

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08444

研究課題名(和文) サルマラリア原虫が感染したヒト赤血球の微細構造と接着能の解析

研究課題名(英文) Ultrastructure and cytoadhesion of Plasmodium knowlesi-infected red blood cells

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：サルマラリア原虫 *Plasmodium knowlesi* が感染したサル及びヒト赤血球の微細構造を解析した結果、それぞれの *P. knowlesi* 感染赤血球において原虫や赤血球内に形成される膜状構造の形態は類似しており、構造の相違は見られないことが分かった。
また、*P. knowlesi* 感染のサル赤血球とヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) との結合アッセイにより強い接着反応を示す *P. knowlesi* 原虫集団を選択することができたため、トランスクリプトーム解析により非接着性原虫集団との比較を行ったところ、接着性原虫集団において特異的な発現を示す SICAv1 遺伝子断片を同定することができた。

研究成果の概要(英文)：Electron microscopy demonstrated that the ultrastructure of *P. knowlesi*-infected human red blood cell (RBC) was similar to that of monkey red blood cell, and there was no structural difference between the iRBCs.
Next *P. knowlesi*-infected monkey RBCs were panned with Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs), and cytoadherent *P. knowlesi* parasites were obtained. Transcriptome analysis of the obtained parasite line with high binding activity and non-binding parasites clearly indicated that two Schizont Infected Cell Agglutination (SICA) variant protein fragments were specifically and highly expressed in the binding parasite population only, whereas no other molecules were differentially transcribed.

研究分野：原虫学

キーワード：サルマラリア 感染赤血球 接着現象

1. 研究開始当初の背景

サルマラリア原虫の一種である *Plasmodium knowlesi* はヒトに自然感染する人獣共通感染性のマラリア原虫であることが2004年より東南アジアの広範囲で報告されており、通常は低いヒト感染率を示す *P. knowlesi* だが地域によってはその感染率は高く重篤化し死に至る例が報告されている。また、*P. knowlesi* は感染赤血球表面に SICAvAr と呼ばれる接着分子を発現することも知られているが、ヒトに感染した場合に宿主の血管内皮細胞に対して接着能を有するのか明らかではない。現在では *P. knowlesi* は第五番目のヒトマラリア原虫として提唱されており、ヒトへの感染能や病原性、症状の重篤化のメカニズムを解明することの必要性が急速に高まりつつある。

2. 研究の目的

研究背景をもとに、*P. knowlesi* が感染したサル赤血球とヒト赤血球の微細構造についてどのような類似あるいは相違があるのか、またヒトの血管内皮細胞に対する接着能の有無を明らかにし、サルマラリア原虫がヒト感染においても接着現象を起こしうるのか否かを解明することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

まず初めに、*P. knowlesi* についてサル赤血球及びヒト赤血球を材料として長期的な *in vitro* 培養が可能かどうかを調べた。そしてそれぞれの赤血球に感染した *P. knowlesi* の微細構造を比較するため、感染赤血球をグルタルアルデヒド及び四酸化オスmium固定後に脱水と樹脂包埋してブロックを作製し、透過型電子顕微鏡を用いて観察を行った。

また、*P. knowlesi* 感染赤血球の接着現象に関与し接着能を有すると考えられる SICAvAr は多数のコピーが存在するため、接着現象に直接関与する SICAvAr 分子を特定するためにヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に対する *P. knowlesi* 感染したサル赤血球の結合アッセイを行った。

そして、アッセイで得られた接着性の原虫集団とアッセイ前の非接着性の原虫集団について遺伝子発現を比較し接着に関わる SICAvAr あるいは他の候補分子を特定するため、RNA-seq により遺伝子配列を決定し、トランスクリプトーム解析を行った。

4. 研究成果

P. knowlesi のサル赤血球及びヒト赤血球による長期的な *in vitro* 培養を行ったところ、いずれの場合も継続的に長く培養することが可能であり、原虫の増殖もそれぞれの赤血球において安定していた。そして透過型電子顕微鏡による観察の結果、それぞれの感染赤血球について *P. knowlesi* や赤血球内部に形成された原虫由来の膜構造及び表面に形成され

た同じく原虫由来のカベオラと呼ばれる特徴的な凹状構造の様子など形態は類似しており、サル及びヒト赤血球の間で微細構造の相違は見られないことが分かった(図 1a, 1b)。

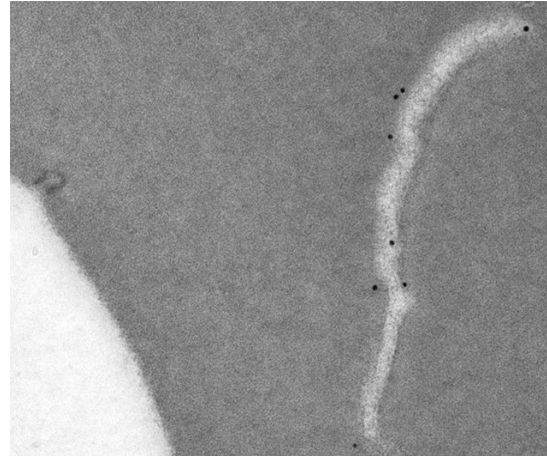


図 1a . *P. knowlesi* が感染したサル赤血球。赤血球内に膜構造、表面にカベオラが見える。

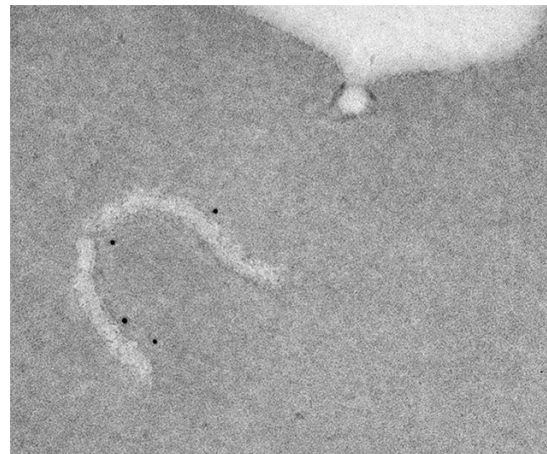


図 1b . *P. knowlesi* が感染したヒト赤血球。サル赤血球の場合と同様、赤血球内に膜構造、表面にカベオラが見える。

次に接着現象に直接関与する SICAvAr 分子を特定するため、サル赤血球に感染した *P. knowlesi* の HUVEC に対する結合アッセイを繰り返し行ったところ、HUVEC に強い接着反応を示す原虫集団を得ることができた(図 2)。

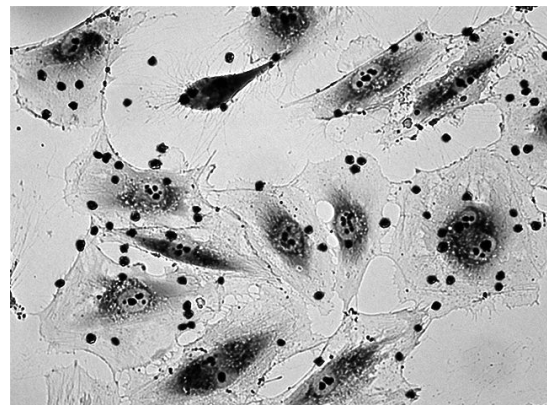


図 2 . *P. knowlesi* 感染赤血球が HUVEC に接着する様子。

そこでアッセイで得られた接着性の原虫集団とアッセイ前の非接着性の原虫集団について遺伝子発現を比較し接着に関わる SICAvAr あるいは他の候補分子を特定するため、まずそれぞれを同調させて大量培養した後細胞を回収し、RNA の精製をした。そして mRNA を取得後にライブラリを作製し、RNA-seq により遺伝子配列を決定した後トランスクリプトーム解析を行ったところ、非接着性の原虫集団と比較して接着性の原虫集団において約 200-500 倍に転写量が増えている二つの SICAvAr 遺伝子断片を同定することができた。また他の分子については、特異的な遺伝子発現は見られなかった(図3)。

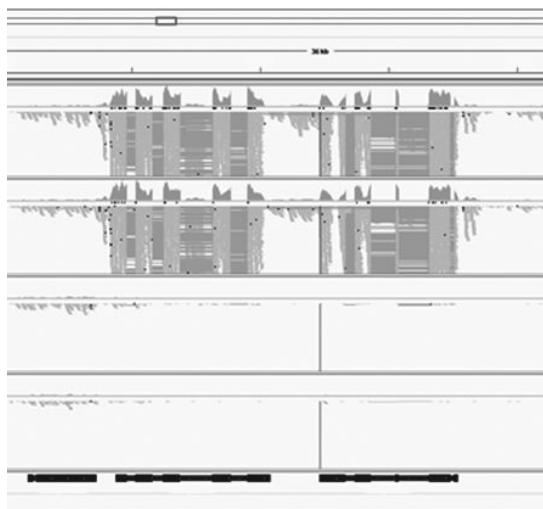


図3. リング前期の接着性原虫集団(上段二つ)と非接着性原虫集団(下段二つ)のトランスクリプトーム解析の結果。接着性原虫集団において、二つの SICAvAr 断片が特異的に発現している様子を示している。

以上、これらの結果から *P. knowlesi* が感染したサル赤血球とヒト赤血球の微細構造について相違は見られないこと、また *P. knowlesi* が感染したサル赤血球はヒト血管内皮細胞に対して接着反応を示すこと、そしてその接着現象には二つの SICAvAr 遺伝子断片が関与している可能性があることが明らかとなった。

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8件)

Iyori M, Yamamoto DS, Sakaguchi M, Mizutani M, Ogata S, Nishiura H, Tamura T, Matsuoka H, Yoshida S. DAF-shielded baculovirus-vectored vaccine enhances protection against malaria sporozoite challenge in mice. *Malaria Journal* 16: 390 (2017). 査読有
DOI: 10.1186/s12936-017-2039-x

Kodama Y, Kuramoto H, Mieda Y, Muro T, Nakagawa H, Kurosaki T, Sakaguchi M, Nakamura T, Kitahara T, Sasaki H. Application

of biodegradable dendrigraft poly-L-lysine to a small interfering RNA delivery system. *Journal of Drug Targeting* 25: 49-57 (2017). 査読有
DOI: 10.1080/1061186X.2016.1184670.

Lucky BA, Sakaguchi M, Kataikai Y, Kawai S, Yahata K, Templeton TJ, Kaneko O. *Plasmodium knowlesi* Skeleton-Binding Protein 1 localizes to the 'Sinton and Mulligan' stipplings in the cytoplasm of monkey and human erythrocytes. *PLoS ONE* 11: e0164272 (2016). 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0164272.

Ebine K, Hirai M, Sakaguchi M, Yahata K, Kaneko O, Saito-Nakano Y. *Plasmodium* Rab5b is secreted to the cytoplasmic face of the tubovesicular network in infected red blood cells together with N-acylated adenylate kinase 2. *Malaria Journal* 15: 323 (2016). 査読有
DOI: 10.1186/s12936-016-1377-4.

Tamura T, Kawabata C, Matsushita S, Sakaguchi M, Yoshida S. Malaria sporozoite protein expression enhances baculovirus-mediated gene transfer to hepatocytes. *Journal of Gene Medicine* 18: 75-85 (2016). 査読有
DOI: 10.1002/jgm.2879.

Shimada S, Aoki K, Nabeshima T, Fuxun Y, Kurosaki Y, Shioyama K, Onouchi T, Sakaguchi M, Fuchigami T, Ono H, Nishi K, Posadas-Herrera G, Uchida L, Takamatsu Y, Yasuda J, Tsutsumi Y, Fujita H, Morita K, Hayasaka D. Tofla virus: A newly identified *Nairovirus* of the Crimean-Congo hemorrhagic fever group isolated from ticks in Japan. *Scientific Reports* 6: 20213 (2016). 査読有
DOI: 10.1038/srep20213.

Sakaguchi M, Miyazaki N, Fujioka H, Kaneko O, Murata K. Three-dimensional analysis of morphological changes in the malaria parasite infected red blood cell by serial block-face scanning electron microscopy. *Journal of Structural Biology* 193: 162-171 (2016). 査読有
DOI: 10.1016/j.jsb.2016.01.003.

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. *Molecular and Biochemical Parasitology* 204: 26-33 (2015). 査読有
DOI: 10.1016/j.molbiopara.2015.12.003.

[学会発表](計2件)

坂口美亜子, Amuza Byaruhanga Lucky, 山岸潤也, 片貝祐子, 川合覚, 金子修. 血管内皮細胞への接着に関わる *Plasmodium knowlesi* 感染赤血球表面分子の同定, 第 87 回日本寄生虫学会大会, 2018 年, 国立国際医療研究センター(東京都・新宿区)

坂口美亜子, Amuza Byaruhanga Lucky, 山岸潤也, 片貝祐子, 川合覚, 金子修. *Plasmodium knowlesi* 感染赤血球のヒト血管内

皮細胞への接着能力、第 86 回日本寄生虫学会大会、2017 年、北海道大学（北海道・札幌市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（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：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

川合 覚 (KAWAI, Satoru)
獨協医科大学・医学部・教授
研究者番号：70275733

(3)連携研究者

金子 修 (KANAKO, Osamu)
長崎大学・熱帯医学研究所・教授
研究者番号：50325370

村田 和義 (MURATA, Kazuyoshi)
生理学研究所・脳機能計測・支援センター・
准教授
研究者番号：20311201