

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：16301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2019～2022

課題番号：19KK0201

研究課題名（和文）熱帯熱マラリア原虫の滑走運動と赤血球侵入のメカニズム

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of gliding motility and erythrocyte invasion by Plasmodium falciparum

研究代表者

矢幡 一英（YAHATA, KAZUHIDE）

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・准教授

研究者番号：40467965

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,200,000円

研究成果の概要（和文）：重症マラリアの病原体である熱帯熱マラリア原虫は、宿主赤血球に感染して致死的な病原性を示すため、赤血球感染を阻害することで原虫増殖を防ぎ、病状を抑えることができると考えられる。本研究は、近年発見した赤血球侵入期の熱帯熱マラリア原虫が持つ滑走運動に着目し、滑走運動に関わる原虫分子を明らかにした。赤血球侵入期におけるマラリア原虫の滑走運動に関わる分子の同定は、今後、赤血球侵入期を標的とし原虫増殖を抑制するためのワクチン候補抗原につながると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マラリア原虫の赤血球侵入機構の解明は、マラリア原虫の侵入・増殖を阻害する方法を見出すために重要な研究課題である。マラリア原虫の赤血球侵入機構の解明により、マラリア原虫増殖を阻害する具体的な標的が明らかになるため、世界中の研究者が全貌の解明を急いでいる。本国際共同研究による原虫分子の同定は、創薬やワクチン開発の新しい標的候補分子となり得るため、マラリアのコントロールと撲滅のための更なる国際的な共同研究に発展していくものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Plasmodium falciparum invades the host's red blood cells and causing severe malaria. Therefore, it is thought that inhibition of infection of erythrocytes could prevent the growth of malaria parasites. In this study, we focused on the recently discovered gliding motility of Plasmodium merozoites during the erythrocyte invasion stage and identified the parasites molecules involved in the gliding motility. The identification of parasites' molecules involved in the erythrocyte invasion stage is expected to be a candidate antigen for future vaccines that target the erythrocyte invasion stage and inhibit the growth of malaria parasites.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア 赤血球侵入 滑走運動

1. 研究開始当初の背景

マラリア原虫を含むアピコンプレクサ原虫は、「滑走運動」と呼ばれるユニークな運動機構を使って宿主細胞・組織上を滑走した後、宿主細胞に侵入することが知られている。滑走運動の推進力は、細胞外で宿主分子と接着した原虫分子が原虫細胞内でアクチン-ミオシン複合体からなる、アクチンモーターに結合することにより生ずると考えられている。マラリア原虫は、媒介蚊内と宿主肝臓内におけるオオキネートとスポロゾイトが滑走運動をすることが古くから知られているが、赤血球侵入期におけるマラリア原虫メロゾイトの滑走運動はこれまで見られなかったことから、メロゾイトは滑走運動を持たないと言われてきた。しかしながら、マラリア原虫の赤血球侵入のタイムラプス解析を行う過程で、メロゾイトがトキソプラズマなど他のアピコンプレクサ原虫より遅いスピードで滑走運動を行なっていることを見出した。メロゾイトの滑走運動は感染赤血球放出後1分以内と短期間で見られ、これはメロゾイトの赤血球侵入能が感染赤血球放出後1分程度であることと一致したことから、見られた滑走運動能はメロゾイトの赤血球侵入能に深く関与していることを示唆した。また、マラリア原虫メロゾイトの赤血球侵入時には、メロゾイトが接着した直後に赤血球が著しく変形することが見られるが、この間に原虫の赤血球侵入分子の活性化や赤血球膜構造の変化が起こっていることが示唆された。赤血球変形はこれまでメロゾイト表面分子と赤血球表面分子が結合と分離を繰り返しているためと考えられていたが、分子レベルでのメカニズムはほとんど分かっておらず、観察されるダイナミックな変形の動きも分子間相互作用だけでは説明できなかったが、マラリア原虫メロゾイトの滑走運動により、このダイナミックな赤血球変形が起こっていることが示唆された。

2. 研究の目的

重症マラリアの病原体である熱帯熱マラリア原虫は、宿主赤血球に感染して致死的な病原性を示すため、赤血球感染を阻害することで原虫増殖を防ぎ、病状を抑えることができると考えられる。本研究は、我々が最近発見した赤血球侵入期に用いられる熱帯熱マラリア原虫メロゾイトの「滑走運動」に着目する。これまで、メロゾイトの滑走運動時間と赤血球侵入時間に相関性が見られたこと、メロゾイトの赤血球接着時に起こる赤血球変形がメロゾイトの滑走運動によって起こされていることが示唆された(図1)。しかしながら、未だメロゾイトの滑走運動と赤血球侵入に関わるワクチン抗原候補として考えられる原虫分子は同定できていないことから、マラリア原虫メロゾイトの滑走運動に関わる分子を明らかにし、マラリア原虫メロゾイトの基質上での滑走運動および赤血球接着時における赤血球変形の動きの背景にある分子機序を明らかにすることでマラリア克服のための新たな標的とシーズを創出することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 滑走運動に関わる分子の同定

近年トキソプラズマ原虫で明らかとなった、原虫アクチンと原虫表面分子を繋ぐコネクタ分子(GAC)が滑走運動の中心分子であると予想されたことから、熱帯熱マラリア原虫オーソログ(PfGAC)にMycタグを付加した遺伝子組換えマラリア原虫を作出し、PfGACに結合する原虫タンパク質をプロテオーム解析した。PfGACにMycタグを付けたプラスミドをエレクトロポレーション法により熱帯熱マラリア原虫に遺伝子導入し、WR99210とG418選抜によりMycタグがゲノム上のPfGACの3'末端側に組込まれた遺伝子組換えマラリア原虫を作出した。その遺伝子組換えマラリア原虫からシズント期原虫をパーコール濃度勾配法にて精製し、Myc抗体でPfGACのタンパク質発現と免疫染色による局在解析をおこなった。その後、シズント期原虫をPFA架橋後にタンパク質抽出し、Myc抗体で免疫沈降した原虫タンパク質を回収し、質量分析法によりPfGACに結合する原虫タンパク質を同定した。

(2) 抗体ライブラリを用いた滑走運動に関わる分子の同定

コムギ無細胞タンパク質合成法により作出された、マラリア原虫メロゾイトのタンパク質に対する抗体ライブラリーを用いて、メロゾイトの滑走運動後に残すと考えられる関連分子の軌跡を免疫染色し、どの分子が滑走運動に関わっているのか蛍光顕微鏡を用いて軌跡を評価した。放出されたメロゾイトをPFAで固定し、免疫染色法によりマラリア原虫分子の局在解析を蛍光顕微鏡でおこなった。使用した1次抗体はコムギ無細胞タンパク質合成法により作出した、マラリア原虫メロゾイトのタンパク質に対する抗体ライブラリーから選択した39抗体を4グループに分けてカクテル抗体とした。また、2次抗体としてAlexa488抗体を用いた。

(3) マラリア原虫メロゾイトの滑走運動の宿主細胞特異性

メロゾイトが滑走運動するために必要な基質として宿主細胞特異性があるのか、赤血球、

血管内皮細胞、HeLa 細胞をそれぞれ播種した ibidi スライドを作成し、そのスライド内にシズント期原虫を入れ、放出されたメロゾイトの滑走運動を倒立顕微鏡下で測定した。

4. 研究成果

- (1) PfGAC に結合する原虫分子を明らかにするため、熱帯熱マラリア原虫のゲノム上にある PfGAC の 3 末端側に Myc タグを付加した遺伝子組み換え原虫を作成した。得られた遺伝子組換え体は 2 クローンを単離し、ウエスタンブロット、免疫染色法により PfGAC の発現とメロゾイトにおける局在確認をおこなったところ、PfGAC は可溶性画分に見られ、またメロゾイト先端部分と原虫膜に局在した。PfGAC と結合する原虫タンパク質を同定するため、分裂期マラリア原虫のタンパク質を抽出し、Myc 抗体で免疫沈降し、共沈したタンパク質を回収して質量分析法により PfGAC に相互作用する原虫分子を同定した (図 2)。この結果、10 種類以上の既知、また機能未知な原虫タンパク質を同定することができた。現在、これらの原虫タンパク質が滑走運動に関わっているのか機能解析を進めているところである。

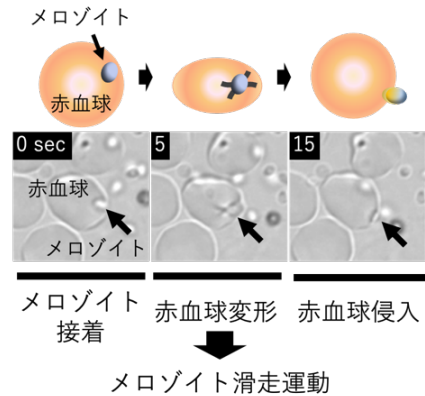


図1. 熱帯熱マラリア原虫の赤血球侵入

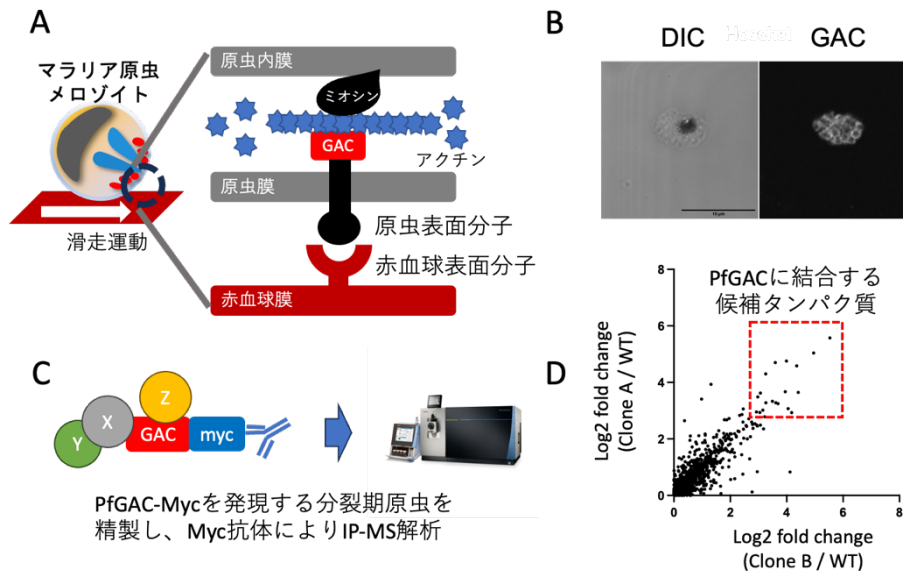


図2. PfGACに結合する原虫タンパク質のプロテオミクス解析

- (2) 滑走運動に関わる原虫分子のうちメロゾイト表面に提示される分子を明らかにした。カクテル抗体 A (10 抗体) とカクテル抗体 B (11 抗体) の 2 グループの抗体を用いた免疫染色法により、メロゾイト表面とメロゾイトがスライド上に残したと考えられる原虫分子による軌跡を検出することができた (図 3)。蛍光抗体により検出した原虫分子の軌跡は、ライブイメージングでメロゾイトが移動した軌跡と類似していることから、使用した抗体に対する原虫抗原は滑走運動に関わる原虫分子であることが示唆された。現在、カクテル抗体のうち、どの抗体によって軌跡が検出できるのか引き続き解析をおこなっている。今後、軌跡として見られる原虫分子を同定し、その原虫分子をノックダウン/ノックアウトすることにより、メロゾイトの滑走運動、さらには赤血球侵入に対する影響を調べる予定である。

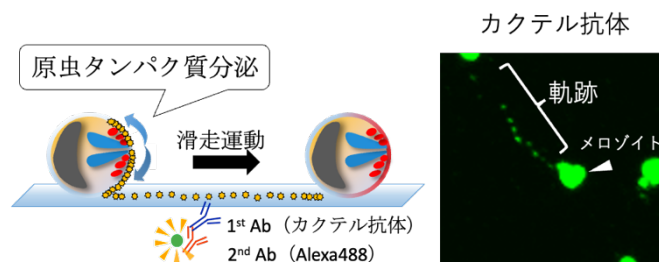


図3. メロゾイト滑走運動に関わる原虫タンパク質

- (3) メロゾイトの赤血球膜接着と滑走運動が細胞特異的に起こるのか、赤血球と血管内皮細胞、また Hela 細胞と比較したところ、赤血球以外ではメロゾイトの滑走運動が見られず、赤血球特異的な現象であることが分かった。
- (4) マラリア原虫の赤血球侵入現象に滑走運動が関わっていることを世界で初めて発見した事例として PNAS 誌に報告した (Yahata K et al. PNAS 2021)。

<引用文献>

Yahata K, Hart MN, Davies H, Asada M, Wassmer SC, Templeton TJ, Treeck M, Moon RW, Kaneko O. Gliding motility of *Plasmodium* merozoites. Proc Natl Acad Sci U S A. 118(48):e2114442118 (2021).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Chaiyawong Nattawat, Ishizaki Takahiro, Hakimi Hassan, Asada Masahito, Yahata Kazuhide, Kaneko Osamu	4. 巻 86
2. 論文標題 Distinct effects on the secretion of MTRAP and AMA1 in Plasmodium yoelii following deletion of acylated pleckstrin homology domain-containing protein	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102479 ~ 102479
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2021.102479	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 Yahata Kazuhide, Hart Melissa N., Davies Heledd, Asada Masahito, Wassmer Samuel C., Templeton Thomas J., Treeck Moritz, Moon Robert W., Kaneko Osamu	4. 巻 118
2. 論文標題 Gliding motility of Plasmodium merozoites	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	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) 10.1073/pnas.2114442118	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 Miyazaki Shinya, Chitama Ben-Yeddy Abel, Kagaya Wataru, Lucky Amuza Byaruhanga, Zhu Xiaotong, Yahata Kazuhide, Morita Masayuki, Takashima Eizo, Tsuboi Takafumi, Kaneko Osamu	4. 巻 83
2. 論文標題 Plasmodium falciparum SURFIN4.1 forms an intermediate complex with PTEX components and Pf113 during export to the red blood cell	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102358 ~ 102358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2021.102358	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 Ishizaki Takahiro, Asada Masahito, Hakimi Hassan, Chaiyawong Nattawat, Kegawa Yuto, Yahata Kazuhide, Kaneko Osamu	4. 巻 85
2. 論文標題 cAMP-dependent protein kinase regulates secretion of apical membrane antigen 1 (AMA1) in Plasmodium yoelii	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102435 ~ 102435
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2021.102435	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 Miyazaki Shinya, Chitama Ben-Yeddy Abel, Kagaya Wataru, Lucky Amuza Byaruhanga, Zhu Xiaotong, Yahata Kazuhide, Morita Masayuki, Takashima Eizo, Tsuboi Takafumi, Kaneko Osamu	4. 巻 83
2. 論文標題 Plasmodium falciparum SURFIN4.1 forms an intermediate complex with PTEX components and Pf113 during export to the red blood cell	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102358 ~ 102358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2021.102358	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 -
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 -

1. 著者名 Sulistiyowaty Melanny Ika, Uyen Nguyen Hoang, Sukanuma Keisuke, Chitama Ben-Yeddy Abel, Yahata Kazuhide, Kaneko Osamu, Sugimoto Sachiko, Yamano Yoshi, Kawakami Susumu, Otsuka Hideaki, Matsunami Katsuyoshi	4. 巻 26
2. 論文標題 Six New Phenylpropanoid Derivatives from Chemically Converted Extract of Alpinia galanga (L.) and Their Antiparasitic Activities	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 1756 ~ 1756
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2020.102056	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 Ishizaki Takahiro, Chaiyawong Nattawat, Hakimi Hassan, Asada Masahito, Tachibana Mayumi, Ishino Tomoko, Yahata Kazuhide, Kaneko Osamu	4. 巻 76
2. 論文標題 A novel Plasmodium yoelii pseudokinase, PypPK1, is involved in erythrocyte invasion and exflagellation center formation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102056 ~ 102056
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2020.102056	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 Tiburcio Marta, Yang Annie S. P., Yahata Kazuhide, Suarez-Cortes Pablo, Belda Hugo, Baumgarten Sebastian, van de Vegte-Bolmer Marga, van Gemert Geert-Jan, van Waardenburg Youri, Levashina Elena A., Sauerwein Robert W., Treeck Moritz	4. 巻 10
2. 論文標題 A Novel Tool for the Generation of Conditional Knockouts To Study Gene Function across the Plasmodium falciparum Life Cycle	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 mBio	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) 10.1128/mBio.01170-19	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5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Kazuhide Yahata, Heledd Davies, Masahito Asada, Thomas J. Templeton, Moritz Treeck, Osamu Kaneko
2. 発表標題 Gliding motility and erythrocyte invasion of Plasmodium falciparum merozoites
3. 学会等名 2022 ASTMH Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 矢幡一英
2. 発表標題 マラリア原虫の赤血球侵入と滑走運動
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 矢幡一英
2. 発表標題 マラリア原虫メロゾイトの滑走運動と赤血球侵入機構
3. 学会等名 第91回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuhide Yahata
2. 発表標題 Gliding motility in Plasmodium falciparum
3. 学会等名 The 14th NUS-Nagasaki Joint Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuhide Yahata, Heledd Davies, Masahito Asada, Thomas J. Templeton, Moritz Treeck, Osamu Kaneko
2. 発表標題 Gliding motility of Plasmodium falciparum merozoites
3. 学会等名 Molecular Approaches to Malaria (国際学会)
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	佐倉 孝哉 (SAKURA TAKAYA) (60816726)	長崎大学・熱帯医学研究所・助教 (17301)	
研究分担者	アサレ クワメ・クミ (ASARE KWAME KUMI) (70854222)	長崎大学・熱帯医学研究所・特任研究員 (17301)	

	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)		

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			
英国	The Francis Crick Institute	LSHTM		