

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450430

研究課題名(和文) オーシスト形成機構の解明：マラリア征圧に向けた新戦略構築の基盤

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of Oocyst formation: construction of newly strategy for malaria prevention

研究代表者

篠井 宏実 (Ikadai, Hiromi)

北里大学・獣医学部・准教授

研究者番号：80327460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：Plasmodium bergheiを用いてマラリア原虫に保存されてる9種の新規オーシスト形成初期発現蛋白質(5種のオーシスト壁構成蛋白質、4種のオーキネート発現蛋白質を明らかにした。さらに、2種のオーシスト壁構成蛋白質(PbCap 93, PbCap494)欠損原虫を作出し、これら蛋白質はオーシスト形成に重要な因子であることを明らかにした。以上より、これらオーシスト壁構成蛋白質は今後のマラリアコントロールおよび新征圧戦略構築に向けたターゲットとなりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Using a combination of genetic analysis and functional studies in the rodent malaria model Plasmodium berghei, we identified five oocyst capsule proteins (PbCaps) and four ookinete expression proteins of conserved Plasmodium proteins. Moreover, we report on the characterization of two PbCaps (PbCap 93 and 494). Genetic analysis indicates that the gene is essential and that two PbCaps(-) mutant parasites form oocysts in decreased numbers. Targeting of the oocyst capsule may provide a new strategy for malaria control.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア原虫 オーシスト 遺伝子欠損

1. 研究開始当初の背景

マラリアは蚊によって媒介され、年間約 200 万人の人が死亡する世界で最も重要な感染症の一つである。マラリア征圧に向けた戦略として：抗原虫薬開発、抗原虫ワクチン開発、媒介蚊の撲滅もしくは数的コントロールなど、様々な対策が講じられてきた。しかしながら、薬剤耐性原虫株や殺虫剤耐性媒介蚊が出現するなど、現在もその予防法や治療法は確立されていない。

そこで、新征圧戦略構築を基盤としたワクチンおよび新規抗原虫薬開発には、マラリア原虫の新たな生物学的特徴を分子レベルで明らかにする事が必要不可欠である。

本研究は、生活環の特徴である媒介蚊体内のステージにおいて、未だ生物学的特徴が分子レベルで理解されていないオーシスト形成期をターゲットとして提案し、征圧のための分子基盤確立を最終目標とした。

2. 研究の目的

オーシスト形成機構解明のため、まずオーシスト壁構成蛋白質を明らかにする事により解析ツールを確保し、媒介蚊体内のマラリア原虫最大の特徴であり、且つ、分子レベルで生物学的特徴を未だ明らかにされていないオーシスト形成機構の分子レベルでの解明を本研究の目的とした。加えて、将来オーシスト期をターゲットとした新マラリア征圧戦略構築の可能性を見据えた、オーシスト形成期に対する抗原虫薬探索法および形成抑制ワクチン抗原スクリーニング法への応用検討も試みた。

3. 研究の方法

(1) オーシスト壁構成蛋白質の探索

in silico 解析

抗血清作製および抗体精製

候補蛋白質の局在決定および経時的発現動態解析

候補蛋白質の mRNA 発現解析

(2) オーシスト壁構成蛋白質および機能解析

KO 原虫の作製および比較解析

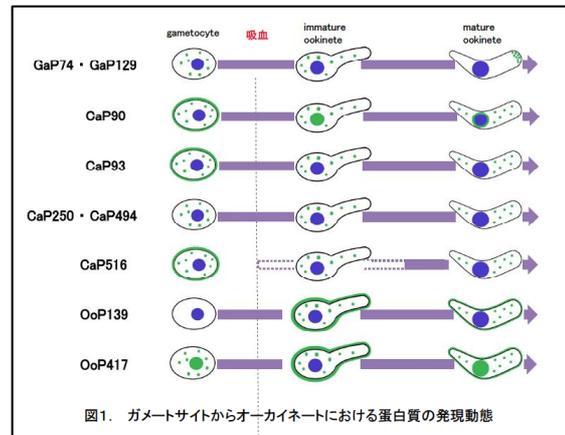
in vitro 培養法による評価法の構築

4. 研究成果

(1) 5 種のオーシスト壁構成蛋白質、4 種のオーキネート発現蛋白質を同定

申請者はこれまでの研究で、5 種のオーシスト壁構成蛋白質、4 種のオーキネート発現蛋白質を見出した。さらに調べると、オーシスト壁構成蛋白質はオーキネートからすでに細胞質や細胞膜に発現している事が確認された。また、

オーキネート発現蛋白質は、虫体先端・両端・細胞辺縁など局在が異なっていた。このような興味深い発現動態を持つ 9 種蛋白質を見出した(図 1)。



(2) KO 原虫の作製

明らかにされた 2 種のオーシスト壁構成蛋白質の遺伝子 PbCap93 と PbCap494 について遺伝子欠損 (KO) 原虫を作製した。得られた 2 つの KO 原虫について野生型 (WT) 原虫と比較検討した結果を以下に述べる。

PbCap93

Plasmodium berghei のオーシスト壁構成タンパク質 PbCap93 (図 2-a) について詳細な評価を行うために、以下の実験を行った。まず PbCap93 がオーシスト壁形成に必須であるかを評価するために、当該遺伝子の ORF にピリメタミン耐性の DHFR 遺伝子を挿入し、遺伝子欠損ネズミマラリア原虫 (KO 原虫) を作製した (図 2-b)。

KO 原虫と野生型 (WT) 原虫のマウス体内における赤血球内増殖率を比較したところ、両者の増殖率には差は見られなかった (図 2-c)。さらにギムザ染色を用いた各ステージの形態、感染赤血球率 10 ~ 15% における雌雄ガメトサイト比 (図 2-d)、ガメト誘導後のエクスフラジレーション数も KO 原虫および WT 原虫において差は見られなかった。

次に、媒介蚊を用いたオーシスト壁形成試験を行なった。具体的には、KO 原虫をマウスに感染させ、パラシテミア上昇を確認した後に媒介蚊による吸血を行った。吸血後 14 ~ 15 日後の蚊を解剖し、中腸内のオーシスト数を KO 原虫と WT 原虫で比較したところ、WT 原虫に比べて KO 原虫でのオーシスト形成数は有意に少なく (図 2-e)、大きさも小型の傾向があった (図 2-f)。電子顕微鏡による観察では、オーシスト壁の電子密度の上昇とスポロゾイトの分化不全がみられた。

以上より、PbCap93 遺伝子は赤内型原虫の増殖及び形態には影響せず、蚊体内におけるマラリア原虫のオーシスト形成に重要な役割を担っていると推測された。

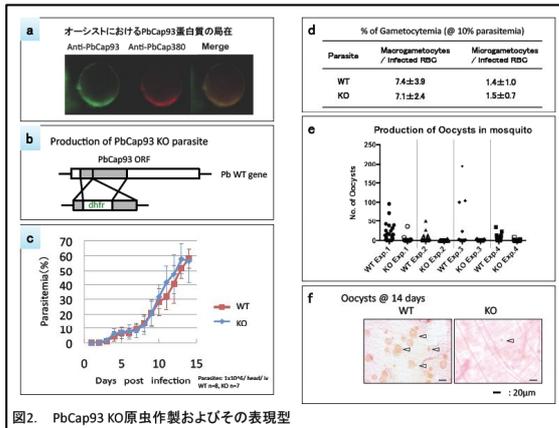


図2. PbCap93 KO原虫作製およびその表現型

PbCap494

P. berghei のオーシスト壁構成タンパク質 PbCap494 (図 3-a) について詳細な評価を行うために、以下の実験を行った。まず PbCap494 がオーシスト壁形成に必須であるかを評価するために、当該遺伝子の ORF にピリメタミン耐性の DHFR 遺伝子を挿入し、KO 原虫を作製した (図 3-b)。

KO 原虫と WT 原虫のマウス体内における赤血球内増殖率を比較したところ、両者の増殖率には差は見られなかった (図 3-c)。さらにギムザ染色を用いた各ステージの形態、感染赤血球率約 10% における雌雄ガメトサイト比 (図 3-d)、ガメト誘導後のエクスフラジレーション数、オーカイネート形成数および大きさも KO 原虫および WT 原虫において差は見られなかった。

次に、媒介蚊を用いたオーシスト壁形成試験を行なった。具体的には、KO 原虫をマウスに感染させ、パラシテミア上昇を確認した後に媒介蚊による吸血を行った。吸血後 13~14 日後の蚊を解剖し、中腸内のオーシスト数を KO 原虫と WT 原虫で比較したところ、WT 原虫に比べて KO 原虫でのオーシスト形成数は有意に少なく (図 3-e)、大きさも小型の傾向があった (図 3-f)。さらに、吸血 25 日目のスポロゾイトの感染能をみた所、WT 原虫と KO 原虫どちらも新たに吸血されたマウスにおいて 4 日目で原虫が観察された。

以上より、PbCap494 遺伝子は赤内型原虫の増殖及び形態には影響せず、蚊体内におけるマラリア原虫のオーシスト壁初期形成に重要な役割を担っているが、スポロゾイトの成熟には関与しないことが推測された。

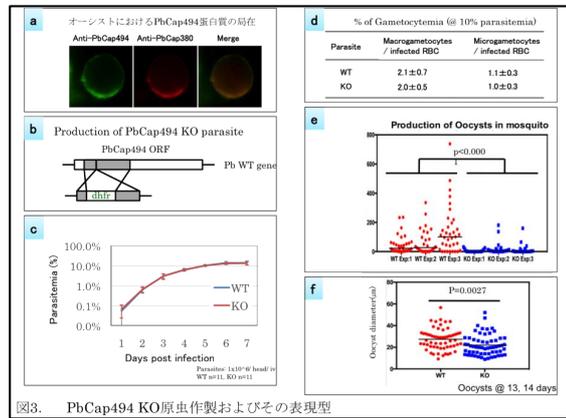


図3. PbCap494 KO原虫作製およびその表現型

(3) in vitro 培養法による評価法の構築

in vivo 試験においてオーシスト形成抑制効果を示したことから、in vitro でのオーシスト形成抑制評価法の構築のために、新たにオーシストの in vitro 培養法も試みた。具体的には、GFP 発現マラリア原虫を感染させたマウスから採血を行い、オーカイネート分化培養液にて 24-36 時間培養し、MACS のマグネットカラムを通しオーカイネートの精製を行った (図 4-a)。その後、精製オーカイネートとショウジョウバエ胚由来の S2 細胞をオーシスト分化培養液で共培養を行った。共培養開始 2 日後には GFP 発現オーカイネートが S2 細胞外に確認され、共培養開始 3 日後には GFP 発現オーカイネートが S2 細胞内に確認されるものもあった (図 4-b)。培養 10 日目と 15 日目において、オーシストは直径 $5.8 \pm 0.8 \mu\text{m}$ から $7.0 \pm 1.6 \mu\text{m}$ へと次第に大きくなり、オーシスト内にヘモゾインが観察されるなど、成熟オーシストの培養が可能となった (図 4-c)。オーシスト形成率 (オーシスト / S2 細胞数) は MOI 0.1 (オーカイネート / S2 細胞数) の場合、5 日目で 0.85%、15 日目で 0.36% であった。このことから、オーカイネートの細胞侵入およびオーシスト形成初期および 15 日までの形成期に関するワクチン評価に応用可能と考えられた。

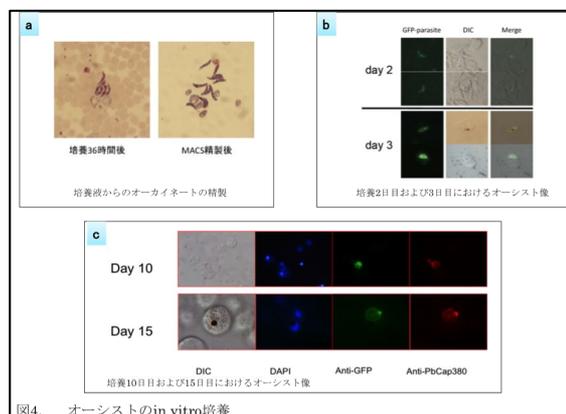


図4. オーシストの in vitro 培養

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)

〔学会発表〕(計2件)

山下裕之、森 貴久、関口晴巳、菅野里子、
佐々木英恵、筏井宏実
Plasmodium berghei PbCap90 および PbCap93
蛋白質は初期のオーシスト形成に重要である
BMB2015(兵庫県・神戸ポートアイランド)
2015年12月3日

武末真鷹、関口晴巳、菅野里子、佐々木
英恵、筏井宏実
マラリア原虫のオーシスト期における特異
的発現蛋白質の探索および遺伝子欠損原虫
作製の試み
第157回日本獣医学会学術集会(北海道・北海
道大学)
2014年9月9日

〔その他〕
ホームページ等
<http://www2.vmas.kitasato-u.ac.jp/parasitology/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

筏井 宏実 (IKADAI HIROMI)
北里大学・獣医学部・准教授
研究者番号：80327460