

令和元年6月3日現在

機関番号：15101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06873

研究課題名(和文) 赤血球期マラリア原虫における栄養素の取込み機構の分子基盤

研究課題名(英文) Molecular mechanism of nutrient uptake by malaria parasite-infected red blood cells

研究代表者

伊藤 大輔 (ITO, Daisuke)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：80609298

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：マラリア原虫の栄養素の取込みの一つは、感染赤血球に形成される原虫特異的なイオンチャンネルを通して行われることが知られており、抗マラリア薬開発の標的となっている。本研究では、遺伝子組換え原虫を用いて栄養素の取込みに関与するRhopH複合体相互作用分子、および先端部小器官分子の同定を試みた。その結果、ロプトリーに局在するRON3が原虫の増殖に必須であり、感染赤血球のイオンチャンネルの形成に関与することを新たに見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、繰り返されてきた薬剤耐性マラリア原虫の出現に終止符を打つことを目的とした耐性獲得リスクの低い栄養素の取込み分子機構を標的とする創薬に繋がる知見となる。これまでに栄養素の取込みに関与する分子として唯一同定されていたRhopH複合体に加えてRON3を新規に同定したことで、赤血球期マラリア原虫の栄養素取込み機構を理解する大きな手がかりを得た。

研究成果の概要(英文)：One of the nutrient uptakes of malaria parasites is mediated by the parasite specific ion channel on infected red blood cells and is an antimalarial drug target. In this study, we attempted to identify RhopH complex interacting proteins and apical organellar proteins that are involved in nutrient uptake using transgenic parasites. Functional analysis of transgenic parasites revealed that Rhoptry neck protein 3 (RON3) is essential for parasite growth and is involved in ion channel formation on infected red blood cells.

研究分野：分子寄生虫学

キーワード：寄生虫 マラリア イオンチャンネル 赤血球 先端部小器官 BioID CRISPR/Cas9 RON3

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

1. 研究開始当初の背景

マラリアは、マラリア原虫が赤血球に寄生することで引き起こされる地球規模の感染症である。現在、薬剤耐性原虫が世界中に蔓延しており、近年、その対策として推奨されているアルテミシニン併用療法に耐性を持つ原虫が出現し深刻な問題となっている。そのため新規薬剤の開発が急務となっているが、薬剤耐性原虫の出現が繰り返される現状を打開するには、マラリア原虫の寄生適応機構を理解し、作用機序が明らかで耐性を獲得させない創薬を目指す必要がある。

マラリア原虫は、宿主赤血球に侵入する際、自身の周囲に寄生胞膜を形成する。その後、寄生胞膜を通して数百種類の原虫タンパク質を感染赤血球表面に分泌する。これにより赤血球膜は宿主免疫からの攻撃を回避する役割を果たす一方、原虫の増殖にとって必須なアミノ酸や脂肪酸といった栄養素を血清中から取り込むように改変される。なお、アミノ酸の取込みは感染赤血球膜上に形成されるイオンチャンネルを通して行われることが知られており、抗マラリア薬開発の標的となっている。またこのイオンチャンネルに対する阻害剤は原虫の増殖を抑制するうえ、さらにアルテミシニンなどの従来治療薬と比較して耐性が獲得されにくいことが示唆されている。研究代表者は、赤血球侵入型原虫であるメロゾイトの先端部小器官に局在する RhopH 複合体がイオンチャンネルの形成に関与することを明らかにしてきたが、それ以外の分子は同定されておらず、栄養素の取込み分子機構の全容は未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究では、薬剤耐性獲得リスクの低い創薬の標的となる、マラリア原虫感染赤血球膜の栄養素の取込み分子機構を解明することを目的とする。アミノ酸の取込みに必須である RhopH 複合体に相互作用する分子を同定し、その機能を明らかにする。また、機能未知な先端部小器官分子の中から、アミノ酸・脂肪酸の取込みに関与する分子を同定する。

3. 研究の方法

(1) RhopH 複合体と相互作用する分子の同定

アミノ酸の取込みに必須であるイオンチャンネルを構成する、またはその形成に重要な役割を果たすと考えられる RhopH 複合体と相互作用する分子を同定する。特異抗体を用いた免疫沈降法では RhopH 複合体以外の分子は検出されなかったため、より感度の高い BioID 法を用いる。ピオチン化酵素を融合した RhopH 複合体を発現する組換え原虫を作成し、複合体と相互作用したピオチン標識分子を検出する。さらに、同定した分子がアミノ酸の取込みに関与することを確認する。

(2) 栄養素の取込みに関わる先端部小器官分子の探索

RhopH 複合体は赤血球侵入型原虫メロゾイトで合成され、先端部小器官と呼ばれる小胞に内包される。この先端部小器官には、RhopH 複合体と同様に、原虫の赤血球侵入後に寄生胞膜や赤血球膜へと輸送される分子が複数存在する。そこで、機能未知な先端部小器官分子に着目して遺伝子組換え原虫を作成し、アミノ酸・脂肪酸の取込みに関与するか否かを確認する。

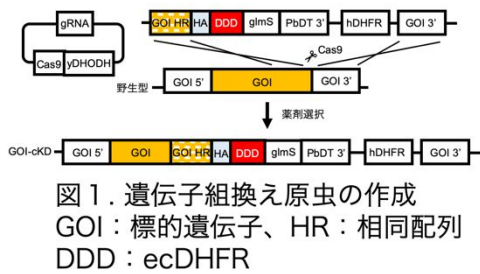
4. 研究成果

(1) RhopH 複合体と相互作用する分子の同定

アミノ酸の取込みに関与する RhopH 複合体に相互作用する分子の同定を試みる。RhopH 複合体を構成する 3 分子のうち、翻訳後に C 末端のプロセシングを受けない RhopH2 の C 末端に大腸菌由来改変型ピオチン化酵素 BioID、または超好熱性細菌由来改変型ピオチン化酵素 BioID2 を付加した RhopH2-BioID 原虫の作成を試みた。研究代表者は CRISPR/Cas9 法を用いて RhopH2 の C 末端に外来タンパク質を融合した組換え原虫を以前に作成しているが、同じプラスミドを用いて BioID 配列を組み込んだプラスミドを構築し、Cas9 発現プラスミドと共にエレクトロポレーション法により原虫に導入した。それぞれ複数回の遺伝子導入を試みたが、遺伝子組換え原虫の増殖が認められなかったことから、BioID による RhopH 複合体のピオチン化は原虫にとって致死的であることが示唆された。今後は任意の時期に BioID を活性化させてピオチン化を誘導するために DiCre-loxP 法などを導入する必要がある。

(2) 栄養素の取込みに関わる先端部小器官分子の探索

機能未知である先端部小器官分子について CRISPR/Cas9 法を用いてコンディショナルノックダウン (cKD) 原虫を作成し、栄養素の取込みに関わる分子の探索を試みる。遺伝子組換え原虫の作成には、ecDHFR-トリメトプリム (TMP) 法によるタンパク質機能制御系と glmS リボスイッチ法による遺伝子発現制御系を合わせて組み込んだプラスミドを用いた。未発表分子を含む 19 種の先端部小器官分子のうち、必須遺伝子である可能性が高い 7 分子を選択した。相同配列として C 末端 500bp と 3' UTR の 500bp を組み込んだプラスミドを構築し、各遺伝子に特異的な gRNA 発現カセットと Cas9 発現カセットを組み込んだプラスミドと共にエレクトロポレーション法により原虫に導入した (図 1)。



上記の遺伝子導入の結果、Rhoptry neck protein 3 (RON3) と未発表分子 2 分子について cKD 原虫の作成に成功したが、残りの 4 分子について組換え原虫の増殖は認められなかった。この結果より、4 分子については ecDHFR の付加による毒性が示唆されたため、タンパク質の機能に影響を与えない glmS リボスイッチ法を用いた cKD 原虫の作成を試みている。得られた 3 分子の cKD 原虫については TMP を除去することで標的タンパク質の機能制御を誘導し、原虫寄生率の推移を評価した。その結果、TMP 非存在下において RON3-cKD 原虫の寄生率の上昇は認められなかった (図 2 A)。RON3 が原虫の増殖にとって必須であることが明らかとなったため、赤血球侵入と成長のどちらに関与しているのか検討した。RON3-cKD 原虫の赤血球侵入前に TMP を除去して侵入後の原虫寄生率を評価した結果、TMP 存在下、非存在下にかかわらず、寄生率に差は認められなかった (図 2 B)。また侵入後に培養を継続した結果、原虫の成長に影響があることが確認された。以上の結果から、RON3 は原虫の赤血球侵入ではなく成長過程において重要な役割を果たすことが示唆されたため、アミノ酸の取込み率を評価したところ、TMP 非存在下で有意に取込み率の低下が認められた (図 2 C)。

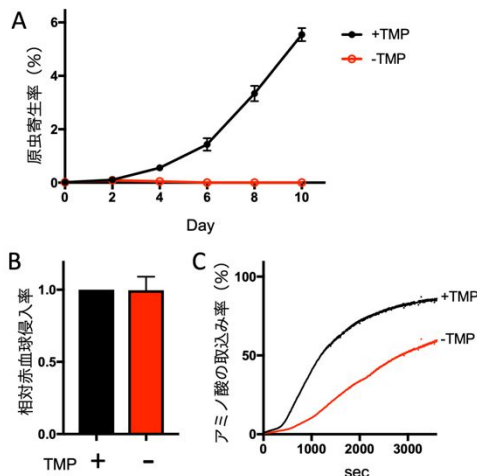


図 2. RON3-cKD の機能解析

以上の結果から、先端部小器官ロプトリーに局在する RON3 が原虫の増殖に必須であり、アミノ酸の取込みに必須であるイオンチャネルの形成に関与することを新たに見出した。よって、今後 RhopH 複合体だけではなく RON3 も含めた栄養素の取込み機構の解析が可能となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 6 件)

Hikaru Nagaoka, Chisa Sasaoka, Takaaki Yuguchi, Bernard N. Kanoi, Daisuke Ito, Masayuki Morita, Rachanee Udomsangpetch, Jetsumon Sattabongkot, Tomoko Ishino, Takafumi Tsuboi, Eizo Takashima. PfMSA180 is a novel *Plasmodium falciparum* vaccine antigen that interacts with human erythrocyte integrin associated protein (CD47). *Sci Rep.* 9(1):5923. (2019) 査読有り

Daisuke Ito, Eizo Takashima, Tsutomu Yamasaki, Shinya Hatano, Tomoyuki Hasegawa, Kazutoyo Miura, Masayuki Morita, Amporn Thongkukiattkul, Mahamadou Diakite, Carole A. Long, Jetsumon Sattabongkot, Rachanee Udomsangpetch, Hideyuki Iriko, Tomoko Ishino, Takafumi Tsuboi. Antibodies against a *Plasmodium falciparum* RON12 inhibit merozoite invasion into erythrocytes. *Parasitol Int.* 68(1):87-91. (2019) 査読有り

Jose M. Ribeiro, Meera Garriga, Nicole Potchen, Anna K. Crater, Ankit Gupta, Daisuke Ito, Sanjay A. Desai. Guide RNA selection for CRISPR-Cas9 transfections in *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol.* 48(11):825-832. (2018) 査読有り

Hideyuki Iriko, Tomoko Ishino, Hitoshi Otsuki, Daisuke Ito, Mayumi Tachibana, Motomi Torii, Takafumi Tsuboi. *Plasmodium falciparum* Exported Protein 1 is localized to dense granules in merozoites. *Parasitol Int.* 67(5):637-639. (2018) 査読有り

Ambuj K. Kushwaha, Liana Apolis, Daisuke Ito, Sanjay A. Desai. Increased Ca⁺⁺ uptake by erythrocytes infected with malaria parasites: evidence for exported proteins and novel inhibitors. *Cell Microbiol.* e12853. (2018) 査読有り

Masayuki Morita, Hikaru Nagaoka, Edward H. Ntege, Bernard N. Kanoi, Daisuke Ito, Takahiro Nakata, Ji-Won Lee, Kazuaki Tokunaga, Tadahiro Iimura, Motomi Torii, Takafumi Tsuboi, Eizo Takashima. PV1, a novel *Plasmodium falciparum* merozoite dense granule protein, interacts with exported protein in infected erythrocytes. *Sci Rep.* 27;8(1):3696. (2018) 査読有り

〔学会発表〕（計6件）

伊藤大輔、西方修馬、土屋僚太、近藤陽子、大槻均 赤血球期マラリア原虫における Rhoptry neck protein 3 タンパク質の機能解析 第88回日本寄生虫学会大会 長崎県 2019

土屋僚太、大槻均、伊藤大輔、近藤陽子、西方修馬 ネズミマラリア原虫赤血球感染関連遺伝子の解析 第88回日本寄生虫学会大会 長崎県 2019

大槻均、伊藤大輔、近藤陽子、蓼本早百合 鳥取県におけるマダニ媒介感染症 第74回日本寄生虫学会西日本支部大会 山口県 2018

森田将之、高島英造、長岡ひかる、Edward H. Ntege、Bernard N. Kanoi、伊藤大輔、李智媛、徳永和明、飯村忠浩、鳥居本美、坪井敬文 新規デンスグラニールタンパク質 PV1 のマラリア原虫感染赤血球内タンパク質輸送における機能 第87回日本寄生虫学会大会 東京都 2018

Daisuke Ito, Marc A. Schureck, Sanjay A. Desai. An essential dual-function complex mediates erythrocyte invasion and channel-mediated nutrient uptake in malaria parasites. 15th Protein Island Matsuyama International Symposium 2017 愛媛県 2017

伊藤大輔、Sanjay A. Desai、大槻均 マラリア原虫感染赤血球における栄養素取込み機構の分子基盤 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 北海道 2017

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。