

令和元年6月20日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08448

研究課題名(和文) マラリア原虫における赤血球密着接合分子の機能解析

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of erythrocyte invasion by malaria parasites

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マラリア原虫は赤血球侵入型原虫(メロゾイト)が赤血球へ侵入することで宿主に寄生し、発熱、貧血といった症状を引き起こす。本研究はメロゾイトの赤血球侵入のうち、赤血球侵入に必要な原虫分子である、AMA1-RON複合体の形成過程について光学的手法を用いて詳細に解析した。本研究により作成したAMA1ノックアウト熱帯熱マラリア原虫を用いることにより、AMA1は赤血球侵入において赤血球侵入前に起こる赤血球変形に関与せず、赤血球との密着接合に関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AMA1はマラリアワクチン候補抗原の一つであり、今回の成果によりマラリア原虫メロゾイトが赤血球に侵入する際にAMA1が赤血球侵入過程のどの場所で機能しているのかを詳細に明らかにすることが出来た。今後、AMA1-RON複合体を形成するRON2、RON4、RON5などの他の赤血球侵入分子の機能解析も進め、機能領域を明らかにすることで、新たなワクチン標的部位や複合体を阻害する薬剤の開発に貢献することが出来る。

研究成果の概要(英文)：The pathology of malaria is caused by asexual stage parasite proliferation in erythrocytes. This amplification cycle involves merozoite release from infected erythrocytes followed by invasion of and growth within new erythrocytes. The essential steps of erythrocyte invasion are mediated by molecular mechanisms which are potential targets for the prevention and treatment of malaria. In this study, we generate conditional apical membrane antigen 1 (AMA1) knockout *Plasmodium falciparum* parasites and show that AMA1 is not involved in erythrocyte deformation immediately prior to erythrocyte internalisation, but is associated with the formation of the tight junction between the merozoite and the erythrocyte.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア 赤血球侵入 メロゾイト

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

マラリアは世界で 100 カ国以上において流行し、年間の感染者は 2 億人、死者数は 43 万人を出す重篤な感染症である。マラリアを引き起こすマラリア原虫は赤血球に侵入し宿主に寄生するため、赤血球侵入に関わるマラリア原虫分子は創薬やワクチンの標的候補となる。しかしながら、原虫分子の組換えタンパク質を抗原として使用するという従来の単純なワクチン開発戦略の行き詰まりから、候補分子の生物学的機能を明らかにすることが必要であると考えられるようになってきている。近年、マラリア原虫の赤血球侵入時の様子が可視化できるようになってきたことから、赤血球侵入時に使われる原虫分子が赤血球侵入のどの段階で働くのかが分かるようになってきた。

### 2. 研究の目的

マラリア原虫は赤血球侵入型原虫(メロゾイト)が赤血球へ侵入し宿主に寄生する。メロゾイトは赤血球に RON と呼ぶ原虫分子群を挿入し、メロゾイト表面に発現する AMA1 と呼ぶ分子との間で形成される複合体により原虫膜と赤血球膜を架橋することで、赤血球内に侵入する。本複合体の形成を阻害すると侵入が阻害されるため、本研究は AMA1-RON 複合体形成の過程を詳細に解析することで、メロゾイトの赤血球侵入を阻害する新たな切り口を見出すことができると考えた。本研究では、AMA1-RON 複合体をコンディショナルにノックアウトし、赤血球侵入前後での各分子の経時的局在変化と複合体形成の有無等を検討することで、AMA1-RON 複合体を構成する各分子の機能を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

マラリア原虫が赤血球侵入時に形成する AMA1-RON 複合体の分子、AMA1、RON2、RON4、RON5 について以下の方法により機能解析をおこなった。

- (1) AMA1-RON がいつ複合体を形成しているのか、分裂体から赤血球侵入時までのマラリア原虫について各段階ごとに生化学的、また光学的手法で複合体形成の時期を明らかにした。
- (2) 薬剤による一過性誘導により、AMA1-RON 複合体を形成する分子をノックアウトし、メロゾイト形成と放出、さらには赤血球侵入を左右するメロゾイトの形態変化と赤血球侵入までの挙動を解析することで、AMA1-RON 複合体を形成する各分子が、メロゾイト形成から赤血球侵入までのどの段階で必要とされるのかを明らかにした。

### 4. 研究成果

本研究において、以下の成果を得た。これらによりマラリア原虫の赤血球侵入に関する原虫分子の機能およびその機能を阻害するための基礎情報を集積することが出来た。

- (1) メロゾイトの赤血球侵入現象を効率良く解析するため、ネズミマラリア原虫を用いた精製法を確立し、さらに感染力を維持したメロゾイトを精製する方法を開発した(論文 11)
- (2) 赤血球侵入時に関わるカルシウムの局在と濃度を測定するため、カルシウムセンサーとして Yellow Cameleon-Nano をマラリア原虫に導入し、カルシウムセンサーの有効性を実証した(論文 9)。
- (3) ネズミマラリア原虫の赤血球侵入分子の一つである RON5 が赤血球侵入時に AMA1-RON 複合体と共局在を示さないことを超解像度顕微鏡で見出した。これは他のアピコンプレクサ原虫であるトキソプラズマ原虫をモデルとした、宿主細胞へ打ち込まれた RON 複合体と原虫側の AMA1 を介した宿主細胞侵入機構とは異なるモデルが提唱された。
- (4) マラリア原虫感染赤血球からの原虫放出時に起こるメカニズムを明らかにし、原虫放出の阻害剤へと発展させるために、温度変化によりマラリア原虫の放出のタイミングをコントロールすることに成功した。
- (5) ラバマイシン誘導型の Dimerisable Cre-recombinase (DiCre)発現熱帯熱マラリア原虫を用い、必須遺伝子である AMA1 についてコンディショナルノックアウト原虫の作成に成功した。
- (6) AMA1 ノックアウト熱帯熱マラリア原虫により、AMA1 は赤内期において赤血球侵入前に起こる赤血球変形に関与しないが、その後の赤血球侵入時に関与することを明らかにした。細胞外領域のみの AMA1 を発現する原虫で赤血球の棘状化を示したことから、AMA1 の細胞外領域は RON 複合体を形成し、赤血球と密着接合を形成すること、またその後の赤血球への侵入が行なわれなかったことから、AMA1 は細胞内領域が原虫のアクトミオシン複合体と結合している可能性を示唆した。
- (7) 蚊のステージでの AMA1 ノックアウト熱帯熱マラリア原虫により、AMA1 は生殖体形成には関与しないが、その後中腸にて形成されるオーシストが形成されないことを示した。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 15 件)

1. Kegawa Y, Asada M, Ishizaki T, Yahata K, Kaneko O. Critical role of Erythrocyte Binding-Like protein of the rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii* to establish an irreversible connection with the erythrocyte during invasion. *Parasitol Int.* 67(6):706-714 (2018) 査読有

2. Ishikawa T, Mizuta S, Kaneko O, [Yahata K](#). Fragment Molecular Orbital Study of the Interaction between Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase and its Inhibitor Thapsigargin toward Anti-Malarial Development. *J Phys Chem B*. 122(33):7970-7977 (2018) 査読有
3. Asare KK, Sakaguchi M, Lucky AB, Asada M, Miyazaki S, Katakai Y, Kawai S, Song C, Murata K, [Yahata K](#), Kaneko O. The Plasmodium knowlesi MAHRP2 ortholog localizes to structures connecting Sinton Mulligan's clefts in the infected erythrocyte. *Parasitol Int*. 67(4):481-492 (2018) 査読有
4. Kijogi C, Kimura D, Bao LQ, Nakamura R, Chadeka EA, Cheruiyot NB, Bahati F, [Yahata K](#), Kaneko O, Njenga SM, Ichinose Y, Hamano S, Yui K. Modulation of immune responses by Plasmodium falciparum infection in asymptomatic children living in the endemic region of Mbita, western Kenya. *Parasitol Int*. 67(3):284-293 (2018) 査読有
5. [矢幡一英](#). 「マラリア原虫の赤血球侵入と放出の分子メカニズム」細胞, 49(14):40-43 (2017) 査読無
6. Abkallo HM, Martinelli A, Inoue M, Ramaprasad A, Xangsayarath P, Gitaka J, Tang J, [Yahata K](#), Zoungrana A, Mitaka H, Acharjee A, Datta PP, Hunt P, Carter R, Kaneko O, Mustonen V, Illingworth CJR, Pain A, Culleton R. Rapid identification of genes controlling virulence and immunity in malaria parasites. *PLoS Pathog*. 13(7):e1006447 (2017) 査読有
7. Gitaka JN, Takeda M, Kimura M, Idris ZM, Chan CW, Kongere J, [Yahata K](#), Muregi FW, Ichinose Y, Kaneko A, Kaneko O. Selections, frameshift mutations, and copy number variation detected on the surf (4.1) gene in the western Kenyan Plasmodium falciparum population. *Malar J*. 16(1):98 (2017) 査読有
8. [矢幡一英](#), 外川祐人, 金子修. 「マラリアの現状：薬剤耐性とワクチン開発」臨床と研究, 93(12): 1571-1575 (2016) 査読無
9. Lucky AB, Sakaguchi M, Katakai Y, Kawai S, [Yahata K](#), Templeton TJ, Kaneko O. Plasmodium knowlesi Skeleton-Binding Protein 1 Localizes to the 'Sinton and Mulligan' Stippings in the Cytoplasm of Monkey and Human Erythrocytes. *PLoS One*. 11(10):e0164272 (2016) 査読有
10. 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. *Malar J*. 15:323 (2016) 査読有
11. Pandey K, Ferreira PE, Ishikawa T, Nagai T, Kaneko O, [Yahata K](#). Ca<sup>2+</sup> monitoring in Plasmodium falciparum using the yellowameleon-Nano biosensor. *Sci Rep* 6:23454 (2016) 査読有
12. Kagaya W, Miyazaki S, [Yahata K](#), Ohta N, Kaneko O. The Cytoplasmic Region of Plasmodium falciparum SURFIN4.2 Is Required for Transport from Maurer's Clefts the Red Blood Cell Surface. *Trop Med Health*. 43(4):265-72 (2015) 査読有
13. 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) 査読有
14. Kato K, [Yahata K](#), Gopal Dhoubhadel B, Fujii Y, Tachibana H. Novel hemagglutinating, hemolytic and cytotoxic activities of the intermediate subunit of Entamoeba histolytica lectin. *Sci Rep*. 5:13901 (2015) 査読有
15. Asada M, [Yahata K](#), Hakimi H, Yokoyama N, Igarashi I, Kaneko O, Suarez CE, Kawazu S. Transfection of Babesia bovis by Double Selection with WR99210 Blasticidin-S and Its Application for Functional Analysis of Thioredoxin Peroxidase-1. *PLoS One*. 10(5):e0125993 (2015) 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

1. [Yahata K](#), Asada M, Kaneko O. Evaluation methods for parasite egress inhibition for Plasmodium falciparum. 14th ICOPA. 2018 年
2. [Yahata K](#), Asada M, Kaneko O. Molecular signaling during RBC invasion by malaria parasites. Forum Cheju-20 (Trends in Parasitology in Korea and Japan). 2018 年
3. [Yahata K](#), Asada M, Kaneko O. Evaluation methods for parasite egress inhibition for Plasmodium falciparum. 14th ICOPA. 2018 年
4. [Yahata K](#), Pandey K, Ferreira PE, Ishikawa T, Kaneko O. Ca<sup>2+</sup> monitoring in Plasmodium falciparum cytosol through yellowameleon-Nano biosensor. Japan-Brazil Malaria Workshop. 2017 年
5. [矢幡一英](#), 麻田正仁, 金子修. 熱帯熱マラリア原虫のメロゾイト放出における阻害評価法の確立. 第 86 回日本寄生虫学会大会. 2017 年
6. [矢幡一英](#), Mutungi JK, 坂口美亜子, 金子修. ローデントマラリア原虫のメロゾイト精製法と赤血球侵入機構の解明. 第 72 回日本寄生虫学会西日本支部大会. 2016 年

7. 矢幡一英, Kishor Pandey, Pedro Ferreira, 石川岳志, 金子修. マラリア原虫のカルシウム調節機構の解明. 第 24 回分子寄生虫学ワークショップ&第 14 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会. 2016 年
8. Yahata K, Pandey K, Ferreira PE, Ishikawa T, Kaneko O. Ca<sup>2+</sup> monitoring in Plasmodium falciparum using the yellowameleon-Nano biosensor. Molecular Approaches to Malaria 2016. 2016 年
9. Yahata K, Pandey K, Ferreira PE, Ishikawa T, Kaneko O. Ca<sup>2+</sup> monitoring in Plasmodium falciparum through yellowameleon-Nano biosensor. Protein Island Matsuyama International Symposium 2015. 2015 年
10. Yahata K, Pandey K, Ferreira PE, Ishikawa T, Kaneko O. Ca<sup>2+</sup> monitoring in Plasmodium falciparum through yellowameleon-Nano biosensor. The 14th Awaji International Forum on Infection and Immunity. 2015 年
11. Yahata K, Calcium monitoring in Plasmodium falciparum through Yellow Cameleon-Nano Biosensors. The 1st Infectious Disease Imaging Symposium. 2015 年

〔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.tm.nagasaki-u.ac.jp/protozoology/>

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者：なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：金子 修

ローマ字氏名：KANEKO, Osamu

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。