

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590485

研究課題名(和文) マラリア原虫生殖母体周縁のコイル状構造：未知の細胞骨格の可能性

研究課題名(英文) Novel coil-like structure in gametocyte : unknown cytoskeleton in Plasmodium?

研究代表者

竹尾 暁 (TAKEO, Satoru)

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号：40302666

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、赤血球内の熱帯熱マラリア原虫有性生殖期、生殖母体の周縁に見出された、コイル状の構造を呈する特定の機能未知分子を広義の細胞骨格タンパク質と仮定して、以下A.B.C.を解析することであった。A.本分子と相互作用するタンパク質分子は何か？B.本分子ないし相互作用分子は、時間的・空間的にいかに形成され、変化するか？C.本分子ないし相互作用分子を欠くと、表現形質や相互作用分子はどう変化するか？A.は、試料の電気泳動まで終えたが、本分子と相互作用する未知のタンパク質分子同定には至らなかった。また、B.C.については、これを解析するためのトランスジェニック原虫のクローニング作業まで達した。

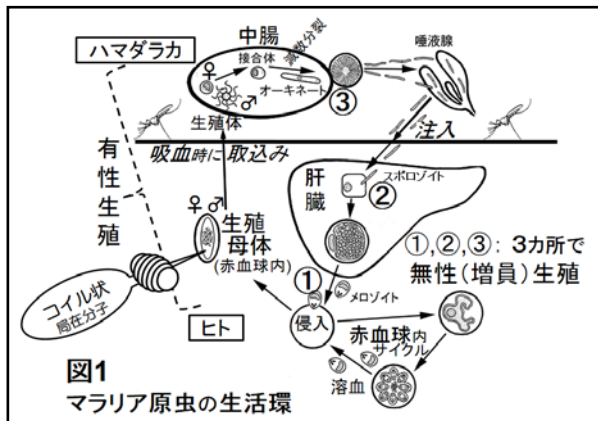
研究成果の概要(英文)：An annotated “hypothetical protein” molecule illuminates a novel coil-like structure in gametocyte from Plasmodium falciparum, which can lead to revealing unknown plasmodial cytoskeleton in the sexual stages in mammalian hosts. Following 3 questions were raised to analyze the molecule: A. Any interacting molecule? : B. How does the molecular structure temporally and spatially change? : C. Any change in phenotype if the molecule or the interacting ones are deleted? Qtn.A lead to electrophoresis, prior to mass spectrometry, of the potential interacting molecules. However they are still to be identified. Qtns. B&C resulted in establishing transgenic parasite lines, but the clear answers are yet to be obtained.

研究分野：分子寄生虫学

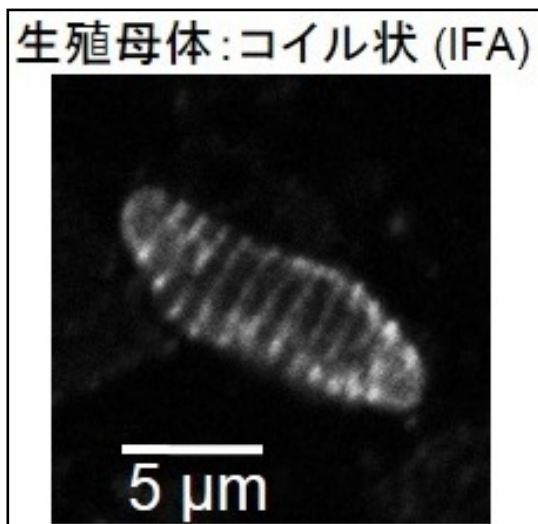
キーワード：マラリア原虫

1. 研究開始当初の背景

マラリア原虫属 *Plasmodium* spp. は、ヒト赤血球内/肝細胞内/蚊の中腸基底膜の無性増殖生殖に加えて、赤血球内からハマダラ蚊吸血を経て蚊中腸への移行期に有性生殖を行う (図1)。



生活環の各期では、形態に加えて代謝や宿主への侵入機構も異なると考えられ、その解明と化学療法剤やワクチンの開発が急務である。研究代表者は当初、未到のマラリアワクチン開発を目標に、マラリア原虫ゲノム・発現データベース (PlasmoDB) の情報と、所属部局の組換えタンパク質合成技術を組み合わせた逆遺伝学的手法によって、ワクチン候補抗原分子を探索していた。この過程で、熱帯熱マラリア原虫の有性生殖期に発現する分子群のタンパク質を網羅的に合成し、動



物抗血清で間接蛍光抗体解析 (IFA) した結果、生殖母体細胞周縁をコイル状に染色する、機能が未知な分子を見出した (左下図)。

これまで、らせん/コイル状の構造は、生殖母体期のみならずマラリア原虫の全生活環、さらに真核細胞において報告がない。一方でグラム陽性桿菌 (枯草菌) のアクチンホモログ MreB (Cell 2001;104:913) を発端に、原核生物の複数の分子が らせん/コイル状の細胞骨格タンパク質として報告されてきた。

2. 研究の目的

前項の機能未知分子を広義の細胞骨格関連タンパク質 (骨格の形成に関与/骨格による輸送 / 骨格と相互作用して独自の機能を発現) と仮定して、以下3点を解析する。

- (1) この機能未知分子と相互作用するタンパク質分子は何か?
- (2) この機能未知分子と相互作用分子は、時間的・空間的にいかに形成され、変化するか?
- (3) この機能未知分子もしくは相互作用分子を欠くと、表現形質や相互作用分子はどう変化するか?

3. 研究の方法

- (1) この機能未知分子と相互作用するタンパク質分子は何か?
⇒生殖母体抗原を調製して 免疫沈降法/電気泳動 (1&2 次元) /質量分析による解析
- (2) この機能未知分子と相互作用分子は、時間的・空間的にいかに形成され、変化するか?

⇒固定細胞の IFA ならびに GFP レポーター融合トランスジェニック原虫を作製し観察

(3) この機能未知分子もしくは相互作用分子を欠くと、表現形質や相互作用分子はどう変化するか？

⇒各分子について遺伝子破壊原虫を作製し観察

4. 研究成果

(1) この機能未知分子と相互作用するタンパク質分子は何か？

生殖母体出現/産生の効率は、熱帯熱マラリア原虫の株により差がある。解析に必要な原虫抗原を調製するために、適当な株を選定し生殖母体産生環境を設定する条件検討を行い、生殖母体の大量調製と凍結保存を行った。次いで、質量分析による未知分子同定の前提となる、生殖母体抗原試料からの免疫沈降/電気泳動を行った。電気泳動に難行したものの、最終的に泳動結果の再現性を確保した。未知分子の同定までは至らず、今後は本研究を発展させて、未達部の解析に向けて取り組む。

(2) この機能未知分子と相互作用分子は、時間的・空間的にいかに形成され、変化するか？

および

(3) この機能未知分子もしくは相互作用分子を欠くと、表現形質や相互作用分子はどう変化するか？

トランスジェニック（遺伝子導入）原虫/遺伝子破壊原虫作製のために必須であるプラスミド構築を行った。これを、実際に原虫に導入した。しかし、本分子の予想された発現は確認されなかった。そこで、野生型原虫の固定細胞に対して、本分子の組換えタンパ

ク質に対する抗体にて再度 IFA（間接蛍光抗体法）解析したところ、これまでの測定よりも発現は弱いことを示唆するデータを得た。そこで、トランスジェニック用のプラスミドを改めて構築し、これによるトランスジェニック原虫のクローニング作業まで終了した。今後は、本研究の成果である原虫を使用した解析により、未知の細胞骨格の存在検証へと展開する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計1件）

① Tonwong N, Sattabongkot J, Tsuboi T, Iriko H, Takeo S, Sirichaisinthop J, Udomsangpetch R
Natural infection of Plasmodium falciparum induces inhibitory antibodies against gametocyte development in human hosts, Jpn J Infect Dis, 査読有、65 巻、2012、152-156
<http://www.nih.go.jp/niid/images/JJID/65-2/152.pdf>

〔学会発表〕（計1件）

① Sasaoka C, Sakamoto H, Ito D, Takeo S, Sattabongkot J, Takashima E, Tsuboi T, Characterization of Plasmodium falciparum MAS170 as novel malaria blood stage vaccine candidate, American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 63rd Annual meeting (米国熱帯医学会 第63回年次総会)、2014年11月4日、ニューオーリンズ (米国)

〔図書〕（計1件）

① 竹尾 暁、坂本寛和、坪井敬文、三恵社、寄生虫学研究：材料と方法-コムギ胚芽無細胞系を利用した組換えタンパク質の合成と検出、2012、129-131 頁

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹尾 暁 (TAKEO, Satoru)

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号: 40302666