

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590508

研究課題名(和文) 熱帯熱マラリア原虫のマウレル裂の構造及び形成過程の解明

研究課題名(英文) Ultrastructural analysis of Maurer's clefts of Plasmodium falciparum infected red blood cell

研究代表者

坂口 美亜子 (SAKAGUCHI, Miako)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：50400651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：熱帯熱マラリア原虫の感染赤血球内に形成される膜状構造(マウレル裂)の形成過程や微細構造を明らかにすることを目的として、まずマウレル裂関連タンパク質の一つであるPfmc2TMについて蛍光タンパク質のGFPとエピトープタグを付与した組換え原虫を作製した。その結果、発現したタンパク質はマウレル裂に局在することが確認されたが、GFPの蛍光が弱いためライブイメージングができなかった。また走査型電子顕微鏡により感染赤血球の連続断面像の取得と三次元像の再構築を行ったところ、マウレル裂は寄生胞膜や赤血球膜、及び互いに連結した一連の膜構造体ではなく、感染赤血球内で個々に存在することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To clarify the formation process and ultrastructure of Maurer's clefts in the Plasmodium falciparum infected red blood cell, we generated transgenic P. falciparum lines expressing Pfmc2TM fused with GFP and several epitope tags such as Flag or Myc. We found that the protein localized to the Maurer's clefts. However, we could not use the transgenic lines for live imaging by confocal microscopy, since the GFP signal was very low intensity. Next, we used SBF-SEM to image the 3D structure of multiple entire P. falciparum infected red blood cells at each stages. The 3D organization showed that Maurer's clefts are not connected to the parasitophorous vacuole, red blood cell membrane, or tubovesicular network. They are not continuous membrane networks but independent membranous structures in the red blood cell.

研究分野：細胞生物学

キーワード：マラリア 感染赤血球 免疫染色 電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

熱帯熱マラリア原虫はヒト赤血球感染後、赤血球内に原虫由来分子の輸送機構として Maurer's cleft (マウレル裂) と呼ばれる膜状構造を形成する。このマウレル裂は原虫を包む寄生胞膜から赤血球膜へと分布しており、それを介して原虫分子が赤血球表面へと運ばれ、赤血球の形態変化が生じる。また、感染赤血球内においてマウレル裂の他に、寄生胞膜から伸びる tubovesicular network (TVN) と呼ばれる膜状構造が存在する (図 1)。

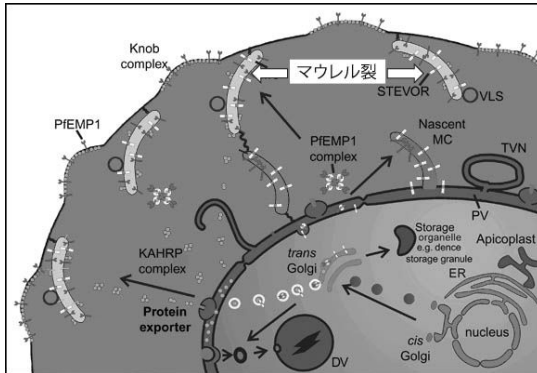


図 1. 熱帯熱マラリア原虫及び感染赤血球内部構造の模式図 (Tilley et al. (2008) Traffic 9: 187-197 より改変)

研究開始当初までにおいて、透過型電子顕微鏡による三次元再構築像からマウレル裂と寄生胞膜は繋がっており連続的なネットワークを形成していると示唆されていたが、蛍光抗体顕微鏡観察の結果からはマウレル裂と寄生胞膜及び TVN にはそれぞれ異なる分子が局在することが示されていた。電顕トモグラフィーによる高解像度の三次元像では、マウレル裂と赤血球膜あるいは寄生胞膜が連結している様子がみられるが、これら三つの構造が連結している様子は観察されおらず不明のままであった。

2. 研究の目的

研究背景をもとに、感染赤血球において原虫分子の輸送に必須なマウレル裂がどのようにして形成されるのか、また原虫分子がどのようにマウレル裂を経由して運ばれているのか、そしてマウレル裂が寄生胞膜から赤血球膜まで繋がる一連の膜状構造であるのか、あるいは独立して局在するのかを解明することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

まず、マウレル裂関連タンパク質について蛍光タンパク質及びエピトープタグでラベルした組換え原虫を作製し、蛍光顕微鏡を用いて生細胞の状態での蛍光シグナルを観察されるかどうかを確かめた。さらに蛍光タンパク質及びエピトープタグ抗体とマウレル裂関連タンパク質マーカーとなる抗体を使用して、感染赤血球内のマウレル裂の位置に目的タンパク質が発現しているかどうかを免

疫染色法によって調べた。

次に、目的タンパク質が原虫内からどのような経路を辿ってマウレル裂へと運ばれていくのか、その動態を調べるためにライブイメージングを行い、目的タンパク質に付与された蛍光タンパク質のシグナルを検出することによって輸送経路を調べた。また、同じく目的タンパク質に付与されたエピトープタグに対する抗体を用いて、原虫の各発育ステージにおける目的タンパク質の局在を調べるために免疫電子顕微鏡解析を行った。

最後に、高分解能走査型電子顕微鏡を用いて感染赤血球の三次元再構築像を作製し、マウレル裂の立体的な微細構造や空間的配置、また寄生胞膜や赤血球膜との関係性について調べた。

4. 研究成果

最初にマウレル裂関連タンパク質の一つである Pfmc2TM に対して蛍光タンパク質の GFP とエピトープタグを付与し、hrp3 あるいは HSP86 プロモーターで発現するようにした組換え原虫を作製した。このタンパク質の局在を調べるためにまず生細胞の蛍光顕微鏡観察を行ったところ、GFP のシグナルが弱いことがわかった。そこで、GFP 及びそれぞれのエピトープタグに対する抗体を用いて免疫染色し蛍光顕微鏡観察を行ったところ、マウレル裂マーカータンパク質である SBP1 との共同発現が観察でき、正しく発現できていることが確認された (図 2)。

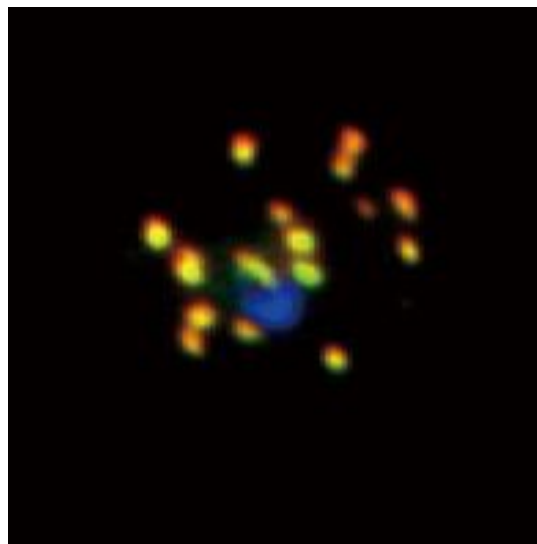


図 2. エピトープタグ (FLAG) を付与した Pfmc2TM とマウレル裂マーカータンパク質 (SBP1) の共同発現 (黄色の部分) の様子を示した蛍光像

次に、このタンパク質の感染赤血球内の動態を調べるために、組換え原虫を用いたラオ部イメージングを行った。しかし、このタンパク質に付与した GFP の蛍光シグナルの強度が改善されず、観察時間が経過するにつれシグナルが消失してしまうため、生細胞のラ

イブイメージングは不可能であった。さらにこのタンパク質のより詳細な局在を調べるため、GFP 及びエピトープタグに対する免疫電顕解析を行ったが、蛍光顕微鏡観察とは異なり GFP 及びそれぞれのエピトープタグの局在を検出することはできなかった。

最後に、高分解能走査型電子顕微鏡を用いて感染赤血球内のマウレル裂の各発育ステージにおける三次元再構築像を作製し、解析を行った。まず試料ブロックを作製するために、感染赤血球をグルタルアルデヒド固定後さらに OTO 法により二重固定しブロック染色を行った後、通常の TEM 試料作製に見られるような脱水と包埋を行った。そして TEM 観察によりこの試料の固定状態とコントラストを確認したところ良好だったため、SBF-SEM による試料の連続断面像の取得と三次元像の再構築を行った。その結果、リング、トロホゾイト、シゾントの各発育ステージにおける完全な感染赤血球の三次元像を得ることができた(図3)。またそれら三次元像から、マウレル裂同士、マウレル裂と TVN、マウレル裂と寄生胞膜、そしてマウレル裂と赤血球膜といったそれぞれの膜構造が繋がっているような様子は観察されなかった。マウレル裂は個々の独立した膜構造として感染赤血球内に局在しており、寄生胞膜から赤血球膜まで繋がるような互いに連結した一連の構造体ではないことが明らかとなった。



図3. 原虫(トロホゾイトステージ)及び感染赤血球の三次元再構築像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Mutungi JK, Yahata K, Sakaguchi M, Kaneko Q. Expression and localization of rhoptry neck protein 5 in merozoites and sporozoites of *Plasmodium yoelii*. *Parasitology International*. 63, 2014, 794-801. 査読有
DOI: 10.1016/j.parint.2014.07.013.

Nabeshima T, Inoue S, Okamoto K, Guillermo PH, Yu F, Uchida L, Ichinose A, Sakaguchi M,

Sunahara T, Buerano CC, Tadena FP, Orbita IB, Natividad FF, Morita K. Tanay virus, a new species of virus isolated from mosquitoes in the Philippines. *Journal of General Virology*. 95, 2014, 1390-1395. 査読有
DOI: 10.1099/vir.0.061887-0.

〔学会発表〕(計8件)

坂口美亜子, SBF-SEM によるマラリア感染赤血球の三次元観察とストラクチャー解析、日本寄生虫学会、2015年3月21日~2015年3月22日、杏林大学(東京都・三鷹市)

坂口美亜子, SBF-SEM によるマラリア感染赤血球の三次元構造解析、日本顕微鏡学会関東支部講演会、2015年2月28日、工学院大学(東京都・新宿区)

坂口美亜子, SBF-SEM を用いたマラリア感染赤血球の三次元観察とストラクチャー解析、生理研研究会、2014年11月12日~2014年11月13日、岡崎コンファレンスセンター(愛知県・岡崎市)

坂口美亜子, 3D structural analysis of malaria parasite-infected red blood cells by SBF-SEM. International Microscopy Congress. 2014年9月7日~2014年9月12日、プラハ(チェコ)

坂口美亜子, SBF-SEM を用いたマラリア感染赤血球の三次元構造解析、日本医学生物学電子顕微鏡技術学会、2014年5月23日~2014年5月25日、大阪大学(大阪府・吹田市)

坂口美亜子, SBF-SEM によるマラリア感染赤血球の三次元観察、日本顕微鏡学会、2014年5月11日~2014年5月13日、幕張メッセ(千葉県・千葉市)

坂口美亜子, Role of the C-terminal region of *Plasmodium falciparum* antigen 332 on the location in the parasite-infected red blood cell. Molecular Parasitology Meeting. 2012年9月22日~2012年9月26日、ウッズホール(アメリカ)

坂口美亜子, Localization of *Plasmodium falciparum* antigen 332, a gigantic protein expressed in the parasite-infected red blood cell. マトリョーシカ型生物学会、2012年7月20日~2012年7月22日、国立感染症研究所(東京都・新宿区)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂口 美亜子 (SAKAGUCHI, Miako)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：50400651

(2) 研究分担者

矢幡 一英 (YAHATA, Kazuhide)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：40467965

(3) 連携研究者

金子 修 (KANEKO, Osamu)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：50325370