

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07097

研究課題名(和文)核制御を中心とした肝内型マラリア原虫の増殖・休眠分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)Molecular dissection of the nuclear division according to the developmental stages in Plasmodium

研究代表者

案浦 健 (Annoura, Takeshi)

国立感染症研究所・寄生動物部・主任研究官

研究者番号：90407239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：肝内型マラリア原虫の増殖期は、真核生物全体でもトップクラスの高速増殖を行う一方で、全く増殖しない休眠期は最大複数年にもわたり潜むことが報告されているが、その両極端な生命現象は興味深い。その制御の詳細な分子メカニズムは不明である。本研究では、この肝内型原虫の増殖・休眠の分子制御を明らかにするため、核の制御に着目し分子細胞生物学、逆遺伝学、電子顕微鏡学などのアプローチにより分子基盤の解明を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マラリアは、結核・エイズなどと共に世界中に蔓延する感染症の一つであり、赤道付近の熱帯・亜熱帯地域などを中心に広く流行し、様々な対策がなされているが制圧には至っていない。マラリアの病原体であるマラリア原虫はハマダラカによって媒介され、ヒト体内において肝細胞内(肝内型)と赤血球内(赤内型)に寄生する疾患であり、肝内型原虫は休眠期を有しており根治が難しくマラリア対策を困難にする。本研究では、この肝内型原虫の増殖・休眠の分子制御を明らかにするため、核の制御に着目し分子細胞生物学、逆遺伝学、電子顕微鏡学などのアプローチにより分子基盤の解明を試みることで、新たなマラリア対策に付与する研究を展開した。

研究成果の概要(英文)：Plasmodium is a unicellular eukaryotic parasite that is the causative agent of malaria, which is transmitted by Anopheles mosquito. The Plasmodium liver-stage parasite represents the first intracellular infectious step in human following a mosquito bite, and this asymptomatic stage forms several thousands of merozoites with tremendous multinuclear hyper-proliferation. Some Plasmodium species generate a dormant uninucleate parasite during liver-stage development termed the hypnozoite which persists for months or even years following an infection. The developmental decision-making that controls dormancy (or promote proliferation) in Plasmodium liver-stage is made before nuclear segregation. However, the detailed molecular mechanism (s) that regulates proliferation is poorly understood. In this study, we used focused-ion-beam-milling combined with scanning-electron-microscopy to reveal the 3D architecture during nuclear segregation in several developmental stages in Plasmodium.

研究分野：寄生虫学・分子生物学

キーワード：マラリア 核の制御 休眠 増殖 電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

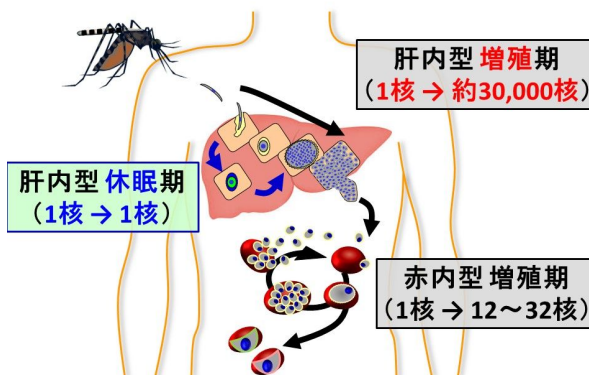
世界最大の感染症の一つであるマラリアは、ハマダラカによって媒介されるマラリア原虫がヒト体内において肝細胞内(肝内型)と赤血球内(赤内型)に寄生する疾患である。この肝内型原虫の増殖期は、真核生物全体でもトップクラスの高速増殖を行う一方で、全く増殖しない休眠期は、平均寿命が約半年とされる肝細胞内で最大複数年にもわたり潜むことが報告されている。この“高速増殖と休眠居座り”という両極端な生命現象は生物学的に興味深い。その分子コントロールは核とリンクすることが示唆されているが、休眠モデル株の不足などの理由から詳細はほとんど解明されていない。本研究では、この肝内型原虫の増殖・休眠の分子制御を明らかにするため、核の制御に着目し分子細胞生物学、逆遺伝学、電子顕微鏡学などのアプローチにより分子基盤の解明に迫る。本研究よりマラリア原虫のユニークな多核体制御機構が明らかとなれば、新たなマラリア対策に有益であるのみならず、生物界全体においても全く新しい細胞分裂・核制御が明らかになる可能性がある。

2. 研究の目的

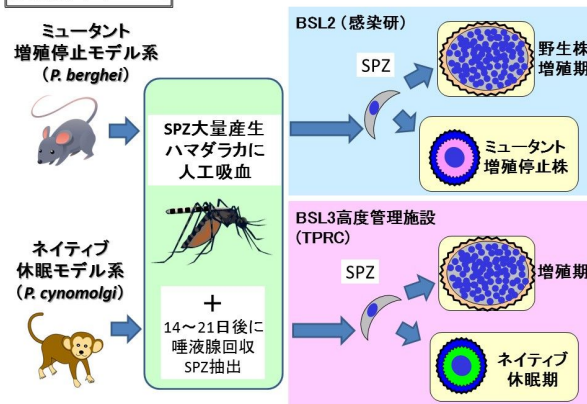
本研究では、肝内型マラリア原虫にユニークな“一細胞内に短時間で多核を形成する増殖”と“一核のまま留まる休眠期”に着目し、その核の増殖動態・分子基盤を明らかにすることで、休眠期の核制御・分子メカニズムの解明を目指す。

マラリアは、年間の罹患者数約2億人、死亡者数は約40万人以上にもおよぶ疾患であり、ワクチンや新薬の開発など様々な対策がなされているが征圧には至っていない。なぜマラリア撲滅は困難なのだろうか？様々な要因が考えられるが、撲滅を難しくする因子の一つとしてマラリア原虫に休眠期が存在することが挙げられる。休眠期原虫は肝臓内に存在し、感染宿主は無症状であるため原虫は時空間的に拡散・伝播できるためマラリア撲滅を困難にしている。休眠期に関する研究上のボトルネックは、休眠期を有する原虫種がヒトや霊長類など限られた宿主にしか感染せず、この感染ハマダラカを維持・管理できる研究施設が非常に限られていることが挙げられる。これまでに研究代表者と研究分担者(川合覚博士)らは、共同研究により、国内初のマラリア原虫ネイティブ休眠期モデル系(*P. cynomolgi*; Pcy)の作製を試みており、非常に良好な予備実験の結果が得られている。そこで本研究課題では、これらの実験系を用いたネイティブ休眠期と、研究代表者らが遺伝子改変技術を用いて作製したミュータント増殖停止モデル系を用いて、電子顕微鏡などによる詳細な解析により、核の増殖制御に関する基盤となる分子メカニズムの解明を試みた。

マラリア原虫の生活環と原虫の核



実験スキーム

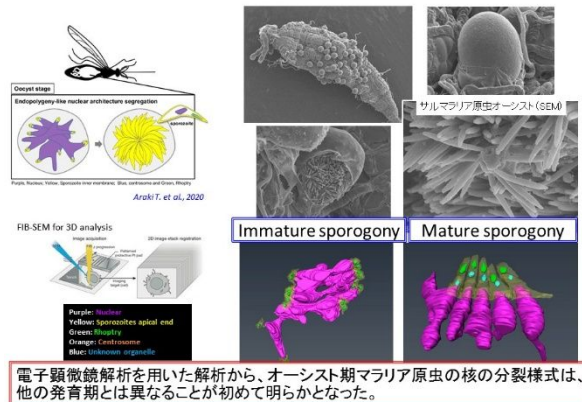


3. 研究の方法

本研究ではマラリア原虫の増殖・休眠の制御機構を明らかにするため、特にその核などのオルガネラの制御機構に着目し、遺伝子導入手法や電子顕微鏡を用いた実験を展開し、細胞生物学・分子生物学などによる詳細な解析を展開した。

研究代表者らはこれまでに、齧歯類特異的マラリア原虫(*P. berghei*; Pb)を用いて様々なミュータント増殖停止・遅延モデル株の作出に成功した。これらの複数のミュータント株を用いて、SPZ 大量産生が可能となるハマダラカに BSL2 管理下にて吸血させ、実験の実施が可能となる十分量の SPZ を回収し、マウスへの *in vivo* 感染実験ならびに肝細胞を用いた *in vitro* 感染実験を展開した。また前述のように代表者と分担者(川合)は、国内初の Pcy を用いたネイティブ休眠期モデル系の作製に予備実験から成功しており、それらを用いて詳細な実験を展開した。実験用ニホンザルの有償譲渡を受け Pcy 感染後、最適のタイミングで採血を行い、感染血液を人工吸血法にてハマダラカに吸血させる。吸血後のハマダラカは霊長類研究センター(TPRC)のBSL3環境下にて管理し、吸血から約14~28日後に顕微鏡下で唾液腺を取り出しSPZを抽出した。取り出したSPZは、代表者が予備実験で成功した各種ヒト肝細胞(*in vitro*)に感染させ観察を行った。観察は免疫蛍光抗体法により休眠期原虫・増殖期原虫の双方を検出し動態を観察した。また各種電子顕微鏡(SEM、TEMならびにFIB/SEM-3D)による解析を実施し、原虫の核やオルガネラなどの細胞内部構造の観察を実施した。

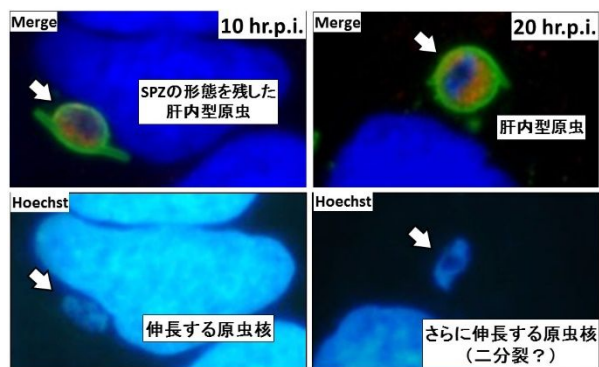
マラリア原虫の核などのオルガネラの3D構造解析(電子顕微鏡)



4. 研究成果

ドナーとなる実験用ニホンザルを用いた実験より、PcyのSPZを大量に調整することに成功した。また得られたPcySPZを異なる実験用ニホンザルに感染させ、*in vivo*にてネイティブ休眠期を高頻度で発生させることに成功し、論文として報告した【*Parasitol Int.* 76:102096. (2020)】。またこのPcyを大量に感染ハマダラカを用いて、増殖期の観察が容易であり、原虫のサイズも大きなオーシスト期の原虫を用いて、各種電子顕微鏡解析を実施したところ、原虫核の分裂増殖様式が赤内期とは異なることが三次元構造解析から明確となった【*Parasitol Int.* 76:102034. (2020)】。これらの見解は、マラリア原虫の核の分裂増殖様式は、発育ステージに応じて明確に異なり、発育期に応じた制御が存在する可能性を示唆している。またPbを用いた*in vitro*感染実験から、肝内型原虫の核の伸長過程などを蛍光顕微鏡下で観察することに成功し、複数のミュータント増殖停止株において停止プロセスが各々異なることが示唆された。これらの増殖停止・遅延の表現型は、*in vivo*感染実験においても確認されており、それらの結果の一部は学会やシンポジウムで発表しており、現在、論文としての公表する準備を行っている。今後、これらの研究を更に発展させることで、全く新しいマラリア対策に付与する分子メカニズム・基盤情報などを明らかにすることを試みる。

肝内型マラリア原虫の増殖期の伸長する核(蛍光顕微鏡写真)



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 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 1).Kawai S, Annoura T, Araki T, Shiogama Y, Soma S, Takano JI, Sato MO, Kaneko O, Yasutomi Y, Chigusa Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Development of an effective alternative model for in vivo hypnozoite-induced relapse infection: A Japanese macaque (<i>Macaca fuscata</i>) model experimentally infected with <i>Plasmodium cynomolgi</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Parasitol Int.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2020.102096.	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 該当する
1. 著者名 2).Araki T, Kawai S, Kakuta S, Kobayashi H, Umeki Y, Saito-Nakano Y, Sasaki T, Nagamune K, Yasutomi Y, Nozaki T, Franke-Fayard B, Khan SM, Hisaeda H, Annoura T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Three-dimensional electron microscopy analysis reveals endopolygeny-like nuclear architecture segregation in <i>Plasmodium</i> oocyst development.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Parasitol Int.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2019.102034.	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 該当する
1. 著者名 Chinh Vu Duc, Masuda Gaku, Hung Vu Viet, Takagi Hidekazu, Kawai Satoru, Annoura Takeshi, Maeno Yoshimasa	4. 巻 47
2. 論文標題 Prevalence of human and non-human primate <i>Plasmodium</i> parasites in anopheline mosquitoes: a cross-sectional epidemiological study in Southern Vietnam	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Tropical Medicine and Health	6. 最初と最後の頁 (2019) 47:9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41182-019-0139-8	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 Armistead Jennifer S., Jennison Charlie, O'Neill Matthew T., Lopaticki Sash, Liehl Peter, Hanson Kirsten K., Annoura Takeshi, Rajasekaran Pravin, Erickson Sara M., Tonkin Christopher J., Khan Shahid M., Mota Maria M., Boddey Justin A.	4. 巻 109
2. 論文標題 <i>Plasmodium falciparum</i> subtilisin-like ookinete protein SOPT plays an important and conserved role during ookinete infection of the <i>Anopheles stephensi</i> midgut	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Microbiology	6. 最初と最後の頁 458 ~ 473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/mmi.13993	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

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 1). 荒木 球沙、川合 覚、菊地 正樹、梅原 崇史、永宗 喜三郎、野崎 智義、久枝 一、案浦 健、
2. 発表標題 「SET-TAIによる肝内型マラリア原虫の増殖制御機構の解明
3. 学会等名 第27回 分子寄生虫学ワークショップ / 第17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 2019年

1. 発表者名 2). 案浦 健、荒木 球沙、川合 覚、前野 芳正、Vu Duc Chinh、久枝 一、
2. 発表標題 霊長類マラリアを用いた原虫の休眠・増殖・病態メカニズムの解明
3. 学会等名 第27回 分子寄生虫学ワークショップ / 第17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 2019年

1. 発表者名 Tamasa Araki, Satoru Kawai, Masaki Kikuchi, Takashi Umehara, Yuko Umeki, Yumiko Saito-Nakano, Blandine Franke-Fayard, Shahid M. Khan, Chris J. Janse, Tomoyoshi Nozaki, Hajime Hisaeda, Takeshi Annoura
2. 発表標題 A novel histone methylase SET-hyp play a critical role in Plasmodium liver-stage development
3. 学会等名 United States-Japan Cooperative Medical Science Program The 50th Joint Conference on Parasitic Diseases; (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 1). Takeshi Annoura, Tamasa Araki, Satoru Kawai, Hiroataka Kobayashi, Michiyo Kataoka, Soichiro Kakuta, Shahid M. Khan, Yasuhiro Yasutomi, Tomoyoshi Nozaki, Hajime Hisaeda
2. 発表標題 Insights into the molecular machinery involved in regulating liver-stage and mosquito-stage proliferation in Plasmodium
3. 学会等名 タイ国立霊長類センター チュラーロンコーン大学 公式オープニングセレモニー及びシンポジウム (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 2). Takeshi Annoura, Tamasa Araki, Satoru Kawai, Hirotaka Kobayashi, Michiyo Kataoka, Soichiro Kakuta, Shahid M. Khan, Tomoyoshi Nozaki, Hajime Hisaeda
2. 発表標題 Insights into the molecular machinery involved in regulating Plasmodium liver-stage proliferation
3. 学会等名 第14回国際寄生虫学会 (ICOPA 2018) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 3). 梅木優子、荒木球沙、川合覚、菊地正樹、梅原崇史、中野由美子、久枝一、○案浦健 (発表者)
2. 発表標題 ヒストン制御機構に着目した新規マラリア薬開発と分子メカニズムの解明
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 4). 案浦健、荒木球沙、川合覚、小林宏尚、片岡紀代、角田宗一郎、Heussler VT、野崎智義、久枝一
2. 発表標題 「核制御を中心としたマラリア原虫の増殖分子メカニズムの解明
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

〔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	佐々木 年則 (Sasaki Toshinori) (10300930)	国立感染症研究所・昆虫医科学部・主任研究官 (82603)	

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 分 担 者	川合 覚 (Kawai Satoru) (70275733)	獨協医科大学・医学部・教授 (32203)	

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