

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07461

研究課題名（和文）マラリア原虫のミトコンドリアリボソームにおける低コストな翻訳機構の解明

研究課題名（英文）A study on a low-cost translation mechanism in the mitochondrial ribosome of the malaria parasite

研究代表者

彦坂 健児（Hikosaka, Kenji）

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：30456933

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：マラリア原虫のミトコンドリア（mt）リボソーム構成タンパク質の数は極めて少なく、ヒトなど哺乳類のmtリボソームの構造と大きく異なることが予想されている。我々は、原虫mtリボソームを Tandem Affinity Purification（TAP）法により単離精製することで立体構造を解明することを想起した。現在、TAP標識付加mtリボソームタンパク質を有する組換え原虫株を2株作製し、これらのタンパク質がRNA及びタンパク質レベルで発現していること、ミトコンドリアに局在することを確認した。また、磁気ビーズを用いた第1段階の免疫沈降によってmtリボソームタンパク質が分離されることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般的に、ミトコンドリアは密度勾配遠心法によって単離されるが、マラリア原虫の場合、アピコプラストと呼ばれる色素体がミトコンドリアと接着しているため単離が困難である。これは、色素体をもった他の原生生物でも同じ状況であることが予想される。本研究によって、ミトコンドリア単離のステップの必要がない Tandem Affinity purification法によりミトコンドリア（mt）リボソームを単離する道筋を示せたことで、これまで困難であった他の原生生物種におけるmtリボソームの解析が進み、生命活動の根源に関わるリボソームの構造進化の領域において大きなインパクトを持つものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The number of mitochondrial (mt) ribosomal proteins in the malaria parasite is extremely small. It is thus seemed that the structure of its mt ribosomes highly differs from that of mammals such as humans. Consequently, we conceived clarifying the three-dimensional structure of this mt ribosomes by isolating them by the Tandem Affinity Purification (TAP) system. Currently, we generated two strains of recombinant parasites with TAP-tagged mt ribosomal proteins (PfmL13 and PfmS17) and confirmed that these protein genes expressed at RNA and protein levels by RT-PCR and western blotting, respectively. Additionally, both ribosomal proteins were localized in parasite mitochondria by fluorescent staining. Furthermore, we performed immunoprecipitation using magnetic beads and found that the parasite mt ribosomal proteins would be separated.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア原虫 ミトコンドリア リボソーム 翻訳機構 TAP法

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報に基づいたタンパク質の合成は、全ての生物において生命活動の根幹をなす生体反応である。リボソームはタンパク質合成のプロセスである「翻訳」を担う RNA-タンパク質の複合体である。動物や植物、菌類、原生生物などの真核生物は、核ゲノムに存在する遺伝子を翻訳するリボソームと、共生が起源とされるオルガネラ(ミトコンドリアや葉緑体などの色素体)のゲノムに存在する遺伝子を翻訳するリボソームの 2 種類のリボソームを有している。前者の染色体ゲノム遺伝子を翻訳するリボソームの構造は、生物種間による多様度が低いのに対し、後者のミトコンドリアに存在するリボソーム (mt リボソーム) は類を見ないほど多様であることが知られている。この多様性には、ミトコンドリア DNA (mtDNA) にコードされているタンパク質の遺伝子の種類や数が生物種間で様々であることが深く関わっていると考えられている。また、ミトコンドリアリボソーム RNA (mt rRNA) の二次構造も極めて多様である。例えば、寄生性原虫のトリパノソーマの mt リボソームは、生物界で最小の mt rRNA を有するが、その機能を補うためのリボソームタンパク質は極めて多く 127 個である。

マラリア原虫 *Plasmodium* は世界三大感染症の一つであるマラリアを引き起こすことでよく知られているが、ミトコンドリア (mt) DNA のサイズが生物界最小の 6 kb であることはあまり知られていない。この mtDNA には 3 つのタンパク質遺伝子のみがコードされており、わずか 3 つの遺伝子を翻訳するために、約 40 個の mt リボソームタンパク質が細胞質で合成され、ミトコンドリアに輸送されることになる。これは、極めて非効率であるように思える。この特殊性は、*Plasmodium* を含むアピコンプレクサ類から渦鞭毛藻類などの原生生物まで生物群を超えて広く保存されている。このことより、生物種の mt リボソームにおいて共通する翻訳機構が存在しているのではないかと考えた。しかし、上述した生物群の mt リボソームの構造に関する情報は非常に少ない。これは、これらの生物種で mt リボソームの沈降係数が大きく異なり、密度勾配法による単離法の確立が困難なためである。そこで本研究では、タンパク質複合体を単離するための効率的な方法である TAP (Tandem Affinity purification) タグ法によって *Plasmodium* の mt リボソームを単離し、構成タンパク質および含有断片化 RNA を網羅的に解析するという画期的な方法を考案した。これにより未解明な mt リボソーム翻訳機構を解明することが可能となる。本研究の成果は、*Plasmodium* mt リボソームを標的とした新規マラリア薬の開発に有用であることのみならず、最小限の翻訳機構を備えるリボソームを構成する重要なタンパク質を特定することで生命活動の根幹に迫り得る。

2. 研究の目的

Plasmodium の mtDNA は、3 つのタンパク質遺伝子のみがコードされている、mt rRNA が高度に断片化されている、tRNA が存在しない、といった他の生物の mtDNA と比較して異質な性質をもつ。これら異質な性質は、*Plasmodium* を含むアピコンプレクサ類と近縁な渦鞭毛藻などの生物群でも保存されている。以上は、これらの生物群に属する原生生物が独自の翻訳機構を備えた mt リボソームをもつことを示唆する。また、*Plasmodium* の染色体ゲノム上にコードされる mt リボソームタンパク質遺伝子数は、ヒトなどの哺乳類と比較して約半数であることが予測されている。このことより、*Plasmodium* mt リボソームは少ないタンパク質でも機能できる低コストな翻訳機構をもつことが考えられる。本研究では、単離した *Plasmodium* の mt リボソームのタンパク質および RNA の網羅的解析を通して、マラリア原虫独自の構成成分を明らかにし新規マラリア薬開発の基盤情報とすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、TAP 法によって *Plasmodium* の mt リボソームの単離を行い、mt リボソームに含まれるタンパク質および RNA について網羅的な解析を可能とすることを目指した。以下に方法について記載する。

(1) *in vitro* 培養が可能な熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* NF54 株を用いて、CRISPR/Cas9 システムによる免疫沈降用標識の付加を行った。TAP 法は、異なる標識を 2 つ用いて 2 回の免疫沈降による目的タンパク質複合体の純度の高い精製を可能とする。本研究ではこれら 2 つの標識に Calmodulin binding protein (CBP) 及び Protein A を採用した。標識付加の標的遺伝子は、既に mt リボソームタンパク質として局在と機能が明らかとなっている mt リボソームタンパク質 mL13 及び mS17 とした。mL13 及び mS17 は、それぞれ mt リボソームの大サブユニット及び小サブユニットに含まれると予測されるタンパク質である。作製した遺伝子組換え原虫については、それぞれ限界希釈によるクローニングを行った。また、PCR によって標識タンパク質遺伝子がノックインされているかどうか調べた。

(2) 上述の(1)で作製したそれぞれの遺伝子組換え *Plasmodium* PfmL13-TAP 原虫株及び PfmS17-TAP 原虫株について、TAP 標識の局在を明らかにするために、抗 CBP 抗体及びミトコンドリア染

色試薬 MitoTracker Red CMXRos (Cat. No. M7512)を用いて免疫蛍光染色を行った。

(3) PfmL13-TAP 原虫株及び PfmS17-TAP 原虫株において、付加した標識が正しく発現しているかどうか確認するためにウェスタンブロットによってタンパク質の解析を行った。この際、1次抗は抗 CBP 抗体を用い、レファレンスタンパク質の検出は抗 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)抗体を用いた。

(4) TAP システムによる第 1 段階の免疫沈降を、まずは、PfmL13-TAP 原虫株の溶解液を用い、標識タンパク質 Protein A を認識するマウス IgA を付加した磁気ビーズを用いて行った。

4. 研究成果

(1) PfmL13-TAP 及び PfmS17-TAP 原虫株の作製

限界希釈によるクローニング後の PfmL13 及び PfmS17 原虫株より DNA を抽出し、標識タンパク質の外側で設計したプライマーを用いて PCR を行ったところ、それぞれ目的サイズの増幅産物を得た(図 1)。ここで得られた PCR 産物のシーケンスを解析したところ、予測した塩基配列と一致した。また、両原虫株を増幅し RNA 抽出後、逆転写によって得られた cDNA を用いた PCR でも遺伝子発現の確認を行った。

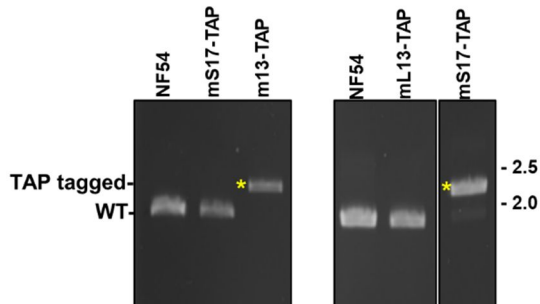


図 1. PCR による TAP 標識ノックインの確認

目的の遺伝子配列が挿入された。NF54 は Pf 野生株を示す。

(2) 蛍光顕微鏡による TAP 標識付加タンパク質の局在の確認

in vitro 培養した Pf 野生株、PfmL13-TAP 及び PfmS17-TAP 原虫株に対し、TAP 標識タンパク質の局在を蛍光顕微鏡によって観察したところ、野生株では TAP 標識が検出されなかったが、組換えを行った両原虫では、CBP がほぼミトコンドリアと同じ位置で検出された(図 2)。これにより、TAP 標識された mL13 及び mS17 はミトコンドリアに輸送されていることが推定された。

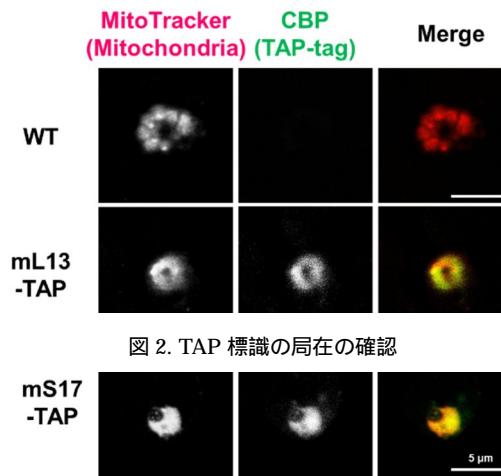


図 2. TAP 標識の局在の確認

(3) ウェスタンブロットによる TAP 標識発現タンパク質の検出

Pf 野生株、PfmL13-TAP 及び PfmS17-TAP 原虫株の溶解液と抗 CBP 抗体を用いてウェスタンブロット解析を実施したところ、PfmL13-TAP 及び PfmS17-TAP 原虫株において予測サイズのタンパク質を検出した(図 3)。

(4) 免疫沈降法による第 1 段階の標的タンパク質の精製

PfmL13-TAP 原虫株の溶解液とマウス IgA 磁気ビーズを用いて免疫沈降を行ったところ、図 3 で示した TAP 標識した mL13 タンパク質を含むタンパク質群が回収できることがわかった。

これらの精製タンパク質が無傷の Pf mt リボソームを含んでいることが最重要課題であり、今後は、Native PAGE による可溶性条件の検討、精製条件の検討を経て、mt リボソームの分離精製を行い、クライオ電子顕微鏡解析によって、立体構造の解明を行う予定である。

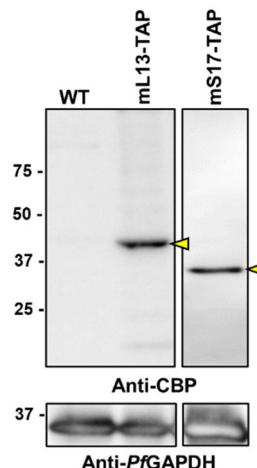


図 3. ウェスタンブロットによる TAP 標識タンパク質の検出

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sakamoto Hirokazu, Lin Xiaoxia X., Bai Yun D., Chen Xue F., Zhang Ziyue Z., Honjo Yui, Hikosaka Kenji	4. 巻 12
2. 論文標題 Development of a novel electroporation method for the oyster parasite Perkinsus marinus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19996
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-24548-0	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 Honjo Yui, Fukumoto Shinya, Sakamoto Hirokazu, Hikosaka Kenji	4. 巻 121
2. 論文標題 New PCR primers targeting the cytochrome b gene reveal diversity of Leucocytozoon lineages in an individual host	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Parasitology Research	6. 最初と最後の頁 3313 ~ 3320
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00436-022-07667-5	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 -
1. 著者名 Komatsuya Keisuke, Sakura Takaya, Shiomi Kazuro, Omura Satoshi, Hikosaka Kenji, Nozaki Tomoyoshi, Kita Kiyoshi, Inaoka Daniel Ken	4. 巻 15
2. 論文標題 Siccanin Is a Dual-Target Inhibitor of Plasmodium falciparum Mitochondrial Complex II and Complex III	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmaceuticals	6. 最初と最後の頁 903 ~ 903
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ph15070903	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 Kitahara Mari, Hiroshima Yuki, Norose Kazumi, Hikosaka Kenji, Kazumoto Hiroko, Uematsu Nozomu, Shishido Tsutomu, Kaiume Hiroko, Sato Keijiro, Ueki Toshimitsu, Sumi Masahiko, Watanabe Masahide, Kobayashi Hikaru	4. 巻 23
2. 論文標題 Clinical characteristics and incidence of toxoplasmosis after autologous hematopoietic stem cell transplantation: A retrospective study and literature review	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transplant Infectious Disease	6. 最初と最後の頁 e13726
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/tid.13726	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 Omori Koji, Imoto Naoto, Norose Kazumi, Maeda Matsuyoshi, Hikosaka Kenji, Kurahashi Shingo	4. 巻 100
2. 論文標題 Acute exacerbation of pulmonary toxoplasmosis during corticosteroid therapy for immune thrombocytopenia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e28430 ~ e28430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.00000000000028430	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 Wadayama Tomoya, Shimizu Mikito, Kimura Ikko, Baba Kousuke, Beck Goichi, Nagano Seiichi, Morita Ryo, Nakagawa Hidenori, Shirano Michinori, Goto Tetsushi, Norose Kazumi, Hikosaka Kenji, Murayama Shigeo, Mochizuki Hideki	4. 巻 8564-21
2. 論文標題 Erdheim-Chester Disease Involving the Central Nervous System with Latent Toxoplasmosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 8564-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.8564-21	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 Akuta T, Minegishi D, Kido N, Imaizumi K, Nakaoka S, Tachibana SI, Hikosaka K, Hori F, Masataka, Nakagawa, Sakuma C, Oouchi Y, Nakajima Y, Tanaka S, Omiya T, Morikaku K, Kawahara M, Tada Y, Tarui H, Ueda T, Kikuchi-Ueda T, Ono Y	4. 巻 11
2. 論文標題 Development of a rapid scabies immunodiagnostic assay based on transcriptomic analysis of <i>Sarcoptes scabiei</i> var. <i>nyctereutis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 6455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-85290-7	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 -

1. 著者名 Shinjyo N, Hikosaka K, Kido Y, Yoshida H, Norose K	4. 巻 267
2. 論文標題 Toxoplasma Infection Induces Sustained Up-Regulation of Complement Factor B and C5a Receptor in the Mouse Brain via Microglial Activation: Implication for the Alternative Complement Pathway Activation and Anaphylatoxin Signaling in Cerebral Toxoplasmosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Ethnopharmacology	6. 最初と最後の頁 113525
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jep.2020.113525	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Xioxia Lin, Hirokazu Sakamoto, Rie Kubota, Yoh-Ichi Watanabe, Daniel Ken Inaoka, Naoaki Shinzawa, Kenji Hikosaka
2. 発表標題 Challenges in isolation of mitochondrial ribosomes from the malaria parasite
3. 学会等名 第92回日本寄生虫学会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 陳雪、新倉保、坂本寛和、佐倉孝哉、稲岡ダニエル健、彦坂健児
2. 発表標題 酵母細胞質型ジヒドロオロト酸脱水素酵素遺伝子を導入したげっ歯類マラリア原虫のアトバコン耐性発現パターンの解析
3. 学会等名 第92回日本寄生虫学会
4. 発表年 2022年～2023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	渡邊 洋一 (Watanabe Yoh-ichi) (90323568)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・准教授 (12601)	
研究分担者	稲岡 健ダニエル (Inaoka Ken Daniel) (10623803)	長崎大学・熱帯医学研究所・准教授 (17301)	

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
---------	---------