

令和元年6月3日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08760

研究課題名(和文) マラリア原虫のヘモグロビン輸送・代謝における寄生胞膜分子の機能解析

研究課題名(英文) Analysis of parasitophorous vacuole membrane protein in hemoglobin transport and metabolism of malarial parasites

研究代表者

入子 英幸 (Iriko, Hideyuki)

神戸大学・保健学研究科・准教授

研究者番号：60346674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：赤血球に寄生したマラリア原虫はヘモグロビンを栄養源としている。マラリア原虫によるヘモグロビンの取り込み・輸送は、寄生胞膜を介して行われるが、その分子機構については明らかにされていない。本研究では、熱帯熱マラリア原虫の寄生胞膜に局在する膜タンパク質(ETRAMPファミリー)に着目し、ヘモグロビン輸送に関わる膜構造における局在を解析し、その結果、ETRAMP10.3は寄生胞膜、サイトストームおよびヘモグロビン輸送小胞に局在し、生殖母体期のヘモグロビン輸送の指標となることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、マラリア原虫の赤血球寄生を支えるヘモグロビン輸送・代謝における寄生胞膜分子の重要性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Plasmodium parasites on erythrocytes utilize hemoglobin as a source of amino acid. Uptake and transport of hemoglobin by malarial parasites are carried out through parasitophorous vacuole membrane (PVM), but the molecular mechanism has not been elucidated. In this study, I focused on the PVM protein (ETRAMP family) of *P. falciparum* and analyzed the localization in the membrane structure involved in hemoglobin transport. In the result, ETRAMP10.3 was found to be localized to the PVM, cytosol and hemoglobin transport vesicles, and to be an indicator of hemoglobin transport during gametocyte stage.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア 生殖母体 寄生胞膜

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

1. 研究開始当初の背景

マラリア原虫は、ヒト体内において赤血球に寄生し、ヘモグロビンをアミノ酸供給源として利用し、赤血球内部で発育、増殖する。マラリア原虫のヘモグロビン代謝は、キニーネやクロロキンなどの治療薬の標的となることから注目を集めてきた。しかし、ヘモグロビン輸送については、指標分子も同定されておらず、その分子機構は未だ明らかにされていない。

マラリア原虫は、赤血球への侵入時に「寄生胞膜」に覆われた寄生胞を形成する。そのため、赤血球内に寄生したマラリア原虫がヘモグロビンを利用するには、寄生胞膜を介してヘモグロビンを取り込む仕組みが必要となる。1970年代に行われた透過型電子顕微鏡による形態学的解析により、寄生胞膜と原虫細胞膜の2つの膜が同時に内側に陥入した「サイトストーム」と呼ばれる構造、原虫細胞膜と寄生胞膜に由来した二重膜で覆われたヘモグロビンを内包する輸送小胞などのヘモグロビンの取り込み・輸送に関わる特徴的な膜構造が見出された。近年、3次元電子線トモグラフィー法を用いた解析により、これらの膜構造の再評価が行われたが、ヘモグロビンの取り込み・輸送の分子機構の解明には至っていない。

申請者は、寄生胞膜に発現する分子群には、ヘモグロビン輸送の指標となるものがあると考え、熱帯熱マラリア原虫の寄生胞膜の分子として知られている ETRAMP ファミリー (Early TRAnscribed Membrane Protein family : 14 分子) EXPorted Protein 1, 2 (EXP1, EXP2) に着目して研究を進めたところ、ETRAPM4 が寄生胞膜、サイトストーム、ヘモグロビン輸送小胞に局在し、ヘモグロビン輸送の指標となることを見出した。さらに最近、生殖母体期に発現する ETRAMP10.3 がサイトストームと輸送小胞に移行することを示す知見を得た。マラリア原虫のヘモグロビン輸送・代謝は、赤血球内における発育・増殖に必須の分子機構であり、無性生殖期においては遺伝子欠損原虫の作成は困難と考えられる。しかし、生殖母体期に特異的に発現する分子は逆遺伝学的手法による機能解析が可能であることから、生殖母体期のヘモグロビン輸送の指標分子を同定し、それらを手がかりとして逆遺伝学手法を駆使することで、ヘモグロビン輸送の分子機構を解析するという研究計画を考案した。

2. 研究の目的

本研究では、世界で大きな被害をもたらす熱帯熱マラリア原虫を対象とした。実験室内で培養した生殖母体を含む感染赤血球を材料として、生殖母体期に特異的に発現する寄生胞膜分子を検索し、その情報をもとに、免疫電顕法によりヘモグロビン輸送に関わる膜構造における分子局在を解析し、生殖母体期におけるヘモグロビン輸送の指標分子を同定すること目的とした。具体的には、生殖母体期の指標分子 Pfs16 の組換えタンパク質を、コムギ胚芽無細胞系により作成し、これを抗原として Pfs16 抗体を作製する。次に、Pfs16 抗体を指標とした間接蛍光抗体法により、無性生殖期と生殖母体期における ETRAMP ファミリーの発現を解析した。さらに、免疫電顕法を用いて生殖母体期特異的に発現する寄生胞膜分子の詳細な分子局在を解析した。

3. 研究の方法

(1) 生殖母体期の指標分子 Pfs16 の特異抗体の作成

熱帯熱マラリア原虫の Pfs16 遺伝子を生殖母体含有感染赤血球から抽出した cDNA を鋳型として、PCR により増幅した。増幅した遺伝子産物をコムギ胚芽無細胞タンパク質発現プラスミドベクター (pEU-E01) に挿入し、組換えタンパク質の発現用コンストラクトを構築した。コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて、GST (glutathion-S-transferase) との融合タンパク質として大量合成したものをアフィニティ精製した。精製した rPfs16 を抗原として、マウスを免疫し (皮下、3 回) 特異抗体を作成した。特異抗体の反応性は、間接蛍光抗体法により確認した。

(2) Pfs16 特異抗体を用いた生殖母体期の寄生胞膜に発現する分子の検索

生殖母体期の培養: 熱帯熱マラリア原虫 (NF54 株) を complete medium (RPMI-1640 with 6g/L of HEPES, 50mg/L of hypoxanthine, 2.5g/L of NaHCO₃ and 10% human serum)、混合ガス封入 (5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂)、37 °C にて、約 18 日間培養した。

寄生胞膜分子の特異抗体：先行研究において作成した ETRAMP ファミリー14 分子、EXP1、EXP2 に対する特異抗体（ウサギ抗血清）計 16 種類、生殖母体の指標として Pfs16 抗体を用いた。

間接蛍光抗体法：感染赤血球を材料として、薄層塗抹標本を作製し、氷温アセトンで 5 分間固定した。5%脱脂粉乳を含む PBS を用いて室温 1 時間のブロッキング処理をした後に、各抗血清を 37°C、1 時間反応させた。2 次抗体として Alexa Fluor 488, 555 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を 37°C、1 時間反応させた。核染色のために 2 次抗体に Hoechst33342 を添加した。反応後の標本を ProLong Gold Antifade reagent で封入し、蛍光顕微鏡 (Axio ScopeA1; Carl Zeiss) を用いて、原虫における寄生胞膜分子の発現と局在部位を観察した。

(3) 生殖母体期におけるヘモグロビン輸送の指標分子の同定

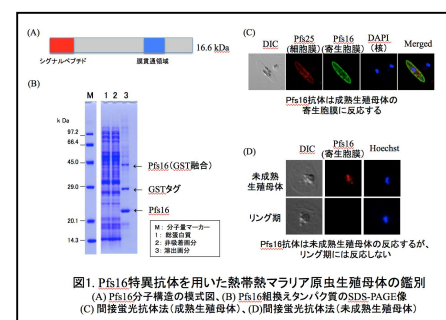
免疫電子顕微鏡法（免疫電顕法）を用いて、生殖母体期のヘモグロビン輸送に関わる膜構造における寄生胞膜分子の局在を解析し、輸送指標分子を同定した。

免疫電顕法：1 % パラホルムアルデヒド / 0.3%グルタルアルデヒドにより固定し、LR-White 樹脂で包埋・重合した熱帯熱マラリア原虫感染赤血球の電顕用ブロックを作成した。超薄切片は 50 nm の厚さで作成し、ブロッキング剤（ブロックエース-PBS）で処理した。次に、一次抗体（抗 ETRAMP4 ウサギ血清、抗 Pfs16 マウス血清、50 倍希釈）を反応させ、金コロイド標識二次抗体（抗ウサギ 10 nm、抗マウス 15 nm）を反応させた。染色した超薄切片は、透過型電子顕微鏡（日立、HT-7100）を用いて観察し、CCD カメラ（浜松フォトニクス、C4742-95）により電子画像を取得した。

4. 研究成果

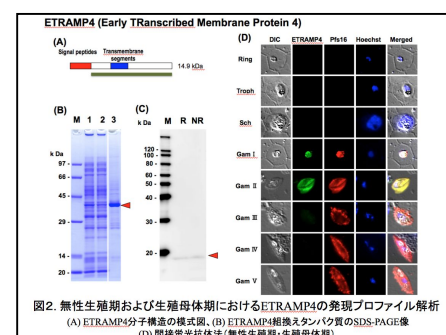
(1) 生殖母体期の指標分子 Pfs16 の特異抗体の作成

熱帯熱マラリア原虫の生殖母体期の指標分子 Pfs16 をコードする遺伝子の N 末端側のシグナル配列を除くほぼ全長を、熱帯熱マラリア原虫 NF54 株から抽出した遺伝子を鋳型として PCR により増幅した（図 1A）。増幅遺伝子産物をコムギ胚芽無細胞発現プラスミドベクターに挿入し、発現用コンストラクトを構築し、GST 融合型の Pfs16 組換えタンパク質（rPfs16）の合成を行った。作製したタンパク質は、グルタチオンセファロースを用いてアフィニ精製を行い、ポリアクリルアミド電気泳動（SDS-PAGE）により予定通りに合成されていることを確認した（図 1B）。次に、rPfs16 を抗原とし、マウスに免疫し、Pfs16 特異抗体を作成した。Pfs16 特異抗体の反応性を確認するために、間接蛍光抗体法を行ったところ、成熟生殖母体の外周部（寄生胞膜）に強い反応が確認された（図 1C）。次に、未成熟生殖母体とリング期を含む塗抹標本を用いて IFA を行った結果、Pfs16 特異抗体は、リング期原虫には反応をせず、未成熟生殖母体の外周部に強く反応を示すことを確認した（図 1D）。



(2) Pfs16 特異抗体を用いた生殖母体期の寄生胞膜に発現する分子の検索

熱帯熱マラリア原虫の生殖母体期における寄生胞膜分子の発現プロファイルリングを目的として、Pfs16 抗体を指標とした間接蛍光抗体法を行い、寄生胞膜分子の発現及び局在を無性生殖期と生殖母体間で比較した（ETRAMP4 の発現プロファイルを図 2 として例示）。これまでに申請者は、ETRAMP4 が赤血球侵入後 16~24 時間に発現し、寄生胞膜、サイトストーム、ヘモグロビン輸送小胞に局在することを明らかにした。今回の解析結果により、ETRAMP4 が未成熟生殖母体（ステージ 1, 2）に特異的に発現することが明らかとなった。また、寄生胞膜分子の発現プロファイル解析の結果から、熱帯熱マラリア原虫の寄生胞膜を構成する分子は、生殖母体期に特有のもの、無性生殖期と生殖母体期に共通のもの、無性生殖期に特有のものと分類できることが示された。さらに、ETRAMP4、



ETRAPM10.3 の 2 分子が生殖母体期に特異的に発現する寄生胞膜分子であることが明らかになった。

(3) 生殖母体期におけるヘモグロビン輸送の指標分子の同定

免疫電子顕微鏡法（免疫電顕法）を用いて、生殖母体期のヘモグロビン輸送に関わる膜構造における寄生胞膜分子の局在を解析した（ETRAPM10.3 の解析結果を図 3 として例示）。ETRAPM10.3 は、生殖母体期のステージ 2 以降に発現し、寄生胞膜、サイトストーム、ヘモグロビン輸送小胞に局在することが明らかとなり、本分子が生殖母体期におけるヘモグロビン輸送の指標となることが示された。

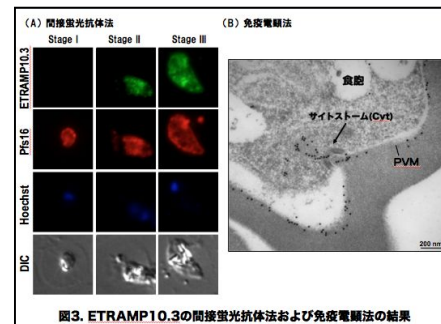


図3. ETRAMP10.3の間接蛍光抗体法および免疫電顕法の結果

(4) まとめ

熱帯熱マラリア原虫のヘモグロビン輸送の指標分子を同定することを目的として、寄生胞膜分子（ETRAPM ファミリー）を対象として、生殖母体期の指標となる Pfs16 抗体を用いた間接蛍光抗体法による発現プロファイル解析、免疫電顕法による詳細な分子局在の解析を行った。寄生胞膜分子の発現プロファイル解析の結果から、ETRAPM4、ETRAPM10.3 の 2 分子が生殖母体期に特異的に発現することを明らかにした。免疫電顕法を用いて、生殖母体期のヘモグロビン輸送に関わる膜構造における ETRAMP10.3 の局在を解析した結果、寄生胞膜、サイトストーム、ヘモグロビン輸送小胞に局在することが明らかとなり、本分子が生殖母体期におけるヘモグロビン輸送の指標となることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Iriko H, Ishino T, Otsuki H, Ito D, Tachibana M, Torii M, Tsuboi T. *Plasmodium falciparum* Exported Protein 1 is localized to dense granules in merozoites. *Parasitol Int.* 67(5), 637-639, 2018.

〔学会発表〕(計 7 件)

入子英幸 谷知 咲 大槻 均 石野智子 橋真由美 鳥居本美 坪井敬文、免疫電顕法を用いた熱帯熱マラリア原虫のヘモグロビン輸送過程の解析、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 月 21-24 日、帯広畜産大学・原虫病研究センター、北海道帯広市

入子英幸 見村琴美 大槻 均 橋真由美 石野智子 鳥居本美 坪井敬文、熱帯熱マラリア原虫・生殖母体期のヘモグロビン輸送における寄生胞膜動態の形態学的アプローチ、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017 年 12 月 6-9 日、神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市

入子英幸 見村琴美 大槻 均 橋真由美 石野智子 鳥居本美 坪井敬文、熱帯熱マラリア原虫・生殖母体期のヘモグロビン輸送における寄生胞膜動態の形態学的アプローチ、第 25 回分子寄生虫学ワークショップ・第 15 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会、2017 年 8 月 27-30 日、帯広畜産大学・原虫病研究センター、北海道帯広市

入子英幸 橋真由美 石野智子 鳥居本美 大槻 均 坪井敬文、ETRAPM4 は熱帯熱マラリア原虫の生殖母体期に発現する寄生胞膜分子である、第 87 回日本寄生虫学会大会、2018 年 3 月 17-18 日、国立国際医療研究センター、東京都新宿区

Iriko H, Ishino T, Otsuki H, Tachibana M, Torii M, Tsuboi T. Morphological observation

of parasitophorous vacuole membrane during hemoglobin uptake of *Plasmodium* gametocyte stages、14th International Congress of Parasitology (国際学会)、2018年8月19-24日、EXCO, 韓国大邱広域市

入子英幸 山崎 望 大槻 均 石野智子 橘真由美 鳥居本美 坪井敬文、熱帯熱マラリア原虫の寄生胞膜分子の発現プロファイル解析、第26回分子寄生虫学ワークショップ・第16回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会、2018年9月19-22日、道後温泉 花ゆづき、愛媛県松山市

入子英幸 山崎 望 大槻 均、石野智子 橘真由美 鳥居本美 坪井敬文、熱帯熱マラリア原虫の寄生胞膜分子の発現プロファイル解析、第88回日本寄生虫学会大会、2019年3月15-16日、長崎大学医学部坂本キャンパス、長崎県長崎市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕出願状況(計0件)

〔その他〕

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。