

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 30 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860311

研究課題名(和文) 寄生胞膜に着目した肝内型マラリア原虫-宿主間“闘ぎ合い”機構の解明

研究課題名(英文) The molecular interactions between host and liver stage malaria parasites through the parasitophorous vacuole membrane.

研究代表者

案浦 健 (Annoura, Takeshi)

国立感染症研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：90407239

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)：代表者らは、肝内型マラリア原虫に特異的な分子のスクリーニングを行い、新たな特異分子“B9”を見出した。b9を用いた詳細な解析から、一遺伝子欠損により複数の寄生胞膜(PVM)タンパク質の局在性を失わせ、不完全なPVMを形成する表現型を示すことが明らかとなった。この表現型は、齧歯類マラリア原虫および熱帯熱マラリア原虫において共通であった。様々な解析から、b9は転写後制御により発現調節される分子であることが明らかとなり、plasma membraneに局在する事が明らかとなった。さらに推定立体構造解析からB9は6-Cys family proteinに類似の構造をとる事を明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Malaria is a major global health burden, and Plasmodium is the causative agents of malaria. In order to reveal the molecular interplay between Plasmodium and the host, we focus on plasmodium liver stage development especially parasitophorous vacuole membrane (PVM), which an interface membrane between parasite and host. Loss-of-function analyses have revealed that B9 is specifically expressed in Plasmodium liver stages and that is important to parasite development in both rodent and human Plasmodium. And also b9 is readily transcribed in sporozoites, B9 protein is present after hepatocyte invasion. Moreover we show that B9 is localized on the parasite plasma membrane where it plays an important role in establishment and maintenance of PVM inside the hepatocyte. Based on the structural analyses of B9 4-cysteine domain, we propose that the presence of the four positionally conserved cysteine residues, are diagnostic for this domain and B9 belong to the 6-Cys family-related proteins.

研究分野：原虫

キーワード：マラリア 原虫 寄生胞膜 肝内型

1. 研究開始当初の背景

世界最大の感染症の一つであるマラリアは、年間の罹患者数 2~5 億人、死亡者数は約 60 万人以上にもおよぶ。そのため効果的なワクチンの開発が切望されているが、マラリア原虫は獲得した寄生戦略により宿主の防御免疫を巧みに回避することから、ワクチン開発は困難を強いられる。そのため次世代のマラリアワクチン開発には、特に高いワクチン効果や長期間持続、細胞性免疫の活性化など、様々な効果・多角的な解析が求められているが、それら分子メカニズムの多くは未だ解明されていない。

ハマダラカによって媒介されるマラリア原虫は、ヒト体内ではまず肝臓に寄生(肝内型)し、次いで赤血球内(赤内期)に寄生する。蚊からヒトへの感染型であるスポロゾイトは、肝細胞侵入後、寄生胞膜(PVM)を形成し宿主と隔たりを設けることで寄生を成立させ、分裂増殖を開始する。原虫の宿主細胞内生存戦略を考えた場合、赤血球はMHC分子などを発現しないナイーブな宿主であるが、肝細胞はMHC分子の発現や様々な免疫応答が可能な細胞であることから、肝内型原虫は巧みに宿主応答を回避している可能性が示唆される。一方で、第III相臨床試験において一定の効果を示したマラリアワクチン(RTS,S/AOS1)は、スポロゾイト表面タンパク質(CSP)を元にデザインされている。CSPは、スポロゾイトの表面だけでなく肝内型原虫のPVMにも局在し、MHCクラスIとともに感染肝細胞表面に提示され細胞性免疫の標的となりうるということが示唆されている。すなわち肝内型原虫のPVMは宿主の排除応答を隔てる原虫ツールであるが、その一方でこれらPVMにはワクチン効果を示す分子が潜んでいる可能性が示唆される。そこで本研究では、マラリアワクチン開発につながる分子基盤研究を行うため、マラリア原虫と宿主との“闘ぎ合い”メカニズム、特に肝内型原虫PVMを介した宿主-原虫間相互作用の分子メカニズムの解明にフォーカスをあて研究を遂行した。

2. 研究の目的

マラリア原虫は宿主細胞内においてPVMを作り、宿主と隔たりを設けることで寄生を成立させる。このPVMを形成することは原虫の宿主内生存に必須であることが示唆されているが、その形成に関する分子メカニズムの詳細は未だ明らかとなっていない。特にPVM構成要素のうち、原虫側に必須なコンポ

ーネント、宿主側から取り込むコンポーネントなどに関する情報は極めて乏しい。そこで本研究では、免疫付与効果の観点から特に肝内型原虫のPVMに着目し、その形成・宿主応答との“闘ぎ合い”を明らかにするため研究を展開した。肝内型原虫PVMと宿主応答を明らかにするため、1. 肝内型原虫PVMに特異的な分子の同定を試み、2. 肝内型原虫PVMに対する宿主応答を明らかにするため、多数の宿主応答の中からオートファジー(Atg)応答をまず選択し、その応答を中心に解析を試みることで、原虫-宿主間の新規相互作用の解明を試みた。

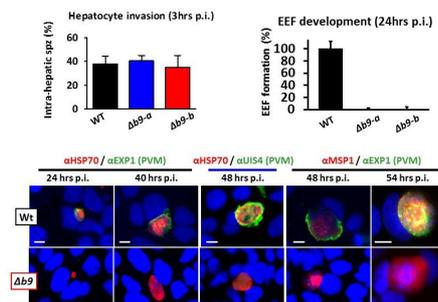
3. 研究の方法

齧歯類マラリア原虫(*Plasmodium berghei*)を用いたLoss-of-function解析を行い、肝内型原虫特異的に表現型を示す変異株のスクリーニングを行った。本スクリーニング解析より、肝内型原虫に特異的な新規機能分子B9を見出した。詳細な表現型解析のため、B9欠損原虫株($\Delta b9$)を用いて肝細胞に感染させin vitroでの詳細な表現型解析を行った。B9の構造および機能を類推するため、既に登録されているデータベースより構造が類似するタンパク質を選別し、それらの結晶構造を元に、B9の構造を推定し比較解析を行った。また肝内型原虫にたいする宿主Atg応答解析のため、肝細胞に野生型原虫(WT)スポロゾイトを感染後、経時的に感染肝細胞を回収し、免疫蛍光抗体法(IFAs)により観察を行った。宿主のAtg応答の観察には、宿主Atgマーカータンパク質LC3を標的として、特異抗体を用いた染色により応答動態を継時的に観察した。

4. 研究成果

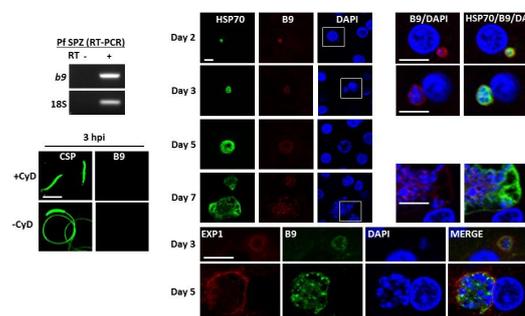
我々はLoss-of-function解析より、肝内型原虫に特異的な新たな特異分子“B9”を見出した。 $\Delta b9$ を用いた詳細な解析を行ったところ、本株は赤内期や昆虫体内期ではWTと同様に増殖し表現型を示さなかった。また $\Delta b9$ のスポロゾイト産生やスポロゾイト活性(グライ

Fig. 1; *P. berghei* $\Delta b9$ parasites that develop into mature liver stages have a compromised PVM



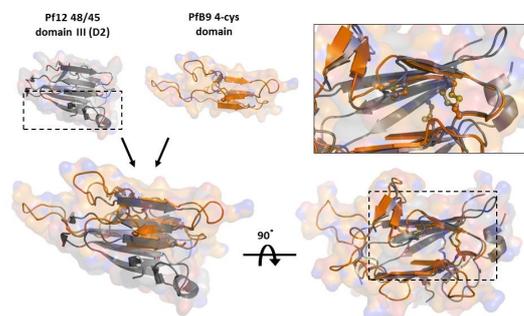
ディング活性や肝細胞への感染率)も、WTと同等であった。(Fig. 1) しかしながら、肝細胞への感染 24 時間後における肝内型原虫の宿主内生存率は著しく低下していた。(Fig. 1)そこでスポロゾイトを肝細胞に感染させ 24、40、48、54 時間後に回収し、IFAsにて観察を行った。その結果 b9 を用いた場合、複数の PVM マーカー分子を用いた染色で明確なシグナルが検出されないが、宿主内で生存する原虫は成熟することが明らかとなった。(Fig. 1)これらの結果より、b9 の一遺伝子欠損は、複数の PVM 局在性タンパク質の細胞内局在性を失わせ、「肝内型原虫特異的に不完全な PVM を形成する表現型」を示すことが明らかとなった。(Fig. 1)この b9 の表現型は、齧歯類マラリア原虫および熱帯熱マラリア原虫を用いた解析で共通であった。

Fig. 2; Expression & localization of B9 in *P. falciparum*



RT-PCR および抗 B9 抗体を用いた IFAs 解析から、b9 は転写後制御により発現調節される分子であることが明らかとなり、免疫蛍光抗体法により原虫 plasma membrane に局在する事が明らかとなった。(Fig.2) さらに各種構造解析などから、B9 の推定立体構造は 6-Cys family protein に類似している事が明らかとなった。(Fig.3)

Fig. 3; Comparative modeling of 6-cys (Pf12) & 4-Cys (B9) domains of the 6-Cys family protein



肝内型原虫 PVM に対する宿主 Atg 応答を明らかにするため、WT スポロゾイトを感染後、経時的に感染肝細胞を回収した。IFAs により原虫と宿主 LC3 を観察したところ、感染初期(4 と 10 時間後)では、肝内型原虫に対して宿主 LC3 の集積が非常に強く観察されたが、

感染後期(48 と 54 時間後)では明確な集積は認められなかった。また b9 を用いて同様に観察を行ったところ、すべての時間において肝内型原虫に対する宿主 LC3 の蓄積は全く認められなかった。今後、本実験で得られた結果を詳細に解析することで、宿主 Atg 応答が肝内型原虫の生存に与える影響・意義を明らかにする予定である。このような原虫-宿主の接点である PVM を形成する分子を明らかにすることで、原虫の宿主内生き残り戦略を明確にすることでワクチン開発につながる分子基盤情報を得ることが期待される。

5. 主な発表論文等(計 9 件)

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

- 1) Lin JW, Spaccapelo R, Schwarzer E, Sajid M, Annoura T, Deroost K, Ravelli RB, Aime E, Capuccini B, Mommaas-Kienhuis AM, O'Toole T, Prins F, Franke-Fayard BM, Ramesar J, Chevalley-Maurel S, Kroeze H, Koster AJ, Tanke HJ, Crisanti A, Langhorne J, Arese P, Van den Steen PE, Janse CJ, Khan SM. (2015) Replication of *Plasmodium* in reticulocytes can occur without hemozoin formation, resulting in chloroquine resistance. *The Journal of Experimental Medicine* 2015 Jun 1;212(6):893-903.
- 2) De Niz M, Helm S, Horstmann S, Annoura T, Del Portillo HA, Khan SM, Heussler VT. (2015) In vivo and in vitro characterization of a *Plasmodium* liver stage-specific promoter. *PLoS One*. 2015 Apr 15;10(4):e0123473.
- 3) van Schaijk BC, Ploemen IH, Annoura T, Vos MW, Foquet L, van Gemert GJ, Chevalley-Maurel S, van de Vegte-Bolmer M, Sajid M, Franetich JF, Lorthiois A, Leroux-Roels G, Meuleman P, Hermsen CC, Mazier D, Hoffman SL, Janse CJ, Khan SM, Sauerwein RW. (2014) A genetically



- attenuated malaria vaccine candidate based on *P. falciparum* b9/slarp gene-deficient sporozoites. *Elife*. 2014 Nov 19;3:e03582
- 4) Lin JW, Shaw TN, Annoura T, Fougère A, Bouchier P, Chevalley-Maurel S, Kroeze H, Franke-Fayard B, Janse CJ, Couper KN, Khan SM. (2014) The Subcellular Location of Ovalbumin in *Plasmodium berghei* Blood Stages Influences the Magnitude of T-Cell Responses. *Infection and Immunity*. 2014 Nov;82(11):4654-65.
- 5) **栗浦 健** マラリアワクチン開発の現状と展望 . **動物用ワクチン-バイオ医薬品研究会ニュースレター** 2014年 No.9 6月号 p12-15.
- 6) **栗浦 健** よそさまのお宿に棲むという細胞進化 . 細胞内寄生成立モデル : トリパノソーマほか . **細胞工学** 「細胞進化の証人たち」 2014年 vol.33 no. 5. 558-9.
- 7) Annoura T, van Schaijk BC, Ploemen IH, Sajid M, Lin JW, Vos MW, Dinmohamed AG, Inaoka DK, Rijpma SR, van Gemert GJ, Chevalley-Maurel S, Kietbasa SM, Scheltinga F, Franke-Fayard B, Klop O, Hermsen CC, Kita K, Gego A, Franetich JF, Mazier D, Hoffman SL, Janse CJ, Sauerwein RW, Khan SM. (2014) Two *Plasmodium* 6-Cys family-related proteins have distinct and critical roles in liver-stage development. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB J)*. 2014 May;28(5):2158-70.
- 8) Annoura T, Chevalley S, Janse CJ, Franke-Fayard B, Khan SM. (2013) Quantitative analysis of *Plasmodium berghei* liver-stages by bioluminescence imaging *Methods in Molecular Biology*.



2013;923:429-43.

- 9) Lin JW, Meireles P, Prudêncio M, Engelmann S, Annoura T, Sajid M, Chevalley-Maurel S, Ramesar J, Nahar C, Avramut CM, Koster AJ, Matuschewski K, Waters AP, Janse CJ, Mair GR, Khan SM. (2013) Loss-of-function analyses defines vital and redundant functions of the *Plasmodium rhomboid* protease family. *Molecular Microbiology*. 2013; 88(2):318-38.

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 10件)

- 1) 第84回日本寄生虫学会大会
2015年3月21日-22日 杏林大学
三鷹キャンパス
- 2) 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3日 帯広畜産大学・原虫病研究センター PKホール
- 3) 第8回細菌学若手コロッセウム
2014年8月6日-8月8日 ホテルニセコ いこいの村
- 4) 第3回マトリョーシカ型生物学研究会
2014年7月11日-7月13日 神戸大学百年記念館 (神大会館)
- 5) 第83回日本寄生虫学会大会
2014年3月27日-28日 愛媛大学
城北キャンパス
- 6) 第3回感染症若手フォーラム
2014年2月13日-15日 やすらぎ伊王島(長崎)
- 7) 第36回日本分子生物学会年会
2013年12月3日-6日 神戸ポート
アイランド
- 8) 第11回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会
2013年10月2日-3日 長崎大学坂本キャンパス ポンペ会館

- 9) 第21回分子寄生虫学ワークショップ
2013年8月25日-8月28日 神戸
市立神戸セミナーハウス
- 10) 9th Annual BioMalPar/EVIMalaR Conference,
Biology and Pathology of the Malaria Parasite
2013/May/13-15, EMBL Heidelberg,
Germany

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

取得状況(計 1件)

名称 : GENETIC ATTENUATION OF PLASMODIUM
BY b9 GENE DISRUPTION

発明者 : Janse CJ, Annoura T, Khan SM, van
Schaijk BC, Ploemen IH, Vos MW, Sauerwein RW.

権利者 : Guillaîne and Sanaria Inc.

種類 : WO/2014/116990

番号 : PCT/US2014/013009

出願年月日 : January 24, 2014

取得年月日 : July 31, 2014

国内外の別 : 全世界を対象とする国際特許

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nih.go.jp/niid/ja/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

案浦 健 (ANNOURA TAKESHI)

国立感染症研究所・寄生動物部・主任研究官
研究者番号 : 90407239