

令和元年6月24日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08450

研究課題名(和文)「格子状の局在」と内膜複合体分子から解析するマラリア原虫生殖母体の細胞骨格

研究課題名(英文) Coil-like structure in Plasmodium gametocyte : IMC molecules involved in the unknown cytoskeleton?

研究代表者

竹尾 暁 (Takeo, Satoru)

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号：40302666

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)：本研究の目的は、マラリア原虫の有性生殖期生殖母体細胞の周縁に格子状の局在が学界で報告された内膜複合体IMCの関連分子、本研究の代表者らが見出した生殖母体の格子状分子、生殖母体では未報告未解析のIMC関連分子、を併せて解析し、生殖母体細胞の骨格形成と変化に關与する分子群を同定することであった。

動物抗血清の調製が完了した分子について、固定したマラリア原虫細胞における発現を解析した。標識化分子によるマラリア原虫内の発現解析、および変異分子導入原虫の解析については、いずれも、マラリア原虫に導入するプラスミドコンストラクトの調製まで進捗した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

21世紀の現在でも全世界で年間推定50万人前後が亡くなる病気マラリアの対策、という視点からみると、マラリア原虫の生活環上で、迂回経路がないヒト赤血球内の生殖母体期は、流行地の感染サイクルを断ち切る抗マラリア薬やワクチンの標的になりうる。この時期に発現する分子群は、薬の標的分子やワクチン構成分子の候補といえる。これに資する分子を、今後の進捗と併せて同定する。

研究成果の概要(英文)：Some molecules reported to be Inner Membrane Complex (IMC) proteins and others stand out in plasmodial gametocyte cells, showing coil-like structure. These and other IMC molecules can collectively form unknown cytoskeleton in the sexual stage in mammalian hosts. Following 3 questions were raised to analyse the molecules: 1. Any interacting partner molecules? 2. How unexamined molecules behave in gametocyte? 3. Any change in phenotype if the molecule(s) of interacting molecules are deleted? The antibodies raised against some previously unexamined molecules on fixed gametocyte cells show coil-like structure.

研究分野：分子寄生虫学

キーワード：マラリア原虫

1. 研究開始当初の背景

単細胞の寄生生物 マラリア原虫属 *Plasmodium* spp. は、その生活環において ヒト赤血球内 / 肝細胞内 / 蚊の中腸基底膜 (図1) で宿主細胞への侵入をとまなう無性増殖生殖を行う。このとき原虫細胞膜直下に膜小胞状の器官 内膜複合体 (Inner Membrane Complex: IMC) が現れる。この無性生殖期マラリア原虫の IMC に関連するとされる複数の分子のうちの一つが、原虫生活環の有性生殖期、すなわち赤血球内から吸血を経てハマダラカ体内へ移行する時期の、生殖母体と称する細胞 (図1参照) でも発現すると報告された。しかも、この報告によれば、細胞内での局在は無性生殖期と異なり、生殖母体細胞の周縁部に格子状/コイル状に局在するという (図2) (Mol Biol Evol 2012;29:2113)。

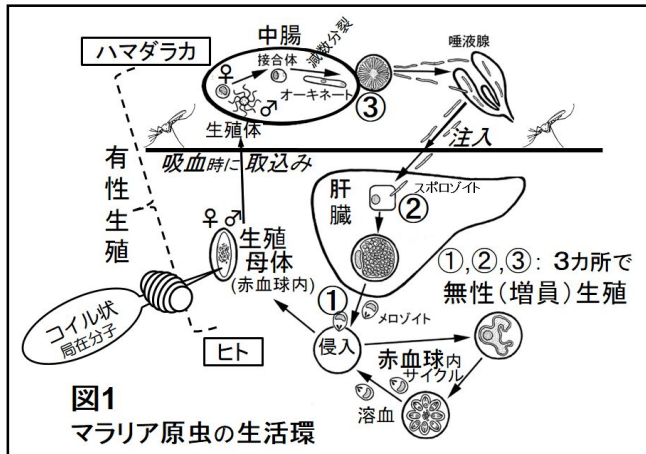
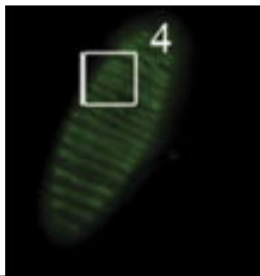


図1 マラリア原虫の生活環

図2 #PF3D7_1345600 生殖母体で格子状 Mol Biol Evol 2012; 29:2113:Fig7

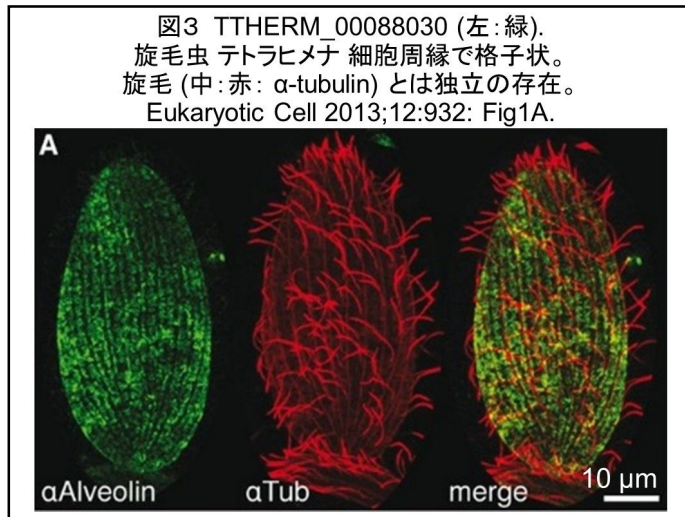


これらの内膜複合体 IMC に関する学界の研究報告とは別に、本研究の代表者らは、IMC の議論とは独立に、マラリア原虫有性生殖期の生殖母体細胞 (生殖母体の虫体。マラリア原虫は単細胞生物であるから、1細胞が原虫1個体である) に特異的に発現して、虫体周縁に格子状に局在する複数の分子を、熱帯熱マラリア原虫から見出した (未発表)。これらの "Hypothetical Proteins" は、格子状の局在が類似する細菌類分子の機能から推定して、マラリア原虫生殖母体の細胞骨格関連タンパク質の可能性が高いと考えられた。

「内膜複合体 IMC の関連分子」に分類されるか否かにかかわらず、なぜマラリア原虫の生活環において、生殖母体期に特異的に、複数の分子が、細胞内でその周縁部に格子状に局在するのか? 細胞の形という視点からみると、ヒトに感染するマラリア原虫の1種 熱帯熱マラリア原虫の学名 *Plasmodium falciparum* の由来である「falci (曲った) form」とは、成熟した生殖母体細胞を指しており、実際に成熟生殖母体は、特異的なバナナ状、三日月状である。その細胞骨格は、球形を維持して宿主細胞に感染寄生する赤血球内の無性生殖期とは大きく異なると考えられる。格子状に局在する分子群が、生殖母体細胞のこの特異的な形の成立と維持に関与する可能性がある。しかしマラリア原虫の無性生殖期に比べて、同じく赤血球寄生期ではあるが、ハマダラカ体内における有性生殖の準備段階である生殖母体期細胞については、その虫体 (繰り返すが、マラリア原虫は単細胞生物であるから、1細胞が原虫1個体である) の構造形成に関わる分子機構について、解析が進んでいない。また、マラリア原虫細胞内の内膜複合体 IMC については、これまで、原虫の生活環のうち主に無性生殖期原虫の細胞内構造として解析されてきた背景がある。原虫の有性生殖期、生殖母体細胞内部の IMC、という視点からの解析は、特に少なかった。

繊毛虫の一種テトラヒメナでも、同じく IMC 関連分子とされるが、上記報告とは別の分子が格子状に局在すると報告された (図3) (Eukaryotic Cell 2013;12:932)。この旋毛虫テトラヒメナの分子には、マラリア原虫にも相同する分子 (オルソログ) が存在する。この分子は、その遺伝子がコードされるマラリア原虫染色体上で、すぐ隣に遺伝子がある更に別の分子と共に、テトラヒメナにおける上記報告の以前から、マラリア原虫でも IMC 関連分子に分類され、生殖母体で発現するとのデータもある (データベース PlasmoDB / ApiLocDB)。しかし、マラリア原虫細胞内のこの分子の局在は未報告であった。

図3 TTHERM_00088030 (左:緑). 旋毛虫 テトラヒメナ 細胞周縁で格子状。旋毛 (中:赤: α-tubulin) とは独立の存在。 Eukaryotic Cell 2013;12:932: Fig1A.



別のより大きな視点、21世紀の現在でも全世界で年間推定50万人前後が亡くなる病気マラリアの対策、という視点からみると、マラリア原虫の生活環上で、迂回経路がないヒト赤血球内の生殖母体期は、流行地の感染サイクルを断ち切る抗マラリア薬やワクチンの標的になりうる。この時期に発現する分子群は、薬の標的分子やワクチン構成分子の候補といえる。

2. 研究の目的

上述の、第1項 研究開始当初の背景から、要点を抽出すると、以下のようになる。

無性生殖期マラリア原虫の宿主細胞侵入の機構と考えられてきた内膜複合体 (Inner Membrane Complex: IMC) の関連分子のなかに、有性生殖期の生殖母体にも発現して、虫体周縁に格子状/コイル状に局在するものがある。本研究の代表者らが IMC とは独立に見出した生殖母体の格子状局在分子がある。さらに、無性生殖期マラリア原虫において IMC 関連分子とされるものの、生殖母体では未報告 (未解析) の分子が複数ある。

これらの分子を併せて解析の起点として、原虫生殖母体細胞の骨格形成やその変化に関する分子群を同定することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

熱帯熱マラリア原虫を用いて以下の3点を順に解析し、原虫生殖母体の細胞骨格の形成およびその変化の分子機構を、内膜複合体 IMC の関与を含めて明らかにする。

(1) 「格子状/コイル状に局在」する複数の分子と相互作用する分子群を探索する。

生殖母体抗原を調製して 免疫沈降法 / 電気泳動 (1 次元 & 2 次元) / 質量分析により、相互作用する分子を同定し、とくに、これまで内膜複合体 IMC の関連分子とはされていない分子の有無に着目する。

(2) (1) 以外の「マラリア原虫 内膜複合体 IMC 関連分子」から生殖母体で解析報告がない分子を選定して、発現と局在を調べ、(1) と同様に相互作用する分子群を探索する。

生殖母体でデータがない IMC 関連分子の発現および局在を、間接蛍光抗体法等で調べる。次いで、A. と同様の手法で、相互作用解析を行う。

(3) (1), (2) の起点分子や、それらと相互作用する分子群が、生殖母体の細胞骨格の形成と変化についていかなる役割を持つのか、当該遺伝子の欠損原虫を作製して明らかにする。

(1), (2) の結果から細胞骨格の鍵と推定される分子の遺伝子破壊原虫を作製、とくに生殖母体に注目して観察する。この解析には、有性生殖期生殖母体の出現の前提として、遺伝子破壊原虫を無性生殖期原虫として作製し得ることが必要である。もしも、作製作業を繰り返した後に、この作製自体が不可能と推定される場合には、当該分子 (とくに、これまで無性生殖期における解析報告が限られる分子) が、有性生殖期以前に無性生殖期でも、原虫生存に必要な役割を担うと考えられる。この場合は、解析の視点を変えて、対象を無性生殖期原虫にして行う。

4. 研究成果

(1) 「格子状/コイル状に局在」する複数の分子と相互作用する分子群を探索する。

動物抗血清の調製が完了した分子について、相互作用分子解析同定の前提として、固定したマラリア原虫細胞における発現を解析した。格子状/コイル状の局在は、生殖母体期のなかでも、成熟するにつれて、すなわち、より成熟した生殖母体ステージの細胞 (虫体) に限定して現れてくることが観察された。相互作用分子解析については、起点分子のいずれからについても、同定に至らなかった。前文の結果を踏まえると、抗原調製用に実験室内で培養調製した生殖母体細胞のステージを更に絞り込む、すなわち、成熟した生殖母体ステージの割合をさらに高めて培養原虫を回収し、抗原調製に進むべきと考えられた。

(2) (1) 以外の「マラリア原虫 内膜複合体 IMC 関連分子」から生殖母体で解析報告がない分子を選定して、発現と局在を調べ、(1) と同様に相互作用する分子群を探索する。

(1) と同様に、相互作用分子解析同定の前提として、固定したマラリア原虫細胞における発現を解析した。その結果、一部の分子が格子状/コイル状に局在を示した。これら (2) についても、(1) と同様に、格子状/コイル状の局在は、生殖母体期のなかでも、成熟するにつれて、すなわち、より成熟した生殖母体ステージの細胞 (虫体) に限定して現れた。相互作用分子の同定には至らなかった。

(3) (1), (2) の起点分子や、それらと相互作用する分子群が、生殖母体の細胞骨格の形成と変化についていかなる役割を持つのか、当該遺伝子の欠損原虫を作製して明らかにする。

標識化分子を導入した変異体マラリア原虫作製とこの標識原虫内の分子の発現解析、および分子欠損変異導入体の作製とこの欠損原虫の解析については、いずれも、マラリア原虫に導入

するプラスミドコンストラクトの調製に時間を要して、この完成までの進捗となった。今後は、解析の前提として、各分子のプラスミドを原虫に導入して、変異化と変異体のクローニングを進める。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

6．研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

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。