

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08808

研究課題名(和文)膜形態制御分子の解析からひもとくマラリア原虫の寄生戦略の解明

研究課題名(英文)Analysis of membrane deforming proteins in Malaria parasite

研究代表者

山田 浩司(Yamada, Hiroshi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：80325092

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)：熱帯熱マラリア原虫は、人体に侵入後赤血球に寄生し増殖する。赤血球に寄生した原虫は、多数の膜構造で囲まれておりこれら膜を介して物質輸送や生存に必要なタンパクや関連分子の輸送を行う。特に、この物質輸送は、ヘモグロビンや栄養分の取込等に関わる。しかしながら、その機構の大部分はわかっていない。本研究では、熱帯熱マラリア原虫に存在するダイナミン関連タンパクが、膜間輸送の基盤である膜変形を顕著に起こすことをin vitroの系を用いて明らかにした。また、この変形はGTPが関与する可能性を発見した。現在、さらに電子顕微鏡、原子間力顕微鏡を用いて、この機構の詳細を解析している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マラリアは3大感染症の一つであり、世界で最も被害の大きい寄生虫感染症である。抗マラリア薬は主要な治療法であるが、薬剤耐性の出現、拡散により、その対応が急務である。熱帯熱マラリア原虫は、赤血球に寄生すると膜輸送を発達させ栄養分を取り込み、また複雑な膜輸送を伴う寄生環境を構築する。この膜輸送に必須である膜制御タンパク候補をみつけ、その性状を解析した。このタンパクの機能阻害は、膜輸送の不全を引き起こすと考えられる。この知見から、これらタンパクを標的に抗マラリア薬の創製が可能となった。本研究の進展は、原虫生理の理解と創薬の展開に大きく寄与していくものと考えられ、その医学薬学的意義も深い。

研究成果の概要(英文)：Malaria parasite live with erythrocyte and form parasitophorous vacuole (PV) around the parasite. And the parasite develops membrane trafficking system to get nutrients and transport many proteins. In this study, we tried to examine whether or not malarial proteins could participate in these membrane remodeling. We found that the candidate protein directly bound to liposomes and deformed them. The activity of membrane deformation by the protein was altered in the presence of GTP. We are now investigating the detailed mechanism of membrane deformation by the protein using electron microscopy and high speed atomic force microscopy.

研究分野：生化学

キーワード：マラリア 膜輸送

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

1. 研究開始当初の背景

熱帯熱マラリア原虫は、人体に侵入後赤血球に寄生し増殖する。この際、マラリア原虫は生存のため寄生環境を構築する。赤血球内の原虫は、多数の膜構造で囲まれておりこれら膜を介して物質輸送を行う。この物質輸送は、ヘモグロビンや栄養分の取込等に関わる。しかしながら、その機構の大部分はわかっていない。我々は、熱帯熱マラリア原虫のダイナミン関連タンパクの機能を解析し膜輸送の基本メカニズムの解明に取り組んだ。

2. 研究の目的

マラリアは3大感染症の一つであり、世界で最も被害の大きい寄生虫感染症である。現在のところ、抗マラリア薬は主要な治療法であるが、薬剤耐性の出現、拡散により、その対応が急務である。本研究は、熱帯熱マラリア原虫におけるダイナミン関連タンパクの生理機能を明らかにし、得られた知見を元に、これらタンパクを標的とした抗マラリア薬の創製につなげる。

3. 研究の方法

熱帯熱マラリア原虫のダイナミン関連タンパクを調製し、その性状を *in vitro* で解析する。人工球状脂質膜(リポソーム)、脂質膜ナノチューブを用いてダイナミン関連タンパクの膜変形活性の検出及び、その様子を蛍光顕微鏡、電子顕微鏡法により調べる。膜変形以外の機能解析は、GTPase 活性測定を主体とした生化学的解析を行う。

4. 研究成果

4-1. 熱帯熱マラリア原虫のダイナミン関連タンパクが結合するリン脂質の同定

既に、熱帯熱マラリア原虫に存在するダイナミン関連タンパクにつき昆虫細胞発現系で、調製、精製する系を構築した。精製したタンパクを用い、細胞膜を構成するリン脂質に結合するのかわをドットプロット法を用いて調べた。ダイナミン関連タンパクは、酸性リン脂質に結合することが判明した(図は示していない)。特に細胞質側に局在している細胞膜リン脂質に強く結合した。

4-2. ダイナミン関連タンパクによる膜変形

4-1より同定した膜リン脂質を含むリポソームを調製し、ダイナミン関連タンパクによる膜変形作用を調べた。リポソームをローダミン-ホスファチジルエタノールアミンで赤色にラベルした。ダイナミン関連タンパクをフルオレセイン(FITC)で緑色にラベルした。両者を混合し16時間後、レーザー共焦点蛍光顕微鏡にて観察したところ、リポソームにタンパクが結合し変形している像が観察された(図1)。この変形作用は、反応時間を長くする必要があった。分単位の短時間の反応では、変形作用はほとんど観察されなかった。

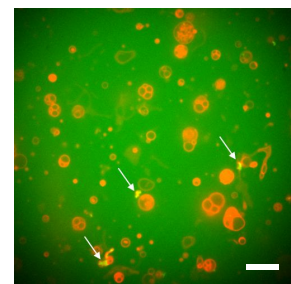


図1: ダイナミン関連タンパクによるリポソームへの結合と変形(矢印)。スケール: 10 μm

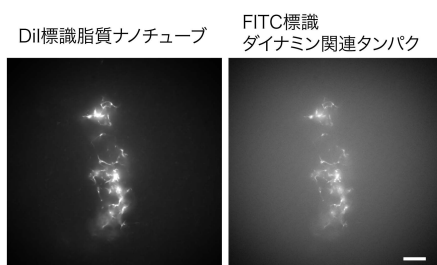


図2: ダイナミン関連タンパクの脂質ナノチューブへの集積と凝集。脂質ナノチューブはDiIでラベルした。脂質ナノチューブにダイナミン関連タンパクが集積するとともに、脂質ナノチューブは凝集した。スケール: 10 μm

さらに、ダイナミンの膜変形解析に汎用される脂質ナノチューブとダイナミン関連タンパクと反応させたところ、脂質ナノチューブの凝集が観察された(図2)。従って、脂質ナノチューブ上で重合したダイナミン関連タンパクの構造を詳細に解析できる可能性がひらけた。現在、この重合体の構造を電子顕微鏡と高速原子間力顕微鏡を組み合わせで解析している。

4-3. ダイナミン関連タンパクによる膜変形の電子顕微鏡による形態観察

ダイナミン関連タンパクによる膜変形能を負染色と透過型電子顕微鏡を組み合わせで調べた。タンパクとリポソームを室温で60分間反応させると、多数の変形したリポソームが観察された。リポソームは、扁平状もしくはチューブ状に変形した。さらに、チューブ状に変形した膜はGTPの添加により速やかに消失した。しかし、チューブ状膜が切断されることにより形成したと考えられる膜小胞を確認できなかった。従って、GTPは膜変形に影響を与える可能性が考えられるが、現状では膜変形とダイナミン関連タンパクによるGTPの加水分解活性との関連は不明である。今後さらなる条件検討が必要である。

4-4. GTPase 欠失変異体のタンパク精製

ダイナミン関連タンパクによる膜変形とそのGTPase活性との相関を調べるために、GTPase活性欠失変異体を作成した。昆虫細胞系で発現させたタンパクは、野生型と同様に精製でき、精製タンパクのGTPase活性の消失も確認した。今後、このタンパクの解析も加えて膜変形を調べる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tadashi Abe, The Mon La, Yuuzi Miyagaki, Eri Oya, Fan-Yan Wei, Kento Sumida, Kenshirou Fujise, Tetsuya Takeda, Kazuhito Tomizawa, Kohji Takei and Hiroshi Yamada	4. 巻 54
2. 論文標題 Phosphorylation of cortactin by cyclin-dependent kinase 5 modulates actin bundling by the dynamin 1-cortactin ring-like complex and formation of filopodia and lamellipodia in NG108-15 glioma-derived cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 550,558
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2018.4663	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 Takuo Hirose, Alfredo Cabrera-Socorro, David Chitayat, Thomas Lemonnier, Olivier Feraud, Carmen Cifuentes-Diaz, Nicolas Gervasi, Cedric Mombereau, Tanay Ghosh, Loredana Stoica, Al Bacha Jeanne d'arc, Hiroshi Yamada et al.	4. 巻 129
2. 論文標題 ATP6AP2 variant impairs CNS development and neuronal survival to cause fulminant neurodegeneration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 2145,2162
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/JCI79990	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 Tetsuya Takeda, Toshiya Kozai, Huiran Yang, Daiki Ishikuro, Kaho Seyama, Yusuke Kumagai, Tadashi Abe, Hiroshi Yamada, Takayuki Uchihashi, Toshio Ando, Kohji Takei	4. 巻 7
2. 論文標題 Dynamic clustering of dynamin-amphiphysin helices regulates membrane constriction and fission coupled with GTP hydrolysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 1,19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.30246	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 Lee, Y., Yamada, H., Pradipta, A., Ma, J.S., Okamoto, M., Nagaoka, H., Takashima, E., Standley, D.M., Sasai, M., Takei, K., Yamamoto, M.	4. 巻 3
2. 論文標題 Initial phospholipid-dependent Irgb6 targeting to Toxoplasma gondii vacuoles mediates host defense	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e201900549
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lsa.201900549	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18件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山田浩司、The Mon La、竹田哲也、阿部匡史、浅沼克彦、竹居孝二
2. 発表標題 腎系球体ポドサイト におけるアンフィファイジン 1 の機能
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部匡史、The Mon La、橘洋美、竹田哲也、竹居孝二、山田浩司
2. 発表標題 腎系球体ポドサイト におけるダイナミンイソフォームの局在と機能
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 The Mon La, Tadashi Abe, Masayuki Morita, Eizo Takashima, Tetsuya Takeda, Katsuhiko Asanuma, Kohji Takei, Hiroshi Yamada
2. 発表標題 Amphiphysin 1 is important for actin cytoskeletal regulation with synaptopodin in glomerular podocyte
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田浩司
2. 発表標題 熱帯熱マラリア原虫の小胞輸送関連分子の解析
3. 学会等名 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
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kohji Takei, Natsuki Wakita, The Mon La, Kento Sumida, Moin Saleem, Tetsuya Takeda, Hiroshi Yamada
2. 発表標題 Dynamin 2 mutation in Charcot-Marie-Tooth disease disturbs reorganization of actin cytoskeleton in glomerular podocyte
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroshi Yamada, Tadashi Abe, Tetsuya Takeda, Eizo Takashima, Masayuki Morita, Kohji Takei
2. 発表標題 Actin bundling mechanism by dynamin GTPase
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹田 哲也, 藤瀬 賢志郎, 延永 裕太, 山田 浩司, 竹居 孝二
2. 発表標題 Elucidating pathogenesis of congenital muscular and neuronal diseases caused by defective membrane remodeling of dynamin GTPase
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤瀬賢志郎, 山田浩司, 竹居孝二, 竹田哲也
2. 発表標題 筋細胞膜の形態形成における張力応答メカニズムの解析
3. 学会等名 2019年生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡本瑞生, 李建振, 山田浩司, 竹居孝二, 竹田哲也
2. 発表標題 ダイナミンによる浸潤突起形成に関わる新規因子の探索
3. 学会等名 2019年生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenshiro Fujise, Kaho Seyama, Yasuka Yamashita, Hiroshi Yamada, Kohji Takei and Tetsuya Takeda
2. 発表標題 Elucidating pathogenesis of congenital myopathy caused by defective membrane remodeling
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会 第51回日本発生生物学会合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤瀬賢志郎、背山佳穂、山下恭加、山田浩司、戸井基道、竹居孝二、竹田哲也
2. 発表標題 膜リモデリングおよびリン脂質代謝異常に起因する先天性ミオパチー発症機序の解明
3. 学会等名 日本筋学会第4回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 隅田健斗、The Mon La、和木田夏輝、森田将之、高島英造、竹田哲也、阿部匡史、竹居孝二、山田浩司
2. 発表標題 ダイナミン2のシャルコー・マリー・トゥース病の原因変異とアクチン再構成との相関
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 The Mon La, Natsuki Wakita, Kento Sumida, Tetsuya Takeda, Tadashi Abe, Kohji Takei, Hiroshi Yamada
2. 発表標題 Role of amphiphysin 1 in actin regulation of glomerular podocyte
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 阿部匡史、山田浩司、竹田哲也、内橋貴之、安藤敏夫、竹居孝二
2. 発表標題 ダイナミン-コルタクチンらせん状複合体の解析：機械的なアクチン線維束形成とアクチン脱重合保護作用
3. 学会等名 2017年生命科学系学会合同年次大会 Conbio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tetsuya Takeda, Toshiya Kozai, Huiran Yang, Kaho Seyama, Yusuke Kumagai, Tadashi Abe, Hiroshi Yamada, Takayuki Uchihashi, Toshio Ando, Kohji Takei
2. 発表標題 "Clusterase" model of dynamin-mediated membrane fission
3. 学会等名 The 2017 ASCB/EMBO meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 和木田夏輝、The Mon La、隅田健斗、竹田哲也、阿部匡史、竹居孝二、山田浩司
2. 発表標題 ダイナミン2のシャルコー・マリー・トゥース病の原因変異は腎ポドサイトのアクチン再構成を阻害する
3. 学会等名 2017年生命科学系学会合同年次大会 Conbio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 The Mon La, Natsuki Wakita, Kento Sumida, Tetsuya Takeda, Tadashi Abe, Kohji Takei, Hiroshi Yamada
2. 発表標題 アンフィファイジン1の腎系球体ポドサイトにおける役割
3. 学会等名 2017年生命科学系学会合同年次大会 Conbio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 竹田哲也、小財稔矢、楊恵然、石黒大輝、背山佳穂、熊谷祐介、阿部匡史、山田浩司、内橋貴之、安藤敏夫、竹居孝二
2. 発表標題 ダイナミンによる膜切断過程の動態イメージング
3. 学会等名 2017年生命科学系学会合同年次大会 Conbio2017
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