

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07088

研究課題名(和文) ヒト血管内皮細胞への接着に關与するサルマラリア原虫分子の解明

研究課題名(英文) Elucidation of Plasmodium knowlesi molecules involved in human endothelial cell adhesion

研究代表者

坂口 美亜子 (SAKAGUCHI, Miako)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：50400651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト血管内皮細胞への接着に關与すると考えられるサルマラリア原虫 *Plasmodium knowlesi* 由来の分子として同定した SICAvAr 遺伝子について、強制発現する組換え原虫を作製した。そしてヒト血管内皮細胞に対する結合アッセイを行ったところ、組換え原虫は野生株に比べ有意に高い接着性を示すことが分かった。

さらにこの遺伝子の組換えタンパク質を作製し、ヒト血管内皮細胞に対する結合アッセイを行ったところ、2つのドメインから成る領域が他の領域に比べ有意に高い接着性を示すことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

東南アジアに生息するマカク属サルを自然宿主とするサルマラリア原虫 *Plasmodium knowlesi* はヒトにも自然感染することが知られており、ヒト感染における重篤化機序の解明が必要であるにも関わらず、*P. knowlesi* 感染赤血球の接着機構に関する研究報告はほとんどなされていない。

本研究により、*P. knowlesi* 感染赤血球のヒト血管内皮細胞への接着に關与すると考えられる SICAvAr 遺伝子を同定し、その組換え原虫や組換えタンパク質によりヒト血管内皮細胞への結合性を確認できたことは、*P. knowlesi* 感染赤血球の接着機構及び血管の塞栓による重篤化機序の解明に繋がる。

研究成果の概要(英文)：Transcriptome analysis indicated that one gene encoding Schizont Infected Cell Agglutination variant (SICAvAr) protein was transcribed in the binding *P. knowlesi* parasites significantly more than the non-binding *P. knowlesi* parasites. The cytoadhesion activity of the identified SICAvAr protein to human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) was confirmed using a transgenic parasite over-expressing this SICAvAr protein. Binding assay of a panel of recombinant SICAvAr proteins with HUVECs revealed that the binding activity of a fragment possessing 2 CRDs was equivalent to the recombinant protein containing entire extracellular region, suggesting 2 CRDs was responsible for the binding to HUVECs.

研究分野：マラリア

キーワード：サルマラリア 感染赤血球 接着現象 SICAvAr トランスクリプトーム

1. 研究開始当初の背景

サルマラリア原虫の一種である *Plasmodium knowlesi* は東南アジアに生息するマカク属サルを自然宿主とするが、ヒトにも自然感染する人獣共通感染性のマラリア原虫であることが報告されている (Singh et al. 2004)。通常は低いヒト感染率を示す *P. knowlesi* だが、マレーシア・ボルネオ島など地域によってはその感染率は高く重篤化し死に至る例が報告され、*P. knowlesi* 感染死亡者の脳内血管では感染赤血球による塞栓が観察されている (Cox-Singh et al. 2010)。

また、*P. knowlesi* は感染赤血球表面に SICAvAr (schizont-infected cell agglutination variant) と呼ばれる接着分子を発現することが知られているが、ヒトに感染した場合に宿主の血管内皮細胞に対して接着することができるのか明らかではない。

現在では *P. knowlesi* は第五番目のヒトマラリア原虫として提唱されており、ヒトへの感染能や病原性、症状の重篤化のメカニズムを解明することの必要性が急速に高まりつつある。

2. 研究の目的

研究背景をもとに、*P. knowlesi* のヒト感染者の重篤化に関与する *P. knowlesi* 感染赤血球の接着機構を明らかにするため、ヒト血管内皮細胞に結合する原虫由来の接着分子を同定することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) まず初めに、高い接着反応を示す原虫集団を得るために、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に対する *P. knowlesi* 感染したサル赤血球の結合アッセイを繰り返し行った。そして、アッセイで得られた接着性の原虫集団とアッセイ前の非接着性の原虫集団について遺伝子発現を比較し接着に関わる SICAvAr あるいは他の候補分子を特定するため、RNA-seq により遺伝子配列を決定し、トランスクリプトーム解析を行った。

(2) 次に、接着性 *P. knowlesi* 原虫において特異的に高発現している 1 つの遺伝子について、遺伝子導入により強制発現する組換え原虫を作製した。この組換え原虫について、付与したエピトープタグ配列の Myc に対する抗体を使用してウェスタンブロッティング及び免疫染色法による顕微鏡観察を行い、目的の遺伝子が発現しているかどうかを確認した。そして、この組換え原虫を用いて HUVEC に対する結合アッセイを行い、接着性について調べた。

(3) さらに、この接着に関与すると考えられる遺伝子の組換えタンパク質を作製し、HUVEC に対する結合アッセイを行った。

4. 研究成果

(1) HUVEC に対する *P. knowlesi* 感染赤血球の結合アッセイの結果得られた接着性の原虫集団とアッセイ前の非接着性の原虫集団について、トランスクリプトーム解析により遺伝子発現を比較した結果、本原虫ゲノムに約 100 個コピーされている SICAvAr 遺伝子のうちの 1 つが、この接着性 *P. knowlesi* 原虫で特異的に高発現していることが分かった。

また、新たに独立した実験として HUVEC に対する *P. knowlesi* 感染赤血球の結合アッセイを繰り返し行い、再び得た接着性原虫集団とアッセイ前の非接着性の原虫集団についてトランスクリプトーム解析により遺伝子発現を比較したところ、最初に得られた接着性原虫と同一の SICAvAr 遺伝子がこの接着性 *P. knowlesi* 原虫においても特異的に高発現しており、再現性が得られた (図 1)。

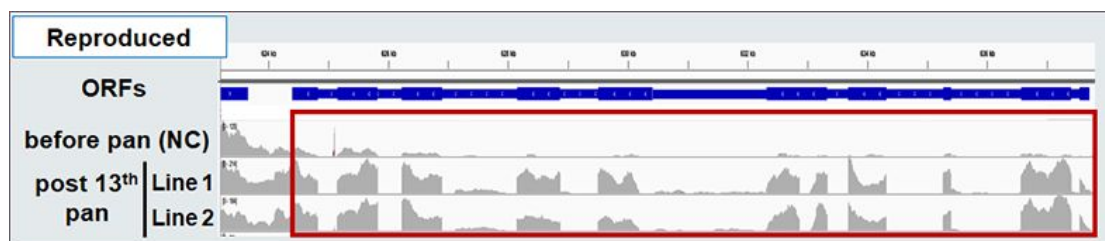


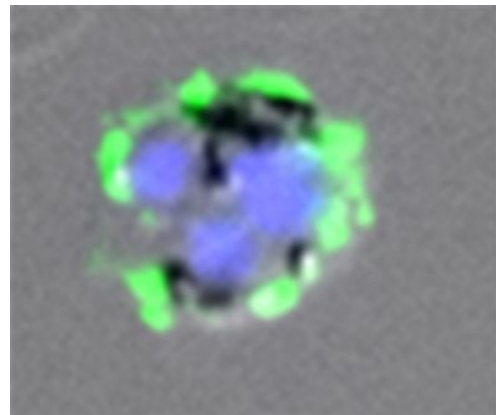
図 1. アッセイ前の非接着性の原虫集団 (NC) と接着性原虫集団 (Line 1, 2) の遺伝子発現の比較。赤い四角で囲まれた部分が対象の SICAvAr 遺伝子で、接着性原虫集団においてのみこの遺伝子が高発現している。

(2) 次に、この SICAvAr 遺伝子について遺伝子導入により強制発現する組換え *P. knowlesi* 原虫を作製した。そしてこの組換え原虫について、付与したエピトープタグ配列の Myc に対する抗

体を使用してウェスタンブロッティング及び免疫染色法による顕微鏡観察を行ったところ、いずれの結果においても目的の SICAvAr 遺伝子が発現していることが確認できた (図 2)。

図 2 . サル赤血球に感染した組換え *P. knowlesi* 原虫 (シゾント期) を免疫染色した顕微鏡画像。

目的の SICAvAr 遺伝子に付与した Myc に対する抗体により、発現した SICAvAr は感染赤血球の表面近くに局在していることが示されている (緑: Myc 抗体、青: 核)。



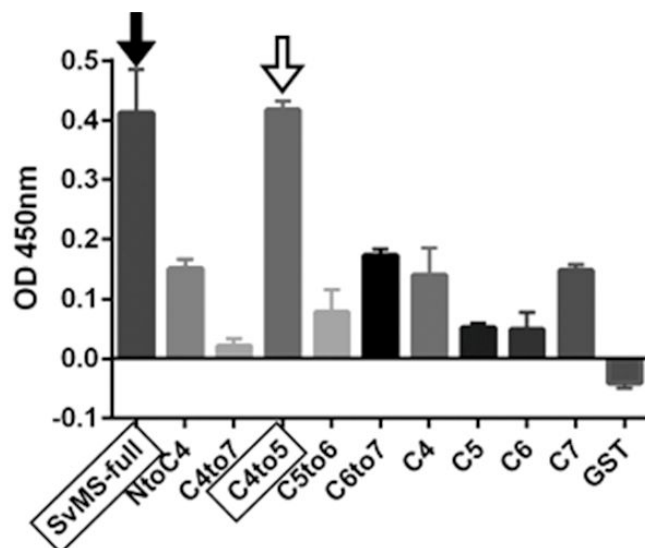
そこで、HUVEC に対するこの組換え原虫の感染赤血球の結合アッセイを行ったところ、組換え原虫は野生株に比べて有意に高い接着性を示すことが分かった。

(3) さらに、*P. knowlesi* 感染赤血球の接着に関与すると考えられるこの SICAvAr 遺伝子について、コムギ無細胞系により組換えタンパク質を作製し HUVEC に対する結合アッセイを行ったところ、Cell ELISA により HUVEC に対して高い結合性を示すことが確認できた。

このタンパク質は複数のドメインにより形成されているが、そのうちのどのドメインが HUVEC のレセプターへの結合に関与するのか調べるために、より小さい領域での組換えタンパク質をさらに作製し、HUVEC に対する網羅的な結合アッセイを行った。その結果、C4-C5 ドメインから成る領域が他のドメインに比べて有意に高い結合性を示すことが明らかとなった。

図 3 . 接着性 *P. knowlesi* 原虫において高発現する SICAvAr の HUVEC に対する結合性。

接着に関与すると考えられるこの SICAvAr について、全長及び各ドメインを含む小さな領域の各組換えタンパク質を作製し HUVEC との結合性を調べた結果、C4-C5 のドメイン (白矢印) のみ全長 (黒矢印) に匹敵する結合性を示したが、他の領域の結合性は有意に低かった。



以上、本研究で *P. knowlesi* 感染赤血球の HUVEC への接着に関与すると考えられる SICAvAr 遺伝子について、同定することができた。そして、この遺伝子を強制発現させた組換え *P. knowlesi* 原虫は、HUVEC に対して有意に高い接着性を持つことが分かった。

さらに、この SICAvAr 遺伝子の組換えタンパク質を作製し HUVEC に対する結合アッセイを行ったところ、C4-C5 ドメインから成る領域が他のドメインに比べて有意に高い結合性を示すことが明らかとなった。ただし、作製した組換え原虫及び組換えタンパク質の配列の一部に誤りが見つかったため修正を行い、現在実験結果の再確認を行っている。

< 引用文献 >

- (1) Singh, B., Sung, L. K., Matusop, A., Radhakrishnan, A., Shamsul, S. S. G., Cox-Singh, J., Thomas, A., Conway, D. J. (2004). A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet* 363: 1017-1024.
- (2) Cox-Singh, J., Hiu, J., Lucas, S.B. et al. (2010). Severe malaria - a case of fatal *Plasmodium knowlesi* infection with post-mortem findings: a case report. *Malaria Journal* 9: 10.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Morimoto Y, Yoshida S, Kinoshita A, Satoh C, Mishima H, Yamaguchi N, Matsuda K, Sakaguchi M, Tanaka T, Komohara Y, Imamura A, Ozawa H, Nakashima M, Kurotaki N, Kishino T, Yoshiura K, Ono S	4. 巻 92
2. 論文標題 Nonsense mutation in CFAP43 causes normal-pressure hydrocephalus with ciliary abnormalities	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurology	6. 最初と最後の頁 e2364-e2374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/WNL.0000000000007505	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 Kyaw Kyaw Aung, Tun Mya Myat Ngwe, Buerano Corazon C., Nabeshima Takeshi, Sakaguchi Miako, Ando Tsuyoshi, Inoue Shingo, Mya Yi Yi, Hayasaka Daisuke, Thu Hlaing Myat, Thant Kyaw Zin, Morita Kouichi	4. 巻 247
2. 論文標題 Isolation and genomic characterization of Culex flaviviruses from mosquitoes in Myanmar	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Virus Research	6. 最初と最後の頁 120 ~ 124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virusres.2018.01.007	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 Asare Kwame Kumi, Sakaguchi Miako, Lucky Amuza Byaruhanga, Asada Masahito, Miyazaki Shinya, Katakai Yuko, Kawai Satoru, Song Chihong, Murata Kazuyoshi, Yahata Kazuhide, Kaneko Osamu	4. 巻 67
2. 論文標題 The Plasmodium knowlesi MAHRP2 ortholog localizes to structures connecting Sinton Mulligan's clefts in the infected erythrocyte	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 481 ~ 492
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2018.04.005	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 Kawai Yusuke, Kawabata Chiaki, Sakaguchi Miako, Tamura Takahiko	4. 巻 41
2. 論文標題 Protection of Baculovirus Vectors Expressing Complement Regulatory Proteins against Serum Complement Attack	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1600 ~ 1605
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b18-00451	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 Zadeh Vahid Rajabali, Urata Shuzo, Sakaguchi Miako, Yasuda Jiro	4. 巻 101
2. 論文標題 Human BST-2/tetherin inhibits Junin virus release from host cells and its inhibition is partially counteracted by viral nucleoprotein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of General Virology	6. 最初と最後の頁 573 ~ 586
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/jgv.0.001414	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 Mousa Eman Abdelazeem Abuelwafa, Sakaguchi Miako, Nakamura Risa, Abdella Osama Hussein, Yoshida Hiroki, Hamano Shinjiro, Mi-ichi Fumika	4. 巻 147
2. 論文標題 The dynamics of ultrastructural changes during Entamoeba invadens encystation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Parasitology	6. 最初と最後の頁 1305 ~ 1312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1017/S0031182020001079	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 Hakimi Hassan, Templeton Thomas J., Sakaguchi Miako, Yamagishi Junya, Miyazaki Shinya, Yahata Kazuhide, Uchihashi Takayuki, Kawazu Shin-ichiro, Kaneko Osamu, Asada Masahito	4. 巻 16
2. 論文標題 Novel Babesia bovis exported proteins that modify properties of infected red blood cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1008917
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1008917	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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Huai Chuang, Amuza Byaruhanga Lucky, Junya Yamagishi, Yuko Katakai, Satoru Kawai, Osamu Kaneko, Miako Sakaguchi
2. 発表標題 Identification of the ligand responsible for the cytoadhesion of Plasmodium knowlesi-infected red blood cells
3. 学会等名 18th Awaji International Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miako Sakaguchi, Amuza Byaruhanga Lucky, Junya Yamagishi, Yuko Katakai, Satoru Kawai, Osamu Kaneko
2. 発表標題 Identification of the ligand responsible for the cytoadhesion of Plasmodium knowlesi-infected red blood cells
3. 学会等名 14th International Congress of Parasitology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂口美亜子, Amuza Byaruhanga Lucky, 山岸潤也, 片貝祐子, 川合覚, 金子修
2. 発表標題 サルマラリア原虫が寄生した赤血球のヒト細胞接着現象
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 荘准, Amuza Byaruhanga Lucky, 山岸潤也, 片貝祐子, 川合覚, 金子修, 坂口美亜子
2. 発表標題 Molecular basis of Plasmodium knowlesi-infected red blood cells to adhere human venous endothelial cells
3. 学会等名 第89回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2020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	川合 覚 (KAWAI Satoru) (70275733)	獨協医科大学・医学部・教授 (32203)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	金子 修 (KANEKO Osamu) (50325370)	長崎大学・熱帯医学研究所・教授 (17301)	
研究協力者	山岸 潤也 (YAMAGISHI Junya) (80535328)	北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・准教授 (10101)	

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