

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860309

研究課題名(和文) 熱帯熱マラリア原虫のヘモグロビン輸送機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of hemoglobin transport in Plasmodium falciparum

研究代表者

入子 英幸 (IRIKO, HIDEYUKI)

神戸大学・保健学研究科・准教授

研究者番号：60346674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マラリア原虫のヘモグロビン輸送機構を理解することを目的とし、ヘモグロビン代謝が活発なトロホゾイト期に発現する膜タンパク質ETRAMP4に着目し、免疫電顕法を用いた分子局在を解析した。ETRAMP4は、初期トロホゾイト期の寄生胞膜に局在し、ヘモグロビン輸送に関わる膜構造(サイトストーム、輸送小胞)に移行することから、マラリア原虫のヘモグロビン輸送の指標となることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the molecular mechanism and membrane dynamics of hemoglobin transport, I focused in ETRAMP4 (Early Transcribed Protein 4), the membrane proteins expressed in trophozoite stage of Plasmodium falciparum. By immunoelectron microscopy, ETRAMP4 localized in parasitophorous vacuole membrane and uptake by cytoosomes, hemoglobin transport vesicles.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア ヘモグロビン輸送 寄生胞膜

1. 研究開始当初の背景

マラリアは、寄生性の単細胞真核生物であるマラリア原虫により引き起こされる感染症である。ヒトの体内において、マラリア原虫は赤血球に寄生し、ヘモグロビンをアミノ酸と供給源として発育、増殖を繰り返す。このヘモグロビン代謝は、酸性の単膜オルガネラ「食胞」で行われ、マラリア原虫特有のプロテアーゼ群や遊離ヘム重合化分子が関与することから、マラリア治療薬の標的として注目されている。

マラリア原虫は赤血球侵入時に「寄生胞膜」に覆われた寄生胞を形成するため、ヘモグロビンと隔離されている。そのため、マラリア原虫は、寄生胞膜と原虫細胞膜を同時に内側に陥入させた「サイトストーム」と呼ばれる構造を形成し、そこからヘモグロビンを輸送小胞に取り込み、食胞へと輸送する。これらの膜系は、1970年代に透過型電子顕微鏡を用いた形態学的解析により見出されたが、指標分子は同定されておらず、その分子機構は未だ明らかにされていない。

2. 研究の目的

赤血球期のマラリア原虫によるヘモグロビン輸送は、赤血球内に寄生するための代表的な適応機構ということができ、マラリア治療薬開発の観点からも、その分子機構の解明が期待されているが、不明な点が多く残されている。本研究課題では、熱帯熱マラリア原虫のヘモグロビン輸送の分子機構の解明を目指し、ヘモグロビン輸送の指標分子の同定し、ヘモグロビン輸送における寄生胞膜の動態を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)赤血球期マラリア原虫の寄生胞膜に発現する分子群の選択、特異抗体の作成

熱帯熱マラリア原虫のゲノムデータベースより、赤血球期の寄生胞膜に発現が予想される分子を選択する。それらの組換えタンパク質を、マラリア原虫のタンパク質発現に最適なコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系に

より大量合成する。これらを抗原として、マウス、ウサギに免疫し、特異抗体を作製する。特異抗体の反応性・特異性は、ウエスタンブロット解析、間接蛍光抗体法により確認する。

(2)赤血球期マラリア原虫における発現時期の解析

選択した分子のタンパク質の発現時期を明らかにするために、熱帯熱マラリア原虫 3D7 株の同調培養を行い、赤血球侵入時を起点として、8時間間隔、6回のサンプリングを行う。それぞれの時間軸において、塗抹標本を作成し、特異抗体を用いた間接蛍光抗体法を行い、それらの発現時期を確認する。陰性コントロールには、免疫前血清および抗 GST 抗体を用いる。

(3)免疫電顕法を用いた分子局在の解析

同調培養した熱帯熱マラリア原虫 3D7 株を用いて、赤血球期原虫を網羅した免疫電顕用ブロックを作成する。赤血球期の熱帯熱マラリア原虫でタンパク質の発現が確認された分子について、特異抗体を用いた免疫電顕法により分子局在を解析し、寄生胞膜に局在し、サイトストーム、輸送小胞に移行する分子を同定する。

4. 研究成果

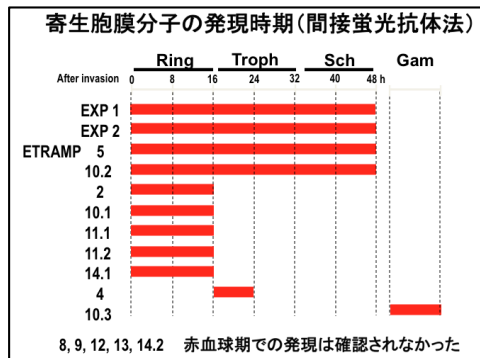
(1)赤血球期マラリア原虫の寄生胞膜に発現する分子群の選択、特異抗体の作成

熱帯熱マラリア原虫のゲノムデータベースの検索により、16種類 (EXported Protein 1, 2, Early TRAnscribed Membrane Protein ファミリー 14 分子)を候補として選定した。これら 16 分子の cDNA をクローニングし、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成用ベクター pEU に組込み、組換えタンパク質合成を試みた。その結果、16種類全ての組換えタンパク質が、1mg の抗原スケールで可溶性画分に得られた。これらを抗原として、マウス、ウサギに免疫し、16種類の特異抗体を作製した。

(2)赤血球期マラリア原虫における発現時期の解析

16 種類 of 寄生胞膜分子のタンパク質の発現時期を明らかにするために、同調培養した

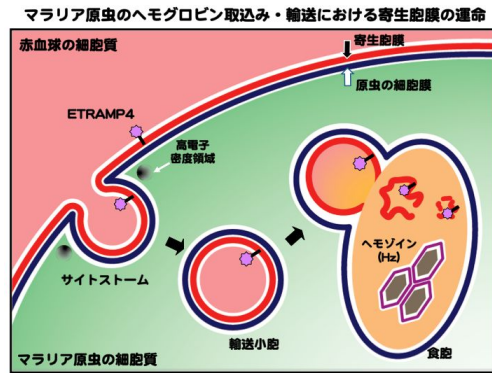
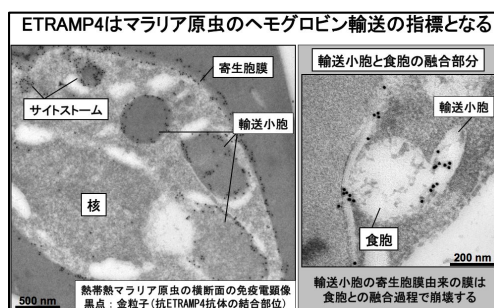
熱帯熱マラリア原虫を抗原として、特異抗体を用いた間接蛍光抗体法を行った。その結果、赤血球期では、11分子（EXP1, EXP2, ETRAMPファミリー：9分子）が発現することが明らかになり、これらの分子の発現時期は、リング期～シズント期（4分子）、リング期（5分子）、トロホゾイト期（1分子）、生殖母体期（1分子）であった。



(3)免疫電顕法を用いた分子局在の解析

ヘモグロビン代謝が活発なトロホゾイト期に発現する ETRAMP4 (Early TRAnscribed Membrane Protein4)に着目し、免疫電顕法を用いて分子局在の解析を行なったところ、ETRAMP4 は、寄生胞膜に局在し、サイトストームと輸送小胞に移行することを見出した。

そこで、ETRAMP4 を指標として、熱帯熱マラリア原虫（リング期～初期トロホゾイト期）のヘモグロビン輸送過程を電子顕微鏡レベルで詳細に解析したところ、食胞と融合した輸送小胞では、寄生胞膜由来の膜のみが崩壊することが明らかになった。さらに食胞内部には、抗 ETRAMP4 抗体に反応を示す膜の残骸が確認され、寄生胞膜由来の膜は食胞内部で分解されることが示された。以上の結果から、輸送小胞と食胞の融合過程において、初めに、輸送小胞の原虫細胞膜由来の膜と食胞膜の膜融合が起こり、次いで、寄生胞膜由来の膜が崩壊することが明らかになった。



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0件)

出版準備中

〔学会発表〕(計5件)

(1) 入子英幸、大槻 均、橘真由美、石野智子、鳥居本美、坪井敬文、福本宗嗣、熱帯熱マラリア原虫のヘモグロビン輸送機構の解析、第 21 回分子寄生虫学ワークショップ、2013 年 8 月 25-28 日（兵庫県 神戸市）

(2) 入子英幸、大槻 均、橘真由美、石野智子、鳥居本美、坪井敬文、福本宗嗣、熱帯熱マラリア原虫のヘモグロビン輸送における寄生胞膜の動態、第 69 回日本寄生虫学会西日本支部会、2013 年 10 月 19-20 日（香川県 高松市）

(3) 入子英幸、大槻 均、橘真由美、石野智子、鳥居本美、坪井敬文、福本宗嗣、熱帯熱マラリア原虫のヘモグロビン輸送における寄生胞膜の動態、第 83 回日本寄生虫学会大会、2014 年 3 月 27-28 日（愛媛県 松山市）

(4) 入子英幸、大槻 均、橘真由美、石野智子、鳥居本美、坪井敬文、福本宗嗣、赤血球期マラリア原虫の寄生胞膜の動態、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 8 月 31 日-9 月 2 日（北海道 帯広市）

(5) 入子英幸、石野智子、橘真由美、鳥居本

美、坪井敬文、大槻 均、福本宗嗣、生殖母
体期マラリア原虫のヘモグロビン輸送機構
の解析、第 84 回日本寄生虫学会大会、2015
年 3 月 21-22 日（東京都 三鷹市）

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

神戸大学大学院 保健学研究科

<http://www.ams.kobe-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

入子 英幸 (Iriko Hideyuki)

神戸大学・大学院保健学研究科・准教授

研究者番号：60346674