

令和 3 年 4 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03707

研究課題名（和文）マラリア根絶の標的、受精機構を曝く新型インタラクトーム解析

研究課題名（英文）New interactome strategy elucidating the fertilization mechanism of malaria parasite

研究代表者

森 稔幸（Mori, Toshiyuki）

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：00462739

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：ネズミマラリア *Plasmodium berghei* を用いて、動植物・原生生物に共通するオス側受精因子 GCS1 に相互作用する新規分子の探索を行った。近年開発された近位依存的ビオチン化酵素 BioID2 をマラリア原虫 GCS1 と融合した、GCS1-BioID2 遺伝子コンストラクトを設計し、GCS1-BioID2 発現株の作製に成功した。当初の目標であった、GCS1 のメス側パートナー因子の同定には未だ至っていないが、本成果は新たな受精因子探索法として有望な可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マラリアは蚊によって媒介される感染症であり、蚊の体内ではマラリア原虫が有性生殖によって増殖する。このことから、マラリア原虫の受精を妨げることがマラリア撲滅の戦略の一つとして現在注目されており、受精分子機構の解明が待たれている。本研究成果であるビオチン化酵素によるスクリーニング法は、マラリア原虫の受精に働く因子の効率的探索に大いに貢献するものであり、さらなる改善を加えることでマラリア原虫の受精機構解明に資する成果が期待できる。

研究成果の概要（英文）：We have tried to identify novel factors interacting with GCS1, the male-side gamete fusion factor conserved among animals, plants and protists, using the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. We succeeded in producing parasites expressing GCS1 conjugated with BioID2, which was recently developed as a proximity-dependent biotin ligase. Although we have not been able to detect female-side partners of GCS1, our findings suggest a promising possibility to identify fertilization factors.

研究分野：有性生殖の生理学および分子生物学

キーワード：受精 有性生殖 膜タンパク質 細胞間相互作用 配偶子

1. 研究開始当初の背景

マラリアは、熱帯地域において年間2億人以上の患者と40万以上の死をもたらす感染症であり、現代においても撲滅が困難とされている。感染を阻止するワクチンは未だ開発されておらず、感染防止策としては媒介蚊の排除がメインとなっている。病原体であるマラリア原虫は媒介蚊の体内で有性生殖によって増殖し、無数に誕生した次世代原虫(スポロゾイト)が新たな感染をもたらすため、近年原虫の受精を阻害する新規のワクチン開発が注目されつつある。マラリアの伝播を阻止するワクチンを開発するためには、マラリア原虫の受精分子機構の解明が必要不可欠と考えられている。

2. 研究の目的

研究代表者は研究分担者と共にマラリア原虫の受精に必須なタンパク質分子 GCS1 の同定に成功している (Hirai et al., *Curr Biol*, 2008)。GCS1 はオス側の受精因子であり、その関連因子を同定・解析することで受精分子機構の全容を解明できることが期待された。本研究では GCS1 を bait とした新規のインタラクトーム解析法を導入することで、GCS1 を基盤としたマラリア原虫受精機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) *in vivo* における受精の様子を解析するツールとして、媒介蚊体内におけるマラリア原虫受精を観察可能とする、蚊の透明化法開発を試みた。

(2) 近年、近傍のタンパク質分子を無差別にビオチン化する、近位依存的ビオチンライゲース BioID が開発された。BioID を連結した標的分子に結合する未知の分子はビオチン化を受けるため、ビオチンと親和性のある担体で回収することができる。本研究では、改良型 BioID である BioID2 を GCS1 に連結し、それを発現するネズミマラリア原虫の作製を行った。回収された分子を網羅的に質量分析することで、GCS1 を取り巻く新規受精因子の同定をはかる。

4. 研究成果

(1) オス配偶子を mNeogreen (緑色蛍光タンパク質)、メス配偶子を mRuby2 (赤色蛍光タンパク質) で同時標識したネズミマラリア原虫 28R/GTA 株を作製し、それに感染したマウスから吸血したハマダラカを固定した。

哺乳類の臓器や胎児を透明化する試薬 CUBIC reagents を用いて固定後のハマダラカを処理したところ、透明化された中腸内における配偶子を共焦点レーザー顕微鏡法によって透視観察することに成功した (図1)。

感度の低さから成熟した鞭毛状のオス配偶子の中腸内で捉えることは困難であったが、受精前のメス配偶子が受精後にオーキネートへと形態変化する様子が明瞭に観察できた。本成果は英国科学誌 *Scientific Reports* に発表された (Mori et al., *Sci Rep*, 2019)。

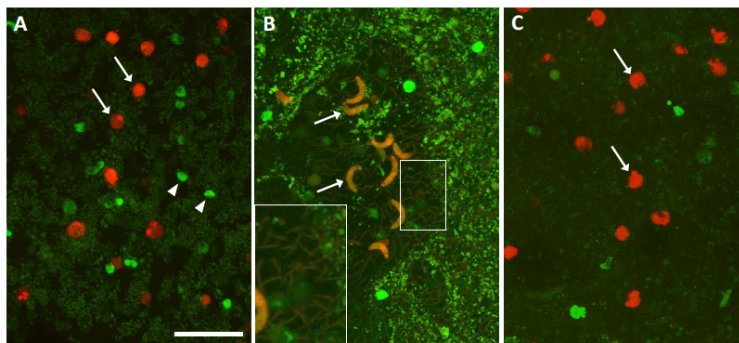


図1 ハマダラカ中腸内における配偶子の動態

A, mRuby2で標識されたメス配偶子(矢印)とmNGで標識されたオス配偶子(矢頭)が透明化されたハマダラカ中腸で検出された。B, 吸血22時間後に同様の観察を行った結果、ほとんどのメス配偶子がオーキネートに形態変化していた。C, オス側受精因子GCS1をノックアウトした原虫ではメス配偶子のオーキネート変換は起こらない。スケールバー; 30 μ m

(2) ネズミマラリア GCS1 と BioID2 を連結した分子 GCS1-BioID2 をネズミマラリア原虫のゲノムにノックインした株を作製した。同株に感染したマウスにビオチンを投与したところ、ビオチン化タンパク質分子の増加が確認された。次に、同株について *in vitro* 受精アッセイを試み、オス配偶子が受精する際にメス側の分子をビオチン化できるかを解析した。ビオチン存在下で配偶子に受精させ、ビオチン化タンパク質の変化を解析したところ顕著なビオチン化の昂進は見られなかった。オーキネートが検出されなかったことから、BioID2 の連結によって GCS1 の機能が(受精そのものが)阻害されたことが一因として考えられた。

(3) 次に、GCS1 の細胞外ドメインと GFP および BioID2 を連結した分子 eGB (ectodomain-GFP-BioID2) をメス配偶子で特異的に発現する株を作製し、メス配偶子表面で eGB にビオチン化される GCS1 パートナー分子の探索を試みた。ネガティブコントロールとして GCS1 のシグナル配列

のみを用いた sGB を同様に発現する株も作製した (図 2)。それぞれの株に感染したマウスからの採血について、ピオチン存在下の *in vitro* 受精培地で感染赤血球を培養しピオチン化タンパク質の構成を質量分析によって比較解析した。その結果、eGB 株由来のピオチン化タンパク質には既知のメス側受精因子が多く検出されることがわかった。この結果は、eGB がメス配偶子受精因子と類似した挙動を見せることを示唆した。さらに、sGB からは検出されなかったメス配偶子特異的細胞外低分子タンパク質 P22 (仮称) の検出に成功した。この P22 について、ノックアウト原虫の作製を試みた。(1) の計画で作製した 28R/GTA 株について P22 遺伝子座を破壊し、*in vitro* 受精アッセイを行ったところ、受精後のオーキネートが野生型と同程度に検出された。このことから、P22 は受精に必要な分子ではないものと結論した。

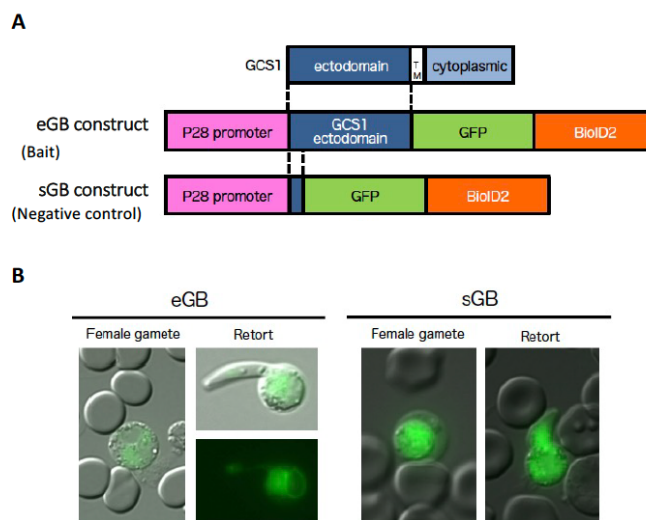


図2 メス配偶子特異的GCS1-BioID2発現株の作製
A, eGBはGCS1の細胞外ドメインの全長を含むのに対し、sGBはGCS1のシグナル配列のみを含む。いずれもメス配偶子特異的プロモーターP28 promoterの下流に連結した。B, メス配偶子におけるeGB, sGBの発現。いずれもメス特異的なGFPシグナルとして検出され、オーキネート変換時 (Retort) にも発現が持続する。

このことから、P22 は受精に必要な分子ではないものと結論した。

(4) GCS1 の細胞外ドメインを新型ピオチン化酵素 TurboID と連結した GCS1-TurboID をコムギ胚芽の無細胞系で *in vitro* 合成し、ネズミマラリア原虫の *in vitro* 受精における受精阻害アッセイを試みた。GCS1 の細胞外ドメインと GFP および TurboID を連結した GGT、GCS1 の機能モチーフである cd loop 構造と GFP および TurboID を連結した LGT、そしてネガティブコントロールである GFP と TurboID の連結分子 GT の遺伝子コンストラクトを発現ベクターで作製し、コムギ胚芽の無細胞系を用いて合成することに成功した。得られた各タンパク質を、(1) の計画で作製した 28R/GTA 株の *in vitro* 受精培地に添加し受精後のオーキネート形成率を比較したところ、GGT および LGT を添加したものにおいて顕著なオーキネート形成率の低下が確認された (図 3)。この結果は GGT や LGT 分子中の GCS1 領域が受精をブロックした可能性を示唆しており、今後 GCS1 のメス側パートナー分子探索のツールとしての有用性が期待された。

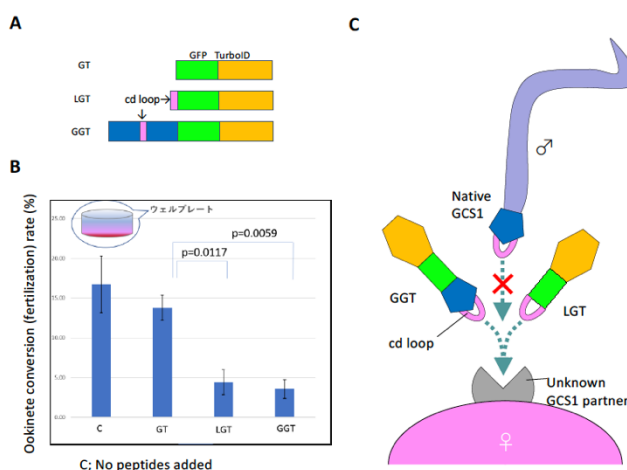


図3 *in vitro*合成GCS1-TurboIDによる受精阻害
A, LGTはcd loopのみ、GGTはGCS1の細胞外ドメインの全長を含めたコンストラクトとした。B, *in vitro*受精アッセイにおいて、LGTおよびGGTを含んだ培地で顕著な受精阻害が確認された。C, GGTおよびLGTによる受精阻害のモデル図。

<引用文献>

- Hirai M, Arai M, Mori T, Miyagishima SY, Kawai S, Kita K, Kuroiwa T, Terenius O, Matsuoka H. Male fertility of malaria parasites is determined by GCS1, a plant-type reproduction factor. *Curr Biol.* 2008 Apr 22;18(8):607-613.
- Mori T, Hirai M, Mita T. See-through observation of malaria parasite behaviors in the mosquito vector. *Sci Rep.* 2019 Feb 11;9(1):1768.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Kubo-Irie M, Hirai M, Irie M, Mohri H	4. 巻 38
2. 論文標題 Postulated Process of Axoneme Organization in the Male Gametogenesis of Malaria Parasite <i>Plasmodium berghei</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Zoolog Sci	6. 最初と最後の頁 187-192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2108/zs200064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukuda N, Tachibana SI, Ikeda M, Sakurai-Yatsushiro M, Balikagala B, Katuro OT, Yamauchi M, Emoto S, Hashimoto M, Yatsushiro S, Sekihara M, Mori T, Hirai M, Opio W, Obwoya PS, Auma MA, Anywar DA, Kataoka M, Palacpac NMQ, Odongo-Aginya EI, Kimura E, Ogwang M, Horii T, Mita T	4. 巻 81
2. 論文標題 Ex vivo susceptibility of <i>Plasmodium falciparum</i> to antimalarial drugs in Northern Uganda	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitol Int	6. 最初と最後の頁 102277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2020.102277	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Matsuzaki R, Suzuki S, Yamaguchi H, Kawachi M, Kanesaki Y, Yoshikawa H, Mori T, Nozaki H	4. 巻 21
2. 論文標題 The Rubisco small subunits in the green algal genus <i>Chloromonas</i> provide insights into evolutionary loss of the eukaryotic carbon-concentrating organelle, the pyrenoid	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Ecol Evol	6. 最初と最後の頁 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12862-020-01733-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi T, Mori T, Igawa T	4. 巻 2160
2. 論文標題 Restricted Pollination for Tracing Individual Pollen Tubes in a Pistil	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 73-81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-0672-8_5	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohashi Y, Mori T, Igawa T	4. 巻 257
2. 論文標題 Behavior of filamentous temperature-sensitive Z2 (FtsZ2) in the male gametophyte during sexual reproduction processes of flowering plants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Protoplasma	6. 最初と最後の頁 1201-1210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00709-020-01503-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Balikagala B, Sakurai-Yatsushiro M, Tachibana SI, Ikeda M, Yamauchi M, Katuro OT, Ntege EH, Sekihara M, Fukuda N, Takahashi N, Yatsushiro S, Mori T, Hirai M, Opio W, Obwoya PS, Anywar DA, Auma MA, Palacpac NMQ, Tsuboi T, Odongo-Aginya EI, Kimura E, Ogwang M, Horii T, Mita T	4. 巻 19
2. 論文標題 Recovery and stable persistence of chloroquine sensitivity in Plasmodium falciparum parasites after its discontinued use in Northern Uganda.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Malar J	6. 最初と最後の頁 76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12936-020-03157-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Mori T, Hirai M, Mita T.	4. 巻 9
2. 論文標題 See-through observation of malaria parasite behaviors in the mosquito vector.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 1768
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-38529-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sekihara M, Tachibana SI, Yamauchi M, Yatsushiro S, Tiwara S, Fukuda N, Ikeda M, Mori T, Hirai M, Hombhanje F, Mita T.	4. 巻 17
2. 論文標題 Lack of significant recovery of chloroquine sensitivity in Plasmodium falciparum parasites following discontinuance of chloroquine use in Papua New Guinea.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Malar J	6. 最初と最後の頁 434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12936-018-2585-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Takahashi T, Mori T, Ueda K, Yamada L, Nagahara S, Higashiyama T, Sawada H, Igawa T.	4. 巻 145
2. 論文標題 The male gamete membrane protein DMP9/DAU2 is required for double fertilization in flowering plants.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev170076
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.170076	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyado K, Kang W, Yamatoya K, Hanai M, Nakamura A, Mori T, Miyado M, Kawano N.	4. 巻 130
2. 論文標題 Exosomes versus microexosomes: Shared components but distinct functions.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Plant Res	6. 最初と最後の頁 479-483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10265-017-0907-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto K, Kawai-Toyooka H, Hamaji T, Tsuchikane Y, Mori T, Takahashi F, Sekimoto H, Ferris PJ, Nozaki H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Molecular evolutionary analysis of a gender-limited MID ortholog from the homothallic species <i>Volvox africanus</i> with male and monoecious spheroids.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0180313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0180313	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Igawa T, Yamada L, Sawada H, Mori T	4. 巻 34
2. 論文標題 Isolation of GFP-tagged plasma membrane protein from <i>Arabidopsis</i> egg cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant Biotechnol	6. 最初と最後の頁 119-123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.17.0522a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi T, Honda K, Mori T, Igawa T.	4. 巻 30
2. 論文標題 Loss of GCS1/HAP2 does not affect the ovule-targeting behavior of pollen tubes.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant Reprod	6. 最初と最後の頁 147-152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00497-017-0305-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 中野 由美子、泉山 信司、平井 誠、川野 哲郎
2. 発表標題 赤痢アメラバミューテーターを利用したミルテフォシン耐性株の迅速単離と全ゲノム解析による耐性遺伝子変異の同定
3. 学会等名 第89回日本寄生虫学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 美田 敏宏、関原 誠、橘 真一郎、山内 祐人、ロベルト アマト、 ソムヤ メーラ、池田 美恵、森 稔幸、平井 誠、バリー アリサ、大橋 順、フランシス ホンバンジェ、ミオットー オリボ
2. 発表標題 パプアニューギニアに出現した K13 C580Y 変異熱帯熱マラリア原虫の集団ゲノム解析
3. 学会等名 第89回日本寄生虫学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平井 誠、森 稔幸、美田 敏宏
2. 発表標題 アルテミシニン耐性マーカーKelch13 ネズミマラリア原虫オルソログの機能解析
3. 学会等名 第89回日本寄生虫学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ochiai S, Maeda J, Hirai M, Mita T, Mori T
2. 発表標題 Synthetic biotin ligase enables to label surface invasion factors of cultured human malaria parasite, Plasmodium falciparum
3. 学会等名 66th ASTMH (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森稔幸、平井誠、美田敏宏
2. 発表標題 ビオチン化を利用した、マラリア原虫新規受精因子の探索
3. 学会等名 第88回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森稔幸、平井誠、美田敏宏
2. 発表標題 マラリア原虫有性生殖の透視観察法の開発
3. 学会等名 第86回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Mori T, Hirai M, Mita T
2. 発表標題 Development of See-Through Imaging Methods for Sexual Reproduction of Malaria Parasites.
3. 学会等名 66th ASTMH (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	平井 誠 (Hirai Makoto) (50326849)	順天堂大学・医学部・准教授 (32620)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------