

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790407

研究課題名(和文) マラリア原虫の寄生胞膜シグナル配列の同定と寄生胞膜動態の解析

研究課題名(英文) Analysis of membrane dynamics and identification of target signal to parasitophorous vacuole membrane of malaria parasite.

## 研究代表者

入子 英幸 (IRIKO HIDEYUKI)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：60346674

## 研究成果の概要(和文)：

マラリア原虫は赤血球侵入時に寄生胞膜と呼ばれる膜を形成する。この寄生胞膜は、原虫-宿主間の物質輸送に深く関わるなど、原虫の寄生戦略において重要な役割を担っている。本研究では、寄生胞膜への移行シグナル配列の同定と寄生胞膜動態の解析を試みた。その結果、寄生胞膜の可視化に成功し、寄生胞膜の伸張および感染赤血球細胞質内の膜系(管小胞膜ネットワーク、サーキュラークレフト)の形成時期を特定した。

## 研究成果の概要(英文)：

During the process of invasion, malaria parasite initiates the formation of a membrane, the so-called parasitophorous vacuole membrane (PVM). PVM is associated with host-parasite interaction. In this study, we analysed membrane dynamics and target signal to PVM in malaria parasite. We succeed in visualization of PVM and determination of forming period of tubulovesicular membrane network and circular clefts.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：マラリア学

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 寄生胞膜

## 1. 研究開始当初の背景

マラリア原虫は赤血球感染時に膜に覆われた寄生胞を形成し、その中で生命を維持し

ている。この膜は脂質二重膜でつくられ「寄生胞膜」と呼ばれている。寄生胞膜は原虫-宿主間の物質輸送に深く関わっている。例え

ば、(1) イオンやアミノ酸、代謝廃棄物などは自由に通過できるが、原虫に必要な分子(1400 Da 以上)は通過できないという半透膜状の性質をもつ、(2) 赤血球細胞質側からヘモグロビンを選択的に取り込む、(3) マラリア原虫は自身で産生したタンパク質を寄生胞膜を選択的に通過させ、赤血球膜上に血管内皮細胞への接着分子、栄養分の取り込みのためのチャンネルなど、寄生に必要なシステムを自発的に形成する。以上のことから、寄生胞膜は単なる膜ではなく、マラリア原虫が寄生するためのライフラインとして機能している。このような多彩な機能をもつ寄生胞膜の分子基盤を解明するために、免疫学的手法を用いた局在解析や寄生胞膜形成時に高発現する遺伝子群の探索が試みられ、寄生胞膜の主要構成成分として、複数の分子(ETRAMPs, EXP-1, EXP-2)が同定された。しかしながら、これらの寄生胞膜分子と物質輸送の関係は未だ明らかになっていない。

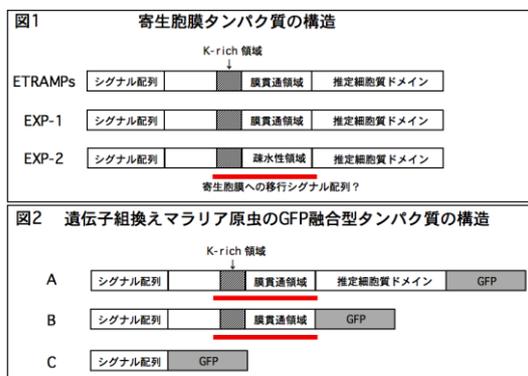
## 2. 研究の目的

マラリア原虫の寄生胞膜へのシグナル配列の同定を試みる。さらに寄生胞膜分子を指標として、原虫の発育と寄生胞膜の動態の関係を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 寄生胞膜へのシグナル配列

熱帯熱マラリア原虫とネズミマラリア原虫の寄生胞膜分子について解析を行ったところ、分泌シグナル配列の直下に塩基性アミノ酸であるリジンに富む領域(5-7 aa)と疎水性アミノ酸領域(約20 aa)が均質に存在し、この特徴は種を超えて保存されていることを見出した(図1)。本研究では、この特徴的な配列が寄生胞膜へのシグナル配列であると推定した。



本実験には、遺伝子組換え実験の容易なネ

ズミマラリア原虫 (*Plasmodium berghei*) を用いた。寄生胞膜分子の (A) 全長、(B) 分泌シグナル配列から疎水性領域、(C) 分泌シグナルを PCR によりクローニングし、C 末端側に GFP を融合するように GFP 融合蛋白質発現用ベクター(環状エピソーム)に組み込む(それぞれの組換え蛋白質の構造を図2に示す)。その上流側には、寄生胞膜分子のプロモーター領域を組み込む。次に、電気穿孔法により野生型原虫内に遺伝子導入し、この原虫を未感染のマウスに戻す。マウスにピリメサミンを投与することにより発現用ベクターが導入された原虫を選択する。作成した原虫は、蛍光顕微鏡により GFP 融合蛋白質の発現部位を解析し、推定シグナル配列による影響を評価する。

### (2) 寄生胞膜動態の解析

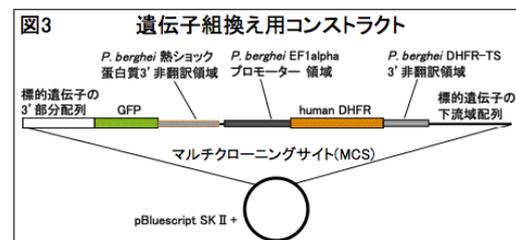
寄生胞膜分子(ETRAMPs, EXP-1, EXP-2)を指標として、赤血球侵入からの経過時間に伴う寄生胞膜の変化を解析する。実験には、

(a) GFP 融合蛋白質発現ネズミマラリア原虫を用いたバイオイメーjing、(b) 熱帯熱マラリア原虫を用いた間接蛍光抗体法および免疫電顕法を用いる。

### (a) GFP 融合蛋白質発現ネズミマラリア原虫を用いたバイオイメーjing

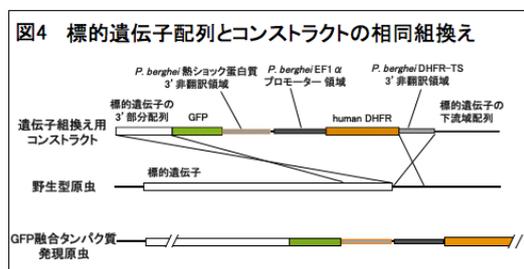
原虫の発育ステージと寄生胞膜分子の関係を明らかにするためには、本来の遺伝子発現制御下でのモニターが可能な、ゲノム上で相同組換えを起させた GFP 融合蛋白質発現原虫の使用が適している。

寄生胞膜分子の遺伝子組換え用コンストラクトを大腸菌用プラスミド pBluescript IISK+上に、標的遺伝子の3'部分配列と3'下流域配列を組み込む。さらに、ヒト由来 DHFR 遺伝子はその上流に、伸長因子(EF-1 $\alpha$ ) 遺伝子のプロモーター領域、下流に DHFR-TS 遺伝子の3'非翻訳領域を配置する(図3)



遺伝子組換え用コンストラクトを電気穿孔法で野生型原虫内に導入する。相同組換えは、標的遺伝子の3'部分配列と3'下流域配列によって起こり、GFP 遺伝子が標的遺伝

子の3'末端にin frameで接続される(図4)。相同組換えを起した原虫はピリメサミンを投与することにより選択する。GFP融合蛋白質発現原虫のタンパク質の発現時期は同調培養した原虫を蛍光顕微鏡下で観察し判定する。



(b)熱帯熱マラリア原虫を用いた間接蛍光抗体法および免疫電顕法

寄生胞膜分子(EXP1, EXP2)をRT-PCRによりクローニングし、コムギ胚芽無細胞蛋白質発現用ベクター(pEU-E01-GST-MCS)に組み込む。次に、コムギ胚芽無細胞系を用いて、GST融合型組換え蛋白質を発現させ、グルタチオンセファロースビーズを用いて精製を行う。得られた蛋白質を抗原として、マウスとウサギに免疫し、抗血清を作成する。抗血清の反応性はウエスタンブロット法、間接蛍光抗体法、免疫電顕法により確認する。さらに同調培養したマラリア原虫を用いて、間接蛍光抗体法を行い、赤血球侵入から寄生胞膜の崩壊まで(48時間)の寄生胞膜の変化を解析する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 寄生胞膜へのシグナル配列

遺伝子導入を行ったネズミマラリア原虫のGFP融合蛋白質の発現部位を蛍光顕微鏡により解析した。寄生胞膜の(B)分泌シグナル配列から疎水性領域、(C)分泌シグナルのGFP融合蛋白質は、寄生胞に発現が確認された。これらの結果から、寄生胞膜分子のリジンに富む領域は、寄生胞膜への移行には必須ではないことが示された。

##### (2) 寄生胞膜の動態

(a) GFP融合蛋白質発現ネズミマラリア原虫を用いたバイオイメージング

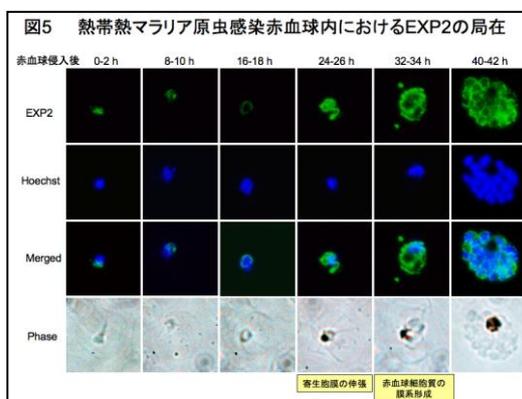
寄生胞膜分子(ETRAMPs, EXP-1, EXP-2)を標的として、GFP融合蛋白質発現原虫の作製を試みた結果、電気穿孔法による遺伝子導入から2週間後に少数の原虫の出現を確認したが、GFP融合タンパク質の発現、相同組換えは確認できなかった。その原因としては、

寄生胞膜分子のC末端側に融合されたGFPによる機能障害が原虫に致死的可能性が考えられた。そのため、本研究においては、遺伝子組換えの容易なネズミマラリア原虫を用いる利点を生かすことが出来ないと判断した。

(b) 熱帯熱マラリア原虫を用いた間接蛍光抗体法および免疫電顕法

熱帯熱マラリア原虫から抽出した細胞質蛋白質、膜蛋白質を抗原として、寄生胞膜分子(EXP1, EXP2)の特異抗体を用いたウエスタンブロット解析を行なった結果、抗EXP抗体では22 kDa付近、抗EXP2抗体では33kDaに単一のバンドが検出された。さらに間接蛍光抗体法、免疫電顕法による分子局在の解析により。これらの特異抗体は寄生胞膜、管小胞膜ネットワーク、サーキュラークレフトに反応することを確認した。

同調培養した熱帯熱マラリア原虫を用いた間接蛍光抗体法により、赤血球侵入から寄生胞膜の崩壊まで(48時間)における寄生胞膜の変化を解析した。その結果、寄生胞膜は赤血球侵入後16時間後から急速に伸長し、24時間以降では赤血球細胞質側に寄生胞膜から派生した膜系(管小胞膜ネットワーク、サーキュラークレフト)が形成されることが明らかになった(図5)。



本研究により、熱帯熱マラリア原虫の寄生胞膜の可視化に成功した。さらに、蛍光抗体法(光学顕微鏡レベル)と免疫電顕法(電子顕微鏡レベル)の解析を組み合わせることにより、寄生胞膜および感染赤血球細胞質内の膜系の形成と分子の輸送を電子顕微鏡レベルで経時的に解析することが可能であることを確認した。

#### 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 0 件）

〔学会発表〕（計 1 件）

感染赤血球内における熱帯熱マラリア原虫-宿主間の物質輸送経路の解析 第 18 回分子寄生虫学ワークショップ、2010 年 8 月 2 日、群馬（草津）

[[その他]

ホームページ等

<http://www.med.tottori-u.ac.jp/1/3/4/10/12.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

入子 英幸 (IRIKO HIDEYUKI)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：60346674