

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590379

研究課題名（和文） マラリア原虫スポロゾイトのロプトリー分子の機能解析

研究課題名（英文） Functional analyses of sporozoite rhoptry proteins in *Plasmodium*

研究代表者

石野 智子 (Ishino Tomoko)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40402680

研究成果の概要（和文）： スポロゾイトの標的細胞侵入機構を理解する目的で、ロプトリーに局在する分泌型タンパク質である RON2 に着目し、まずはプロモーター置換によるスポロゾイト時期特異的遺伝子発現抑制法を開発した。 *ron2* 発現抑制スポロゾイトを用いた解析により、RON2 が、スポロゾイトの蚊の唾液腺侵入、およびほ乳類の肝臓感染に重要な役割を担うことを明らかにした。さらに、スポロゾイトのロプトリーに局在する分子を複数同定した。

研究成果の概要（英文）： To elucidate the molecular mechanisms of sporozoites invasion, we focused on RON2, the secretory proteins localized to rhoptries. First, we developed the sporozoite-stage specific gene silencing system by promoter swapping. Using *ron2* silencing transgenic sporozoites, it is revealed that RON2 has important roles both in salivary glands and liver invasion. Furthermore, we have identified 6 other sporozoite rhoptry proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2011年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2012年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

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：寄生虫学、スポロゾイト、オルガネラ、ロプトリー、唾液腺

1. 研究開始当初の背景

蚊の吸血の際に皮膚内に注入されたマラリア原虫スポロゾイトは、血流によって運ばれ最初に肝細胞に寄生する。次いで、肝細胞内で発育・分裂してメロゾイトへと分化し、これらが赤血球に侵入して感染を繰り返すことで発熱・貧血などの病態を引き起こす。従っ

て、スポロゾイトの肝細胞への寄生は、ほ乳類への感染成立段階ということができ、感染阻止法の標的として注目を集めてきた。しかしながら、スポロゾイトは感染蚊の唾液腺から回収せねばならず、大量に材料を集めるのが困難なことから研究は大幅に遅れてきた。スポロゾイトの先端部には、宿主細胞への侵

入に深く関与すると考えられる分泌型タンパク質を貯蔵する小器官（マイクロネーム・ロプトリー）が存在する。このうち、マイクロネームには申請者を含めたこれまでの研究成果により、スポロゾイトが皮膚から肝細胞へと移動する際に必要とされる、移動・細胞通過能を担う原虫タンパク質が局在することが判明している。一方、ロプトリーについてはあまり着目されてこなかった。もう一つの侵入型であるメロゾイトもロプトリーを有していることから、本研究課題において、**ロプトリーに局在する原虫分子が「細胞への寄生」に重要な役割を果たす**という仮説を提唱する。実際、メロゾイトにおいて、ロプトリーに貯蔵されるいくつかのタンパク質が細胞侵入の際に放出されることが見だされてきた。しかしながら、既存の遺伝子ターゲティング法では赤血球感染に必須な原虫分子の機能解析は技術上不可能であるため、その役割は未だに解明されていない。

2. 研究の目的

スポロゾイトの標的細胞への侵入は、ほ乳類への感染成立段階ということができ、感染阻止法開発の観点からも肝細胞侵入機構の解明が期待されているが、なお不明な点が多く残されている。本課題は、スポロゾイト先端部小器官ロプトリーに着目し、ここに貯蔵される原虫タンパク質の肝細胞寄生における役割をステージ特異的機能欠損原虫の作出により明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

以下の実験は全て、ネズミマラリア原虫である *Plasmodium berghei* を用いて行う。

(1) スポロゾイト特異的遺伝子発現抑制原虫作出法の開発

ロプトリー分子は、メロゾイトおよびスポロゾイトの両ステージで重要な役割を果たすと考えられる為、既存の遺伝子欠損原虫は作出できないと予想される。そこで、スポロゾイト時期特異的に遺伝子発現を抑制するために、プロモーター置換を行うことにした。置換するプロモーターは、①赤血球ステージでロプトリー分子群とよく似た発現プロフ

ァイルを有し、②スポロゾイトで発現が極めて低いもの、の2点をクライテリアに候補を絞る。最終的には、RON2のプロモーターを置換した組換え原虫を作出し、①赤血球ステージで正常に増殖すること、②中腸、唾液腺のスポロゾイトにおいてRON2の発現が極めて抑制されること、を判断根拠に選定する。

(2) スポロゾイトで発現が認められるRON2のスポロゾイト特異的遺伝子発現抑制による機能解析

上で作成したRON2プロモーター置換組換え原虫をマウスに感染させ、吸血により蚊へ伝搬させた24日後に、中腸、体液、唾液腺からスポロゾイトを回収する。野生型と比較し、スポロゾイトの形成効率、体液への放出の効率、運動能、唾液腺への侵入効率を評価する。さらに、スポロゾイトをラットの尾静脈から投与することで、ほ乳類への感染性を評価する。

(3) スポロゾイトで発現するロプトリー候補分子の探索と確認

①ロプトリー関連分子の探索 赤血球侵入ステージであるメロゾイトにおいてロプトリーに局在すると予想されているタンパク質群(12種類)が、スポロゾイトにおいても発現しているか否か、RT-PCR法により解析した。赤血球ステージ原虫、中腸、唾液腺から回収したスポロゾイトからRNAを抽出して鋳型として用いた。

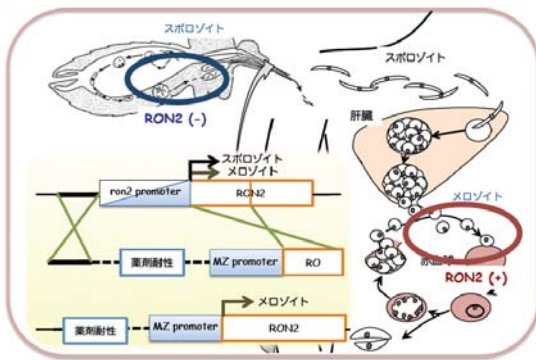
②スポロゾイトにおけるタンパク質局在の解析 スポロゾイトで遺伝子発現が確認された分子について、タンパク質の局在を解析するために、c-myc タグと融合させたタンパク質を発現させる遺伝子組み換え原虫を作出した。得られた組換え原虫を蚊に感染させ、スポロゾイトを回収し、抗c-myc抗体を用いた免疫電顕法により、それぞれのタンパク質の局在を解析した。

4. 研究成果

(1) スポロゾイト特異的遺伝子発現抑制原虫作出法の開発

in silico 解析と、スポロゾイトを用いたRT-PCRにより、3つの分子が置換するプロモ

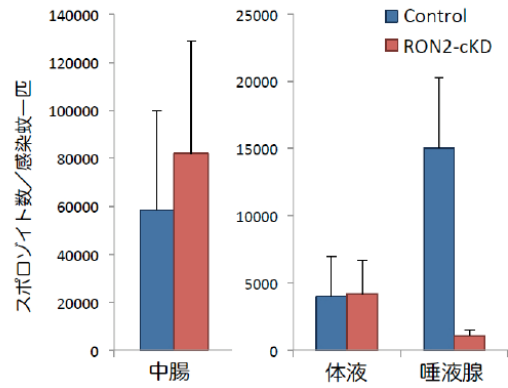
ーターの候補として選定された。そこで、それぞれのプロモーター相当領域(1kb. p. 程度)を ron2 のプロモーターと置換させる遺伝子組換え原虫を作成した。その結果、merozoite surface protein の一種を用いた時に、中腸から回収したスポロゾイトにおける RON2 の遺伝子発現が 1/50 程度にまで抑制されることを見出した。従って、プロモーター置換によるスポロゾイト時期特異的遺伝子発現抑制法の開発に成功し、スポロゾイトにおけるロプトリー分子群の役割の解明のための準備が整った。



＜図1＞プロモーター置換によるスポロゾイト時期特異的 RON2 発現抑制組換え原虫の作出

（2）スポロゾイトで発現が認められる RON2 のスポロゾイト特異的遺伝子発現抑制による機能解析

（1）で作成したスポロゾイト時期特異的 ron2 発現抑制原虫 (RON2 conditional knock down; RON2-cKD) を用いる。野生型 (Control) と RON2-cKD を感染させたマウスを媒介蚊に吸血させ、21 日間 20 度で飼育した後、顕微鏡下での解剖により、中腸・体液・唾液腺からスポロゾイトを回収し数を比較する。その結果、RON2-cKD 原虫は、スポロゾイトの形成や体腔への放出は正常であるが、唾液腺への侵入が大きく損なわれることを見出された。すなわち、RON2 が唾液腺侵入に重要な役割を担うことが初めて明らかになった。さらに、体液、あるいは唾液腺から回収したスポロゾイトをラットに尾静脈から投与して、感染能を評価した。野生型では 100% の動物に感染を引き起こす条件下、RON2-cKD スポロゾイトを用いた時にはラットへの感染が認められな

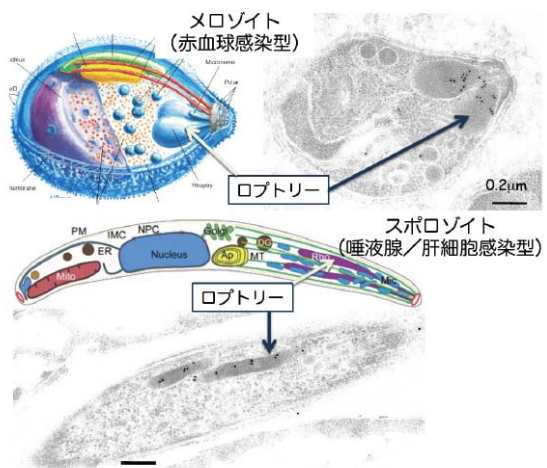


＜図2＞RON2 はスポロゾイトが唾液腺に侵入する際に重要な役割を有する

かったことから、RON2 は肝臓感染にも大きな役割を果たすことが明らかになった。

（3）スポロゾイトで発現するロプトリー候補分子の探索と確認

赤血球感染ステージでロプトリーに局在が予想されている分子 12 種類について、スポロゾイトでも遺伝子が発現されているのか、RT-PCR を用いて解析した。その結果、調べたすべての遺伝子について、中腸で形成されたスポロゾイトにおいて強い発現が認められた一方で、唾液腺に侵入後のスポロゾイトには mRNA はほとんど検出されなかった。そこで、候補分子の C 末端側に c-myc を融合させる組換えタンパク質発現遺伝子改変原虫を作出し、抗 c-myc 抗体を用いた免疫電顕法により詳細な局在を解析した。その結果、RON2 以外にも 6 つの分子がスポロゾイトにおいてもロプトリーに局在していることが



＜図3＞スポロゾイトのロプトリーに局在する分子の免疫電顕法による探索

判明した。これらの分子が、スポロゾイトの唾液腺あるいは肝細胞への侵入に関わるのか否か、今後解析を続ける。さらに、標的細胞膜上に、相互作用分子があればその探索を行い、スポロゾイトの細胞侵入機構の分子基盤の解明を目指す。

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)
出版準備中

[学会発表] (計 12 件)

1. 石野智子、杉野友香、野崎守、徳永順土、橘真由美、坪井敬文、鳥居本美 スポロゾイトの細胞侵入におけるロプトリータンパク質の機能分担 第 82 回 日本寄生虫学会大会 (ワークショップ「寄生現象の分子メカニズム」) 2013 年 3 月 30, 31 日 東京都
2. 野崎守、徳永順土、坪井敬文、石野智子、鳥居本美 ネズミマラリア原虫 Rhoptry neck protein 4 は蚊の唾液腺への侵入に必要である 第 82 回 日本寄生虫学会大会 2013 年 3 月 30, 31 日 東京都
3. 石野智子、杉野友香、徳永順土、野崎守、坪井敬文、鳥居本美 Functional analyses of sporozoite rhoptry proteins by stage-specific gene silencing system in *Plasmodium berghei*. Keystone シンポジウム 2013 年 1 月 20-25 日 アメリカ合衆国、ニューオーリンズ (ルイジアナ州)
4. 徳永順土、野崎守、村田英理、坪井敬文、石野智子、鳥居本美 Screening for sporozoite rhoptry proteins in *Plasmodium*. Keystone シンポジウム 2013 年 1 月 20-25 日 アメリカ合衆国、ニューオーリンズ (ルイジアナ州)
5. 石野智子、村田英理、徳永順土、橘真由美、坪井敬文、鳥居本美 Rhoptry neck protein 2 is produced in oocyst-derived sporozoites and required for salivary gland invasion. ASTMH meeting, 2012 年 11 月 11-15 日、アメリカ合衆国、アトランタ
6. 石野智子、徳永順土、杉野友香、野崎守、橘真由美、坪井敬文、鳥居本美 スポロゾイトロプトリー分子の機能分担 第 20 回分子寄生虫学ワークショップ、2012 年 8 月 26-29 日 兵庫県
7. 石野智子、村田英理、徳永順土、橘真由美、坪井敬文、鳥居本美 Investigation of the mechanisms how malaria sporozoites invade salivary glands Molecular Approach to Malaria 2012 2012 年 2 月 20 日 オーストラリア、ローン (ビクトリア州)
8. 石野智子、村田英理、徳永順土、橘真由美、坪井敬文、鳥居本美 マラリア原虫先端部小器官 (ロプトリー) に局在する分子のスポロゾイトにおける機能解析 第 81 回 日本寄生虫学会大会 (シンポジウム「寄生虫におけるオルガネラ進化と寄生適応」) 2012 年 3 月 23 日 兵庫県
9. 徳永順土、村田英理、坪井敬文、石野智子、鳥居本美 マラリア原虫スポロゾイトのロプトリータンパク質の同定と発現解析 第 81 回 日本寄生虫学会大会 2012 年 3 月 24 日 兵庫県
10. 徳永順土、村田英理、石野智子、鳥居本美 マラリア原虫スポロゾイトにおけるロプトリータンパク群の性状解析 第 19 回分子寄生虫学ワークショップ、2011 年 10 月、兵庫県
11. 徳永順土、村田英理、石野智子、鳥居本美 マラリア原虫スポロゾイトのロプトリー分子の探索及び発現プロファイル解析 第 80 回 日本寄生虫学会大会 2011 年 3 月 27 日 東京都
12. 石野智子、Hegge Stephan、徳永順土、村田英理、杉野友香、鳥居本美 マラリア原虫スポロゾイトの肝細胞への侵入過程の real time imaging 解析 第 80 回日本寄生虫学会、東京都、2011 年 3 月

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

愛媛大学プロテオサイエンスセンター 寄
生病原体学部門

<http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/parasitology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石野 智子 (Ishino Tomoko)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40402680

(3) 連携研究者

徳永 順士 (Tokunaga Naohito)

愛媛大学・総合科学研究支援センター・技術員

研究者番号：30596151