

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460507

研究課題名(和文) マラリア原虫赤血球侵入リガンド分子の細胞内輸送メカニズムの解明

研究課題名(英文) Intracellular trafficking mechanism of erythrocyte invasion ligand molecule Plasmodium parasites

研究代表者

大槻 均(Otsuki, Hitoshi)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：80403806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マラリア原虫はヒトを含む動物の赤血球に寄生する単細胞の寄生虫であり、赤血球に寄生するために自らが分泌する複数のタンパク質を赤血球に結合させて侵入を行う。このタンパク質のうち、赤血球との不可逆的な結合に用いられるEBLは原虫の赤血球侵入に不可欠である。このEBLは赤血球侵入型原虫の先端部にあるマイクロネームと呼ばれる小胞に輸送され、分泌される。我々はEBLの分子中でこの輸送に関わる部分を同定した。また、この輸送に関わらないがマラリア原虫の感染性に大きな影響を及ぼす部分を別に見出した。

研究成果の概要(英文)：Malaria parasites are single cell organism that invade into red blood cells of various animals. They secrete several proteins to attach on the surface of red blood cells to help their invasion. The molecule called EBL is an essential protein to attach on red cell surface irreversibly. EBL is transported to the tip of the invasive form of the parasite. We identified the domain for this transport inside the molecule. And we also detected another important domain that influences the infectivity of the parasite.

研究分野：マラリア

キーワード：マラリア 細胞内輸送 赤血球侵入

1. 研究開始当初の背景

マラリア原虫メロゾイトは、赤血球侵入に必要な分子を先端部にある細胞内小器官から秩序だてて分泌しながらいくつかのステップを経て赤血球内に寄生を完了する。

マラリア原虫が侵入に用いる細胞内小器官はマイクロネーム、ロプトリー、デンスグラニールの3種があり、それぞれ侵入のステップの経過に応じて内容物を分泌し、侵入のプロセスを進行させていると考えられる。これらの分子を目的の細胞内小器官に正しく輸送するメカニズムが存在すると考えられる。

このメカニズムの理解はマラリア原虫に対する効果的な治療・予防戦略を構築するために重要であるが、現在の所報告されている知見は多くはなく、侵入のプロセスを断ち切り、原虫の赤血球への寄生を阻害して治療/予防に役立てるにはさらなる知見の蓄積が求められている。

我々は、マラリア原虫が赤血球表面と不可逆的な結合を形成するのに必須な、赤血球侵入関連分子のうちEBLと呼ばれるリガンド分子の細胞内輸送に着目して研究を行っている。EBLは原虫が赤血球表面に不可逆的に結合するために必須の分子で、EBLのレセプターを欠いた赤血球には原虫は侵入出来ない事が報告されている。我々はこれまで分子のC末端にあるシステイン豊富な領域の1アミノ酸置換が分子の細胞内の局在と原虫の赤血球への感染性を大きく変化させる事を見出した。本研究はこの知見を発展させたものである。

2. 研究の目的

マラリア原虫赤血球侵入関連分子EBLの細胞内輸送に重要な分子内ドメインを同定し、原虫内の輸送メカニズムを解明する事を目的とした。この細胞内輸送ドメインを特定するため、原虫内のドメインをそれぞれ欠失させた遺伝子組換え原虫を作製して探索する事とした。

また、研究により明らかとなったEBLの細胞内輸送に重要なドメインとマラリア原虫の赤血球への侵入性の関連についても解析を行い、細胞内輸送と原虫の病原性の関連について明らかにする事を目的とした。

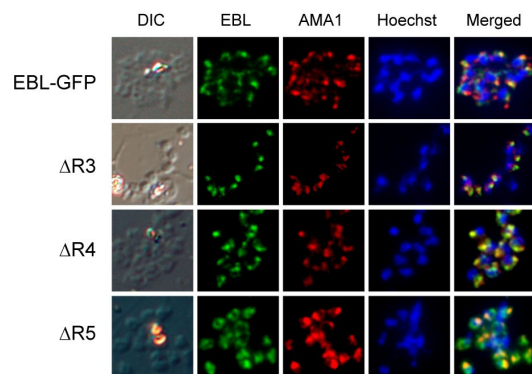
3. 研究の方法

まず、EBL内の細胞内輸送に関わるドメインを特定する目的で、EBLのC末端にGFPを融合させた組換え原虫であるEBL-GFP原虫およびEBL赤血球結合ドメイン領域2よりC末端側にある領域3・4・5・6の各ドメインの欠失させ分子末端にGFPを同様に融合させたEBL R3・4・5・6-GFP原虫を作製を試みた。

EBLの特異的な配列を挿入したプラスミドを作製し、この特異的な配列を欠失させる事で二重相同組換えにより目的部位を欠失させる事とした。電気穿孔法を用いて原虫の核に組換え用コンストラクトを導入し、ピリメサミンによる薬剤選択で組み換えられた原虫を選択した。

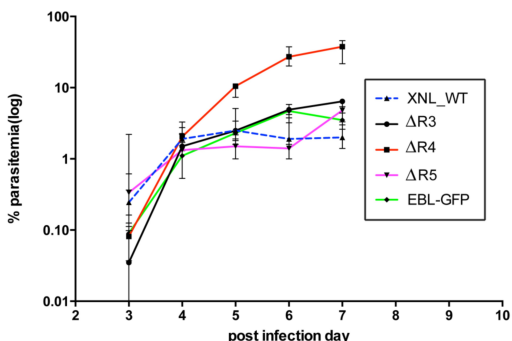
作製された原虫からgDNAを採取し、PCRおよびシーケンス法により目的部位の欠失を確認した。実験の結果、領域3・4・5・6をそれぞれ除去した組換え原虫を作製することができた。同時に作製を試みた領域3・4・5を一塊として欠失させた原虫は遺伝子組換え後出現せず、欠失させた部分が大きすぎたものと考えられた。

次に、これらを用いてEBLの局在の変化について検討を行った。作製した組換え原虫は、GFPによるライブイメージングと特異抗体を用いた間接蛍光抗体法でEBLの局在について解析を行った(図1)。



その結果、領域6を欠損させたR6-GFP原虫においてコントロールである野生型原虫およびEBL-GFP原虫とは明らかにEBLの局在が異なっていることが観察され、領域6がEBLの細胞内局在に関わるドメインである事が強く示唆された。他のドメインについてはEBLの細胞内局在に変化は観察されず、細胞内輸送には関わっていないことが示唆された。

さらに、作製した原虫を用いて原虫率の比較を行った。8週齢の BALB/c マウスに作製した組換え原虫を感染赤血球として1頭あたり 1×10^4 個経静脈的に接種して感染させ、毎日血液塗抹標本を作製してギムザ染色し、原虫に感染した赤血球の全赤血球に占める割合を計測した。(図2)



その結果、コントロール原虫と比較して、領域3、領域5、領域6を欠損させた原虫は原虫率に変化を認めなかった。これに対し、領域4を欠損させた原虫では原虫率は大きく上昇した。このことから領域4は原虫の感染性と関連する領域である事が示唆された。

感染の経過を通じて死亡したマウスはなく、EBLのドメイン欠失により生じる影響は致死的なものではなかった。

4. 研究成果

マラリア原虫赤血球侵入関連分子 EBL の細胞内ドメインを系統的に欠失させた組換え原虫を作製し、機能解析を行った。

作製した組換え原虫の細胞内での局在を間接蛍光抗体法で観察した所、C末端側のシステインに富んだ領域6を欠失させた原虫でのみ EBL の細胞内局在が変化した。それに対して領域3,4,5を欠失させた原虫では局在の変化は観察されなかった。

このことから領域6が EBL の細胞内輸送を司るドメインである事が強く示唆された。他の領域は EBL の細胞内輸送に関わっていない事が示唆された。

しかし、この領域6を欠失させた原虫は感染率の上昇を来さなかった。これに対し、領域4を欠失させた原虫は、EBL の細胞内の局在は変化しなかったのに対して原虫率は大きく上昇した。このことから EBL と原虫の感染性について新しいメカニズムがある事が示唆された。

今後はこれらの結果を発展させ、マラリア原虫の赤血球侵入機構における細胞内輸送機構の解析と、機能不明の領域の原虫感染率への影響について更に検討を進める予定である。

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)

[学会発表](計 2件)

第84回日本寄生虫学会大会 大槻 均
1 菅井千明 1 入子英幸 1,2 石野智子
3 金子 修 4 福本宗嗣 1 坪井敬文 5
鳥居本美 3 「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」
2015年3月21日杏林大学三鷹キャンパス(東京都三鷹市)

第85回日本寄生虫学会大会 大槻 均
1 菅井千明 1 入子英幸 1,2 石野智子
3 金子 修 4 福本宗嗣 1 坪井敬文 5
鳥居本美 3 「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」
2016年3月19日宮崎市民プラザ(宮崎県宮崎市)

[図書](計 0件)

[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：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大槻 均 (Hitoshi Otsuki)
鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：80403806

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()