

平成21年6月5日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2008

課題番号：19041007

研究課題名（和文）ハマダラカ *Furrowed* によるマラリア原虫認識メカニズム

研究課題名（英文）Malaria parasite pattern recognition mechanism of Anopheline mosquito

研究代表者

福本 晋也 (FUKUMOTO SHINYA)

帯広畜産大学・原虫病研究センター・講師

研究者番号：50376422

研究成果の概要：ショウジョウバエを蚊の代替生物として用いることにより、蚊の体内における新規のマラリア原虫認識分子 *Furrowed* の同定を行い、ハマダラカ中腸におけるパターン認識分子としてマラリア原虫排除因子として機能していることを明らかにした。また、吸血時に、腸内細菌数の一過性の急激な増加が起こることが明らかになり、これは *Furrowed* の発現上昇パターンと高い相関性を示し、ハマダラカにおけるマラリア原虫の排除には腸内細菌が関与している可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,200,000	0	4,200,000
2008年度	4,300,000	0	4,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	8,500,000	0	8,500,000

研究分野：節足動物感染免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：マラリア、ハマダラカ、*Furrowed*、ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

マラリアは、現在世界的に問題となっている重要な感染性疾患である。マラリアはヒトの赤血球内に寄生し分化したマラリア原虫が、ハマダラカ属の蚊の吸血によってヒトからヒトへと運ばれて発症する。つまり、マラリアの全体像の解明には、ハマダラカの体内における、蚊とマラリア原虫の相互作用を解明することが必須である。しかし、蚊とマラリア原虫の間に働く因子の遺伝学的解析は技術的な理由から困難であり、これまでの進行状況

は芳しくなかった。

研究代表者は、ショウジョウバエを蚊の代替生物として用いることによりこの問題を解決し、蚊の体内における新規のマラリア原虫認識分子 *Furrowed* の同定に成功した。*Furrowed* はC型レクチンファミリーの一つで、この機能を減衰させるとハマダラカにおいてマラリア原虫の発育が促進されることを示した。つまり、*Furrowed* タンパク質はマラリア原虫の排除に関与する因子であると考えられる。そこで本研究では、この *Furrowed*

の機能とマラリア原虫に対する認識メカニズムの解析を進め、蚊におけるマラリア原虫の伝播メカニズムを明らかにし、マラリアの全体像を浮き彫りにすることを目的とした。

マラリア原虫は、媒介体である蚊の細胞と同じ真核生物であり、よく似た細胞成分をもつ病原体を媒介節足動物側がどのように異物として認識しているのかは未知のままであった。このような寄生虫に対する節足動物側の認識メカニズムを明らかにすることは、マラリアのみならず他の感染症における宿主・寄生体相互作用の解明にも応用できると予測された。さらに、蚊から病原体に働く因子の同定および解析は、病原体を媒介しない節足動物の開発の足がかりにもなり、各種感染症制圧への大きな基礎を築くものと期待された。

2. 研究の目的

マラリアは、現在世界的に問題となっている重要な感染性疾患である。マラリアはヒトの赤血球内に寄生し分化したマラリア原虫が、ハマダラカ属の蚊の吸血によってヒトからヒトへと運ばれて発症する。つまり、マラリアの全体像の解明には、ハマダラカの体内における、蚊とマラリア原虫の関係を解明することが必須である。しかし、蚊とマラリア原虫の間に働く因子の遺伝学的解析は技術的な理由から困難であり、これまでの進行状況は芳しくなかった。

研究代表者は、ショウジョウバエを蚊の代替生物として用いることによりこの問題を解決し、蚊の体内における新規のマラリア原虫認識分子 *Furrowed* の同定に成功した。*Furrowed*はC型レクチンファミリーの一つで、この機能を減衰させるとハマダラカにおいてマラリア原虫の発育が促進されることを示した。つまり、*Furrowed*タンパク質はマラリア原虫の排除に関与する因子であると考えられる。そこで本研究では、この *Furrowed* の機能とマラリア原虫に対する認識メカニズムの解析を進め、蚊におけるマラリア原虫の伝播メカニズムを明らかにし、マラリアの全体像を浮き彫りにすることを目的とする。

本研究は、マラリアを「マラリア媒介蚊が有する寄生虫認識メカニズム」という着眼点から解析し、マラリア原虫-ハマダラカの相互作用の全体像を明らかにするという画期的な研究である。蚊の体内に真核生物である寄生虫が侵入すると、蚊は何らかの応答により排除を試みると推測されている。この時最初に関わる因子は、寄生虫に対する認識因子であると思われる。蚊の寄生虫に対する認識

は、同じ真核生物である寄生虫を認識するという点で、細菌などの異物に対する認識と異なっており、極めて正確な認識機構が必要である。侵入してきた寄生虫に対する蚊の認識メカニズムは、寄生虫感染の解明において重要であるにも関わらず、不明な部分が多い。本研究の特徴は、このような真核生物に対する認識に関わる因子の候補として *Furrowed*タンパク質をショウジョウバエを用いて *in vivo*で同定し、これを実際の媒介動物であるハマダラカに適用して解析をおこなうという点にある。今回同定した *Furrowed*タンパク質は、哺乳類Pセレクトインのホモログであり、哺乳類においてマラリア原虫に結合することも明らかにされている。つまり、媒介動物である蚊と、宿主である哺乳類はマラリア原虫に対して似通った認識メカニズムを持っていると予測される。この点は病原体と宿主との相互作用に新たな視点をもたらすと期待される。すなわち本研究の結果がマラリアのみではなく、他の節足動物媒介感染症および哺乳動物の感染症にも応用することが可能であり、新興感染症や再興感染症が問題となっている昨今において、極めて重要な研究課題になり得ると考えられる。さらに、蚊から病原体に働く因子の同定および解析は、病原体を媒介しない節足動物の開発の足がかりにもなる。

以上のように、研究代表者はこれまでに、*furrowed* 遺伝子が蚊体内からのマラリア原虫の排除に働いていることを明らかにしてきた。そこで本研究では、*furrowed* 遺伝子産物が蚊の体内でどのようにマラリア原虫を認識し排除へと導くのか、その詳細を明らかにすることによりマラリア原虫と蚊の相互作用の解明を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

これまでの研究により、蚊体内の *Furrowed*タンパク質の機能を減衰させると、マラリア原虫の発育が促進されることを明らかにした。しかし、蚊の *Furrowed*タンパク質がマラリア原虫を、どの組織でどのように認識しているのかは未知のままである。そこで本研究では、*in vitro*アッセイを用いた *Furrowed*タンパク質のマラリア原虫に対する認識機構の解明と、蚊体内における *Furrowed*タンパク質のマラリア原虫に対する作用の解明を行う。

(1) *Furrowed* タンパク質のマラリア原虫認識機構とその効果の評価

Furrowed タンパク質が直接マラリア原虫に結合し、マラリア原虫の運動に対する影響

を持つかどうか検討する。大腸菌によるタンパク質発現システムを用い、組換えハマダラカ Furrowed タンパク質を回収、精製をおこなう。マラリア原虫感染マウスの血液を培養することにより、マラリア原虫オーキネートを得る。これらのオーキネートを精製し、組換え Furrowed タンパク質を添加した培地で培養する。このオーキネートを免疫染色によって観察し、Furrowed タンパク質のマラリア原虫オーキネートに対する結合能の評価をおこなう。

また、マトリゲルを用いて、マラリア原虫の運動能の評価をおこなう。Furrowed タンパク質を添加したマトリゲルを用意し、マラリア原虫を放飼する。そして、このマトリゲル内でマラリア原虫を運動・移動させ、Furrowed タンパク質がマラリア原虫の運動にどのように影響するのかを明らかにする。これらの実験から、Furrowed タンパク質がマラリア原虫の蚊体内でのサイクルを阻害する可能性を詳細に検討する。

(2) ハマダラカ Furrowed タンパク質の機能解析とマラリア原虫に対する排除機構の解明

マラリア原虫感染血液を吸血したハマダラカにおいて、*furrowed* 遺伝子が実際にマラリア原虫の進入に対する応答に働いていることを検証する。RNA 干渉法を用いた Furrowed タンパク質の発現減衰実験において、マラリア原虫のオーシスト形成が増加したことから、Furrowed タンパク質はハマダラカの中腸で発現・機能し、マラリア原虫の通過を阻害していると予測される。ハマダラカに感染血液を吸血させ、*in situ* ハイブリダイゼーションおよび免疫染色を用いて、*furrowed* 遺伝子と Furrowed タンパク質の発現組織を同定する。次に、ハマダラカがマラリア原虫感染血液を吸血した際の、中腸細胞における *furrowed* 遺伝子の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションおよび免疫染色を用いて観察する。この観察により、マラリア原虫がハマダラカの中腸細胞を通過する際に、進入された中腸細胞において Furrowed タンパク質が発現する可能性を調べる。その後、これらの Furrowed タンパク質が、実際に蚊の中腸においてマラリア原虫の通過を阻害しているかどうかを検討する。

(3) *furrowed* 遺伝子組み換えハマダラカの作成および評価

ハマダラカの *furrowed* 遺伝子を、トランスポゾンをもつベクターである *piggyBac* に挿入し、これをハマダラカ胚にインジェクションすることにより、トランスジェニック・ハマダラカを作成し系統化する。この強制発

現のためのプロモーターには、AgCP 遺伝子のプロモーターを用いる。AgCP 遺伝子は、吸血の刺激により中腸において発現が上昇する遺伝子である。このプロモーターを用いることにより、吸血により中腸細胞で特異的に *furrowed* 遺伝子を強制的に発現させることが可能である。

作成した *furrowed* 強制発現ハマダラカ系統にマラリア原虫を感染させ、蚊体内のマラリア原虫の発育に対する表現型を解析する。ハマダラカの中腸において Furrowed タンパク質を強制的に発現させることにより、マラリア原虫の中腸通過を阻害することができると予測される。これにより、マラリア原虫に対する Furrowed タンパク質の生理機能を検討する。

以上の研究計画に基づき、*furrowed* 遺伝子産物が蚊の体内でどのようにマラリア原虫を認識し排除へと導くのか、その詳細を明らかにすることによりマラリア原虫と蚊の相互作用の解明を目指す。

4. 研究成果

本研究は、マラリアを「マラリア媒介蚊が有する寄生虫認識メカニズム」という着眼点から解析し、マラリア原虫-ハマダラカの相互作用の全体像を明らかにするものである。研究代表者は、ショウジョウバエを蚊の代替生物として用いることにより、蚊の体内における新規のマラリア原虫認識分子 *furrowed* の同定に成功し、この遺伝子が蚊体内からのマラリア原虫の排除に働いていることを明らかにしてきた。本研究では、*furrowed* 遺伝子産物が蚊の体内でどのようにマラリア原虫を認識し排除へと導くのか、その詳細を明らかにすることを目的として研究を行った。

(1) 大腸菌によるタンパク質発現システムを用い、組換えハマダラカ Furrowed タンパク質を回収、精製した。マラリア原虫感染マウスの血液を培養することにより、マラリア原虫オーキネートを回収・精製し、組換え Furrowed タンパクを添加した培地で培養後、ウエスタンブロット法により、Furrowed タンパクのマラリア原虫オーキネートに対する結合能の評価を行った。その結果、Furrowed タンパクの補体様ドメインがマラリア原虫に対して結合能を有することを明らかとした。

(2) また、抗 Furrowed タンパクモノクローナル抗体を作製し、マラリア原虫感染時における Furrowed タンパクの発現変動を、免疫染色により解析した。その結果、Furrowed タンパクはマラリア原虫感染血液の吸血時に平常時と比較し数倍量発現上昇することが明らかとなった。

(1) (2) の結果より、Furrowed はハマダラカ

におけるマラリア原虫感染において、感染初期において直接的な原虫認識分子として機能することで、ハマダラカ体内からのマラリア原虫排除へと導いていることが示唆された。

(3) また、Furrowed の発現パターンのより詳細な解析の結果、吸血時、一過性に急激な発現上昇が起きると同時に、ハマダラカ中腸において腸内細菌数の一過性の急激な増加が起こることが明らかになった。また、この増加は Furrowed の発現上昇パターンと高い相関性を示すことが示唆された。

以上の結果から、ハマダラカにおけるマラリア原虫の排除には腸内細菌が関与している可能性が示唆された。以上の結果より、ハマダラカ中腸内細菌とマラリア原虫の間には明らかな相互作用が存在することが明らかとなり、ベクター・病原体・腸内細菌の相関関係メカニズムを解析することは感染現象を理解するうえで、大きな知見をもたらすことが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Aonuma, H., Suzuki, M., Iseki, H., Perera, N., Nelson, B., Igarashi, I., Yagi, T., Kanuka, H., Fukumoto, S. Rapid Identification of *Plasmodium*-carrying mosquitoes using loop-mediated isothermal amplification. *Biochem Biophys Res Commun.* 376(671-6) 2008 査読有
- ② Okado, K., Shinzawa, N., Aonuma, H., Nelson, B., Fukumoto, S., Fujisaki, K., Kawazu, S., Kanuka, H. Rapid recruitment of innate immunity regulates variation of intracellular pathogen resistance in *Drosophila*. 379(6-10) 2009 査読有
- ③ Perera, N., Aonuma, H., Yoshimura, A., Teramoto, T., Iseki, H., Nelson, B., Igarashi, I., Yagi, T., Fukumoto, S., Kanuka, H. Rapid identification of virus-carrying mosquitoes using reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods.* 156(32-6) 2009 査読有
- ④ Aonuma, H., Yoshimura, A., Perera, N., Shinzawa, N., Bando, H., Oshiro, S., Nelson, B., Fukumoto, S., Kanuka, H. Loop-mediated isothermal amplification applied to filarial parasites detection in the mosquito vectors: *Dirofilaria immitis* as a study model. *Parasit Vectors* 2(15) 2009 査読有

[学会発表] (計20件)

- ① 青沼宏佳、福本晋也、寺本時靖、三浦正幸、八木健、David Schneider、嘉糠洋陸 What *Drosophila* Can Tell Us About Insect-borne Diseases: Mosquito Immune Mechanisms Against Malaria Parasite ショウジョウバエ研究会第8回研究集会(兵庫) 2007.7.3
- ② 青沼宏佳、Stephanie Brandt、福本晋也、寺本時靖、三浦正幸、八木健、嘉糠洋陸、David Schneider Furrowed/CTLSE1 aborts development of *Plasmodium* parasite in *Anopheles gambiae* EMBO WORKSHOP "Molecular and Population Biology of Mosquitoes and Other Disease Vectors (ギリシャ) 2007.7.14
- ③ 寺本時靖、宮内亜宜、吉村文、福本晋也、嘉糠洋陸 Why can't the insect vector be killed by an arbovirus? 7th Awaji International Forum of Infection and Immunity (兵庫) 2007.9.2
- ④ 福本晋也、青沼宏佳、嘉糠洋陸 Pattern recognition of *Plasmodium* parasite in mosquito 7th Awaji International Forum of Infection and Immunity (兵庫) 2007.9.2
- ⑤ 伴戸寛徳、青沼宏佳、福本晋也、嘉糠洋陸 ハマダラカ中腸に存在する細菌がマラリア原虫の発育に与える影響 第77回日本寄生虫学会(長崎) 2008.4.2
- ⑥ 岡戸清、新澤直明、青沼宏佳、福本晋也、河津信一郎、嘉糠洋陸 細菌感染における感受性の多様性と認識シグナル伝達メカニズム 日本分子生物学会第8回春季シンポジウム(北海道) 2008.5.26
- ⑦ 伴戸寛徳、青沼宏佳、福本晋也、嘉糠洋陸 マラリア媒介蚊における腸内細菌と病原体のインターフェース 日本分子生物学会第8回春季シンポジウム(北海道) 2008.5.26
- ⑧ 寺本時靖、吉村文、福本晋也、嘉糠洋陸 ウイルス媒介蚊における抗ウイルス反応メカニズムの解析 日本分子生物学会第8回春季シンポジウム(北海道) 2008.5.26
- ⑨ 新澤直明、青沼宏佳、福本晋也、三浦正幸、嘉糠洋陸 細菌感染におけるトレランス機能による新規感染防御メカニズム 日本分子生物学会第8回春季シンポジウム

- (北海道) 2008. 5. 26
- ⑩ 青沼宏佳、鈴木萌美、井関博、土井裕子、五十嵐郁男、嘉糠洋陸、福本晋也 等温遺伝子増幅法 (LAMP 法) のマラリア原虫媒介蚊への応用 日本分子生物学会第 8 回春季シンポジウム (北海道) 2008. 5. 26
- ⑪ 土井裕子、福本晋也、岡野栄之、嘉糠洋陸 ロバストネスによるマラリア原虫温度適応メカニズム 日本分子生物学会第 8 回春季シンポジウム (北海道) 2008. 5. 26
- ⑫ 青沼宏佳、鈴木萌美、吉村文、井関博、土井裕子、五十嵐郁男、平田晴之、嘉糠洋陸、福本晋也 等温遺伝子増幅法 (LAMP 法) の蚊媒介性感染症への応用 第 146 回日本獣医学会 (宮崎) 2009. 9. 25
- ⑬ 伴戸寛徳、青沼宏佳、福本晋也、嘉糠洋陸 Impact of midgut bacteria on *Plasmodium* development in mosquito 8th Awaji International Forum of Infection and Immunity (兵庫) 2008. 9. 10
- ⑭ 新澤直明、青沼宏佳、福本晋也、三浦正幸、嘉糠洋陸 Cellular encapsulation-based host tolerance in bacterial infection 8th Awaji International Forum of Infection and Immunity (兵庫) 2008. 9. 10
- ⑮ 伴戸寛徳、青沼宏佳、福本晋也、嘉糠洋陸 感染症媒介蚊・腸内細菌・病原体の間に存在するインターフェース 第 8 回昆虫病理研究会シンポジウム (山梨) 2008. 9. 11
- ⑯ 土井裕子、福本晋也、小林朋美、岡野栄之、嘉糠洋陸 マラリア原虫における温度ロバストネス機構 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 (兵庫) 2008. 12. 10
- ⑰ 新澤直明、青沼宏佳、福本晋也、三浦正幸、嘉糠洋陸 貪食細胞による囲い込みは細菌感染に対する tolerance 機能を宿主に付与する 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 (兵庫) 2008. 12. 10
- ⑱ 伴戸寛徳、青沼宏佳、福本晋也、嘉糠洋陸 蚊・マラリア原虫・腸内細菌の三者の相互作用 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 (兵庫) 2008. 12. 10
- ⑲ 木村亜希子、福本晋也、野村伸彦、満山順一、井上昇、河津信一郎、五十嵐郁男 In

vitro and In vivo Antimalarial activity of T-2037, a novel Arylamidine 第 42 回日米医学協力・寄生虫疾患部会合同会議 (東京) 2009. 1. 7

- ⑳ 木村亜希子、福本晋也、野村伸彦、満山順一、井上昇、河津信一郎 新規アリアルアミジン系化合物 T-2307 の抗マラリア活性 第 78 回日本寄生虫学会 (東京) 2009. 3. 28

[図書] (計 0 件)
[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
福本 晋也 (FUKUMOTO SHINYA)
帯広畜産大学・原虫病研究センター・講師
研究者番号：50376422