

## 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24年3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890128

研究課題名（和文） マラリア原虫のベクター適応機構の解明

研究課題名（英文） Parasites-adaptation to vector environments in *Plasmodium*

研究代表者

新澤 直明 (SHINZAWA NAOAKI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10583015

研究成果の概要（和文）：

ハマダラカとネズミマラリア原虫による吸血実験系を用いることにより、ある野生型である PbR 系統はネズミマラリア原虫 *P. yoelii* による感染は成立するが、別のネズミマラリア原虫 *P. berghei* の感染に強い感染抵抗性を示すことが明らかとなった。また、*P. berghei* による感染では、ハマダラカ中腸内でマラリア原虫が正常通りに分化しないことから、中腸内におけるハマダラカ・原虫相互作用がベクター環境への適応メカニズムを制御していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Blood-feeding assay of rodent malaria parasites with *Anopheles stephensi* revealed that a wild-type variant, named as PbR, represented refractoriness for *P. berghei*, but not for *P. yoelii*. In parasites stage-specific analysis, we found incomplete differentiation to ookinetes in the PbR midgut in *P. berghei* infection. Our results suggest that midgut-parasites interaction control parasite-differentiation which is the key factor of adaptation mechanisms evolving specie-specifically.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,260,000 | 378,000 | 1,638,000 |
| 2011年度 | 1,160,000 | 348,000 | 1,508,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 2,420,000 | 726,000 | 3,146,000 |

研究分野：節足動物感染免疫学

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：ハマダラカ マラリア 自然免疫 分子生物学

## 1. 研究開始当初の背景

マラリアは世界中で年間 100 万人以上が死亡する驚異的な感染症である。2002 年にヒト熱帯熱マラリア原虫の全ゲノムが読了されて以来、分子生物学的アプローチによる研究が重ねられてきた。しかしながら未だに、有効なマラリアワクチンは無く、また、薬剤耐性原虫の出現という大きな問題も残されており、マラリア制圧に関わる基盤研究の重要性は年々増している。

マラリアの原因病原体であるマラリア原虫 (*Plasmodium* 属) は主に病原体媒介節足動物 (ベクター) であるハマダラカ (*Anopheles* 属) の媒介によって感染が伝播する。そのため、マラリア制圧に向けた対策の一つとして、ベクター側からのコントロールが従来より考えられている。これまでは、蚊帳などを用いた物理的防除や殺虫剤などを用いた化学的防除が主であった。しかしながら、経済的問題や殺虫剤抵抗性の節足動物の出現によって阻まれている。そのため、複合的手法の一つとして、媒介性に着目したアプローチが求められている。

## 2. 研究の目的

現在までに *Anopheles* 属は数百種確認されているが、その中でもマラリア原虫を媒介可能な種は約 70 種にとどまっている。そのうち、実際のフィールドにおいてベクターとして機能している種は 30-40 種となっている。また、マラリア媒介能をもつハマダラカ種であっても、種ごとに媒介可能なマラリア原虫の種が異なることがわかっており、媒介が成立するハマダラカ種とマラリア種の組み合わせは多種多様である。つまり、ベクターと原虫の間には特異的な種間関係が存在し、原虫種とハマダラカ種の適合の結果、初めてハマダラカによるマラリア原虫の伝播が成立する。その適合の背景には、マラリア原虫とハマダラカ双方の遺伝学的背景・生理状態のバリエーションが存在することが推測される。

マラリア原虫とベクター蚊の相互作用は、蚊の吸血によって開始される。感染宿主からの吸血時に中腸内腔に運ばれたマラリア原虫は、細長い形状をした運動体 (オーキネート) に分化する。オーキネートは中腸壁を通過し基底膜に辿り着くと、分化・増殖の後、感染虫体を作り出す。そして、再度吸血を行

った際に唾液とともに宿主への感染虫体の侵入が起き、新規の感染が成立する。ベクター内生活環においては、血液が多く含まれる中腸内腔と昆虫体液の間におけるイオン濃度などの大きな環境変化や、唾液腺への侵入過程、あるいはハマダラカが示すマラリア原虫に対する防御応答などのベクター・原虫間相互作用が数多く存在している。つまり、マラリア原虫はベクター内生活環における適応戦略を備えていることが示唆される。そこで、研究代表者は、「マラリア原虫には防御応答を含むベクター内における環境変化に対する適応機構 (ベクター適応機構) が存在し、ベクター適応機構のバリエーションによりベクターと原虫の特異的な種間関係が決定する」という仮説を立てた。上記仮説に対して、分子生物学的アプローチにより、その検証を行う。

## 3. 研究の方法

研究代表者が所属する研究室では、ネズミマラリア原虫を感染させたネズミを用いることで、実験室内でハマダラカへの媒介実験を行うことが可能である。そこで、複数種のマラリア原虫と複数種のハマダラカを用いて、その媒介性のバリエーションを見出すことを目的とする。媒介性が見出された原虫種を用いて、原虫の蚊体内ステージのどの段階でその発生・分化に影響が生じているかを検討する。さらに、媒介性が異なるマラリア原虫の遺伝子領域を入れ替えることにより、その媒介性への影響を検討する。

以上の段階的過程により、ベクター環境への適応を制御する原虫側因子の同定を目指す。

### (1) マラリア原虫種間の媒介性プロファイル解析

ネズミマラリアを複数種用いたハマダラカによる媒介実験を行い、ネズミマラリアごとの媒介性の違いについてプロファイル解析を行う。ネズミマラリアとして *P. berghei*、*P. yoelii*、*P. chabaudi*、*P. vinckei* の 4 種を用いる。それらの原虫種をハマダラカに感染させ、数日後に中腸基底膜上に形成されたオーシストの数を数えることでその媒介性を評価する。

### (2) 媒介性に差を生じる原虫ステージの探索

媒介性が異なる原虫種間を用いて、上述した蚊体内ステージにおける原虫数を測定す

る。吸血後 15 分後にハマダラカ中腸から取り出した血を用いて雄ガメトサイト・ガメト特異的抗体を用いて免疫染色を行い、鞭毛活動を開始した雄ガメト数を評価する。吸血後 18 時間後の中腸内血液を用いて、オーキネート特異的抗体を用いることで、分化後のオーキネート数を評価する。

(3) 原虫ステージレポーター組換え原虫を用いたトランスクリプトーム解析

媒介性に差を生じる原虫ステージを同定した後、その原虫ステージを高純度に精製しトランスクリプトーム解析を試みるために、高純度精製を目的としてステージレポーター組換え原虫を作製する。データベース上に公開されている情報を元に、ある原虫ステージで特異的な遺伝子を選別しそのプロモーター領域下に GFP を配置したマラリア原虫人工染色体 (PAC: Plasmodium Artificial Chromosome) を作製する。PAC は環状 DNA としてマラリア原虫核内に存在し、分裂の際に安定して娘細胞に分配されるため、ステージ変化を通じて安定した遺伝子組換え体を得ることが可能である。PAC にステージ特異的 GFP を挿入したものをレポーター-PAC とし、マラリア原虫に組込むことで特定の原虫ステージレポーター原虫の作出を行う。

作製したレポーター原虫を用いて、RNA-seq 法によるトランスクリプトーム解析を行う。検出された転写産物のうち、膜タンパク質に着目し、ベクター適応因子の候補遺伝子とする。

(4) 遺伝子領域入替え原虫の作製によるベクター適応因子の同定

高媒介性原虫種と低媒介性原虫種の上記候補遺伝子の遺伝子領域を相同組み換え法により入れ替えた原虫 (入替え原虫) を作製し、ハマダラカによる媒介性を評価してその候補遺伝子がベクター環境への適応に寄与するかどうかを評価し、ベクター適応因子として同定を試みる。

#### 4. 研究成果

本研究は、「マラリア原虫はベクター環境に適応する機構を進化させてきた」という着眼点から解析し、ハマダラカによるマラリア原虫媒介能を規定するベクター適応機構を明らかにするものである。

(1) 2 種類のネズミマラリア原虫 *P. berghei* および *P. yoelii* を用いた媒介実験を行った。

*A. stephensi* を 3 系統を用いた媒介性プロファイル解析により、ある野生型ハマダラカは *P. berghei* の感染に対して高感受性を示す SDA500 系統と比較して、オーシスト数は非常に少なく、高い抵抗性を示すことが明らかになった。一方、*P. yoelii* を用いた感染実験では *P. berghei* ほどの抵抗性を示すことはなかった。この野生型 *A. stephensi* 系統を PbR 系統 (*P. berghei*-Refractory) と名付けた。以上の結果から、*P. berghei* は低媒介性のマラリア原虫種であることが明らかとなった。

(2) 雄ガメトの特異的抗体である抗 Py06 抗体を用いて、鞭毛活動を有している雄原虫数を評価した。その結果、PbR 系統の中腸内では *P. berghei* の雄ガメトは正常通り鞭毛活動を有することが明らかとなった。さらに、オーキネート特異的抗体である抗 PyS25 抗体による免疫染色を行った結果、PbR 系統では *P. berghei* のオーキネートは正常に分化した原虫数が非常に少ないことが明らかとなった。つまり、*P. berghei* の中腸内発育は PbR 系統中腸との相互作用に影響されることが示唆された。

(3) 以上の (1), (2) の結果から、中腸内ステージに着目して、トランスクリプトーム解析を行うことを計画した。中腸内ステージ原虫の高純度精製のために中腸内ステージレポーター原虫の作出を行った。中腸内ステージ特異的遺伝子として S25 および WARP を選択した。S25 は雌雄原虫受精後のザイゴート期初期から発現しており、WARP はザイゴート期後期から発現していることが知られている。S25 および WARP のプロモーター領域として翻訳開始コドンの上流 1000bp をクローニングし、GFP の上流に配置した。この組換え遺伝子配列 (PbS25-GFP および WARP-GFP) をマラリア原虫人工染色体に挿入し、*P. berghei* に組み込んだ。蚊体内ステージの *in vitro* 培養を行った結果、組換え *P. berghei* はザイゴート期から GFP を発現することが明らかになった。このようにして作製した中腸内ステージレポーター原虫を用いて、フローサイトメーター解析により、中腸内ステージを高純度に精製することが期待される。

以上の結果から、PbR 系統による *P. berghei* と *P. yoelii* の媒介性の差に着目することで、ハマダラカ中腸-マラリア原虫相互作用に基づいたベクター適応機構の解析を行うことが可能となった。また、中腸内ス

テープレポーター原虫を作製したことにより、他のステージが混在しない精製を行い、高精度なトランスクリプトーム解析を行うことが可能となった。以上の結果から、本研究によって得られた知見はマラリア原虫のベクター適応機構の理解に通じる大きな手がかりとなることが示唆された。

#### 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 5 件)

① Yuko Doi, Naoaki Shinzawa, Shinya Fukumoto, Hideyuki Okano, Hirotaka Kanuka. Calcium signal regulates temperature-dependent transformation of sporozoites in malaria parasite development *Exp. Parasitol.* 128(2): 176-180 (2011) 査読有り

② Yuko Doi, Naoaki Shinzawa, Shinya Fukumoto, Hideyuki Okano, Hirotaka Kanuka, ADF2 is required for transformation of the ookinete and sporozoite in malaria parasite development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 397(4): 668-72 (2010) 査読有り

③ Toshio Shibata, Shigeru Ariki, Naoaki Shinzawa, Ryuta Miyaji, Haruka Suyama, Miyuki Sako, Nobuyuki Inomata, Takumi Koshiba, Hirotaka Kanuka, Shun-ichiro Kawabata. Protein crosslinking by transglutaminase controls cuticle morphogenesis in *Drosophila*. *PLoS One*, 5(10): e13477 (2010) 査読有り

④ Tomoko Kubori, Naoaki Shinzawa, Hirotaka Kanuka, Hiroki Nagai. *Legionella* metaeffector exploits host proteasome to temporally regulate cognate effector. *PLoS Pathogens*, 6(12): e1001216 (2010) 査読有り

⑤ Naoaki Shinzawa, Hirotaka Kanuka. Host tolerance and infectious disease. *Seikagaku* 82 (11): 1051-1055 (2010) 査読有り

[学会発表] (計 13 件)

① 岡戸清、新澤直明、福本晋也、嘉糠洋陸 ショウジョウバエによる病原細菌の摂食媒介感染症若手フォーラム 長崎県 2012.2.2-4

② Naoaki Shinzawa, Tomoko Ishino, Mayumi Tachibana, Takafumi Tsuboi, Motomi Torii. Functional dissection of vectorial capacity in *Plasmodium*-refractory *Anopheles stephensi*. MAM 2012 Conference (Molecular Approaches to Malaria), Lorne, Victoria, Australia, 2012.2.19-23

③ 岡戸清、新澤直明、福本晋也、嘉糠洋陸 ショウジョウバエによる病原細菌の摂食媒介 第 63 回日本衛生動物学会東日本支部大会 神奈川県 2011.12.13-16

④ 岡戸清、新澤直明、福本晋也、嘉糠洋陸 ハエ類による病原細菌の摂食媒介メカニズム 第 63 回日本衛生動物学会東日本支部大会 東京都 2011.10.22

⑤ 新澤直明、石野智子、橘真由美、坪井敬文、鳥居本美 ハマダラカ系統間解析を用いてマラリア原虫媒介性を探る 第 19 回分子寄生虫学ワークショップ 兵庫県 2011.10.21-23

⑥ 新澤直明、石野智子、橘真由美、坪井敬文、鳥居本美 ハマダラカ系統間比較解析によるマラリア原虫の媒介成立を左右するハマダラカ側分子基盤の構築 第 84 回生化学大会 京都府 2011.9.21-24

⑦ Kiyoshi Okado, Naoaki Shinzawa, Shinya Fukumoto, and Hirotaka Kanuka. Odor-based bioenhanced transmission of pathogen by *Drosophila melanogaster* 1st Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference Taipei, Taiwan 2011.5.22-25

⑧ Naoaki Shinzawa, Tomoko Ishino, Mayumi Tachibana, Takafumi Tsuboi, Motomi Torii. Functional dissection of innate immune response in *Plasmodium*-refractory *Anopheles Stephensi*. TNF2011 兵庫県 2011.5.15-18

⑨ Kiyoshi Okado, Naoaki Shinzawa, Shinya

Fukumoto, and Hirotaka Kanuka. Odor-based bioenhanced transmission of pathogen by *Drosophila melanogaster* 52nd Annual Drosophila Research Conference San Diego, USA 2011. 3. 30-4. 3

⑩ 新澤直明、石野智子、鳥居本美 マラリア媒介ハマダラカ *Anopheles stephensi* の感染抵抗性系統を用いたマラリア感染防御機構の解析 第80回日本寄生虫学会 東京都 2011. 3. 28-30

⑪ 岡戸清、新澤直明、福本晋也、嘉糠洋陸 ショウジョウバエは病原体を嗅覚で認識し摂食媒介する 第33回日本分子生物学会年会・第83回生化学大会 合同大会 兵庫県 2010. 12. 7-10

⑫ 柴田俊生、宮地隆太、新澤直明、木場健吾、小柴琢己、嘉糠洋陸、川畑俊一郎 キイロショウジョウバエトランスグルタミナーゼの基質群の機能解明 第33回日本分子生物学会年会・第83回生化学大会 合同大会 兵庫県 2010. 12. 7-10

⑬ 新澤直明、斉木選射、鹿島千紗子、寺本時靖、土井裕子、高橋慧、下島昌幸、福本晋也、河岡義裕、嘉糠洋陸 An approach of producing live vaccine by transgenic mosquito 10th Awaji International Forum of Infection and Immunity 兵庫県 2010. 9. 7-10

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新澤 直明 (SHINZAWA NAOAKI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10583015