

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2011～2015

課題番号：23117008

研究課題名(和文) 共生非依存的に進化したオルガネラによるマトリョーシカ化機構

研究課題名(英文) Matryoshka-type cell configuration by organelles evolved for the parasitism

研究代表者

金子 修 (KANEKO, Osamu)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：50325370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 75,200,000円

研究成果の概要(和文)：マラリア原虫が赤血球を隷属化するマトリョーシカ化発展機構の成立と分子機序を理解するため、赤血球侵入・改変に関わる分泌オルガネラに局在するタンパク質の網羅的同定とオルガネラへのタンパク質輸送機序の解析を行った。熱帯熱マラリア原虫にて赤血球侵入・改変の役割を担う25の新規分子、および、赤血球侵入型原虫の分泌器官への輸送に必要な領域を新たに同定した。また、感染赤血球内に輸送される原虫分子の一つであるSURFINが寄生胞膜を透過し、赤血球内の新規膜構造物マウレル裂に到達するために必要な領域およびSURFINの膜透過を担う分子装置、さらにマウレル裂から赤血球表面への移行に必要な領域を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：For better understanding of the Matryoshka-type cell configuration by organelles evolved for the parasitism in malaria parasites, proteins located in the secretory organelles of the invasive stage of malaria parasites *Plasmodium falciparum* were comprehensively analyzed. To this end, 25 novel molecules were identified and characterized for their importance during the invasion and growth. Analysis of a parasite molecule SURFIN that is expressed on the parasite-infected erythrocyte identified essential regions for the trafficking to the erythrocyte cytosol and Maurer's clefts, nascent membranous structures generated by the parasite in the erythrocyte. The translocon responsible for this trafficking was also identified. In addition, regions required for the translocation from Maurer's clefts to the erythrocyte membrane and exposure on the erythrocyte surface was identified.

研究分野：医歯薬学

キーワード：寄生 原虫 真核細胞 マラリア 赤血球 オルガネラ 細胞侵入 細胞内輸送

1. 研究開始当初の背景

二次共生由来オルガネラという「オルガネラ二重構造」を内部に持つアピコンプレクス門原虫は、さらに真核細胞へ侵入・改変することでマトリョーシカ構造を発展させる。世界的にいまだに問題となっているマラリアを起こす病原体原虫もアピコンプレクス門原虫に属する。マラリア原虫に対する創薬やワクチン開発の研究は広く行われているが、細胞生物学的理解に基づいたものは少ない。マラリア原虫の細胞侵入ステージは、先端部にマイクロネームと呼ばれる分泌オルガネラをもち、膜貫通型細胞接着分子を放出することで宿主細胞に接着する。接着分子が原虫細胞膜直下にある泡室と呼ばれる膜構造を足がかりにして細胞表面を後方へ移動することで原虫は宿主細胞に侵入してゆくと同時に、ロプトリーと呼ばれる分泌オルガネラから宿主細胞を改変する分子を打ち込み、細胞の初期改変を行う。細胞侵入直後からはデンスグラニュールと呼ばれるオルガネラから放出される分子により、宿主細胞内に寄生胞膜やマウレル裂といった新規の膜構造を構築しつつ、原虫の生存に適するように宿主細胞内を大々的に改変する。このように細胞侵入期・改変期、つまり「マトリョーシカ構造化」が起こる時期には様々なイベントが起きるが、その分子機序については、不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では赤血球に侵入・改変して発育するマラリア原虫について、種々の分泌オルガネラに局在するタンパク質の網羅的同定と各オルガネラへの輸送に関わる分子の同定を通じて、細胞侵入と寄生成立を可能とする特殊化された分泌オルガネラの機能と起源を明らかにし、マラリア原虫が赤血球を隷属化するマトリョーシカ化発展機構の成立と分子機序を包括的に理解することを目的とした。

3. 研究の方法

【赤血球侵入に関与する分子の同定と機能解析】

熱帯熱マラリア原虫ゲノムに存在する約5400 遺伝子のうち、網羅的転写解析により、赤血球侵入型原虫のオルガネラ形成が開始される時期に転写が見られる分子125 種を標的として選択し、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系にて組換えタンパク質170 個を作製した。作出した組換えタンパク質170 個のうち、165 個に対して抗体を作製した。一部の原虫タンパク質に対しては、ペプチド抗体を作製した。同定した分子が赤血球を認識する機能があるかどうかを、赤血球への接着能を

測定することで明らかにした。さらに、同定した分子の赤血球侵入への役割を検討するため、作製した抗体を用いて赤血球侵入能を評価した。作製した特異抗体や、組換えマラリア原虫で発現させたエピトープタグ融合タンパク質に対する抗体により、間接蛍光抗体法および免疫電子顕微鏡法により分子局在解析を行った。また、カルシウム濃度を検出するために、蛍光タンパク質バイオマーカーを利用した蛍光顕微鏡法を行った。原虫の細胞侵入過程はタイムラプスイメージングにより解析した。原虫感染赤血球の構造変化を明らかにするために通常の透過型電子顕微鏡法に加えて、走査電子顕微鏡法により連続断面画像を自動取得・再構築する方法を用いた。遺伝子座を誘導的にロックダウンする系を構築するために、種々の遺伝子改変ネズミマラリア原虫 *Plasmodium yoelii* を作製した。

【赤血球改変に関与する分子の同定と機能解析】

感染赤血球内に輸送される原虫分子 SURFIN の輸送モチーフの同定と輸送機構関連分子の同定のため、タグ配列を付与した組換えタンパク質を発現する組換え熱帯熱マラリア原虫を作製した。輸送モチーフは種々の組換えタンパク質局在を間接蛍光抗体法により検討した。また、組換えタンパク質に結合する分子を免疫沈降法と質量分析により、輸送機構関連分子の同定を行った。また、赤血球侵入型原虫のデンスグラニュールに局在し、また赤血球侵入後に寄生胞に局在する分子を超解像度顕微鏡と免疫電子顕微鏡法により同定し、それら分子の組換えタンパク質を用いて Biacore による分子間相互作用解析を行なうことにより新規輸送機構関連分子の同定を行なった。

4. 研究成果

【マラリア原虫の赤血球侵入機構】

熱帯熱マラリア原虫について、メロゾイト期に発現している分子を標的として網羅的に作製した組換えタンパク質を用いて、流行地の熱帯熱マラリア患者の応答を検討することで、赤血球侵入に重要な役割を果たしている分子のランク付けを行った (Richards JS et al. 2013)。これらの組換えタンパク質を用いて作製した抗体を用いて、熱帯熱マラリア原虫メロゾイトの分泌器官であるマイクロネームの分子1種、ロプトリー体部の分子2種、ロプトリー頸部の分子3種を免疫電子顕微鏡法により同定した。これらのうち、赤血球結合能を持つマイクロネーム分子 GAMA、ワクチン候補抗原 AMA1 と複合体を形成するロプトリー体部分子 RON3、赤血球結合能を持ち、メロゾイトが赤血球侵入時に形成される移動接合帯に局在するロプトリー頸部分子 RALP1 について、赤血球から放出前から侵入後にかけての局在、組換えタンパク質

の赤血球結合能、作製した抗体の赤血球侵入阻害効果等に関する評価を終えて論文発表を行った (Arumugam TU et al. 2014; Ito D et al. 2013)。また、マイクロネームタンパク質のEBA175についてマイクロネームに移行するための領域を同定し (Sakura T et al, 2013)、異なる赤血球結合性を示す分子の組み合わせ (EBA175 と RH5) を標的とすることで原虫の赤血球侵入が著しく阻害されることを示した (Ord RL, et al. 2012)。マラリア原虫が赤血球に侵入する際のマイクロネームタンパク質の放出には、細胞内カルシウム濃度の上昇が関与していることが知られており、カルシウムが関与する原虫のシグナル伝達系の解析を行うために、原虫細胞質内カルシウム濃度を鋭敏に検出できる系を確立した (Pandey K et al. 0216)。

ネズミマラリア原虫 *Plasmodium yoelii* を用いた実験では、RON5 と呼ばれる分子がロプトリー類部に局在し、RON2、RON4、AMA1 と複合体を形成していること、赤血球侵入型のメロゾイトのみならず肝細胞侵入型のスポロゾイトにも発現していることを明らかにした。また、ネズミマラリア原虫のメロゾイトを侵入能力を保持したまま精製する方法を確立し、RON5 等の赤血球侵入中の動態を明らかにすることに成功した (Mutungi JK et al. 2014; Mutungi JK et al. 2015)。EBA175 の相同体である EBL の型が宿主免疫応答に影響を及ぼしていることも明らかにした (Pattaradilokrat S et al, 2014)。メロゾイト期発現分子の細胞侵入における役割をより詳細に明らかにするため、*P. yoelii* におけるテトラサイクリンによる誘導性遺伝子発現系の確立を進めた (論文未発表)。ネズミマラリア原虫の増殖を簡便に定量解析ができるアッセイを確立した (Otsuki H et al. 2015)。

三日熱マラリア原虫についても、メロゾイト期発現分子について網羅的に作製した組換えタンパク質に対する特異抗体により、PvRAMA、PvMSP10、PvRhopH2、PvMSP1p、Pv41、Pv12 といった分子の局在を明らかにし、一部の分子には赤血球結合能を有することを初めて明らかにした (Li J et al. 2012; Wang B et al. 2013; Cheng Y et al. 2013a; Cheng Y et al. 2013b; Lu F et al. 2014; Cheng Y et al. 2014)。

【マラリア原虫の赤血球改変機構】

赤血球への輸送モチーフの同定

既知の赤血球への輸送モチーフを持たないにもかかわらず、原虫細胞膜と寄生胞膜の二枚の膜を越えて、原虫から感染赤血球内に輸送される SURFIN と呼ばれる熱帯熱マラリア原虫分子を用いて、未知の輸送機序を明らかにする研究を進めた。その結果、SURFIN の赤血球への輸送には細胞膜貫通領域、N 末端の配列および細胞内領域の一部が必要である事を明らかにした (Zhu et al. 2013)。また、細胞内領域のトリプトファンに富んだ領域が、赤血球内に新たに形成されるマウレル裂

と呼ばれるオルガネラ構造物から、さらに、感染赤血球への移行に必要であることを見出した (Kagaya W et al. 2015)。

また、三日熱マラリア原虫のトリプトファンに富んだタンパク質の一群に対して組換えタンパク質を作製し、局在を検討したところ、これらのタンパク質が本原虫感染赤血球に形成される caveola-vesicle 複合体と呼ばれる膜構造に輸送されていることを示唆する結果を得ることができた (Wang B et al. 2015)。さらに、従来、熱帯熱マラリア原虫に固有と考えられていた赤血球内輸送機序に關与する分子 SBP1 が他のマラリア原虫種にも保存されていることを見出し、サルマラリア原虫 *P. knowlesi* を用いて局在を免疫電子顕微鏡法等にて明らかにした (論文投稿中)。

赤血球細胞質への膜透過装置の同定

感染赤血球内に輸送される原虫分子 SURFIN の細胞内輸送の機序をより明らかにするために、種々のタグを付与した部分組換え SURFIN を作製し、SURFIN が複合体を形成していることを見出した。そのうち、分子量 700 kDa 以上の複合体についてプロテオーム解析を行い、複合体を構成する分子の同定に成功した。その結果、既知のトランスロコンの構成分子が検出され、SURFIN も本トランスロコンを利用して輸送されていることが示唆された。また、従来、輸送に關与することが知られていなかった分子について特異抗体により、組換え SURFIN との結合が確認された (論文未発表)。

熱帯熱マラリア原虫メロゾイトのデンスグラニール分子 19 種を免疫電子顕微鏡法により同定した。これらのうち、PV1 と呼ばれる分子に着目し、感染赤血球内における PV1 と PTEX 構成分子の 1 種である EXP2 の局在を、共焦点レーザー顕微鏡の 2 倍の分解能を誇る超解像顕微鏡を用いて解析した。その結果、PV1 と EXP2 は両方とも寄生胞に局在が見られたが、PV1 と EXP2 は共局在しなかった。次に、PV1 抗体による原虫ライセートの免疫沈降の結果、PV1 と相互作用するタンパク質を 3 種同定し、そのうちの 2 種が赤血球内へ輸送されている分子であった。さらに、これらの組換えタンパク質をコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて作製し、Biacore を用いた分子間相互作用解析を行った結果、PV1 は赤血球内輸送タンパク質と直接結合した。以上の結果から、PV1 は原虫から赤血球内へのタンパク質輸送に關与する分子の一つであり、かつ PTEX を構成する分子ではないことが示唆された。すなわち PV1 は PTEX による膜透過とは異なる、未同定のタンパク質輸送機構に關連した分子である可能性を示している (論文未発表)。

【マラリア原虫の進化】

ヒトに感染する三日熱マラリア原虫の近縁種であるサルマラリア原虫 *Plasmodium*

cynomolgi の全ゲノム配列を決定し、マラリア原虫の細胞侵入や細胞改変にかかわる遺伝子群の進化を理解するための基盤を提供した (Tachibana S et al. 2012)。また、偶蹄類寄生性のマラリア原虫の全ミトコンドリアゲノム配列を世界で初めて明らかにし、マラリア原虫の進化に新しい視点を与えた (Templeton TJ et al. 2016a; Templeton TJ et al. 2016b)。

【その他】

蚊ステージのマラリア原虫の増殖や、蚊からヒトが感染する際に重要な役割を果たす分子および、それらを標的とする分子を見出した (Tachibana M et al. 2015; Kapulu MC et al. 2015; Feng H et al. 2015; Kangwanransan N et al. 2013; Mathias DK et al. 2013; Arakawa T et al. 2014; Aguiar JC et al. 2015)。また、マラリア原虫と同じアピコンプレクス門に属するバベシア原虫にて、遺伝子導入の系を開発し、細胞侵入・改変機序の解析を行う基盤を整えた (Adasa M et al. 2015; Hakimi H et al. 2016)。

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 37 件)

- (1) Pandey K, Ferreira PE, Ishikawa T, Nagai T, Kaneko O, Yahata K. Ca²⁺ monitoring in *Plasmodium falciparum* using the yellowameleon-Nano biosensor. *Sci Rep* 6:23454 (2016) doi: 10.1038/srep23454. 査読有
- (2) Templeton TJ, Asada M, Jiratanh M, Ishikawa SA, Tiawsirisup S, Sivakumar T, Namangala B, Takeda M, Mohkaew K, Ngamjituea S, Inoue N, Sugimoto C, Inagaki Y, Suzuki Y, Yokoyama N, Kaewthamasorn M, Kaneko O. Ungulate malaria parasites. *Sci Rep* 6:23230 (2016) doi: 10.1038/srep23230. 査読有
- (3) Mutungi JK, Yahata K, Sakaguchi M, Kaneko O. Isolation of invasive *Plasmodium yoelii* merozoites with a long half-life to evaluate invasion dynamics and potential invasion inhibitors. *Mol Biochem Parasitol* 204(1):26-33 (2015) doi: 10.1016/j.molbiopara.2015.12.003. 査読有
- (4) Kagaya W, Miyazaki S, Yahata K, Ohta N, Kaneko O. The cytoplasmic region of *Plasmodium falciparum* SURFIN_{4.2} is required for transport from Maurer's clefts to the red blood cell surface. *Trop Med Health* 43(4):265-272 (2015) doi: 10.2149/tmh.2015-38. 査読有
- (5) Mutungi JK, Yahata K, Sakaguchi M, Kaneko O. Expression and localisation of rhoptry neck protein 5 in merozoites and sporozoites of *Plasmodium yoelii*. *Parasitol Int* 63(6):794-801 (2014) doi: 10.1016/j.parint.2014.07.013. 査読有
- (6) Arumugam TU, Ito D, Takashima E, Tachibana M, Ishino T, Torii M, Tsuboi T. Application of wheat germ cell-free protein expression system for novel malaria vaccine candidate discovery. *Expert Rev Vaccines* 13(1):75-85 (2014) doi: 10.1586/14760584.2014.861747. 査読有
- (7) Ito D, Hasegawa T, Miura K, Yamasaki T, Arumugam TU, Thongkukiatkul A, Takeo S, Takashima E, Sattabongkot J, Han ET, Long CA, Torii M, Tsuboi T. RALP1 is a rhoptry neck erythrocyte-binding protein of *Plasmodium falciparum* merozoites and a potential blood-stage vaccine candidate antigen. *Infect Immun* 81(11):4290-8 (2013) doi: 10.1128/IAI.00690-13. 査読有
- (8) Zhu XT, Yahata K, Alexandre JSF, Tsuboi T, Kaneko O. The N-terminal segment of *Plasmodium falciparum* SURFIN_{4.1} is required for its trafficking to the red blood cell cytosol through the endoplasmic reticulum. *Parasitol Int* 62(2):215-29 (2013) doi: 10.1016/j.parint.2012.12.006. 査読有
- (9) Sakura T, Yahata K, Kaneko O. The upstream sequence segment of the C-terminal cysteine-rich domain is required for microneme trafficking of *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen 175. *Parasitol Int* 62(2):157-64 (2013) doi: 10.1016/j.parint.2012.12.002. 査読有
- (10) Tachibana S, Sullivan SA, Kawai S, Nakamura S, Kim HR, Goto N, Arisue N, Palacpac NMQ, Honma H, Yagi M, Tougan T, Katakai Y, Kaneko O, Mita T, Kita K, Yasutomi Y, Sutton PL, Shakhbatyan R, Horii T, Yasunaga T, Barnwell JW, Escalante AA, Carlton JM, Tanabe K. *Plasmodium cynomolgi* genome sequences provide insight into *Plasmodium vivax* and the monkey malaria clade. *Nat Genet* 44(9):1051-5 (2012). doi: 10.1038/ng.2375. 査読有

〔学会発表〕(計 115 件)

- (1) Miyazaki S, Kagaya W, Yahata K, Ohta N, Kaneko O. The tryptophan-rich domain of *Plasmodium falciparum* SURFIN_{4.2} is required for its transport from Maurer's clefts to the surface of red blood cell. *Molecular Approach to Malaria 2016*. Lorne, Austraria (2016 Feb 21-25)
- (2) Pandey K, Ferreira PE, Ishikawa T, Kaneko O, Yahata K. Ca²⁺ monitoring in

- Plasmodium falciparum* using the yellowameleon-Nano biosensor. *U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program (USJCMSP)*. Bethesda, USA (2016 Jan 13-14) (招待)
- (3) Kaneko O. Evaluation of Ca²⁺ Oscillation in *Plasmodium falciparum* through Yellow Cameleon-Nano Biosensors. *The 12th NUS-Nagasaki Joint Symposium*. Singapore (2015 Jun 11-12) (招待)
- (4) Tsuboi T. "WGCFS: an innovative technology for post-genome malaria vaccine research. *25th Annual Molecular Parasitology/Vector Biology Symposium*. Athens, USA (2015 April 28-29) (招待)
- (5) Tsuboi T., Kanoi BN, Egwang TG, Horii T. An integrated approach to tackling malaria in Uganda with special reference to novel malaria vaccine candidate discovery. *E-JUST 2nd International Conference on Innovative Engineering*. Alexandria, Egypt (2015 May 19-21) (招待)
- (6) Tsuboi T. Pre-erythrocytic vaccines for malaria elimination. *Malaria R&D in a Time of Global Partnerships*. The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan (2015 June 26) (招待)
- (7) Tsuboi T., Takashima E, Ito D, Feng Lu, Cheng Y, Han ET. Wheat germ cell-free protein synthesis system (WGCFS): a breakthrough for the post-genome vivax malaria research. *13th International Congress of Parasitology*. Mexico City, Mexico (2014 August 10-15) (招待)
- (8) Kaneko O. Recognition and invasion of erythrocytes by malaria parasites. International Sessions "Biochemistry toward malaria control". *The 86th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society*. Pacifico Yokohama, Yokohama, Kanagawa, Japan (2013 Sep 11 - 13)
- (9) Tsuboi T. Application of cell-free protein synthesis technology for production of malaria protein. *Cell-Free Protein Synthesis Workshop*. Bangkok, Thailand (2012 June 25-27) (招待)
- (10) Zhu X, Yahata K., Alexandre JSF, Kaneko O. Recombinant *Plasmodium falciparum*

SURFIN_{4,1} protein is exported to the parasite-infected red blood cell. *Joint International Tropical Medicine meeting 2011*. Bangkok, Thailand (2011 December 1-2) (Prof. Sornchai Looareesuwan Foundation Award 受賞)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.matryoshka-evolution.jp/>

<http://www.tm.nagasaki-u.ac.jp/protozoology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 修 (KANEKO, Osamu)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：50325370

(2) 研究分担者

坪井 敬文 (TSUBOI, Takafumi)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授

研究者番号：00188616

(3) 連携研究者

矢幡 一英 (YAHATA, Kazuhide)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：40467965

坂口 美亜子 (SAKAGUCHI, Miako)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：50400651

(4) 研究協力者

麻田 正仁 (ASADA, Masahito)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

宮崎 真也 (MIYAZAKI, Shinya)

長崎大学・熱帯医学研究所・特任研究員

伊藤 大輔 (ITO, Daisuke)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・博士研究員