

令和元年6月14日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05182

研究課題名(和文) スポロゾイトの肝細胞侵入におけるRON3の作用機序の解明とレセプターの同定

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanisms of RON3 during sporozoites invasion of hepatocytes

研究代表者

石野 智子 (Ishino, Tomoko)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・准教授

研究者番号：40402680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：マラリア原虫のヒトへの感染は、スポロゾイトが肝細胞に侵入する段階から始まる。従って、スポロゾイトの肝細胞侵入は、感染阻止ワクチン開発の最も適切な標的であるが、その分子機構はほとんど解明されていない。本研究は、分泌型の原虫分子RON3を手掛かりに、宿主細胞との相互作用の観点から侵入機構を分子レベルで解明することを目的とする。RON3は侵入型原虫に共通して発現している為、スポロゾイト時期特異的に発現抑制する原虫を作出し、RON3がスポロゾイトの肝臓感染において初期の段階に重要な役割を担うことを明らかにした。また、RON3の特異抗体がスポロゾイトの肝細胞感染を抑制することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちが開発したスポロゾイト時期特異的遺伝子発現抑制法を適応することで、寄生型(メロゾイト、スポロゾイト)に共通に発現する分子の機能解析が可能になった。この方法により、これまで感染に関わることが示唆されていた複数の分泌型タンパク質の機能解析が行える様になり、RON2, RON11がスポロゾイトの接着や運動能に関わることで細胞侵入に関与することを、RON3は哺乳類肝臓感染に関わることを明らかにした。今後の感染阻止ワクチン開発に向けての論理的基盤を与えるものとなる。

研究成果の概要(英文)：Malaria transmission to humans initiates by sporozoite infection of hepatocytes, which are inoculated by infected Anopheles mosquitoes. To develop the infection inhibitory vaccines, the step of sporozoite invasion of hepatocytes is one of the ideal targets, however its molecular mechanisms are not elucidated clearly. The aim of this study is to elucidate the molecular mechanisms of sporozoite invasion by focusing on RON3, the secretory protein stored in rhoptries in both merozoites and sporozoites. By generating sporozoite stage-specific RON3 conditional knockdown parasites in *Plasmodium berghei*, RON3 functions during sporozoite invasion was investigated in vitro and in vivo. Moreover, specific antibodies against partial recombinant RON3 were raised in rabbits to examine their inhibitory effects on sporozoite infection.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア スポロゾイト 肝臓感染

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

媒介蚊の吸血によりヒトの皮膚内に注入されたマラリア原虫（スポロゾイト）は、まず始めに肝細胞へと侵入し、その中で発育して数千もの赤血球感染型（メロゾイト）を形成する。これらが血中に再び放出され赤血球への感染を繰り返すことで、貧血・発熱などの症状を引き起こす。すなわち、マラリアの感染阻止を目的とする予防法の標的は、スポロゾイトが肝細胞に侵入するステップが最適である。しかしながら、現在までにスポロゾイトの肝細胞侵入機構はほとんど明らかにされておらず、対策は困難を極めている。

これまで「寄生の為の細胞侵入」の分子基盤解明を目指して、関連する原虫分子の探索が活発に行われてきたが、長らく同定されなかった。申請者らは、**メロゾイトの赤血球侵入と、スポロゾイトの肝細胞侵入には共通する分子基盤が存在するのではないか**という仮説を立て、両ステージに共通して発現する分泌型タンパク質に焦点を絞り侵入関連分子のスクリーニングを行った。メロゾイトにおける当該タンパク質が、赤血球侵入に必須であれば、遺伝子欠損原虫は作出できないために、独自にプロモーター置換法による**スポロゾイト時期特異的遺伝子発現抑制法**を開発した。これを用いて、メロゾイトの赤血球侵入に関わることが示唆されてきた **RON3 がスポロゾイトの肝細胞への侵入にも重要な役割を担う**ことを、初めて明らかにした。

2. 研究の目的

マラリア原虫のヒトへの感染は、スポロゾイトが肝細胞に侵入する段階から始まる。従って、スポロゾイトの肝細胞侵入は、感染阻止ワクチン開発の最も適切な標的であるが、その分子機構はほとんど解明されていない。本研究は、申請者らが新たに見いだした肝細胞への侵入に関わる分泌型の原虫分子 **RON3** を手掛かりに、宿主細胞との相互作用の観点から侵入機構を分子レベルで解明することを目的とする。

3. 研究の方法

RON3 の作用機序を解明するために以下の方法で研究を実施した。

1. RON3 のプロモーター置換により、スポロゾイト特異的に **RON3** の遺伝子発現を抑制したネズミマラリア原虫 (**RON3-cKD: RON3 conditional knock-down**)を用いて、**RON3 が肝臓感染のどのステップに関わるのか**詳細に検討した。この際に、スポロゾイトの肝細胞寄生に着目して解析を進めやすくするために、細胞通過できない原虫 (**SPECT2-KO**)に、さらに **RON3-cKD** を導入した原虫も新たに作出した。
2. **RON3** は 2000 アミノ酸を超える大きなタンパク質であるので、肝細胞侵入に関わる領域を明らかにするために、構造活性相関を解析したい。その目的のために、薬剤耐性カセットを含まない **RON3-cKD** 原虫の作出を試みた。
3. **RON3** の立体構造の予想から、表面に露出すると考えられる領域に対して抗体を作出し、これがスポロゾイトの細胞侵入を阻害するのか解析を行った。
4. スポロゾイトに発現するロプトリー分子の中から、**RON3** と同様の作用機序で肝細胞寄生に関わるものを選択する。

宿主細胞との相互作用を解析するための手がかりとして、以下の研究を実施した。

5. 7 種類の哺乳類培養細胞を用いて、スポロゾイトの細胞侵入効率、及び、原虫の発育の効率を比較し、スポロゾイトの侵入、あるいは発育を支持する細胞に共通に発現する遺伝子の絞込みを行った。

4. 研究成果

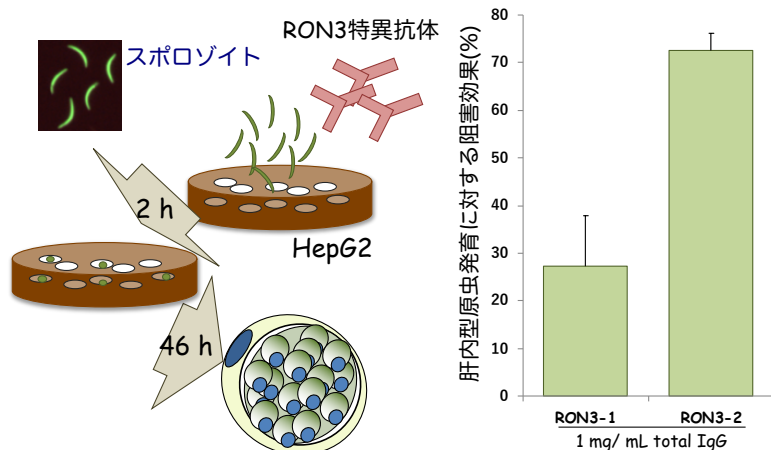
1. **RON3** を発現抑制することで、スポロゾイトをネズミに尾静脈より投与した時に肝臓内での原虫量が激減することを見出した。In vitro の実験を実施し、寄生胞膜を伴い侵入しているスポロゾイトの数が減少していたことから、肝細胞に寄生する最初のステップに **RON3** が関わりと考えられる。スポロゾイトが細胞に侵入する際に、細胞膜を障害して「通過」する様式と、寄生胞膜を形成し「寄生」する様式があり、解釈が複雑になると

という問題があった。そこで、寄生における RON3 の役割のみを調べる目的で、通過に関わる原虫タンパク質 SPECT2 (Sporozoite micronemal protein essential for cell traversal 2) を欠損させた原虫に、さらに RON3-cKD を導入した遺伝子改変原虫を新たに作出した。その結果、RON3 が細胞寄生に関わることを明確に示すことができた。

2. RON3 はメロゾイトの赤血球侵入に必須と考えられており、遺伝子欠損組換え原虫が得られないという報告が既にある。したがって、RON3 の構造活性相関を調べるためには、スポロゾイト時期特異的に RON3 の発現を抑制した RON3-cKD 原虫にさらに、改変型 RON3 を強制発現させて、機能が回復されるかを解析する必要がある。そこで、遺伝子導入しても原虫の生活環に問題を生じないゲノム領域 (Pb230p 遺伝子座) に、様々な改変型 RON3 を挿入することで、RON3 のどの領域がスポロゾイトの肝細胞寄生に関わるのか解明しようとした。ネズミマラリア原虫の遺伝子改変原虫選択に利用できる薬剤が限られているため、まずは、RON3-cKD 原虫から、薬剤耐性マーカーを除く必要があった。しかしながら、相同組換え法、CRISPR-Cas9 法、いずれの方法でも目的の原虫を得ることができなかった。理由としては、RON3 が染色体のサブテロメア領域にあるために、組換えに際して、RON3 よりテロメア側の領域を失ってしまったと考えられる。欠失された領域に、スポロゾイトの感染に関わる分子が存在しているのか現時点では不明であるため、本プロジェクトはペンディングとし、他の方法で機能解析を進めることにした。

3. *Plasmodium berghei* RON3 について、Phyre2 アルゴリズムを用いて立体構造の予測を行ったところ、既知のタンパク質のドメイン構造と似ているものは見つけれなかった。一方で、30 を超えるアルファヘリックス様構造が認められた。種間でよく保存されている 2 箇所を選んで、マラリア原虫タンパク質の合成に至適である小麦胚芽由来無細胞タンパク質合成システムを用いて組換えタンパク質を発現させ、ウサギに免疫し特異抗体を作成した。スポロゾイト、メロゾイトを用いて Western blotting により、これらの抗体

が RON3 を特異的に認識することを確認した。これらの抗体を肝由来培養細胞 (HepG2) にスポロゾイトと共に添加したところ、一種の抗体は容量依存的にスポロゾイトの細胞侵入を阻害することを見出した。すなわち、RON3 は分泌、あるいはスポロゾイト表面に結合して、肝細胞感染に機能することが示唆された。



4. スポロゾイトに発現するロプトリー分子をスクリーニングし、前述の様にスポロゾイト特異的に発現抑制させることで機能解析を行うことで、RON3 と同様にスポロゾイトの肝細胞侵入に関わるものがあるかどうか解析を行った。RON12 に関しては、メロゾイトにおいては特異抗体が赤血球侵入を抑制することが判明したが、遺伝子欠損したところ、メロゾイトもスポロゾイトも、その細胞侵入効率に影響が認められなかった。また、RON2, RON11 に関しては、スポロゾイト時期特異的に遺伝子発現を抑制したところ、スポロゾイトの蚊の唾液腺への侵入効率が顕著に減少することを明らかにした。従って、スポロゾイトの標的細胞侵入に関して、RON2, RON11 は RON3 とは異なる役割を担うことを見出した。詳細な解析により、RON2 はスポロゾイトの接着能に関わること、RON11 は接着に加えて運動能にも関与することを明らかにした。以上の結果は、ロプト

リー内に貯蔵される分子が、細胞侵入に関して役割分担されていることを示唆する。

5. ヒト由来の7種類の培養細胞を用いて、スポロゾイトの侵入・発育効率を比較した。その結果、6種類の培養細胞に効率よく侵入することがわかったが、そのうちの1種類の細胞内では原虫の発育が進まなかった。まずは、侵入に関わる分子として6種類に共通に発現しており、侵入を許容しない細胞のみで発現量が少ない膜タンパク質を、公表されているマイクロアレイデータを用いて *in silico* 解析により探索した。さらに、*real-time RT-PCR* 法により、実験に用いた細胞株での発現量を比較し、スポロゾイトの侵入効率と遺伝子発現が相関する分子を7種類選択した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Rhoptry neck protein 11 has crucial roles during malaria parasite sporozoite invasion of salivary glands and hepatocytes. Bantuchai S, Nozaki M, Thongkukiakul A, Lorsuwannarat N, Tachibana M, Baba M, Matsuoka K, Tsuboi T, Torii M, Ishino T* (*: corresponding). *Int J Parasitol*, in press (2019) (査読有)
2. Rhoptry neck protein 2 expressed in *Plasmodium* sporozoites has a crucial role during invasion of mosquito salivary glands. Ishino T*, Murata E, Tokunaga N, Baba M, Tachibana M, Thongkukiakul A, Tsuboi T, Torii M (*: corresponding). *Cell Microbiol*, e12964 (2018) (査読有)
3. *Plasmodium* RON12 localizes to the rhoptry body in sporozoites. Oda-Yokouchi Y, Tachibana M, Iriko H, Torii M, Ishino T*, Tsuboi T* (*: corresponding). *Parasitol Int*, 68(1): 17-23 (2018) (査読有)
4. Antibodies against a *Plasmodium falciparum* RON12 inhibit merozoite invasion into erythrocytes. Ito D, Takashima E, Yamasaki T, Hatano S, Hasegawa T, Miura K, Morita M, Thongkukiakul A, Diakite M, Long CA, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, Iriko H, Ishino T, Tsuboi T* (*: corresponding). *Parasitol Int*. 68(1):87-91(2019). (査読有)

[学会発表] (計 14 件)

1. 石野智子 時期特異的遺伝子発現抑制原虫を用いたマラリア原虫スポロゾイトの侵入機構の解析 医学会連合 *Rising star* リトリート企画・2019・千葉
2. 藤崎佳乃, 馬場みなみ, 野崎守, 橘真由美, 松岡和弘, 坪井敬文, 鳥居本美, 石野智子 スポロゾイトの唾液腺侵入に関わるロプトリータンパク質 RAMA の作用機序の解明 第88回日本寄生虫学会大会・2019・長崎
3. 小田(横内)ゆき, 橘真由美, 入子英幸, 鳥居本美, 坪井敬文, 石野智子 マラリア原虫侵入型の先端部小器官ロプトリーに局在する RON12 の解析 第88回日本寄生虫学会大会・2019・長崎
4. 馬場みなみ, 野崎守, 鳥居本美, 石野智子 マラリア原虫スポロゾイト肝臓感染における RON4 の機能解析 第88回日本寄生虫学会大会・2019・長崎
5. Kazuhiro Matsuoka, Amporn Thongkukiakul, Takafumi Tsuboi, Motomi Torii, Tomoko Ishino. Role of Apical Sushi Protein in sporozoite invasion of salivary glands. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene 67th Annual Meeting*・2018・New Orleans, USA
6. Minami Baba, Mina Fujii, Yuka Sugino, Motomi Torii, Tomoko Ishino. RALP1 is localized to rhoptries in sporozoites and involved in infection of the mammalian liver. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene 67th Annual Meeting*・2018・New Orleans, USA

7. 石野智子 スポロゾイトにおけるロプトリータンパク質群の網羅的機能解析
分子寄生虫学フォーラム・2018・松山
8. Tomoko Ishino Involvement of *Plasmodium* rhoptry proteins in sporozoite invasion of mammalian hepatocytes. **14th International Congress of Parasitology**・Symposium/ Keynote speaker・2018・Daegu, Korea
9. Tomoko Ishino Involvement of *Plasmodium* rhoptry proteins in sporozoite invasion
Protein Island Matsuyama・Symposium・2018・Matsuyama, Japan
10. Sirasate Bantuchai, Mamoru Nozaki, Amporn Thongkukiatkul, Natcha Lorsuwanarat, Mayumi Tachibana, Kazuhiro Matsuoka, Takafumi Tsuboi, Motomi Torii, **Tomoko Ishino**. Functional analysis of a sporozoite rhoptry protein during hepatocyte infection. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene 66th Annual Meeting**・2017・Baltimore, USA
11. 石野智子 マラリア原虫肝細胞寄生機構の解明にむけて 日本比較免疫学会・第29回学術シンポジウム・2017・札幌
12. Sirasate Bantuchai, 野崎守, Amporn Thongkukiatkul, Natcha Lorsuwanarat, 橘真由美, 松岡和弘, 坪井敬文, 鳥居本美, 石野智子 マラリア原虫スポロゾイトの唾液腺および肝細胞侵入に関する新規膜タンパク質の同定 第86回日本寄生虫学会大会・2017・札幌
13. Tomoko Ishino. Rhoptry proteins have important roles during sporozoite invasion of mosquito salivary glands or mammalian hepatocytes. **Protein Island Matsuyama**・Symposium・2016・Matsuyama, Japan
14. 石野智子 分泌型タンパク質の役割から観る マラリア原虫の宿主細胞認識・侵入の分子基盤 PROS シンポジウム・シンポジウム・2016・松山

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

愛媛大学プロテオサイエンスセンター 寄生病原体学部門

<https://www.m.ehime-u.ac.jp/school/parasitology/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：鳥居 本美

ローマ字氏名：(Torii motomi)
所属研究機関名：愛媛大学
部局名：プロテオサイエンスセンター
職名：教授
研究者番号（8桁）：20164072

研究分担者氏名：橋 真由美
ローマ字氏名：(Tachibana mayumi)
所属研究機関名：愛媛大学
部局名：プロテオサイエンスセンター
職名：助教
研究者番号（8桁）：00301325

研究分担者氏名：馬場 みなみ
ローマ字氏名：(Baba minami)
所属研究機関名：愛媛大学
部局名：プロテオサイエンスセンター
職名：研究員
研究者番号（8桁）：00814906

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

※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。