

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：15101  
研究種目：基盤研究(C)（一般）  
研究期間：2021～2023  
課題番号：21K06989  
研究課題名（和文）赤血球期マラリア原虫の特異的なイオンチャネル形成機構におけるRON3の機能解明  
  
研究課題名（英文）Roles of RON3 in the mechanism of ion channel formation in the blood-stage malaria parasites  
  
研究代表者  
伊藤 大輔（ITO, Daisuke）  
  
鳥取大学・医学部・講師  
  
研究者番号：80609298  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：繰り返し出現する薬剤耐性マラリア原虫対策として耐性を獲得させない新規抗マラリア薬の開発が求められている。本研究では原虫感染赤血球における原虫特異的なイオンチャネル形成に關与する新規分子RON3の機能を解明することを目的とした。RON3のC末断片がイオンチャネル形成において必須である赤血球へのタンパク質輸送に重要であることを明らかとし、その機能への關与が示唆される新たなRON3複合体を同定することで新規抗マラリア薬開発へと繋がる知見を得た。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、赤血球期マラリア原虫におけるRON3を基盤としたイオンチャネル形成機構の一端を明らかにすることができた。同定したRON3複合体、および現在解析を進めているRON3相互作用分子に着目することで、現在問題となっているアルテミシニン耐性原虫に有効であり、複数の作用機序を持つ耐性獲得リスクの低い新規抗マラリア薬の開発に発展することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：In order to combat the recurrent emergence of drug-resistant malaria parasites, there is a need to develop new anti-malarial drugs that do not induce resistance. In this study, we aimed to elucidate the function of RON3, a novel molecule involved in the formation of Plasmodium-specific ion channels in *P. falciparum*-infected erythrocytes. We revealed that the C-terminal fragment of RON3 is important for protein export to erythrocytes, which is essential for ion channel formation. Identifying a new RON3 complex, which may be involved in ion channel formation, has led to the developing of new anti-malarial drugs.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア原虫 イオンチャネル タンパク質輸送 RON3 タンパク質複合体 薬剤耐性

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

マラリアは、マラリア原虫が赤血球に寄生することで引き起こされる世界規模の感染症である。繰り返される薬剤耐性原虫の出現への対策として、WHO は第一選択薬であるアルテミシニン誘導体と既存の抗マラリア薬を併用する治療法を推奨しているが、近年相次いでリング期において限定的にアルテミシニン誘導体に耐性を獲得した原虫の出現が報告されている。したがって、アルテミシニン耐性原虫の拡散を防ぎ、完全な耐性を獲得させない新たな抗マラリア薬の開発が求められている。マラリア原虫は、赤血球に侵入する際、自身の周囲に寄生胞膜を形成する。その後、寄生胞膜を通して数百種類の原虫タンパク質を感染赤血球表面に分泌する。これにより原虫は感染赤血球膜を改変して宿主免疫からの攻撃を回避する一方、独自のイオンチャネルを形成することで原虫の増殖に必須であるアミノ酸などの栄養素を血清中から取り込む。このイオンチャネルに対する阻害剤は原虫の増殖を抑制するだけでなく、既存の抗マラリア薬と比較して耐性が獲得されにくいことから創薬の標的とされているが、チャネル形成メカニズムは未だ明らかとなっていない。研究代表者はチャネル形成に必須である原虫分子として RhopH 複合体を世界で初めて報告したが、遺伝子組換え原虫を用いた表現型解析によりリング期原虫の成長に必須であり、チャネル形成に關する原虫分子として新たに RON3 を見出した。

### 2. 研究の目的

本研究では、研究代表者が見出している RON3 について遺伝子組換え原虫を用いて RON3 タンパク質の発現、および機能を解析し、相互作用分子を同定する。これにより、赤血球期マラリア原虫における原虫独自のイオンチャネル形成分子機構を明らかにすることを目的とする。本研究は、アルテミシニン耐性によって生存するリング期原虫に有効であり、耐性獲得リスクの低い新規抗マラリア薬の開発に向けた分子基盤の確立に繋がる。赤血球期マラリア原虫の寄生適応機構の一端を明らかにするだけでなく、アルテミシニン耐性原虫の拡散を防ぎ、これまで繰り返されてきた耐性原虫の出現に終止符を打つ成果を上げることが期待される。

### 3. 研究の方法

#### (1) RON3 タンパク質の発現解析

HA タグとトリメトプリム (TMP) 依存的に構造が安定化する大腸菌由来のジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR-based Destabilization Domain; DDD) を C 末端に付加した RON3 を発現する RON3-DDD 原虫を用いて RON3 タンパク質の発現解析を行った。RON3 が発現するトロホゾイト期から TMP 存在下、または非存在下で RON3-DDD 原虫を培養した。シゾント期原虫、および赤血球侵入後のリング期原虫の RON3 の発現を RON3 の N 末断片に対する抗 RON3N 抗体、および RON3 の C 末断片に対する抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロット法により解析した。

#### (2) 寄生胞膜チャネルによるグルコース取り込み量の測定

RON3 はリング期原虫において寄生胞膜チャネル形成に關することが報告されていたため、TMP 存在下、または非存在下で培養したリング期 RON3-DDD 原虫におけるグルコースの取り込み量を測定した。蛍光標識グルコース誘導体を培地に添加して培養後、蛍光顕微鏡を用いて染色像を取得し、原虫内に取り込まれたグルコース誘導体を定量的に比較解析した。

#### (3) 寄生胞膜トランスロコンによるタンパク質輸送の解析

RON3 はリング期原虫において寄生胞膜トランスロコンによる赤血球へのタンパク質輸送に關することが報告されていたため、TMP 存在下、または非存在下で培養したリング期 RON3-DDD 原虫における赤血球へのタンパク質輸送について比較解析した。赤血球侵入型原虫であるメロゾイトの分泌小器官から侵入後に寄生胞に分泌され、直ちに寄生胞膜を介して赤血球膜に輸送される RESA と、リング期後期で発現して同様に寄生胞膜を介して赤血球膜に輸送される SBP1 の輸送について、それぞれの特異抗体を用いた間接蛍光抗体法により評価した。

#### (4) 共免疫沈降法による RON3 相互作用分子の同定

TMP 存在下、または非存在下で培養したリング期 RON3-DDD 原虫について、サポニン処理により赤血球のヘモグロビンを除去した後、ジギトニンを用いて RON3 を含む原虫粗抗原を調整した。抗 HA 抗体を用いた共免疫沈降法により原虫粗抗原から RON3、および RON3 相互作用分子を精製した。共免疫沈降産物を抗原として RON3 の N 末断片に対する抗 RON3N 抗体、RON3 の C 末断片に対する抗 HA 抗体、および寄生胞膜チャネル構成分子 EXP2 に対する特異抗体を用いたウエスタンブロット法により RON3 との相互作用を解析した。

#### (5) 近位依存性ビオチン化酵素 AirID を用いた RON3 相互作用分子の同定

TMP 非存在下で培養したリング期 RON3-DDD 原虫において RON3 の C 末断片の消失が認められ、当初予定していた共免疫沈降法による RON3 相互作用分子の同定が困難になったため、近接タン

パク質をビオチン標識する新規近位依存性ビオチン化酵素 AirID を C 末端に付加した RON3 を発現する RON3-AirID 原虫を CRISPR/Cas9 法を用いて作出した。コントロールとして寄生胞膜トランスロコンによる赤血球へのタンパク質輸送に必須である HSP101 について同様に AirID を付加した HSP101-AirID 原虫を作出した。サポニン処理したリング期原虫を抗原として HRP 標識ストレプトアビジンを用いたウエスタンブロット法によりビオチン化タンパク質を検出した。

#### 4. 研究成果

##### (1) RON3 タンパク質の発現解析

RON3 は赤血球侵入型原虫メロゾイトの分泌小器官であるロプトリーに発現して N 末断片と C 末断片にプロセッシングされるが、TMP 非存在下では約 60% のプロセッシング阻害と約 40% の原虫の赤血球侵入不全が認められた (図 1)。また赤血球侵入後のリング期原虫においては RON3C の消失が確認された (図 2) (Ito et al., *Front Cell Infect Microbiol.* 2023; 13: 1197126.)。

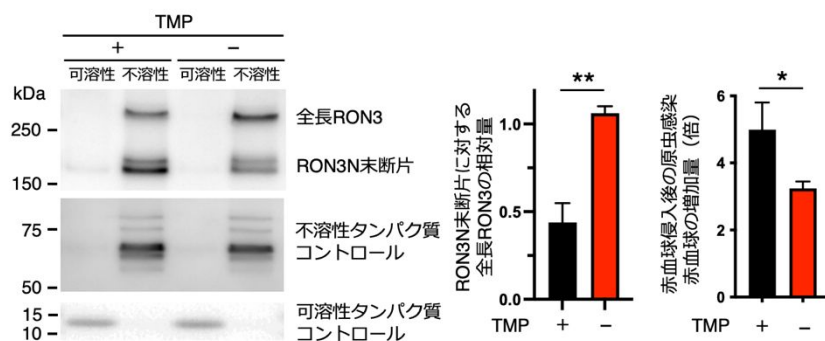


図 1. シゾント期RON3-DDD原虫におけるRON3の発現量と赤血球侵入効率比較

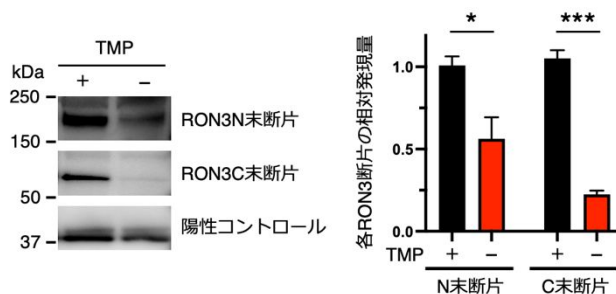


図 2. リング期RON3-DDD原虫におけるRON3の発現量比較

##### (2) 寄生胞膜チャネルによるグルコース取り込み量の測定

RON3 時期特異的欠損原虫の機能解析から RON3 は寄生胞膜チャネルによるグルコースの取り込みに関与すると報告されているが、RON3 断片のどちらが機能しているのかは不明であった。そこで TMP 非存在下で培養すると RON3 の C 末断片が消失するリング期 RON3-DDD 原虫 (図 2) におけるグルコースの取り込み量を解析した。その結果、赤血球侵入後 6 時間のリング期初期ではグルコースの取り込み量に有意な差は認められなかったが、リング期後期において有意差が認められた。このことから RON3 の N 末断片が寄生胞膜チャネル形成に関与することが示唆された (Ito et al., *Front Cell Infect Microbiol.* 2023; 13: 1197126.)。

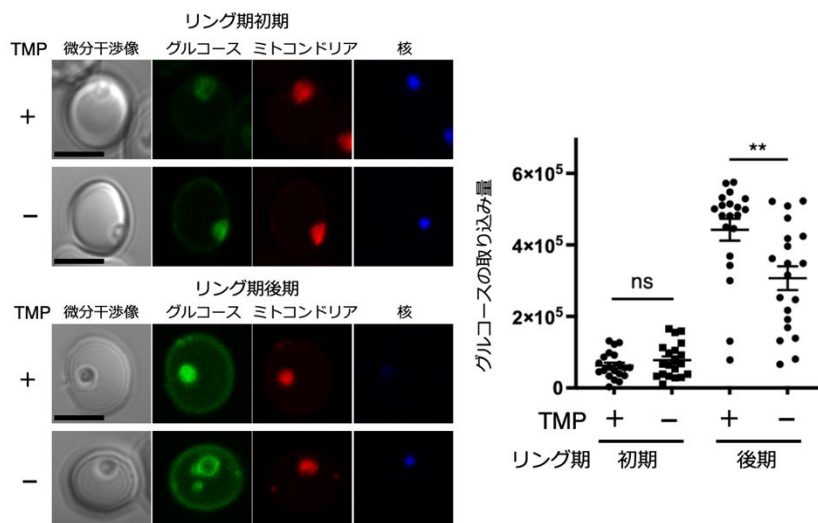


図 3. リング期RON3-DDD原虫におけるグルコースの取り込み量比較

### (3) 寄生胞膜トランスロコンによるタンパク質輸送の解析

同様に RON3 は寄生胞膜トランスロコンによる赤血球へのタンパク質輸送にも関与することが報告されているため、リング期 RON3-DDD 原虫において発現する時期と輸送される時期が異なる 2 種の分泌タンパク質の輸送について解析した。その結果、赤血球侵入型原虫メロゾイトの分泌小胞から侵入直後に分泌される RESA は赤血球へと輸送されるのに対して、リング期から発現して分泌される SBP1 については約 60% の感染赤血球が赤血球膜に輸送されておらず、約 60% の赤血球膜チャネル活性の低下が認められている。このことから RON3 の C 末断片はトランスロコン形成には関与しないが、リング期発現タンパク質の輸送に関与することが示唆された (Ito et al., Front Cell Infect Microbiol. 2023; 13: 1197126. )

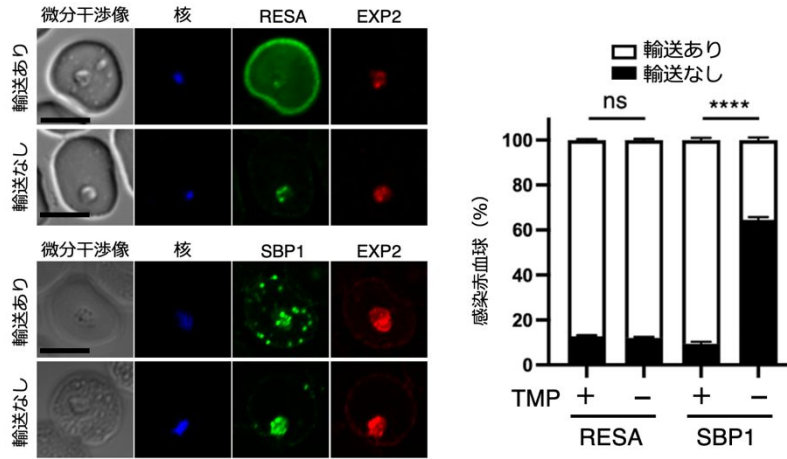


図 4. リング期RON3-DDD原虫における赤血球へのタンパク質輸送比較

### (4) 共免疫沈降法による RON3 相互作用分子の同定

TMP 非存在下で培養するとリング期 RON3-DDD 原虫において RON3 の C 末断片が消失することが明らかとなり (図 2) TMP 存在下、または非存在下で培養した原虫を用いた共免疫沈降産物の比較解析による RON3 相互作用分子の同定が困難となったが、RON3 と寄生胞膜チャネル構成分子 EXP2 の相互作用を確認するために TMP 存在下で培養したリング期 RON3-DDD 原虫のみを用いて共免疫沈降実験を実施した。その結果、抗 HA 抗体を用いた RON3C 末断片を含む免疫沈降産物中に EXP2 のシグナルは認められなかったが、RON3 の N 末断片のシグナルが検出されたことから、RON3 が断片どうしでヘテロ複合体を形成することが明らかとなった。

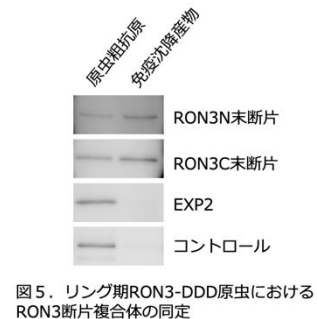


図 5. リング期RON3-DDD原虫における RON3断片複合体の同定

### (5) 近位依存性ビオチン化酵素 AirID を用いた RON3 相互作用分子の同定

当初予定した共免疫沈降産物の比較解析による RON3 相互作用分子の同定が困難となったため、代替案として近接タンパク質をビオチン標識する新規近位依存性ビオチン化酵素 AirID を C 末端に付加した RON3 を発現する RON3-AirID 原虫について解析した。その結果、培地にビオチンが含まれているため、ビオチン添加の有無に関わらず、ビオチン化タンパク質が検出された。トランスロコン構成分子の 1 つである HSP101 に AirID を付加した原虫ではトランスロコン構成分子群と様々な輸送タンパク質のビオチン化が認められたが、RON3-AirID 原虫では全長 RON3 と各断片がビオチン化されたシグナルと 50kDa 付近に相互作用分子と考えられるシグナルを認めた。このことから RON3 はタンパク質輸送に直接関与しないことが示唆された。現在、質量分析による RON3 相互作用分子の同定を進めている。

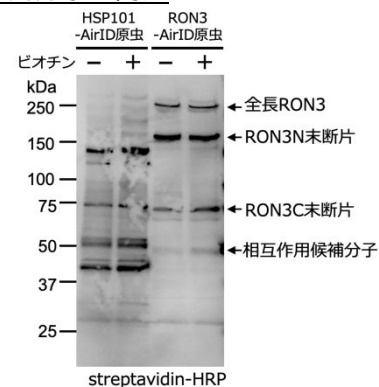


図 6. RON3-AirID原虫における ビオチン化タンパク質の検出

### (6) まとめと展望

本研究では、RON3 のプロセッシングがマラリア原虫の赤血球侵入に重要であり、特に RON3 の C 末断片がリング期原虫の発育に必須であることを明らかにした。また、RON3 の C 末断片にこれまで報告されてきた寄生胞膜チャネル形成、およびトランスロコン形成とは異なる機能があることを示唆する結果が得られたことから、今回同定した RON3 の N 末断片と C 末断片の複合体形成、および現在解析を進めている RON3 相互作用分子に着目すれば、リング期にアルテミシニン耐性を持つ原虫に有効であり、複数の作用機序を持つ耐性獲得リスクの低い新機抗マラリア薬の開発に繋がることを期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Takashima Eizo, Otsuki Hitoshi, Morita Masayuki, Ito Daisuke, Nagaoka Hikaru, Yuguchi Takaaki, Hassan Ifra, Tsuboi Takafumi	4. 巻 14
2. 論文標題 The Need for Novel Asexual Blood-Stage Malaria Vaccine Candidates for Plasmodium falciparum	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 100 ~ 100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom14010100	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 Ito Daisuke, Kondo Yoko, Takashima Eizo, Iriko Hideyuki, Thongkuiatkul Amporn, Torii Motomi, Otsuki Hitoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Roles of the RON3 C-terminal fragment in erythrocyte invasion and blood-stage parasite proliferation in Plasmodium falciparum	5. 発行年 2023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.2023.1197126	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 Otsuki Hitoshi, Kaneko Osamu, Ito Daisuke, Kondo Yoko, Iriko Hideyuki, Ishino Tomoko, Tachibana Mayumi, Tsuboi Takafumi, Torii Motomi	4. 巻 13
2. 論文標題 Cysteine Residues in Region 6 of the Plasmodium yoelii Erythrocyte-Binding-like Ligand That Are Related to Its Localization and the Course of Infection	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 458 ~ 458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom13030458	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 Ito Daisuke, Chen Jun-Hu, Takashima Eizo, Hasegawa Tomoyuki, Otsuki Hitoshi, Takeo Satoru, Thongkuiatkul Amporn, Han Eun-Taek, Tsuboi Takafumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Identification of a Novel RAMA/RON3 Rhoptry Protein Complex in Plasmodium falciparum Merozoites	5. 発行年 2021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.2020.605367	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 Yuguchi Takaaki, Kanoi Bernard N., Nagaoka Hikaru, Miura Toyokazu, Ito Daisuke, Takeda Hiroyuki, Tsuboi Takafumi, Takashima Eizo, Otsuki Hitoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Plasmodium yoelii Erythrocyte Binding Like Protein Interacts With Basigin, an Erythrocyte Surface Protein	5. 発行年 2021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.2021.656620	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10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 伊藤 大輔、近藤 陽子、高島 英造、入子 英幸、Thongkukiatkul Amporn、鳥居 本美、大槻 均
2. 発表標題 赤血球期マラリア原虫におけるRON3C末端断片の機能解析
3. 学会等名 第93回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 大槻 均、金子 修、伊藤 大輔、近藤 陽子、入子 英幸、石野 智子、橘 真由美、坪井 敬文、鳥居 本美
2. 発表標題 ネズミマラリア原虫Plasmodium yoelii EBL領域6のCysと感染性と局在の解析
3. 学会等名 第93回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 面田 彩馨、松本 香乃実、吉野 健一、橘 真由美、石野 智子、伊藤 大輔、大槻 均、坪井 敬文、鳥居 本美、入子 英幸
2. 発表標題 熱帯熱マラリア原虫の未成熟生殖母体期のSBP1はPfHSP70と相互作用する
3. 学会等名 第93回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 伊藤 大輔、近藤 陽子、高島 英造、大槻 均
2. 発表標題 赤血球期マラリア原虫におけるRON3タンパク質の機能解析
3. 学会等名 第92回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 湯口 貴聡、Bernard Kanoi、長岡 ひかる、三浦 豊和、伊藤 大輔、竹田 浩之、坪井 敬文、高島 英造、大槻 均
2. 発表標題 Plasmodium yoeliiのerythrocyte binding like タンパク質はマウス赤血球表面タンパク質Basiginと相互作用する
3. 学会等名 第92回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 面田 彩馨、伊藤 大輔、橘 真由美、吉野 健一、石野 智子、大槻 均、鳥居 本美、入子 英幸
2. 発表標題 熱帯熱マラリア原虫生殖母体期の原虫タンパク質輸送におけるSBP1の機能解析
3. 学会等名 第92回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大槻 均、金子 修、伊藤 大輔、近藤 陽子、入子 英幸、石野 智子、橘 真由美、坪井 敬文、鳥居 本美
2. 発表標題 ネズミマラリア原虫 Plasmodium yoelii EBL 領域 6 における感染性についての解析
3. 学会等名 第92回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤 大輔、大槻 均
2. 発表標題 赤血球期マラリア原虫におけるRON3タンパク質の性状解析
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 Daisuke Ito, Jun-Hu Chen, Eizo Takashima, Tomoyuki Hasegawa, Hitoshi Otsuki, Satoru Takeo, Amporn Thongkukiatkul, Eun-Taek Han, Takafumi Tsuboi
2. 発表標題 Identification of a novel RAMA/RON3 rhoptry protein complex in Plasmodium falciparum merozoites
3. 学会等名 第90回日本寄生虫学会大会 第32回臨床寄生虫学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤大輔、大槻均
2. 発表標題 赤血球期マラリア原虫におけるRON3タンパク質の機能解析
3. 学会等名 第76回日本寄生虫学会西日本支部大会
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			
タイ	Burapha University			
中国	中国疾病預防控制中心			
韓国	Kangwon National University			