

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293102

研究課題名(和文) マラリア原虫の赤血球侵入時におけるシグナル伝達経路の解明

研究課題名(英文) Signal transduction during erythrocyte invasion by malaria parasites

研究代表者

金子 修 (KANEKO, Osamu)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：50325370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：マラリア原虫は細胞内小器官から種々の分子を秩序だてて分泌しながら赤血球に侵入するが、そのシグナル伝達経路は不明な点が多いため、ネズミマラリア原虫 *Plasmodium yoelii* にて誘導性遺伝子ノックダウン/アウト系を確立し、このシグナル伝達経路を明らかにすることを目的とした。その結果、原虫増殖に必須ではない遺伝子では誘導性遺伝子ノックダウン/アウト系が作動したが、増殖必須分子では作動しなかった。そのため、網羅的な原虫分子機能評価の前に、本系の最適化を進めた。また、赤血球侵入活性を保持した原虫の精製法および細胞内Ca²⁺濃度モニター系を確立し、赤血球侵入時の表現型を解析する基盤を整えた。

研究成果の概要(英文)：Malaria parasites invade into erythrocytes using molecules sequentially released from their apical microorganelles. However, the details of the signal transduction during erythrocyte invasion by the parasites is largely unknown. In this study, we tried to adapt the conditional knock-down/knock-out systems to the rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii* aiming to apply the developed systems to answer above question. We were able to inducibly delete the gene loci for an exogenous mCherry or a non-essential protein in the transgenic *P. yoelii*, however, the gene locus of the essential molecule was not deleted by the induction. Thus we continued to optimize this systems in *P. yoelii*. In addition to this effort, we established a platform to examine parasite phenotypes during erythrocyte invasion by developing a method to isolate erythrocyte-invasive *P. yoelii* merozoites and a robust method to monitor the intracellular Ca²⁺ level of the malaria parasites.

研究分野：医歯薬学

キーワード：原虫 マラリア 侵入 シグナル伝達 赤血球

1. 研究開始当初の背景

マラリアは世界中で年間2～3億人の感染者、150万人の死者を出す重大な感染症である。マラリア原虫はヒト体内では赤血球で発育増殖してこれを破壊することで病害を与えるが、マラリア原虫の感染成立には、赤血球への侵入が必須であるため、原虫の赤血球侵入関連分子はワクチンや薬剤開発の標的と考えられる。ところが、長年の研究にもかかわらず、マラリアのワクチン開発の顕著な成果はいまだに出ておらず、有効な予防方法を開発するためには、マラリア原虫が赤血球に侵入する際の種々の抗原候補分子の役割や細胞侵入の分子機序を理解し、それをもととした機能阻害の方法を考える事が重要であると考えられるようになってきた。

研究代表者は上述した観点から、赤血球侵入型のメロゾイト期に発現する赤血球侵入関連分子群の解析を行ってきた。赤血球侵入にはメロゾイトの先端部分分泌器官マイクロネームやロプトリーから分泌される種々のタンパク質が重要な役割を果たすが、研究代表者はマイクロネームから放出され、密着接合形成に関係するとされてきた Erythrocyte-binding like (EBL)分子の熱帯熱マラリア原虫での相同体 BAEBL, JESEBL を同定し (Mayer et al. 2001; Mayer et al. 2004)、ネズミマラリア原虫 *Plasmodium yoelii* において EBL の一アミノ酸置換により、EBL の細胞内局在と病原性が変化する事も見出した (Otsuki et al. 2009)。ロプトリー体部から放出される RhopH 複合体については、その構成成分をコードする遺伝子群を同定し、エピジェネティックに発現が調整されていることを明らかにした (Kaneko et al. 2001; Ling et al. 2004; Kaneko et al. 2005; Cortés et al. 2007)。また、赤血球内に放出され、ワクチン候補抗原の AMA1 との間で複合体を形成する分子として、ロプトリー頸部タンパク質 RON2 を同定した (Cao et al. 2009)。さらに、これらの分子が赤血球侵入中のどのステップで放出され、どのように局在を変えるのかを光学的に明らかにするため、マラリア原虫の赤血球侵入のタイムラプス解析の系を確立し、*P. yoelii* は感染赤血球から放出後、形態を変えないと次の赤血球に侵入できない事を見出し、この間に、侵入に必要な分子が活性化されている可能性を提唱した (図1) (Yahata et al. 2012)。

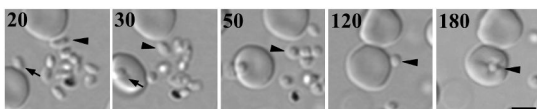


図1 *P. yoelii* は細長い形から丸い形に形態を変えて180秒後には赤血球に侵入できる(矢頭)。30秒後では侵入できない(矢)。

一方、遺伝子座破壊は分子の機能解析にとって重要な手法であるが、マラリア原虫では遺伝子座破壊を赤血球期ステージで行うため、

赤血球期で必須の遺伝子座を破壊する事が出来ない。RNAiによるノックダウン手法も、マラリア原虫には遺伝子サイレンシング機構が存在しないため利用できない。ところが、2011年にネズミマラリア原虫 *P. berghei* 用に実用性に足る Tet 発現誘導用プラスミドがついに開発された(当時、論文未発表)。このことは、代表者が種々の分析ツールを準備してきたネズミマラリア原虫 *P. yoelii* に本 Tet 発現誘導系を適用し、種々の分泌分子の放出の有無や、細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化をモニターすることで、従来不可能であった、これらの現象を引き起こす上流のシグナル伝達経路を担う原虫の生存に必須の分子群を同定する事が出来る準備が整ったことを意味した。

2. 研究の目的

本研究では、株により多様な表現型があり、かつ、遺伝子座破壊を速やかに行うことができるネズミマラリア原虫 *P. yoelii* を対象に、新規コンディショナル・ノックダウン/アウト系を確立し、赤血球侵入期に発現している原虫分子をノックダウン/アウトできる組換え体を網羅的に作製し、細胞内小器官からの分子分泌や Ca^{2+} 濃度の変化等を指標に、各細胞内小器官の分泌調節機序のシグナル伝達経路を明らかにすることで、ワクチンや薬剤開発の標的を見出す事を目的とした。

3. 研究の方法

【*P. yoelii* への Tet 発現誘導系の移入と確立】

Tet 発現誘導ノックダウン系をネズミマラリア原虫 *P. yoelii* に移入するため、Proof-of-concept 実験として、必須であると考えられる赤血球認識リガンド *ebl* の遺伝子座と必須でないことが分かっている *msh8* の遺伝子座を使用する。tetR と tetO による発現誘導用カセットを *ebl* および *msh8* 遺伝子座の上流に挿入した遺伝子組換え *P. yoelii* を作製した。組換え原虫のマウス内での原虫感染率と標的分子の発現量を検討した。

【Cre/loxP 部位特異的組換えとの組み合わせによる遺伝子座完全除去系の作製】

Tet 発現誘導系では完全に転写を抑制することが困難である事が知られている。そのため、Cre/loxP 部位特異的組換え法により標的遺伝子座をゲノムから完全に除去する方法と組み合わせ、標的タンパク質を全く発現しない原虫を作製する手法の開発を進めた。まず、ATc 投与により Cre の発現を調節できる遺伝子座破壊原虫を作製した。この際、薬剤選択マーカーカセットは hDHFR と yFCU を融合タンパク質として発現するものを使用し、negative selection マーカーの yFCU に対して 5FC を投与することで、薬剤選択マーカーカセットを除去した。

その上で、標的遺伝子の読み枠を loxP 配列

で囲み、Cre により loxP 配列の間に挟まれた標的遺伝子が除去されると、緑色蛍光タンパク質 (GFP) が発現し、遺伝子座が除去された原虫が蛍光により識別できるプラスミドを構築した (図 2)。*eb1* と *msp8* を標的遺伝子座とした。標的分子のプロモーター領域、3'非翻訳領域 (3' UTR) 1 kb と読み枠を PCR 増幅し、遺伝子座完全除去用プラスミドを構築した。Cre 発現組換え原虫に、プラスミドを遺伝子導入し、ピリメサミンにて組換え原虫を選択、クローン化した。組換え原虫のマウス内での原虫感染率と標的分子の発現量を検討した。また、間接蛍光抗体法にて標的遺伝子座が除去された原虫の割合を、ライブイメージにて蛍光が検出される事を確認した。

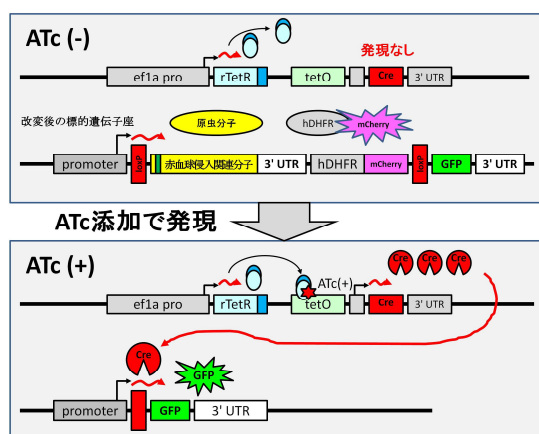


図 2 . 無水テトラサイクリン (ATc) 投与により、遺伝子座が破壊される原虫を作製するためのデザイン。

【*P. yoelii* の赤血球侵入に関連する標的遺伝子座の選択】

熱帯熱マラリア原虫において、メロゾイトが感染赤血球から放出される前後で高い転写がみられる一群の分子について *P. yoelii* 相同体をリスト化し、必須分子および必須かどうか不明の分子を分類した。分類をもとに、解析を行う分子群の順序立てを行った。

【*P. yoelii* メロゾイトの精製法の最適化】

マウスより回収した *P. yoelii* 感染赤血球から、密度勾配遠心法により分裂体期を分離し、その後、フィルター膜を通過させることによりメロゾイトを精製した。精製したメロゾイトを非感染赤血球と混ぜ、新規赤血球への侵入効率を計測することで、温度や混ぜるまでの時間が赤血球侵入能力に及ぼす影響を検討した。また、電子顕微鏡により、侵入時の形態観察ができるかどうかを検討した。*P. yoelii* の赤血球侵入における AMA1-RON2 複合体の結合部位に相当するペプチドを作製し、侵入阻害活性を検討した。

【マラリア原虫の細胞内カルシウム濃度の計測法の確立】

Ca^{2+} バイオセンサー YC-Nano50 を発現する組換え熱帯熱マラリア原虫を用いて、顕微鏡観察下での YC-Nano50 蛍光シグナルの減退

を最低限にする条件を検討した。

4 . 研究成果

【*P. yoelii* におけるコンディショナル・ノックアウト法の開発】

まず、相同組換え法により標的遺伝子座をゲノムから完全に除去する方法と組み合わせ、標的タンパク質を全く発現しない原虫を作製する手法 (コンディショナル・ノックアウト) の開発を推進した。共同研究者より入手した *P. berghei* で成功している Tet 誘導による発現ノックダウン系 (Tet-OFF) を *P. yoelii* に適用するために、まず、栄養体期に発現し、原虫生存に必須ではない *msp8* 遺伝子の発現を抑制するようにプラスミドをデザインし、組換え *P. yoelii* を作製したが、ATc 投与により *msp8* の発現量に変化が見られなかった。また、メロゾイト期に発現し、原虫生存に必須である *eb1* の発現を抑制するようにデザインした組換え *P. yoelii* の作製も試みたが、組換え原虫が得られなかった。そのため、*P. berghei* にて Tet-OFF ができたと報告された *prf* 遺伝子を標的に、完全に相同なゲノム位置を標的として、使用されたのと同等のプラスミドを *P. yoelii* 用に構築し組換え *P. yoelii* を作製したが、ATc 投与により *prf* の発現量にも変化が見られなかった。そのため、実験コントロールとして、Tet 発現誘導系により *prf* 遺伝子の遺伝子発現が抑制される遺伝子組換え *P. berghei* を入手したが、先行実験の結果が再現できなかった。

一方、同時に入手した Tet 発現誘導系により mCherry 遺伝子の遺伝子発現が抑制される遺伝子組換え *P. berghei* については、Tet-OFF の作動が再現できたため、手技が問題ではないことが明らかとなった。そこで、誘導性に mCherry が発現される組換え *P. berghei* の作製に使用されたプラスミドを基にして、新たにプラスミドを作製し、ATc 投与にて mCherry 発現が抑制されるデザインの遺伝子組換え *P. yoelii* を作製したところ、Tet-OFF が作動することが確認できた。続いて Tet-OFF を Tet-ON に改変し、ATc 投与にて mCherry が発現されるデザインの遺伝子組換え *P. yoelii* を作製し、Tet 発現誘導系 (Tet-ON) の系も作動することを確認した。

さらに、作製した Tet-ON の系により部位特異的組換え酵素を発現する遺伝子組換え *P. yoelii* を作出し (図 2 参照)、これを基として、*msp8* および *eb1* 遺伝子座の発現が調整できるデザインの組換え原虫を作製した。原虫生存に必須ではない *msp8* 遺伝子座についてはテトラサイクリン投与により、ほとんどの原虫で mCherry シグナルから GFP シグナルに発現が変化したため、部位特異的組換え酵素により標的遺伝子座で組換えが起き、*msp8* 遺伝子座が喪失したことが確認できた (図 3)。一方、原虫生存に必須である *eb1* 遺伝子座については、ATc 投与を行っても標的遺

伝子座の喪失がみられず、より詳細な検討が必要であることが判明した(麻田ら、第85回日本寄生虫学会大会にて口頭発表、2016年3月19-20日)。

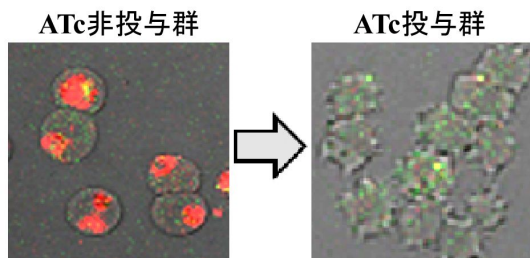


図3. 無水テトラサイクリン(ATc)投与により、遺伝子座が破壊されmCherryシグナルからGFPシグナルを発するように変化した遺伝子組換え *P. yoelii*。

また、Tet-OFFによる遺伝子発現制御についても、発現制御は見られたものの効率が悪いため、プラスミドの塩基配列を再確認した。その結果、Tet発現誘導に重要な役割を果たしている領域が予想とは異なっていることを見出したため、この点を検討する組換え原虫を作製した(外川ら、第85回日本寄生虫学会大会にて口頭発表、2016年3月19-20日)。

上記の調整と同時進行で、熱帯熱マラリア原虫の赤血球侵入期における網羅的転写解析により赤血球侵入期に発現する事が分かっている分子の *P. yoelii* 相同体をリスト化し、シグナル伝達に關与すると考えられる分子群を標的とするノックダウン/アウト用プラスミドの作製を開始した。

【赤血球侵入活性を保持した *P. yoelii* メロゾイトの精製法の確立】

赤血球に侵入する能力を保持した *P. yoelii* のメロゾイトを精製する方法を確立し、電子顕微鏡レベルで、侵入過程を観察することができた。ネズミマラリア原虫においても熱帯熱マラリア原虫と同様に、AMA1-RON2複合体の形成を阻害することで侵入が阻害されることを示した。また、15°Cでメロゾイトを保持することで、赤血球侵入活性を4時間にわたり精製直後の50%以上の活性で維持できることを見出した。この発見により精製したメロゾイトを長時間にわたり操作することが可能となった(Mutung et al. 2015)。

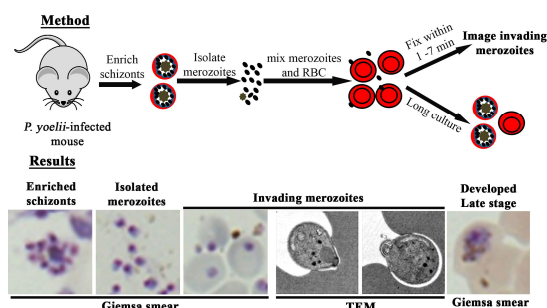


図3. 赤血球への侵入能力を保持したネズミマラリア原虫 *P. yoelii* メロゾイトの精製法の確立。

さらに、Ca²⁺バイオセンサーYC-Nanoを発現する遺伝子改変マラリア原虫を用いて、細胞内Ca²⁺濃度を経時的にモニターする検出系も確立した(Pandey et al. 2016)。

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4件)

- (1) Pandey K, Ferreira PE, Ishikawa T, Nagai T, Kaneko O, Yahata K. Ca²⁺ monitoring in *Plasmodium falciparum* using the yellow cameleon-Nano biosensor. *Sci Rep* 6:23454 (2016) doi: 10.1038/srep23454. 査読有
- (2) Mutungi JK, Yahata K, Sakaguchi M, Kaneko O. Isolation of invasive *Plasmodium yoelii* merozoites with a long half-life to evaluate invasion dynamics and potential invasion inhibitors. *Mol Biochem Parasitol* 204(1):26-33 (2015) doi: 10.1016/j.molbiopara.2015.12.003. 査読有
- (3) Kagaya W, Miyazaki S, Yahata K, Ohta N, Kaneko O. The cytoplasmic region of *Plasmodium falciparum* SURFIN_{4.2} is required for transport from Maurer's clefts to the red blood cell surface. *Trop Med Health* 43(4):265-272 (2015) doi: 10.2149/tmh.2015-38. 査読有
- (4) Mutungi JK, Yahata K, Sakaguchi M, Kaneko O. Expression and localisation of rhoptry neck protein 5 in merozoites and sporozoites of *Plasmodium yoelii*. *Parasitol Int* 63(6):794-801 (2014) doi: 10.1016/j.parint.2014.07.013. 査読有

〔学会発表〕(計20件)

- (1) 加賀谷涉、宮崎真也、矢幡一英、太田伸生、金子修 熱帯熱マラリア原虫 SURFIN_{4.2}の細胞内領域はマウレル裂から赤血球表面への輸送に必要である 第85回日本寄生虫学会大会 宮崎市民プラザ(宮崎県宮崎市) (2016 Mar 19-20)
- (2) 大槻均、菅井千明、近藤陽子、入子英幸、石野智子、金子修、坪井敬文、鳥居本美 ネズミマラリア原虫赤血球侵入リガンド EBL 領域4の機能解析 第85回日本寄生虫学会大会 宮崎市民プラザ(宮崎県宮崎市) (2016 Mar 19-20)
- (3) 麻田正仁、外川裕人、矢幡一英、金子修 ネズミマラリア原虫における Tet-On による遺伝子コンディショナルノックアウト法の開発 第85回日本寄生虫学会大会 宮崎市民プラザ(宮崎県宮崎市) (2016 Mar 19-20)
- (4) 外川裕人、麻田正仁、矢幡一英、金子修

- Plasmodium yoelii* 遺伝子を標的としたテトラサイクリン発現誘導システムの確立 第85回日本寄生虫学会大会 宮崎市民プラザ (宮崎県宮崎市) (2016 Mar 19-20)
- (5) Mutungi JK, Yahata K, Sakaguchi M, Kaneko O. Isolation method of invasive *Plasmodium yoelii* merozoites with a long half-life to evaluate erythrocyte invasion dynamics and potential invasion inhibitors. *Molecular Approach to Malaria 2016*. Lorne, Austraria (2016 Feb 21-25)
- (6) Yahata K, Pandey K, Ferreira PE, Ishikawa T, Kaneko O. Ca²⁺ monitoring in *Plasmodium falciparum* using the yellow cameleon-Nano biosensor. *Molecular Approach to Malaria 2016*. Lorne, Austraria (2016 Feb 21-25)
- (7) Pandey K, Ferreira PE, Ishikawa T, Kaneko O, Yahata K. Ca²⁺ monitoring in *Plasmodium falciparum* using the yellow cameleon-Nano biosensor. *U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program (USJCMSP)*. Bethesda, USA (2016 Jan 13-14) (招待)
- (8) 加賀谷渉、宮崎真也、矢幡一英、太田伸生、金子修 熱帯熱マラリア原虫 SURFIN_{4.2} のトリプトファン豊富領域はマウレル裂から赤血球表面への輸送に必要である 第56回日本熱帯医学会大会 大阪大学コンベンションセンター (大阪府吹田市) (2015 Dec 4-6)
- (9) Mutungi JK, Yahata K, Sakaguchi M, Kaneko O. Isolation method of invasive *Plasmodium yoelii* merozoites with a long half-life to evaluate erythrocyte invasion dynamics and potential invasion inhibitors. *2nd International Symposium & 4th Annual Research Meeting on Matryoshka-Type Evolution of Eukaryotic Cells*. University Hall of University of Tsukuba (Tsukuba, Ibaraki, Japan) (2015 Sep 30-Oct 2)
- (10) Yahata K, Pandey K, Ferreira PE, Ishikawa T, Kaneko O. Ca²⁺ monitoring in *Plasmodium falciparum* cytosol through yellow cameleon-Nano biosensors. *Protein island Matsuyama International Symposium*. Matsuyama Municipal Gender Equality Center (Matsuyama, Ehime, Japan) (2015 Sep 24-25)
- (11) Yahata K, Pandey K, Ferreira PE, Ishikawa T, Kaneko O. Calcium monitoring in *Plasmodium falciparum* through Yellow Cameleon-Nano Biosensors. *The 14th Awaji International Forum on Infection and Immunity*. Awaji Yumebutai International Conference Center (Awaji, Hyogo, Japan) (2015 Sep 8-11)
- (12) Asada M, Kegawa Y, Yahata K, Kaneko O. Development of Tet-On-based conditional gene knockout system for rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii*. 第4回感染症若手フォーラム アテナ海月 (兵庫県淡路市) (2015 Sep 6-8)
- (13) 加賀谷渉、宮崎真也、矢幡一英、太田伸生、金子修 熱帯熱マラリア原虫 SURFIN_{4.2} のマウレル裂から赤血球表面への輸送機構 第23回分子寄生虫学ワークショップ/第13回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 帯広畜産大学原虫病研究センター (北海道帯広市) (2015 Aug 30-Sep 2)
- (14) 外川裕人、麻田正仁、矢幡一英、金子修 *Plasmodium yoelii* 赤血球内侵入型原虫を標的としたテトラサイクリン発現誘導システムの確立 第23回分子寄生虫学ワークショップ/第13回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 帯広畜産大学原虫病研究センター (北海道帯広市) (2015 Aug 30-Sep 2)
- (15) Kaneko O. Evaluation of Ca²⁺ Oscillation in *Plasmodium falciparum* through Yellow Cameleon-Nano Biosensors. *The 12th NUS-Nagasaki Joint Symposium* Singapore, Singapore (2015 Jun 11-12) (招待)
- (16) 大槻均、菅井千明、入子英幸、石野智子、金子修、福本宗嗣、坪井敬文、鳥居本美ネズミマラリア原虫赤血球侵入リガンド EBL 領域 3-5 の機能解析 第84回日本寄生虫学会大会 杏林大学三鷹キャンパス (東京都三鷹市) (2015 Mar 21-22)
- (17) Mutungi JK, Yahata K, Sakaguchi M, Kaneko O. Isolation of viable and invasive *Plasmodium yoelii* merozoite. *The 13rd Awaji International Forum on Infection and Immunity*. Nara Prefectural New Public Hall (Nara, Nara, Japan) (2014 Sep 23-26)
- (18) Mutungi JK, Yahata K, Sakaguchi M, Kaneko O. Characterization of PyRON5, a *Plasmodium yoelii* rhoptry neck protein. *25th Annual Molecular Parasitology Meeting*. Woods Hole, USA (2014 Sep 14-18)
- (19) 金子修 マラリア原虫による赤血球侵入と改変 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 帯広畜産大学原虫病研究センター (北海道帯広市) (2014 Aug 31-Sep 3)
- (20) 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 帯広畜産大学原虫病研究センター (北海道帯広市) (2014 Aug 31-Sep 3)

(1) 研究代表者

金子 修 (KANEKO, Osamu)
長崎大学・熱帯医学研究所・教授
研究者番号：50325370

(2) 連携研究者

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) 研究協力者

麻田 正仁 (ASADA, Masahito)
長崎大学・熱帯医学研究所・助教