

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390098

研究課題名(和文)チオレドキシネルオキシダーゼファミリーがマラリア原虫寄生適応に果たす役割の解明

研究課題名(英文) Analysis of the roles of thioredoxin peroxidase family for adaptation to oxidative stresses in malaria parasites

研究代表者

河津 信一郎(KAWAZU, Shin-ichiro)

帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授

研究者番号：60312295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,400,000円、(間接経費) 4,620,000円

研究成果の概要(和文)：チオレドキシネルオキシダーゼファミリー(Prx)遺伝子を欠損するローデント(ネズミ)マラリア原虫の表現型を調べた。(1)肝臓型でのPrx発現について：qRT-PCRによる欠損原虫株でのmRNA相対定量から、肝臓型においてもPrx欠損による他Prx遺伝子の過剰発現(酸化ストレス応答)が示唆された。(2)肝臓型での発育障害について：培養細胞感染モデルを用いた解析から、2-Cys Prx遺伝子欠損原虫では、シゾントの小型化とメロゾイト数の減少が起きることが解った。(2)赤血球型の増殖障害について：マウス感染モデルを用いた解析から、1-Cys Prx遺伝子欠損原虫の赤血球型に増殖障害が観察された。

研究成果の概要(英文)：Phenotypes observed in the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei* carrying a targeted knockout of thioredoxin peroxidase-family genes (2-Cys Prx KO and 1-Cys Prx KO) were investigated and have the following results: (1) Expression profiling of Prx mRNAs in 2-Cys Prx KO in the hepatic stage: qRT-PCR analysis revealed overexpression of other Prx mRNAs in the populations, indicating a mechanism underlying the response to oxidative stress in the hepatic-stage. (2) Defect in the hepatic-stage development of 2-Cys Prx KO: IFA analysis displayed smaller sized and fewer merozoite formation in the schizont than the parent strain (WT). (2) Defect in the blood-stage development of 1-Cys Prx KO: mice experiments showed lower parasite density of about 1-5% in the population than WT (>20%) during the first 7 days of infection.

研究分野：医歯薬学

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：感染症 マラリア ストレス レドックス 遺伝子改変原虫

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の肝臓・赤血球内、媒介蚊の体内など好気的環境に寄生し、自らも活発な DNA 合成、ヘム代謝の過程で多量の過酸化物を産生するマラリア原虫にとって、細胞内外から被る酸化ストレスへの応答、さらには細胞内酸化還元(レドックス)バランスのコントロールは、原虫細胞分化・増殖の調節、更にはその寄生適応の成否を左右する重要な機構である。マラリア原虫はカタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼといった主要な抗酸化酵素を欠損するので、細胞内での過酸化物の還元は主にチオレドキシ系ペルオキシダーゼのペルオキシレドキシ(Prx) family の分子が受け持つと考えられている。これまでに得られた成績から、細胞質に局在する Prx family がマラリア原虫の全発育環を通じて、様々なステージで、原虫に特有の生物現象と関連して機能する多機能なペルオキシダーゼであることが明らかになった。

## 2. 研究の目的

Prx family 遺伝子を欠損するローデント(ネズミ)マラリア原虫で観察される表現型について、そのメカニズムを詳細に調べること、Prx family の(1)酸化ストレス応答機構(2)肝臓型発育ステージでの役割(3)蚊体内発育ステージでの役割を明らかにする。これを以て、細胞に普遍的な生命維持装置、細胞内レドックスバランス制御機構のマラリア原虫での特性を明らかにし、マラリア制御法開発研究の場に新規基礎知見を提供することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 酸化ストレス応答機構の解析:

ローデントマラリア原虫には *Plasmodium berghei* ANKA 株を用いた。

同マラリア原虫肝臓型における Prx family [1-Cys Prx および 2-Cys Prx (Thioredoxin peroxidase (TPx)-1 および TPx-2)] 遺伝子の発現プロファイルを野生型親株 (WT) と TPx-1 欠損株 (TPx-1 KO) および TPx-2 欠損株 (TPx-2 KO) との間で比較した。各原虫株感染蚊唾液腺から調整したスポロゾイトを、*in vitro* で培養した HepG2 細胞へ接種した。接種後 5 時間後 (5h)、17 時間後 (17h) トロホゾイト期、40 時間後 (40h) シゾント期、50 時間後 (50h) サイトメア期に 1-Cys Prx、TPx-1 および TPx-2 の mRNA 発現量をリアルタイム qRT-PCR にて相対定量した。WT における Prx family の局在を各 Prx 特異抗体による間接蛍光抗体法で観察した。

### (2) 肝臓型発育ステージでの役割の解析:

WT、TPx-1 KO スポロゾイトを、*in vitro*

で培養した HepG2 細胞へ接種後、肝臓型原虫の発育状態を抗 CSP (circumsporozoite protein) 抗体と抗 MSP (merozoite surface protein)-1 抗体による蛍光染色で観察した。

### (3) 蚊体内発育ステージでの役割の解析:

Prx family の蚊体内発育型での役割を調べる目的で、1-Cys Prx を欠損する *P. berghei* (1-Cys Prx KO) を作製した。遺伝子欠損原虫は Nature Protocols (Vol.1,346-56, 2006) の方法で作製した。同 Prx 遺伝子欠損原虫について、まず赤血球型ステージでの表現型を観察した。1-Cys Prx KO および WT 寄生赤血球をマウス腹腔内に接種し、その後の赤血球型原虫の増殖を観察した。

## 4. 研究成果

### (1) 酸化ストレス応答機構の解析:

WT において、TPx-1 は細胞質に局在し、構成的な発現を示した。1-Cys Prx の発現も細胞質に局在し、その発現は 40h シゾント期から亢進し 50h サイトメア期でピークとなった。一方 TPx-2 はミトコンドリアに局在し、その発現は 17h トロホゾイト期から亢進し 40h でピークとなった。Prx family はマラリア原虫肝臓型において abundant な発現を示した (図 1)。

TPx-1 KO では、1-Cys Prx の 17h および 40h の発現量が WT のそれと比較して有意に増加した。TPx-2 の発現量も 40h で WT のそれと比較して有意に増加した。TPx-2 KO でも、1-Cys Prx の 17h および 40h での発現量が WT のそれと比較して有意に増加した。一方この時間帯の TPx-1 の発現量には、WT と比較して有意な差は認められなかった。これらの結果より、蚊体内発育型に加えて、肝臓型でも酸化ストレス応答のメカニズムが存在することが示唆された。現在 Prx 遺伝子欠損原虫株と WT について、RNA シーケンス (RNA-seq) による網羅的トランスクリプトーム解析をおこない、Prx family 以外の抗酸化タンパク質や転写因子などを対象として酸化ストレス応答の詳細について解析する実験を計画している。

### (2) 肝臓型発育ステージでの役割の解析:

CSP 抗体を用いた蛍光染色像から、TPx-1 KO では肝臓型シゾント期以降 (40-50h) で、原虫細胞の大きさが WT に比較して有意に小さいことが解った (図 2)。

また、MSP-1 抗体を用いた蛍光染色像から、TPx-1 KO でも WT と同様にシソゴニーが進行するが、シゾント内に形成されるメロゾイトの数が WT と比較して有意に少ないことも解った。このことから、TPx-1 KO 感染マウスで観られた赤血球型出現の潜伏期遅延は、肝臓型シゾント期以降の発育障害によるメロゾイト数の減少によると考察された。

TPx-1 KO シゾンでメロゾイト形成数が減少する理由を考察するため、発育阻害を見出したタイミングで電子顕微鏡での観察をおこない、発育障害の原因について形態的な検証を加える実験を計画している。

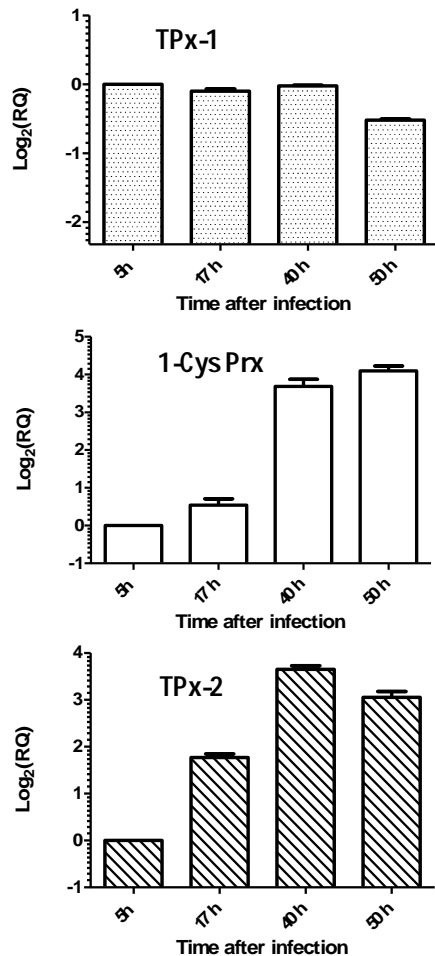


図1： HepG2 培養細胞に感染した *P. berghei* ANKA 株 WT 肝臓型での Prx family 発現プロファイルを示す。RQ は Prx 遺伝子 mRNA の 18S rRNA に対する発現量相対値を示す。(Usui, M. et al., Parasitol. Int. (2013))

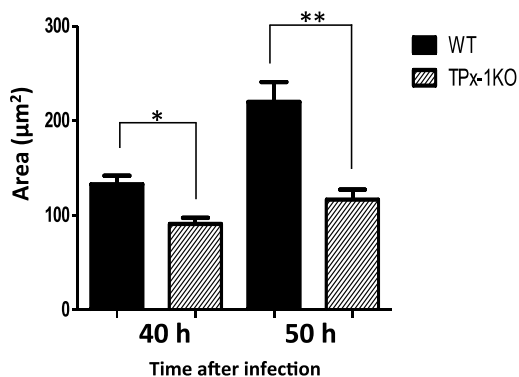


図2： HepG2 培養細胞に感染した *P. berghei* 肝臓型の大きさを示す。Area (μm<sup>2</sup>) はシゾン (40h) およびサイトメア (50h) の表面積を示す。\**P*<0.05; \*\**P*<0.001 (Usui,

M. et al., 未発表データ)

### (3) 蚊体内発育ステージでの役割の解析：

2 回のノックアウト実験で計 2 クローンの Prx 遺伝子欠損原虫を作製した。1-Cys Prx 遺伝子座での相同組換えは locus 特異的 PCR と Southern blot で確認した。WT を接種したマウスの赤血球型原虫寄生率 (PE) は接種後 4 日目で 10% に到達し、その後も 20% 以上の高い値を継続した。WT 接種マウスは 8 割が死亡した。一方 1-Cys Prx KO 接種マウスの PE は 7 日目まで 1-5% にとどまり、その後 20% に上昇するが、18 日目には 0.2% 以下に低下した (図 3)。同原虫接種マウスは全頭が生きた。

形態的には、1-Cys Prx KO で空胞を形成した原虫細胞が、WT と比較して有意に多く認められた。また、1-Cys Prx KO では生殖母体 (ガメトサイト) PE のピークが接種後 10-11 日目となり WT (接種後 4 日目) に比較して著しく遅延した。このタイミングでハマダラ蚊 (*Anopheles stephensi*) への媒介試験をおこなったところ、同エクスフラジェレーション率で WT が形成するオーシスト数に比較して中腸オーシストの形成数が著しく少なくなった。1-Cys Prx KO の PE が接種初期に低く抑えられる理由や空胞形成の理由について、原虫細胞膜の過酸化脂質や細胞内の過酸化レベルを比較して、現在考察を進めている。また蚊媒介試験でのオーシスト数の減少について、*in vitro* 培養系でオーキネート形成を比較する実験を計画している。

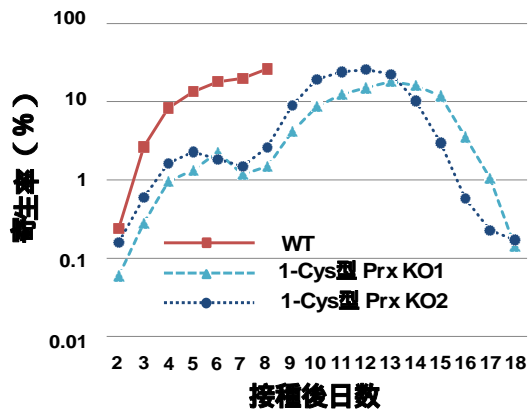


図3： BALB/c マウス (各区 n=3) に 1x10<sup>6</sup> 感染赤血球を腹腔内接種後の赤血球型原虫寄生率の推移を示す。(Masuda-Suganuma, H. et al., 未発表データ)

### 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 14 件)

Hakimi, H., Kawai, S., and Kawazu, S. Molecular epidemiology of the emerging

human malaria parasite "*Plasmodium knowlesi*". Trop. Parasitol. 査読有 4(1): 20-24 (2014) DOI: 10.4103/2229-5070.129154.

Komaki-Yasuda, K., Okuwaki, M., Nagata, K., Kawazu, S., and Kano, S. Identification of a novel and unique transcription factor in the intraerythrocytic stage of *Plasmodium falciparum*. PLoS ONE 査読有 8(9): e74701 (2013) DOI: 10.1371/journal.pone.0074701.

Hakimi, H., Nguyen, TT., Suganuma, K., Masuda-Suganuma, H., Angeles, JM., Inoue, N., and Kawazu, S. Development of monoclonal antibodies that target 1-Cys peroxiredoxin and differentiate *Plasmodium falciparum* from *P. vivax* and *P. knowlesi*. Trop. Med. Health 査読有 41(2): 55-59 (2013) DOI: 10.2149/tmh.2012-30.

Usui, M., Masuda-Suganuma, H., Fukumoto, S., Angeles, JM., Inoue, N., and Kawazu, S. Expression profiles of peroxiredoxins in liver stage of the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. Parasitol. Int. 査読有 62(3): 337-340 (2013) DOI: 10.1016/j.parint.2012.11.007.

Kimura, R., Komaki-Yasuda, K., Kawazu, S., and Kano, S. 2-Cys peroxiredoxin of *Plasmodium falciparum* is involved in resistance to heat stress of the parasite. Parasitol. Int. 査読有 62 (2): 137-143 (2013) DOI: 10.1016/j.parint.2012.11.005.

Turturice, BA., Lamm, MA., Tasch, JJ., Zalewski, A., Kooistra, RL., Schroeter, EH., Sharma, S., Kawazu, S., and Kanzok SM. Expression of cytosolic peroxiredoxins in *Plasmodium berghei* ookinetes is regulated by environmental factors in the mosquito bloodmeal. PLoS Pathog. 査読有 9(1): e1003136 (2013) DOI: 10.1371/journal.ppat.1003136.

Hakimi, H., Asada, M., Angeles, JM., Kawai, S., Inoue, N., and Kawazu, S. *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi*: Cloning, expression and functional analysis of 1-Cys peroxiredoxin. Exp. Parasitol. 査読有 133(1): 101-105 (2012) DOI: 10.1016/j.exppara.2012.10.018.

Masuda-Suganuma, H., Usui, M., Fukumoto, S., Inoue, N., and Kawazu, S. Mitochondrial peroxidase TPx-2 is not essential in the blood and insect stages of *Plasmodium berghei*. Parasit. Vectors 査読有 12:5: 252 (2012) DOI: 10.1186/1756-3305-5-252.

Hakimi, H., Asada, M., Angeles, JM., Inoue, N., and Kawazu, S. Cloning and

characterization of *Plasmodium vivax* thioredoxin peroxidase-1. Parasitol. Res. 査読有 111(2): 525-529 (2012) DOI: 10.1007/s00436-012-2864-3.

Usui, M., Fukumoto, S., Inoue, N., and Kawazu, S. Improvement of the observational method for *Plasmodium berghei* oocysts in the midgut of mosquitoes. Parasit. Vectors 査読有 4: 118 (2011) DOI: 10.1186/1756-3305-4-118.

〔学会発表〕(計19件)

増田-菅沼裕乃 他、1-Cys 型ペルオキシレドキシン遺伝子欠損 *Plasmodium berghei* の作製と表現型解析、第 83 回日本寄生虫学会、2014 年 3 月 28 日、愛媛大学城北キャンパス

Usui, M. *et al.* Expression profiles of peroxiredoxins in liver stage of the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 62<sup>th</sup> Annual Meeting (第 62 回米国熱帯医学会年会) 2013 年 11 月 15 日、Marriot Wardman Park Washington, Washington, DC (ワシントン DC、米国)

Hakimi, H., and Kawazu, S. *Plasmodium vivax* and *P. knowlesi*: Cloning, expression and functional analysis of peroxiredoxins. International Malaria Symposium (マラリア国際シンポジウム) 2013 年 4 月 16 日、Novotel Hotel, Kota Kinabalu, Malaysia (コタキナバル、マレーシア)

河津信一郎、熱帯熱マラリア原虫の薬剤耐性メカニズム、第 155 回日本獣医学会学術集会、2013 年 3 月 28 日、東京大学駒場キャンパス

薄井美帆 他、ミトコンドリア局在ペルオキシダーゼ (TPx-2) ノックアウトがマラリア原虫の発育に及ぼす影響の解析、第 80 回日本寄生虫学会大会、2012 年 7 月 17 日、東京慈恵会医科大学

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.obihiro.ac.jp/~tryp/index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

河津 信一郎 (KAWAZU, Shin-ichiro)  
帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授

研究者番号：60312295

(2)分担研究者

川合 覚 (KAWAI, Satoru)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70275733

(3)連携研究者

嘉糠 洋陸 (KANUKA, Hirotaka)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：50342770