

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590426

研究課題名（和文）比較ゲノムによるマラリア原虫受精メカニズムの解明

研究課題名（英文）The mechanisms of sexual reproduction of malaria parasites

研究代表者

平井 誠 (HIRAI MAKOTO)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：50326849

研究成果の概要（和文）：植物とマラリア原虫の比較ゲノム解析を行った結果、植物受精にとって必須な因子である GCS1 (Generative Cell Specific 1) の相同分子がマラリア原虫にも存在することを見出した。GCS1 欠損マラリア原虫を作製しその受精能を検証した結果、GCS1 はマラリア原虫においても受精に必須である事、すなわち植物とマラリア原虫の受精メカニズムが GCS1 を基盤として営まれている事実を初めて見出した。

研究成果の概要（英文）：

By performing comparative genomics analysis, we identified the malaria orthologue of plant reproduction factor, GCS1 (Generative Cell Specific 1) and named it as PbGCS1. PbGCS1(-) parasites completely lost the fertility, indicating that PbGCS1 is surely functional orthologue of plant GCS1. Our findings indicate that GCS1-based sexual reproduction systems are conserved in various organisms.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：寄生虫学

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：マラリア原虫、比較ゲノム、受精、GCS1

1. 研究開始当初の背景

マラリア原虫の受精は蚊の消化管内腔で行われる。一对の雌雄原虫が受精したのち千個以上にも増殖する。マラリア原虫のライフサイクルを蚊の体内における受精のステップで断つ試みは、マラリアコントロールの新戦略である。この戦略を成功させるためにはマラリア受精のメカニズム、そして立ち働く受精因子を同定することが前提であるが全く

明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究は、植物を含むモデル生物の受精因子のマラリアオルソログを探索し、これを足掛かりとしてマラリア原虫の受精因子の同定、およびマラリア原虫と異種生物間で保存されている受精共通因子と機構を発見する。

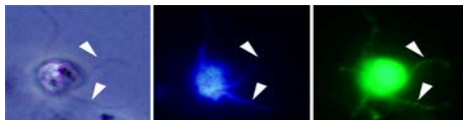
3. 研究の方法

1) モデル生物の生殖細胞に特異的に発現している遺伝子のネズミマラリア原虫 (*P. berghei*) オルソログを探索する。次に、推定オルソログ遺伝子のプロモーター下に GFP をつけたコンストラクトを作製し、*P. berghei* に導入する。レポーターの発現を指標としてオルソログ遺伝子が *P. berghei* 生殖細胞に特異的に発現していることを確認する。

2) 生殖細胞特異的に発現している推定オルソログ遺伝子を欠損した *P. berghei* を作製し、欠損株の受精能を調べることにより機能的オルソログ遺伝子をスクリーニングする。

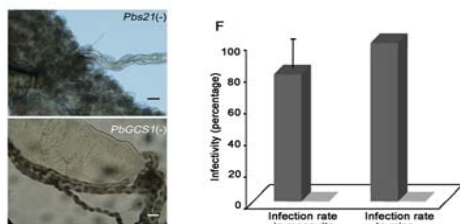
4. 研究成果

1) テッポウユリの精細胞特異的に機能することが知られている GCS1 遺伝子の *P. berghei* オルソログ (PbGCS1) に注目し、発現解析を行ったところ、*P. berghei* では雄性配偶子特異的に発現していることを見出した。



(♂配偶子; 明視野像 (左)、DAPI 染色像 (中)、GFP 蛍光像 (右))

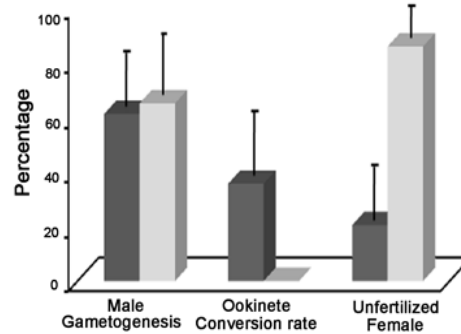
2) PbGCS1 欠損(-)株を作製し蚊に吸血させた結果、蚊の中での発育が完全にストップし、PbGCS1(-)株を吸血した蚊は、naïve なネズミを吸血してもマラリア原虫を伝播できないことが明らかになった。このことは PbGCS1(-)株は蚊の中でライフサイクルを完全に停止したことを意味する。



(写真左上; 野生株感染血液を吸血したハマダラカ中腸 (オオシスト+), 左下; PbGCS1(-)株感染血液を吸血した中腸 (オオシスト-)。写真右; 野生株 (dark gray bar) および PbGCS1(-)株 (white gray) を吸血したハマダラカのマウスへのマラリア伝搬効率)

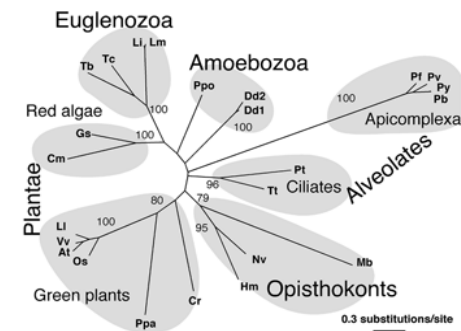
3) PbGCS1(-)株において、ライフサイクルのどこで止まっているかを突き止めるため、PbGCS1(-)原虫株を in vitro fertilization (IVF) assay に供したところ、雌雄配偶子の接着は正常だったが、その後の膜融合が完全

にストップしていることを明らかにした。この表現型は GCS1(-)シロイヌナズナと全く同じであり、GCS1 はマラリア原虫と植物に共通した受精因子であることが判明した。



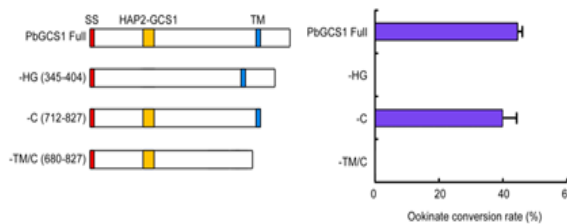
(野生株 (dark gray bar) および PbGCS1(-)株 (white gray) 感染血液の IVF assay. ♂鞭毛放出効率 (左)、オオキネート形成率 (中)、未受精の♀ (右))

4) GCS1 相同分子の探索を行ったところ、藻類、ヒドラ、リーシュマニアやトキソプラズマ原虫など、幅広い生物種において保存されていることが判明した。このように幅広い生物種において保存されている受精因子は GCS1 が世界初である。



(GCS1 様遺伝子は広範な生物間で保存されている)

5) PbGCS1 タンパクの機能ドメインの探索を行うため、PbGCS1 部分欠損原虫を作製し、それらの受精能を調べた。その結果、PbGCS1 の推定細胞内領域は受精には一切必須ではなく、逆に推定細胞外領域のどの部分を欠損しても受精能を完全に喪失していることから、この領域が極めて重要な機能=メス配偶子との相互作用に必須であることを見出した。アラビドプシスでも同様な実験を試みたが、全く同じ結果を得たことから、GCS1 の機能は動植物間で高度に保存されていることを見出した。



(PbGCS1 部分欠損株 (左) とその受精能 (オオキネート形成率; 右))

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 10 件)

- ① Arisue N, Kawai S, Hirai M, Palacpac NM, Jia M, Kaneko A, Tanabe K, Horii T. Clues to Evolution of the SERA Multigene Family in 18 Plasmodium Species. PLoS One. 査読有、vol. 6, No3, 2011, e17775.
- ② Mori T, Hirai M, Kuroiwa T, Miyagishima SY. The functional domain of GCS1-based gamete fusion resides in the amino terminus in plant and parasite species. PLoS One, 査読有、vol.5, No12, 2010, e15957.
- ③ Ishida H, Matsuzaki-Moriya C, Imai T, Yanagisawa K, Nojima Y, Suzue K, Hirai M, Iwakura Y, Yoshimura A, Hamano S, Shimokawa C, Hisaeda H. Development of experimental cerebral malaria is independent of IL-23 and IL-17. Biochem Biophys Res Commun. 査読有、Vol.402, No. 4, 2010, 790-795.
- ④ Matsuoka H, Ikezawa T, Hirai M. Production of a transgenic mosquito expressing circumsporozoite protein, a malarial protein, in the salivary gland of Anopheles stephensi (Diptera: Culicidae). Acta Med Okayama. 査読有、vol.64, No.4, 2010, 233-241.
- ⑤ Iseki H, Kawai S, Takahashi N, Hirai M, Tanabe K, Yokoyama N, Igarashi I. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method as a tool for diagnosis of infection by the zoonotic simian malaria parasite Plasmodium knowlesi. J Clin Microbiol. 査読有、vol.48, No.7, 2010, 2509-14
- ⑥ Wang J, Matsuoka H, Hirai M, Mu L, Yang L, Luo E. The first case of a class I glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, G6PD Santiago de Cuba (1339 G > A), in a Chinese population as found in a survey for G6PD deficiency in northeastern and central China. Acta Med

- Okayama 査読有、vol.64, No.1, 2010, 49-54
- ⑦ Hirai M, Mori T. Fertilization is a novel attacking site for the transmission blocking of malaria parasites. Acta Trop 査読有、vol.114, No.3, 2010, 157-161
 - ⑧ Kawai S, Hirai M, Haruki K, Tanabe K, Chigusa Y. Cross-reactivity in rapid diagnostic tests between human malaria and zoonotic simian malaria parasite Plasmodium knowlesi infections. Parasitol Int. 査読有、vol.58, No.3, 2009,300-2.
 - ⑨ Sasaki N, Hirai M, Maeda K, Yui R, Itoh K, Namiki S, Morita T, Hata M, Murakami-Murofushi K, Matsuoka H, Kita K, Sato S. The Plasmodium HU homolog, which binds the plastid DNA sequence-independent manner, is essential for the parasite's survival. FEBS Lett. 査読有、vol.583, No.9, 2009, 1446-50.
 - ⑩ Hirai M, Arai M, Mori T, Miyagishima SY, Kawai S, Kita K, Kuroiwa T, Terenius O, Matsuoka H. Male fertility of malaria parasites is determined by GCS1, a plant-type reproduction factor. Curr Biol. 査読有、vol.18, No.8, 2008, 607-13.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 平井 誠, Fertilization of malaria parasite is determined by GCS1, a definitive fertilization factor. 第33回日本分子生物学会年会、「動植物に共通するアロ認証中核原理を探る」ワークショップ。2010.12.07. 神戸ポートピアホテル (兵庫県)
- ② 平井 誠, Malaria parasites reproduce by similar manner to flowering plant. 第9回あわじしま感染症・免疫フォーラム 2009.9.8. 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県)
- ③ 日野 明紀菜、平井 誠、田中 健、松岡裕之、北 潔マラリア原虫コハク酸-ユビキノ還元酵素 (複合体 II) の遺伝子破壊による表現型解析. 第78回日本寄生虫学会 2009.3.27. 法政大学 (東京都)
- ④ 平井 誠, Mechanisms of malaria fertilization are highly conserved in various organisms. JSPS presents Sweden-Japan joint Seminar 2008.6.11 カロリンスカ研究所 (スウェーデン王国)
- ⑤ 平井 誠、川合 覚、新井 明治、松岡 裕之 マラリア原虫オオシストスポロゾイト形成に必要なプロテアーゼ 第77回日本寄生虫学会 2008.4.2 長崎新聞文化ホール (長崎県)

[図書] (計 1 件)

- ① 松岡裕之、平井 誠 「光るマラリア原虫」医学のあゆみ 医歯薬出版株式会社

[その他]

ホームページ等

<http://stke.sciencemag.org/cgi/content/abstract/sigtrans;1/17/ec153>

<http://www.u-presscenter.jp/modules/bulletin/index.php?page=article&storyid=209>

<http://www.rikkyo.ac.jp/news/2008/05/1017/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平井 誠 (HIRAI MAKOTO)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：50326849