21 を使用した。大腸菌を mid-log まで培養した後、22°C で 0.1mM の IPTG で 18 時間 His 融合タンパク質の発現誘導を行った。約半分の発現したタンパク質が可溶性に分画され、400ml の大腸菌培養液から抗体作成に十分な 1.7mg のリコンビナントタンパク質を得た。この人工合成遺伝子で得られたリコンビナントタンパク質は抗体を作成するのに使用されるとともに、*in vitro* で PfRab5b との結合タンパク質の探索にも使用可能である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Saito-Nakano, Y., Nakahara, T., Nakano, K., Nozaki, T., Numata, O. Marked Amplification and Diversification of Products of ras Genes from Rat Brain, Rab GTPases, in the Ciliates *Tetrahymena thermophila* and *Paramecium tetraurelia* *The Journal of Eukaryotic Microbiology.* 2010, 57:389-399.

[学会発表] (計 3 件)

Yumiko Saito-Nakano, Genetic identification of drug resistance in *Plasmodium falciparum* using archive blood smears. The 7th Taiwan-Japan Symposium on Immunization and Travel Medicin

e. 台湾CDC (台湾国), 2010年9月9-10日

Yumiko Saito-Nakano, Mami Okada, Gil Mallari Penuliar, Yuki Hanadate, Carol A. Gilchrist, Oswald Crasta, William A. Petri, Jr., Zhangjun Fei, Ni no Trapaidze, Tomoyoshi Nozaki. Diversity and Significance of Vesicular Trafficking in *Entamoeba histolytica*. Hotel le Crystal (カナダ国) 2010年9月22-24日

Yumiko Saito-Nakano, Kentaro Nakano, Tomoyoshi Nozaki. Diversity of vesicular trafficking in phagocytic protozoa and significance of traffic in *Entamoeba histolytica*. The 45th Annual Japan-U.S. Joint Conference on Parasitic Diseases: Intestinal and Free-Living Protozoan Parasites Meeting 国立感染症研究所 (東京都), 2011年1月10-12日

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野由美子 (斉藤)

(NAKANO YUMIKO SAITO)

寄生動物部・主任研究官

研究者番号: 30321764

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし