

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2007 ～ 2008
課題番号：19790308
研究課題名（和文） マラリア原虫の赤血球リガンドの局在と病原性
研究課題名（英文） Localization of erythrocyte invasion ligand defines virulence of Malaria parasites
研究代表者 大槻 均（OTSUKI HITOSHI）
愛媛大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：80403806

研究成果の概要：

マラリア原虫の赤血球侵入分子 EBL は原虫の赤血球侵入にとって必須なリガンド分子であり、かつ重要なワクチン候補分子でもある。本研究により、EBL 分子の機能不明なシステインに富んだ領域 6 が、細胞内輸送におけるマイクロソームへの輸送を決定する部位である事、ネズミマラリア原虫 *Plasmodium yoelii* 17X 株と 17XL 株の赤血球への感染性の違いは、領域 6 のアミノ酸置換を原因とする EBL 分子の異なった細胞内小器官への局在が原因である事が明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

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 病原性 侵入 遺伝子組換え

1. 研究開始当初の背景

マラリア感染成立には、赤血球侵入型原虫（メロゾイト）の先端部小器官に局在する原虫リガンドが、赤血球レセプターを認識することが必須であるため、原虫リガンドは有望なワクチン候補抗原である。マラリア原虫の赤血球侵入機構は単純ではなく、ある侵入経路を阻止しても、別の侵入経路により侵入をすることができる多様性、重要なリガンドは多型性を示し、宿主免疫を回避する宿主免疫回避機構など、複雑かつ洗練されており、ワクチン候補抗原の選択は容易ではない。そこで、マラリア原虫の赤血球侵入機構を詳細に解析することが必要だと考えられる。

2. 研究の目的

マラリア原虫の赤血球侵入に必須の分子である EBL の細胞内での局在の相違が、病原性に影響を及ぼしうるかについてマウスモデルを用いて明らかにする。EBL の局在と病原性の関連性についての報告はこれまでになく、EBL を標的としたワクチン開発にとり有用な知見が得られるものと考えられる。

3. 研究の方法

- (1) PyEBL の第 6 領域の一塩基置換を含む部分を致死株と非致死株のネズミマラリア原虫 *P. yoelii* から PCR 増幅し、一塩基置換領域が致死株型と非致死株型の間で入れ替わるような遺伝子導入用コンストラクトを構築した。
- (2) 電気穿孔法にて致死株と非致死株のネズミマラリア原虫 *P. yoelii* に遺伝子導入してマウスに感染させ、

薬剤で選択を行い、遺伝子組換え原虫を得た。

- (3) 間接蛍光抗体法で第 6 領域の塩基の置換により PyEBL の局在が変化した事を確認した。
- (4) 遺伝子組換え原虫と野生株のネズミマラリア原虫 *P. yoelii* をマウスに感染させたところ、遺伝子組換えによって第 6 領域を強毒型とした弱毒株の感染率は上昇し、逆に弱毒型とした強毒株の感染率は著明に低下した。また感染する赤血球のステージも変化していた。

4. 研究成果

抗 EBL 特異抗体を用いた間接蛍光抗体法で作成した組換え原虫の EBL 分子の細胞内局在を比較した所、17X 株原虫でシステインをアルギニンに置換すると、EBL 分子の局在パターンはマイクロネーム型からデンスグラニュール型へ変化した。また、17XL 株原虫で置換されたアルギニンをシステインへ置換すると、局在のパターンはデンスグラニュール型からマイクロネーム型へ変化した。以上の結果から、EBL 分子領域 6 のこのシステインの置換により、マラリア原虫メロゾイト内の EBL 分子の細胞内小器官への局在が決定されている事が明らかになった。

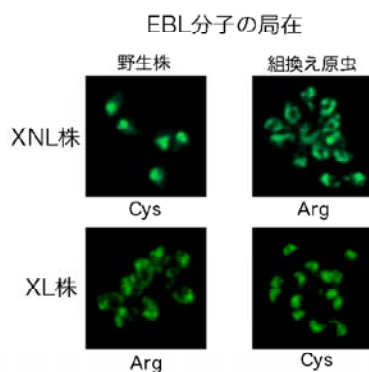
さらに組換え原虫および野生株原虫をマウスに感染させて、赤血球への感染率を比較した所、本来低い感染率を示す 17X 株原虫ではシステインをアルギニンに置換した原虫では感染率が明らかに増加した。逆に高い感染性と致死性を示す 17XL 株でアルギニンをシステインに置換すると、感染率は著明に低

下した。これらの組換え原虫の感染する赤血球ステージを調べた所、未熟赤血球のみに感染する 17X 株では置換により全てのステージの赤血球に感染するようになり、逆に全てのステージの赤血球に感染する 17XL 株では置換後未熟赤血球にしか感染しなくなった。

以上から、領域 6 のシステインがアルギニンに置換される事により、*P. yoelii* の感染しうる赤血球ステージが拡大し、その結果として原虫感染率が上昇する事が示された。

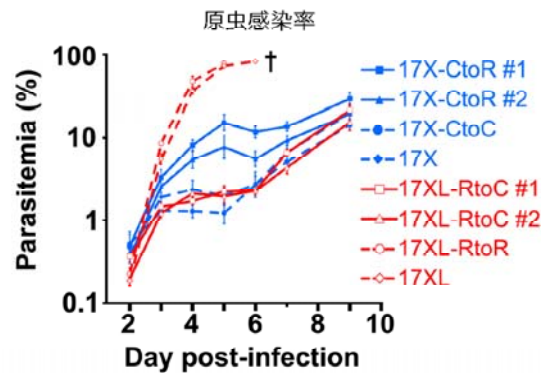
以上より、ネズミマラリア原虫 *P. yoelii* の EBL の中で機能が未同定の領域 6 に着目し、その機能について検討を行った。遺伝子組換え技術を用いて領域 6 内のアミノ酸を置換することにより、EBL の細胞内における細胞内小器官への局在が変化することを示し、領域 6 が EBL の細胞内輸送に関わる重要な部位であることを明らかにした。

さらに、遺伝子組換え原虫のマウスへの感染動態の観察から、領域 6 内のアミノ酸置換による EBL の局在の変化に対応して原虫の感染性が変化することを明らかにすることができた。



第6領域の第2システイン置換

Cys→Arg：マイクロネームからデンスグラニュール
Arg→Cys：デンスグラニュールからマイクロネーム



第6領域の第2システイン置換

Cys→Arg：感染率上昇
Arg→Cys：感染率低下

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 1 件)

大槻 均、金子 修、Amporn Thongkukiattkul、橘 真由美、入子 英幸、竹尾 暁、坪井 敬文、鳥居 本美 Single amino acid substitution in Plasmodium yoelii erythrocyte ligand determines its localization and controls parasite virulence. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America vol.106 no.17 2009 年 7167-7172p、査読有り

[学会発表] (計 3 件)

① 大槻 均、金子 修、Amporn Thongkukiattkul、橘 真由美、入子 英幸、竹尾 暁、坪井 敬文、鳥居 本美 Erythrocyte-Binding-Like molecule and

Virulence of *Plasmodium yoelii* 43rd Annual
U.S.-Japan Joint Conference on Parasitic
Diseases 2009年1月7日 東京

② 大槻 均、金子 修、Amporn
Thongkukiatkul、橘 真由美、入子 英幸、
竹尾 暁、坪井 敬文、鳥居 本美
Erythrocyte-Binding-Like molecule and
Virulence of *Plasmodium yoelii*.
Molecular Parasitology Meeting、2008年9
月21日、米国

③ 大槻 均、金子 修、Amporn
Thongkukiatkul、橘 真由美、入子 英幸、
竹尾 暁、坪井 敬文、鳥居 本美 ネズミ
マラリア原虫の赤血球結合分子 EBL の局在と
病原性 日本寄生虫学会大会 2008年
4月3日 長崎市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大槻 均(OTSUKI HITOSHI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80403806

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：