

令和 2 年 11 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670201

研究課題名(和文) マラリア原虫のライフラインを司る小胞輸送を標的とした抗マラリア薬の開発

研究課題名(英文) Development of antimalarial drugs targeting the membrane trafficking

研究代表者

山田 浩司(YAMADA, Hiroshi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：80325092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：赤血球に寄生したマラリア原虫は、寄生胞膜に包まれて生存する。赤血球膜を含めた多重膜の中にあるマラリア原虫は、膜形態を変化させ、外から栄養分を取り込み、必要タンパクを輸送する。この過程に関わると考えられるタンパク候補を見つけ、その機能解析を行った。このタンパクは、容易に重合し、また、球状の人工脂質膜を顕著に変形させることを、顕微鏡観察により見出した。さらに、この膜変形にはGTPが必要であった。現在、詳細な膜変形様式を調べるために、電子顕微鏡観察を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マラリアは世界で最も被害の大きい寄生虫感染症である。抗マラリア薬が主要な治療法であるが、これら薬剤に対する耐性原虫が出現し拡散しており、より効果的な抗マラリア薬の探索が急務である。熱帯熱マラリア原虫は赤血球に寄生すると膜間輸送を利用して栄養分を取り込み、膜輸送を伴う寄生環境を構築している。これら膜制御に関わるタンパク候補をみつけ解析した。このタンパクの機能阻害は膜輸送の不全を引き起こすと考えられる。本研究から、これらタンパクを標的にした抗マラリア薬の創製が可能となった。本研究の進展は、マラリア原虫生理の理解と創薬の展開に大きく寄与していくものと考えられ、その医学薬学的意義も深い。

研究成果の概要(英文)：Malaria parasites live in erythrocyte by forming parasitophorous vacuole (PV) around the parasite, and by developing membrane trafficking system. In this study, we tried to examine whether or not malarial proteins could participate in these membrane remodeling. By microscopy, the candidate protein self-assembled under the low ionic strength conditions. Furthermore, the candidate protein deformed liposomes. The activity of membrane deformation by the protein was altered in the presence of GTP but not GTP gamma S, a non-hydrolyzable GTP analogue. We are now investigating the detail mechanism of membrane deformation by the protein using electron microscopy.

研究分野：生化学、細胞生物学

キーワード：小胞輸送 マラリア原虫 ダイナミン 膜変形

1. 研究開始当初の背景

赤血球に寄生するマラリア原虫は、原虫細胞膜、寄生胞膜、赤血球膜を介して物質輸送を行う。この物質輸送は、原虫のヘモグロビンや栄養分の取込等原虫の生存に重要であるが、その機構はほとんどわかっていない。我々は、高等動物で膜変形に関わるタンパクのホモログに注目して、この物質輸送の基本メカニズムの解明に取り組んだ。

2. 研究の目的

マラリアは、世界で最も被害の大きい寄生虫感染症であり、抗マラリア薬は主要な治療法であるが、薬剤耐性の出現、拡散により、その対応が急務である。本研究は、熱帯熱マラリア原虫のダイナミン関連タンパクの機能を明らかにし、これらタンパクを標的とした抗マラリア薬の創製につなげる。

3. 研究の方法

熱帯熱マラリア原虫の膜変形関連タンパク候補の機能及びその細胞機能を明らかにして、その阻害を引き起こす分子を捜す。既に構築した昆虫細胞タンパク発現系及び小麦胚芽無細胞発現系により、膜変形関連タンパク候補を精製しその機能を *in vitro* で調べる。

タンパクの機能解析は、GTPase 活性測定を主体とした生化学的解析、蛍光顕微鏡解析、電子顕微鏡解析を行う。細胞機能の解析には、部位特異抗体などを用いた免疫染色を主体に解析する。

4. 研究成果

< PfDYN2 タンパクの精製法改良 >

既に、2種の膜変形関連タンパク候補 (PfDYN1 及び 2) を昆虫細胞発現系により精製していた。しかし、PfDYN2 は精製ロットごとに GTPase 活性にぶれが生じて、

品質的に不安定であることが判明した。安定なタンパクを精製するため、条件検討を行った。タンパクの重合状態に影響を持つ因子の再検討を行い、還元剤及び 2 価イオン濃度を最適化した。その結果、高い GTPase 活性を維持した PfDYN2 を精製することに成功した。

< PfDYN2 の重合状態 >

新しく精製した PfDYN2 の自己重合構造を、生理的イオン強度緩衝液及び高イオン強度緩衝液中で光学顕微鏡により調べた。イオン強度は KCl 濃度で調製した。生理的イオン強度緩衝液中で、自己重合体と考えられる凝集体を多数観察した (図 1)。

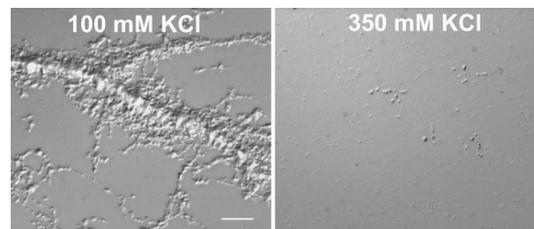


図 1: PfDYN2 のイオン強度依存性の重合体形成。高イオン強度条件下では、ほとんど重合体は観察されないが、イオン強度を下げると重合体と考えられる粒子が出現する。スケールバーは 10 μm を示す。

一方、高イオン強度緩衝液中では、タンパク重合体はほとんど観察されなかった。従って、PfDYN2 は非常に重合しやすい性質を持つタンパクであることが強く示唆された。現在、この重合体の構造解析を結晶化も合わせて行っている。

< PfDYN2 による膜変形 >

大型球状脂質膜 (リポソーム) を用いて、PfDYN2 の膜変形能を調べた。脂質膜変形実験で汎用されており、生体膜のリン脂質組成と類似したリン脂質組成のリポソームを調製した。PfDYN2 とリポソームを室温で 60 分間保温し、その膜変形を蛍光顕微鏡を用いて観察した。タンパク存在下で、顕著に膜変形が起こった。

変形したりポソームには、脂質膜が集積したと考えられる蛍光強度の高い点が複数現れた。

さらに、カバーガラス上に薄い脂質フィルム膜を作成し、そのフィルム膜と PfDYN2 を反応させた。PfDYN2 添加のみでは膜変形は起こらなかったが、GTP を添加すると速やかに脂質膜の変形が起こった。以上の結果から、PfDYN2 は膜変形因子であること、この膜変形は GTP の加水分解が必要であることが示唆された。GTPase 活性の阻害は、強力な膜変形阻害を引き起こし、細胞内輸送活性の混乱を引き起こす可能性が考えられるが、今後さらなる条件検討が必要である。

PfDYN2 におけるマラリア原虫細胞内の局在を調べるために、精製タンパクを抗原にしてポリクローナル抗体を作成した。今後、この抗体とこれまでに作成した部位特異抗体を併用して免疫化学的にその局在を同定していく予定である。

PfDYN2 により変形したりポソームをネガティブ染色し電子顕微鏡にて観察した。予備的な結果であるが、多数の変形した膜構造体が観察された。今後、詳細な PfDYN2 の膜変形様式を調べていくと共に、早急に細胞内機能を確定していく予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Zhang, Y., Nolan, M., **Yamada, H.**, Watanabe, M., Nasu, Y., **Takei, K.**, Takeda, T. Dynamin2 GTPase contributes to invadopodia formation in invasive bladder cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 480, 409-414, 2016, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.063 (査読有)
2. **Yamada, H.**, Kobayashi, K., Zhang, Y., Takeda, T., **Takei, K.** Expression of dynamin 2 mutant associated with Charcot-Marie-Tooth disease leads to aberrant actin dynamics and

lamellipodia formation. *Neurosci. Lett.*, 628, 179-185, 2016, doi: 10.1016/j.neulet.2016.06.030 (査読有)

3. **Yamada, H.**, Takeda, T., Michiue, H., Abe, T., **Takei, K.** Actin bundling by dynamin 2 and cortactin is implicated in cell migration by stabilizing filopodia in human non-small cell lung carcinoma cells. *Int. J. Oncol.*, 49, 877-886, 2016, doi: 10.3892/ijo.2016.3592 (査読有)

4. Hayashi, K., Michiue, H., **Yamada, H.**, Takata, K., Nakayama, H., Wei, F.Y., Fujimura, A., Tazawa, H., Asai, A., Ogo, N., Miyachi, H., Nishiki, T., Tomizawa, K., **Takei, K.**, Matsui, H. Fluvoxamine, an anti-depressant, inhibits human glioblastoma invasion by disrupting actin polymerization. *Sci. Rep.*, 6, 23372, 2016, doi: 10.1038/srep23372 (査読有)

5. **Yamada, H.**, Kikuchi T., Masumoto, T., Wei, F., Abe, T., Takeda, T., Nishiki, T., Tomizawa, K., Watanabe, M., Matsui, H., **Takei, K.** Possible role of cortactin phosphorylation by protein kinase C α in actin-bundle formation at growth cone. *Biol. Cell*, 107, 319-330, 2015, doi: 10.1111/boc.201500032 (査読有)

6. **Yamada, H.**, Abe, T., Li, S.A., Tago, S., Huang, P., Watanabe, M., Ikeda, S., Ogo, N., Asai, A., **Takei, K.**, N¹-[4-(dipropylamino)benzylidene]-2-hydroxybenzohydrazide is a dynamin GTPase inhibitor that suppresses cancer cell migration and invasion by inhibiting actin polymerization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 443, 511-517, 2014, doi: 10.1016/j.bbrc.2013.11.118 (査読有)

7. Terami, N., Ogawa, D., Tachibana, H., Hatanaka, T., Wada, J., Nakatsuka, A., Eguchi, J., Horiguchi, C.S., Nishii, N., **Yamada, H.**, **Takei, K.**, Makino, H. Long-term treatment with the sodium glucose cotransporter 2 inhibitor, dapagliflozin, ameliorates glucose

homeostasis and diabetic nephropathy in db/db mice. PLoS One, 9, e100777, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0100777 (査読有)

〔学会発表〕(計8件)

1. 山田浩司、小林絹枝、張羽白、竹田哲也、竹居孝二：シャルコマリートゥース病の原因遺伝子の一つであるダイナミン2の変異は細胞の異常なアクチン動態とラメリポディア形成の減少をもたらす、第54回日本生物物理学会年会、つくば国際会議場、2016年11月25-27日
2. 石黒大輝、竹田哲也、小財稔矢、熊谷祐介、脊山佳穂、楊恵然、山田浩司、内橋貴之、安藤敏夫、竹居孝二：高速AFMによるダイナミン1-アンフィファイジン複合体の動態観察、第54回日本生物物理学会年会、つくば国際会議場、2016年11月25-27日
3. 竹田哲也、熊谷祐介、背山佳穂、楊恵然、山田浩司、田岡東、内橋貴之、竹居孝二、安藤敏夫：ダイナミンによる膜切断メカニズムの高速AFMイメージング解析、第53回日本生物物理学会年会、金沢大学、2015年9月13-15日
4. 竹居孝二、阿部匡史、熊谷祐介、宮垣祐志、竹田哲也、内橋貴之、安藤敏夫、山田浩司：GTP加水分解とPKCリン酸化によるダイナミン-コルタクチン複合体の制御、第53回日本生物物理学会年会、金沢大学、2015年9月13-15日
5. 橘洋美、竹田哲也、山田浩司、小川大輔、竹居孝二：腎糸球体ポドサイト分化におけるダイナミンGTPアーゼの役割、第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会、神戸国際会議場、国際展示場、2015年12月1-4日
6. 山田浩司、菊池達也、増本年男、魏范研、阿部匡史、竹田哲也、西木禎一、富澤一仁、渡部昌実、松井秀樹、竹居孝二：成長円錐におけるPKC のコルタクチンリン酸化に

よるアクチン制御の可能性、第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会、神戸国際会議場、神戸国際展示場、2015年12月1-4日

7. 竹居孝二、菊池達也、増本年男、魏范研、阿部匡史、竹田哲也、西木禎一、富澤一仁、渡部昌実、松井秀樹、山田浩司：PKCによるコルタクチンリン酸化は成長円錐のアクチンダイナミクスを制御する、第38回日本神経科学大会、神戸国際会議場、国際展示場、2015年7月28-31日

8. 阿部匡史、山田浩司、竹田哲也、竹居孝二：肺がん細胞株における細胞運動を司るダイナミン2によるアクチン動態制御、第87回日本生化学会大会、国立京都国際会館、グランドプリンスホテル京都、2014年10月15-18日

〔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〕

該当無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

山田 浩司 (YAMADA, Hiroshi)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：80325092

(2)連携研究者

竹居 孝二 (TAKEI, Kohji)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：40322226