

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22767

研究課題名（和文）マラリア原虫ガメトサイト期に赤血球内に形成される膜構造物の生理機能

研究課題名（英文）Physiological mechanisms of membrane structures in *P. falciparum* gametocytes

研究代表者

宮崎 真也 (Miyazaki, Shinya)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：40637435

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、熱帯熱マラリア原虫ガメトサイトが赤血球の細胞質内に新たに形成する膜構造物の生理的意義を解明することを目的としている。本研究において、研究代表者は熱帯熱マラリア原虫がガメトサイトを効率よく形成する条件を確認した。続いて、熱帯熱マラリア原虫ガメトサイトが感染した赤血球の中における膜構造を電子顕微鏡により観察した。その結果、感染赤血球には、原虫細胞とは異なる特徴的な膜構造が存在することが分かった。ガメトサイト期において赤血球へと輸送されるタンパク質やトランスロコン構成タンパク質のノックダウン用プラスミドを複数種類作成しトランスフェクションを行い、現在遺伝子改変原虫の解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、マラリア原虫の基礎的な理解および抗伝播薬の創薬研究に資する。熱帯熱マラリア原虫はヒト赤血球内でガメトサイトへと分化し蚊へと感染するため、ガメトサイトを殺滅することができればマラリア伝播を抑制することができる。ガメトサイトが赤血球内に作り出す膜構造は、ガメトサイト性分化に関連していると推察されるため、その生理機構の理解は重要である。

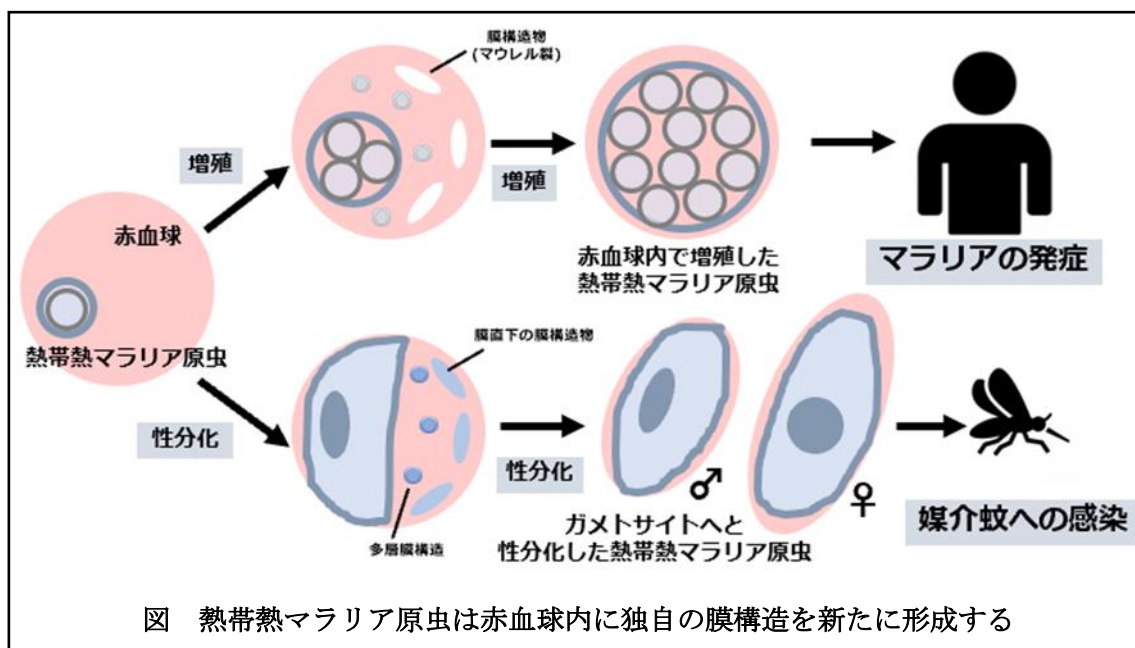
研究成果の概要（英文）：This study aimed to elucidate the physiological significance of the new membrane structures formed by *Plasmodium falciparum* gametocytes in the cytoplasm of erythrocytes. In this study, the principal investigators identified the conditions under which *Plasmodium falciparum* gametocytes efficiently form gametocytes. The membrane structures in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum* gametocytes were subsequently observed by electron microscopy. The results showed that infected erythrocytes have a characteristic membrane structure that differs from that of *Plasmodium falciparum* cells. Several plasmids for knockdown of proteins transported to erythrocytes during the gametocyte stage and translocon constituent proteins were generated and transfected, and analysis of the genetically modified *Plasmodium* is currently underway.

研究分野：寄生虫学、細胞生物学

キーワード：熱帯熱マラリア原虫 ガメトサイト 膜リモデリング 赤血球

### 1. 研究開始当初の背景

熱帯熱マラリア原虫ガメトサイトが赤血球の細胞質内に新たに形成する膜構造物の生理的意義を解明する。熱帯熱マラリア原虫は、ヒト赤血球内でガメトサイトへと性分化することにより、蚊に感染する能力を得る。このガメトサイト性分化の過程で、マラリア原虫は赤血球の細胞質内に新たな膜構造物を作り出すが、その生理的意義はよくわかっていない。



### 2. 研究の目的

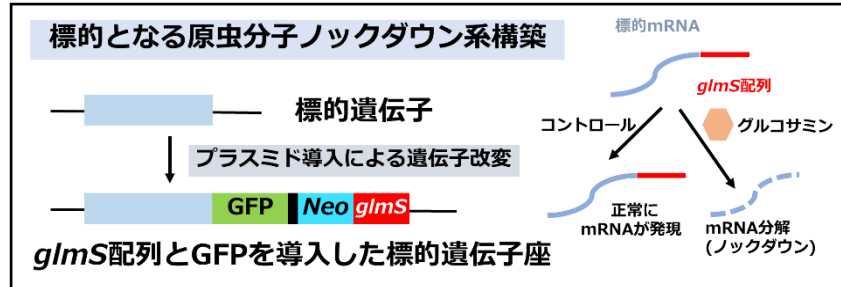
本研究は、熱帯熱マラリア原虫ガメトサイトが赤血球の細胞質内に新たに形成する膜構造物の生理的意義を解明することを目的としている。本研究では、これらの膜構造物のガメトサイト分化における役割を明らかにすることを試みた。本研究により、ガメトサイト分化の生物学が深化し、将来的にはマラリア伝播阻止への新たな方策に貢献する。

### 3. 研究の方法

本研究では、ヒト由来赤血球を使用してガメトサイト形成能が高い熱帯熱マラリア原虫 NF54 株もしくは 3D7GL 株を培養した。ガメトサイトが効率よく誘導できる培養条件の最適化を行った。また、標的の原虫分子のノックダウンに用いる g1mS リボザイムを使ったプラスミドを複数構築した。作出したノックダウン用プラスミドを熱帯熱マラリア原虫にトランスフェクションし、赤血球へのタンパク質輸送に関わるトランスロコン構成タンパク質のひとつ EXP2 の C 末端に発現確認用の GFP タグおよびノックダウン用 g1mS タグを付加した遺伝子改変原虫を作出した。この遺伝子改変原虫を用いて、ノックダウンによる増殖阻害やガメトサイト形成能の評価を試みた。また、ガメトサイト期に赤血球内に形成される膜構造を電子顕微鏡解析により観察した。

#### 4. 研究成果

本研究において、研究代表者は熱帯熱マラリア原虫がガメトサイトを効率よく形成する条件を確認した。続いて、熱帯熱マラリア原虫ガメトサイトが感染した赤血球の中における膜構造を電子顕微鏡により観察した。その結果、感染赤血球の中に、原虫細胞とは異なる特徴的な膜構造が存在することが分かった。この後に、熱帯熱マラリア原虫の遺伝子改変によるノックダウン実験系の構築に着手した。最初に、ステージ特異的なノックダウン系に用いるベシクプラスミドを構築し、ノックダウン系がワークすることをコントロール遺伝子や複数の機能未知遺伝子を対象にして確認した。これ



らの知見を基盤として、目的のノックダウン原虫を作出するためのプラスミドを10種類以上クローニングし、一部のプラスミドを熱帯熱マラリア原虫にトランスフェクションした。

その過程でガメトサイト形成株において、トランスフェクション効率が低いことが分かったため、目的の原虫作出に先立ち、種々の条件検討を行い、遺伝子改変技術の基盤を整えた。今後も引き続き、ガメトサイト期に形成される膜構造に局在すると予想される分子の遺伝子改変原虫の作出および表現型解析を進めていく。

本研究では、赤内期原虫のトランスロコン構成タンパク質のひとつEXP2のノックダウン原虫を作出した。標的遺伝子であるEXP2のC末端側にGFPタグおよびgImSタグを導入した。培地にグルコサミンを添加することによりgImSリボザイムは活性化され、GFPタグが付加された標的遺伝子のmRNAの分解が促進される。この原理により、培地にグルコサミンを添加することにより標的遺伝子の発現をノックダウンすることができる。作出したEXP2タグ付加原虫は、グルコサミンを添加していない条件においても親株よりも顕著に増殖能が低下していた。この結果は、GFPタグ付加によりEXP2の機能が低下したことによると考えられた。さらに、グルコサミンの添加によりEXP2の発現をノックダウンすることで、原虫の増殖が全く見られなくなった。この結果は赤内期での増殖におけるEXP2の必須な役割を示しており、これは先行研究での知見とも一致している。本研究で作出したEXP2ノックダウン原虫は、グルコサミンを添加していない条件においてもガメトサイトを全く形成しなくなっていた。この結果は、タグ付加によりEXP2の機能が消失しガメトサイト形成が見られなくなった可能性を示唆している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

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 1008917 ~ 1008917
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 Portugaliza Harvie P, Miyazaki Shinya, Geurten Fiona JA, Pell Christopher, Rosanas-Urgell Anna, Janse Chris J, Cortes Alfred	4. 巻 9
2. 論文標題 Artemisinin exposure at the ring or trophozoite stage impacts Plasmodium falciparum sexual conversion differently	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	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) 10.7554/eLife.60058	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 Yukiko, Marin-Mogollon Catherin, Imai Takashi, Mendes Antonio M, van der Laak Rianne, Sturm Angelika, Geurten Fiona J. A., Miyazaki Shinya .....Wilder Brandon K, . Reyes-Sandoval Arturo, Dechering Koen J., Prudencio Miguel, Janse Chris J., Khan Shahid M, Franke-Fayard Blandine	4. 巻 10
2. 論文標題 Generation of a Genetically Modified Chimeric Plasmodium falciparum Parasite Expressing Plasmodium vivax Circumsporozoite Protein for Malaria Vaccine Development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	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) 10.3389/fcimb.2020.591046	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 Tokumasu Fuyuki、Hayakawa Eri H.、Fukamoto Junpei、Tokuoka Suzumi M.、Miyazaki Shinya	4. 巻 83
2. 論文標題 Creative interior design by Plasmodium falciparum: Lipid metabolism and the parasite's secret chamber	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102369 ~ 102369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2021.102369	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 Kolli Surendra Kumar、Salman Ahmed M.、Ramesar Jai、Chevalley-Maurel Severine、Kroeze Hans、Geurten Fiona G. A.、Miyazaki Shinya、Mukhopadhyay Ekta、Marin-Mogollon Catherin、Franke-Fayard Blandine、Hill Adrian V. S.、Janse Chris J.	4. 巻 16
2. 論文標題 Screening of viral-vectored P. falciparum pre-erythrocytic candidate vaccine antigens using chimeric rodent parasites	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0254498 ~ 0254498
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0254498	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2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Miyazaki S, Marin-Mogollon C, Miyazaki Y, Geurten FJA, Ramesar J, Kolli SK, Chevalley-Maurel S, Janse CJ, Franke-Fayard B
2. 発表標題 A critical role of the apicoplast protein PALM for Plasmodium falciparum sporozoite development in the mosquito
3. 学会等名 第90回 日本寄生虫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮崎真也、福本隼平、宮崎幸子、石井隆太、Franke-Fayard Blandine、J Janse Chris、徳舩富由樹
2. 発表標題 マラリア原虫とヒト・蚊宿主との相互作用の解明
3. 学会等名 第94回 日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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			
スペイン	ISGlobal			
オランダ	ライデン大学			