

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 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：24590509

研究課題名(和文) マラリア原虫の赤血球侵入関連分子の時間・空間的動態解析

研究課題名(英文) Spatiotemporal localization of RBC invasion related proteins in malaria parasites

研究代表者

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

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)：マラリア原虫の赤血球侵入には、ワクチン開発・創薬標的でもある多数の原虫分子が関わるが、実際にどのようなタイミングで働くのか詳細に分かっていない。マラリア原虫の赤血球侵入関連分子が赤血球侵入時においてどのように機能しているのかを明らかにする。ローデントマラリア原虫は感染赤血球から放出された後、形態変化とマイクロネームタンパク質であるAMA1、EBLの局在変化を伴い赤血球に感染することを見出した。マラリア原虫から赤血球侵入能を有する赤血球侵入型原虫を単離精製する方法を確立し、マラリア原虫が赤血球に侵入する際に構築する、AMA1/RON2/4/5の密着複合体形成と局在部位を確認した。

研究成果の概要(英文)：In order to propagate within the mammalian host, malaria parasites must invade RBC. This process offers a window of opportunity targeting the parasites with drugs or vaccines. However, the dynamics of molecular interactions of parasite proteins with host cells remain largely unknown. We analyzed the invasion kinetics of *Plasmodium yoelii* by time-lapse imaging and found that the shape of *P. yoelii* merozoite changes from elongated oval to spherical body. During this period merozoites were able to attach to the RBC membrane, but were not able to invade. We proposed that this morphological change of *P. yoelii* merozoites is likely related to the secretion or activation of invasion-related proteins, and indeed we found that AMA1 and EBL were transferred from the apical to the surface of merozoites during this transition phase. We also developed a method to isolate viable invasive *P. yoelii* merozoites and confirmed PyAMA1/RON2/4/5 localization during RBC invasion and a complex formation.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア マラリア原虫 赤血球侵入 動態解析

1. 研究開始当初の背景

マラリア原虫はハマダラカの刺咬により、マラリア原虫がヒト体内に侵入して起こる疾患であり、肝臓を経て血液中で赤血球に感染し、赤内型発育を繰り返す。この過程においてマラリア原虫が新規赤血球に侵入することは必須のイベントであり、また赤血球侵入に関わる分子はワクチン候補と考えられていることから、赤血球侵入に関わる原虫分子の生物学的機能を明らかにすることは重要である。しかしながら、基本的研究とも言えるマラリア原虫の赤血球侵入時の動態に関する研究は少ない。赤血球侵入に関わる多数の原虫分子が赤血球侵入時にどのようなタイミングで機能しているのかを時空間的に明らかにすることが必要となっている。

2. 研究の目的

本研究はマラリア原虫の赤血球侵入時の3つのステージ(前侵入期、侵入期、エキノサイトーシス期)において、赤血球侵入に関わる原虫分子の挙動と活性化メカニズム、さらにはマラリア原虫が宿主である赤血球に感染する際に起こす現象を、マラリア原虫由来の抗体と蛍光イオンプローブを用い、タイムラプスライブイメージングと超解像度顕微鏡を駆使する事で明らかにし、ワクチン開発・創薬の基礎情報を集積する。

3. 研究の方法

赤血球侵入関連分子が赤血球侵入時の3つのステージ(前侵入期、侵入期、エキノサイトーシス期)においてどのように機能しているのかを明らかにする。(1)前侵入期において、熱帯熱マラリア原虫とローデントマラリア原虫のメロゾイト放出後に起こる形態変化と侵入関連分子の関連性を超解像度顕微鏡を用いて詳細に解析する。さらに赤血球侵入関連分子の侵入期における機能を確かめるため、(2)侵入期における赤血球侵入関連分子の特異抗体による阻害効果と阻害時期をタイムラプスライブイメージング解析する。また、マラリア原虫の赤血球侵入後に見られる、エキノサイトーシス期に起こる現象はこれまで研究されていないことから、(3)エキノサイトーシス期に見られる赤血球膜とマラリア原虫の形態変化をカルシウム蛍光プローブを用いてタイムラプスライブイメージング解析することで、エキノサイトーシス期に起こる分子メカニズム解明への足掛かりを探索する。

4. 研究成果

(1)熱帯熱マラリア原虫は感染赤血球から放出後、球状形態で数秒以内に赤血球に侵入・感染出来るが、ローデントマラリア原虫は感染赤血球から放出後、棒状から球状に形態変化を起こして赤血球に侵入することを見出した。この形態変化は侵入関連分子の機能活性化に繋がっていると考えられたこと

から、ローデントマラリア原虫が赤血球侵入関連分子の機能解析に有用であることを提唱した。このローデントマラリア原虫を用い、赤血球侵入関連オルガネラである、マイクロネームタンパク質のAMA1 および EBL は感染赤血球から放出された後に侵入型原虫の先端部から表面へ形態変化を伴いながら移行することを見出した。また、赤血球侵入に重要な密着複合体(RON 複合体)について、これまでに明らかになっていなかった RON5 の性状解析を行ない、赤血球侵入時に AMA1/RON2/4/5 で複合体を形成していることを見出した。

(2)抗体や薬剤による赤血球侵入阻害効果を効果的に検定するため、熱帯熱マラリア原虫とローデントマラリア原虫から赤血球侵入能を有したまま赤血球侵入型原虫を単離精製する方法を確立した。精製した赤血球侵入型原虫を用い、マラリア原虫が赤血球に侵入する際に構築する密着接合に関わる原虫分子として、AMA1/RON2/4/5 について局在解析することにより、赤血球侵入中における分子局在を明らかにした。また、赤血球侵入阻害実験として、マラリア原虫が赤血球侵入に必要なとする、AMA1-RON2 結合を阻害する R1 または RON2 ペプチドと赤血球侵入型原虫を感染実験したところ、ヒトとネズミマラリア原虫が種特異的に侵入阻害されることを確認した。

(3)カルシウムは侵入関連分子の活性化に関わっていると近年報告があったが、リアルタイムでの現象を捉えていなかったことから、メロゾイト放出期から侵入期、さらにエキノサイトーシス期のマラリア原虫と赤血球のカルシウム変動をタイムラプスイメージング解析した。Fluo4 染色した熱帯熱マラリア原虫を用いたところ、マラリア原虫が感染赤血球から放出される直前の数秒以内に原虫細胞内カルシウム濃度が瞬間的に上昇し、マラリア原虫は感染赤血球から放出されることを観察した。さらにマラリア原虫が赤血球に侵入する際に形成する密着接合面で局所的なカルシウムの集積が確認された。その後、赤血球膜の収縮が見られ、赤血球内カルシウムが密着接合面から拡散・上昇することを見出した。RON2-AMA1 複合体形成を阻害する R1 ペプチドを用いたところ、マラリア原虫が赤血球に密着接合した後に侵入阻害され、また密着接合面にはカルシウム集積は認められなかった。マラリア原虫にカルシウムキレーターを導入する事によりマラリア原虫の増殖阻害効果が見られていたが、マラリア原虫放出時のみならず、赤血球侵入時にもカルシウムシグナルが関与する事が示唆された。

[雑誌論文](計 5件)

1. Mutungi JK, Yahata K, Sakaguchi M,

- Kaneko O. Expression and localisation of rhoptry neck protein 5 in merozoites and sporozoites of *Plasmodium yoelii*. *Parasitology International*, 6 794-801, 2014 査読有
2. Sakura T, Yahata K, Kaneko O. The upstream sequence segment of the C-terminal cysteine-rich domain is required for microneme trafficking of *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen 175. *Parasitology International*, 62(2) 157-6, 2013 査読有
 3. Zhu X, Yahata K, Alexandre JS, Tsuboi T, Kaneko O. The N-terminal segment of *Plasmodium falciparum* SURFIN4.1 is required for its trafficking to the red blood cell cytosol through the endoplasmic reticulum. *Parasitology International*, 62(2) 215-29, 2013 査読有
 4. Yahata K, Treeck M, Culleton R, Gilberger TW, Kaneko O, Time-lapse imaging of red blood cell invasion by the rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii*. *PLoS ONE*, 7(12):e50780, 2012 査読有
 5. Asada M, Goto Y, Yahata K, Yokoyama N, Kawai S, Inoue N, Kaneko O, Kawazu S-I. Gliding motility of *Babesia bovis* merozoites visualized by time-lapse video microscopy. *PLoS ONE*, 7(4): e35227, 2012 査読有
- [学会発表](計 14件)
1. Kazuhide Yahata, Kishor Pandey, Pedro E. Ferreira, Osamu Kaneko. Calcium monitoring in *Plasmodium falciparum* through Yellow Cameleon-Nano Biosensors. 第 84 回日本寄生虫学会, 2015 年 03 月 21 日 ~ 2015 年 03 月 22 日, 杏林大学 (東京三鷹市)
 2. Mutungi JK, Yahata K, Sakaguchi M, Kaneko O. Isolation of viable and invasive *Plasmodium yoelii* merozoites. The 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity in Nara, 2014 年 09 月 23 日 ~ 2014 年 09 月 26 日, 奈良県新公会堂 (奈良市)
 3. Pandey K, Ferreira PE, Yahata K, Kaneko O. Distinct response of *Plasmodium falciparum* against inhibitors for sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. The 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity in Nara, 2014 年 09 月 23 日 ~ 2014 年 09 月 26 日, 奈良県新公会堂 (奈良市)
 4. Yahata K, Pandey K, Ferreira P, Kaneko O. Evaluation of Ca²⁺ Oscillation in *Plasmodium falciparum* through Yellow Cameleon-Nano Biosensors. 25th Annual Molecular Parasitology Meeting, 2014 年 09 月 14 日 ~ 2014 年 09 月 18 日, Woods Hole (USA).
 5. Mutungi JK, Yahata K, Sakaguchi M, Kaneko O. Characterization of PyRON5, a *Plasmodium yoelii* rhoptry neck protein. 25th Annual Molecular Parasitology Meeting, 2014 年 09 月 14 日 ~ 2014 年 09 月 18 日, Woods Hole (USA)
 6. 矢幡一英, Mutungi JK, 坪井敬文, 金子修. ネズミマラリア原虫 *Plasmodium yoelii* の AMA1 はメロゾイトの形態変化にともない放出される. 第 22 回分子寄生虫学ワークショップ/第 12 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会, 2014 年 08 月 31 日 ~ 2014 年 09 月 03 日, 帯広畜産大学 (北海道帯広市)
 7. Kishor Pandey, Pedro E. Ferreira, Osamu Kaneko, Kazuhide Yahata. Calcium signaling in the malaria parasites for the drug development. 13th International Congress of Parasitology, 2014 年 08 月 10 日 ~ 2014 年 08 月 15 日, Mexico city (Mexico)
 8. 矢幡一英, Joe Kimanthi Mutungi, 坪井敬文, 金子修. ネズミマラリア原虫 *Plasmodium yoelii* の AMA1 はメロゾイトの形態変化にともない放出される. 第 83 回日本寄生虫学会, 2014 年 03 月 27 日 ~ 2014 年 03 月 28 日, 愛媛大学城北キャンパス (松山市)
 9. Kazuhide Yahata. Imaging of malaria parasite 's behavior in the red blood cell. The 17th SANKEN International Symposium 2014 (招待講演), 2014 年 01 月 21 日 ~ 2014 年 01 月 22 日, 大阪大学吹田キャンパス (吹田市)
 10. Kazuhide Yahata, Mutungi Joe Kimanthi, Takafumi Tsuboi, Osamu Kaneko. Different timing of the AMA1 secretion between *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium yoelii*. 第 11 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム, 2013 年 10 月 02 日 ~ 2013 年 10 月 03 日, 長崎大学坂本キャンパス内ポンペ会館 (長崎市)
 11. Kazuhide Yahata, Mutungi Joe Kimanthi, Takafumi Tsuboi, Osamu Kaneko. Different timing of the AMA1 secretion between *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium yoelii*. 24th Annual Molecular Parasitology Meeting, 2013 年 09 月 08 日 ~ 2013 年 09 月 12 日, MBL, Marine Biological Laboratory (アメリカ)
 12. 矢幡一英, Mutungi Joe Kimanthi, 坪井敬文, 金子修. 赤血球侵入時におけるマ

ラリア原虫タンパク質の時間空間的な局在. 国際シンポジウム&第2回マトリョーシカ型生物学研究会, 2013年07月24日~2013年07月26日, 京都ガーデンパレス(京都市)

13. Yahata K, Kaneko O. Time-lapse imaging of red blood cell invasion by rodent malaria parasites. The 6th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases and The 11th Nagasaki-Singapore Medical Symposium 2012年12月10日~2012年12月12日 長崎大学(長崎県)
14. 矢幡一英. 分子イメージングを用いたマラリア原虫による赤血球感染現象の解明. 第20回分子寄生虫学ワークショップ, 2012年08月26日~2012年08月28日, 神戸市立神戸セミナーハウス(兵庫県)

〔図書〕(計 1件)

1. 矢幡一英, 坂口美亜子, 金子修. 「細胞進化の証人たち:細胞進化モデル生物図鑑 第8回 細胞に入って改造して連絡するシェイプチェンジャーたちの物語 宿主細胞支配モデル:マラリア原虫など」細胞工学. 学研メディカル秀潤社, 692(670-672), 2014

〔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

<http://www.tm.nagasaki-u.ac.jp/protozoology/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

矢幡 一英 (YAHATA, Kazuhide)
長崎大学・熱帯医学研究所・助教
研究者番号: 0467965

(2)研究分担者
なし

(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