

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月3日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08759

研究課題名(和文) マラリア原虫感染赤血球における血清タンパク質の取り込みメカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of uptake of serum proteins by the malarial parasite Plasmodium falciparum

研究代表者

東岸 任弘 (Tougan, Takahiro)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：20379093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：マラリア原虫が取り込む血清タンパク質を網羅的に解析し、取り込み効率が顕著に高い3種のタンパク質、プロテインS、プロトロンビン、ウイトロネクチンを同定した。さらに血清タンパク質の取り込みに必要な宿主因子の同定を試み、血清中のカルシウムイオン濃度依存的に血清タンパク質が取り込まれていることを明らかにした。さらに取り込み効率の高かったプロトロンビンは血液凝固反応を引き起こすことが確認できた。これらの結果から、マラリア原虫による血清タンパク質の取り込みが播種性血液凝固症候群のような重症マラリアの発症のメカニズムに関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マラリアはエイズ、結核と並ぶ世界三大感染症の一つに数えられる熱帯感染症である。中でも熱帯熱マラリアは世界中で年間1億人以上が感染し、死亡数は50万人にのぼる。病原体であるマラリア原虫は蚊の吸血によって体内に侵入し、赤血球内で増殖する。マラリア原虫の宿主因子の利用については脂質、ビタミン類などの解析が先行しており、血清タンパク質の利用については十分な理解が得られていない。本研究では取り込まれる血清タンパク質を網羅的に同定し、その取り込みメカニズムを解析した。さらに病因との関係を解析し、マラリア症状の軽減、治療への応用への新たな手掛かりを得た。

研究成果の概要(英文)：Malarial parasites require various host factors not only for their growth, but also for evading the host immune system. Previous studies regarding the utilization of host factors have focused mainly on ions and low-molecular weight compounds, such as lipids and vitamins. Therefore, less information is available on the utilization of host serum proteins. In the current study, we have comprehensively identified serum proteins taken up by parasites. Especially, three proteins, vitamin K-dependent protein S, prothrombin, and vitronectin, were selectively internalized in a Ca²⁺-dependent manner. Uptake of these proteins was initiated before DNA replication and increased during the trophozoite and schizont stages irrespective of the assembly/disassembly of actin filaments. In addition, it was demonstrated that prothrombin was cleaved and activated, causing blood coagulation. These findings indicated a mechanism of severe malarial complications such as disseminated intravascular coagulation.

研究分野：マラリア生物学

キーワード：マラリア原虫 感染赤血球 血清タンパク質 取り込み現象 血液凝固 播種性血液凝固症候群

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

1. 研究開始当初の背景

SE36 タンパク質は熱帯熱マラリアに対するワクチン抗原として有効であるが、SE36 タンパク質の基盤となった熱帯熱マラリア原虫の Serine repeat antigen 5 (SERA5) の P47 ドメインの役割については未だ明らかではない。そこで P47 ドメインの役割を明らかにするために、P47 ドメインに結合する血清タンパク質の同定を行った。その結果、ヴィトロネクチンが SE36 タンパク質と強固に直接結合することが明らかとなった。次に共焦点顕微鏡によりヴィトロネクチンの局在観察を行ったところ、トロフォゾイト期から感染赤血球内に局在し、シゾン形成後、メロゾイト表面に局在していた。このことは血清タンパク質であるヴィトロネクチンが感染赤血球に取り込まれることを示している (Tougan, 2018)。このような血清タンパク質の感染赤血球への取り込み現象は組換えアルブミン (El Tahir, 2003)、キニノゲン (Bagnresi, 2012)、プラスミノゲン (Melo, 2014) において報告があるのみであり、その取り込みのメカニズムについては明らかではない。

2. 研究の目的

感染赤血球に取り込まれる血清タンパク質を網羅的に同定し、その取り込みのメカニズムを明らかにすることを目的とする。さらに、得られたデータから、マラリア原虫の生存、寄生戦略に基づいたマラリアの予防、治療戦略を考察する。

3. 研究の方法

(1) 感染赤血球に取り込まれる血清タンパク質の網羅的解析

これまでに感染赤血球への取り込みの報告のある血清タンパク質は限られており、我々が見出したヴィトロネクチンを含めても数種類である。そこで、感染赤血球に取り込まれている血清タンパク質を網羅的に明らかにするために、マラリア原虫感染赤血球粗抽出液と培養に用いた血清を Shotgun LC-MS/MS で解析し、各血清タンパク質の血清中での量と感染赤血球に取り込まれた量を比較する。さらに Shotgun LC-MS/MS で得られる候補についてウェスタンブロッティングでも確認する。これにより、取り込み量の多い血清タンパク質を網羅的に同定する。その後、多く取り込まれた血清タンパク質を分類することで、取り込まれた血清タンパク質に特徴的な性質 (機能、モチーフなど) を特定する。

(2) 取り込みに必要な宿主因子の同定と解析

宿主側の因子として、血清因子の同定と解析、と赤血球膜の変化の解析、の2点に着目し解析を行う。

取り込みに必要な血清因子の同定と解析: これまでに正常血清中にはヴィトロネクチンの取り込みに必要な因子が含まれているが、リポタンパク質欠損血清には含まれていないことを見出している。そこで、高比重リポタンパク質 (HDL)、低比重リポタンパク質 (LDL) を添加したリポタンパク質欠損血清で原虫を培養し、血清タンパク質の取り込みが回復するか確認する。回復しなかった場合、正常血清をゲルろ過カラム、DEAE カラム等の各種イオン交換クロマトグラフィーなどで分画し、その分画をリポタンパク質欠損血清に加えてマラリア原虫を培養することで、取り込みに必要なタンパク質を含む分画を特定する。さらに、特定した分画に含まれるタンパク質を Shotgun LC-MS/MS により解析し、取り込みに必要な候補タンパク質を選定する。候補タンパク質について組換えタンパク質を作成し、リポタンパク質欠損血清に加えた後マラリア原虫を培養することで、取り込みに必要なタンパク質を同定する。さらに、同定したタンパク質をイムノデブリーション法により正常血清から除去し、取り込みが起らないことを確認する。

赤血球膜の変化の解析: 感染赤血球においてホスファチジルセリンが細胞膜外層に露出していることが知られていることから、リポタンパク質欠損血清と正常血清で培養したマラリア原虫の感染赤血球膜外層にホスファチジルセリンが露出しているか調べる。その方法として、ホスファチジルセリンに結合することが知られているアネキシン V を用いて、蛍光顕微鏡、FACS によりアネキシン V が感染赤血球に結合しているか観察する。さらにホスファチジルセリンと結合することが知られるトロンピンなどの凝固系因子が結合しているかを調べ、で行った網羅的解析の結果と比較する。一方、これまでに赤血球でもエンドサイトーシスが起ることが知られているため、エンドサイトーシスの阻害剤 (例えばアクチンの重合阻害剤であるサイトカラシン D、アクチン脱重合剤であるミカロライド B) で処理した後、血清タンパク質が赤血球内に取り込まれているか確認する。

(3) 取り込みに必要な寄生虫因子の同定と解析

血清タンパク質が感染赤血球に取り込まれ、寄生胞に届くには少なくとも赤血球膜と寄生胞膜の2種類の膜を通過する必要がある。ここでは赤血球膜の通過の解析を、寄生胞膜の通過の解析を行う。

血清タンパク質の取り込みに必要なマラリア原虫の因子は赤血球表面に現れ、今回同定した宿主因子と結合することが考えられる。そこで、原虫タンパク質を赤血球膜表面に移行できない阻害剤を用いて原虫タンパク質を赤血球膜への輸送を阻害した後、血清タンパク質の取り込みが起っているか確認する。もし取り込みが起っていないければ原虫タンパク質の赤血球

表面への局在が取り込みに必要であることを示唆している。逆に取り込みが起こっていれば、感染赤血球自身のエンドサイトーシスによる取り込みが考えられる。

の結果において取り込みが起こっていなかった場合、血清タンパク質の取り込みに必要なタンパク質は感染赤血球表面に局在し、血清中の取り込み因子と直接結合していることが考えられる。そこで、感染赤血球膜抽出液を用いて、ヴィトロネクチン、あるいは で同定した取り込みに必要な血清タンパク質に対して免疫沈降することで、感染赤血球膜抽出液中の共免疫沈降物を得る。共沈殿してきたタンパク質について LC-MS/MS 解析などにより同定する。同定したタンパク質について検出抗体を作成し、局在観察を行う。さらに CRISPR/Cas9 法による同定した遺伝子のノックアウト (KO) 原虫を作成し、取り込み現象を観察する。さらにげっ歯類マラリア原虫における KO 原虫を作成し、マウス感染後の表現型の解析を行う。

の結果より、赤血球膜の変化、特にホスファチジルセリンの外層への露出が重要であることが明らかになった場合、ホスファチジルセリンが外層に現れるメカニズムを明らかにする。その方法として、マリアスクランブラーゼがトロフォゾイト期で発現しているか mRNA を抽出し発現解析する。もし発現しているようであれば、抗マリアスクランブラーゼ抗体を作成し局在観察を行う。さらに、CRISPR/Cas9 法によるマリアスクランブラーゼ遺伝子の KO 原虫を作成し、取り込み現象を観察する。もし生存できないようであれば赤血球膜の変化は原虫の増殖にとって必須であると考えられる。必要であれば、げっ歯類マラリア原虫における KO 原虫を作成し、マウス感染後の表現型の解析を行う。

赤血球膜を通過した血清タンパク質が寄生胞に完全に取り込まれるためには寄生胞膜の通過も必要である。これまでに寄生胞膜の通過は原虫のエンドサイトーシスを通して行われていることが知られている。そこでエンドサイトーシスを阻害した後、取り込みが起こるか調べる。特にこれまでにエンドサイトーシスにはアクチンの働き重要であることが知られており、アクチン重合阻害後の取り込みの有無を確認する。アクチン重合阻害剤としてはサイトカリン D、アクチン脱重合剤であるミカロライド B などを用い、その後の取り込みの有無を観察する。

4. 研究成果

(1) マラリア原虫が取り込む血清タンパク質を網羅的に解析し (図 1) 取り込み率が顕著に高い 3 種のタンパク質、プロテイン S、プロトロンビン、ヴィトロネクチンを同定した (図 2)

図1. ショットガンLC-MS/MSによる解析

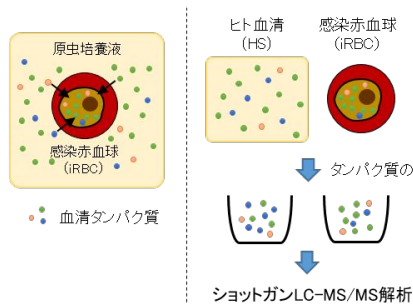
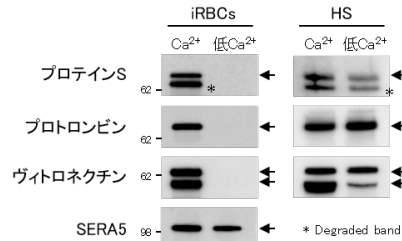
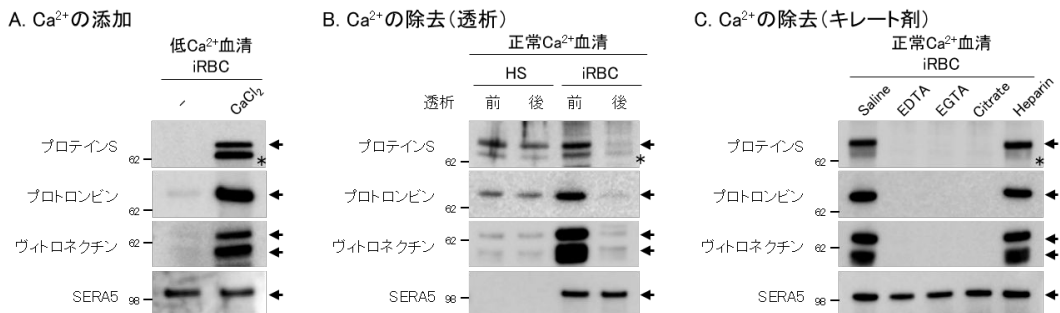


図2. 取り込みの確認



(2) 血清タンパク質の取り込みに必要な宿主因子の同定を試み、血清中のカルシウムイオン依存的に血清タンパク質が取り込まれていることを明らかにした (図 3)

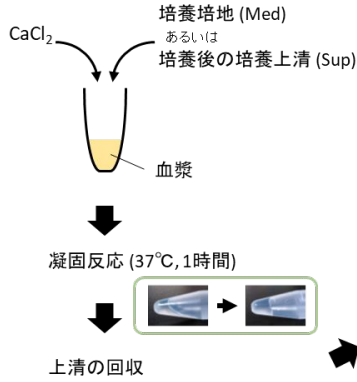
図3. カルシウムイオンの添加・除去と血清タンパク質の取り込み



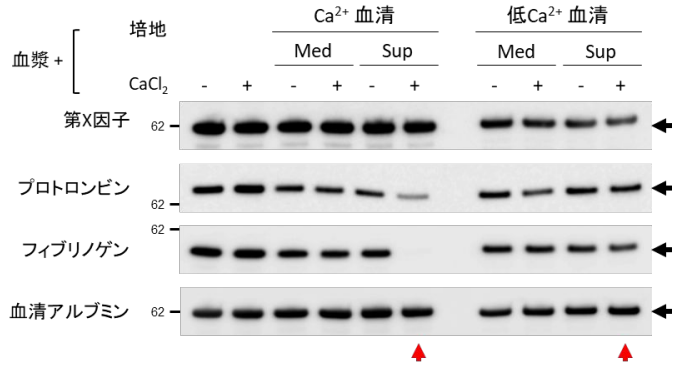
(3) 取り込み率の高かったトロンビンは血液凝固反応を引き起こすことを確認した (図 4)。これらの結果から、播種性血液凝固症候群のような重症マラリアの発症の原因の一つにマラリア原虫による血清タンパク質の取り込みが関与していることが示唆された。

図4. トロンビンの活性化による血液凝固反応の確認

A. 血液凝固アッセイの手順



B. 血液凝固アッセイの結果



5. 主な発表論文等

[学会発表](計 2件)

Takahiro Tougan, Koji Adachi, Kazuto Nunomura, Bang-Zhong Lin, Yoon-Jeong Kim, and Toshihiro Horii, Elucidation of a role of P47 domain of *P. falciparum* SERA5, 第86回日本寄生虫学会大会、2017

Takahiro Tougan, Jyotheeswara Reddy Edula, and Toshihiro Horii, Uptake mechanism of host serum proteins by malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, 第5回感染症若手フォーラム、2016

6. 研究組織

(1)研究分担者

無し。

(2)研究協力者

研究協力者氏名：堀井 俊宏

ローマ字氏名：HORII, Toshihiro

研究協力者氏名：エデュラ ジョティースワラ

ローマ字氏名：EDULA, Jyotheeswara Reddy

研究協力者氏名：坪井 敬文

ローマ字氏名：TSUBOI, Takafumi

研究協力者氏名：高島 英造

ローマ字氏名：TAKASHIMA, Eizo

研究協力者氏名：森田 将之

ローマ字氏名：MORITA, Masayuki

研究協力者氏名：金 允政

ローマ字氏名：KIM, Yoon-Jeong

研究協力者氏名：布村 一人

ローマ字氏名：NUNOMURA, Kazuto

研究協力者氏名：林 邦忠

ローマ字氏名：LIN, Bang-Zhong

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。