

200903011A

厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

マラリア感染細胞表面のタンパク質一分子計測と異常ヘモグロビンの
マラリア耐性メカニズムの解明に関する研究

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 有江 隆之

平成22(2010)年 5月

厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

マラリア感染細胞表面のタンパク質一分子計測と異常ヘモグロビンの
マラリア耐性メカニズムの解明に関する研究

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 有江 隆之

平成22(2010)年 5月

目 次

I. 総括研究報告

マラリア感染細胞表面のタンパク質一分子計測と異常ヘモグロビンの
マラリア耐性メカニズムの解明に関する研究 ----- 1
有江隆之

マラリア感染細胞表面のタンパク質一分子計測と異常ヘモグロビンの
マラリア耐性メカニズムの解明に関する研究

研究代表者 有江 隆之 大阪府立大学工学研究科助教

研究要旨 遺伝性疾患であるヘモグロビン異常がマラリアに耐性を示すことは広く知られているが、そのメカニズムは明らかにされていない。本研究では原子間力顕微鏡を用い、感染赤血球表面上の突起状構造が、血管内壁細胞へ接着するプロセスを一分子レベルで解明し、耐性メカニズムを明らかにするための顕微鏡システムの開発、および顕微鏡プローブの化学修飾を行った。プローブ表面をアミノ基で覆うことで、グルタルアルデヒドを用いた簡便な方法によりタンパク質を固定することが可能となった。次年度では実際の計測により適したプローブの作製条件を模索すると同時に、異常ヘモグロビンをもった感染赤血球に対して相互作用計測を行う。

A. 研究目的

マラリアは結核、HIV/AIDSと共に世界三大感染症の一つで、アフリカ、東南アジアを中心に主に熱帯、亜熱帯地方で流行している感染症である。ヒトに感染する寄生虫の中で、特に重篤なケースをもたらすものが*Plasmodium falciparum*であり、感染赤血球表面にノブと呼ばれる突起状構造を発現し、脳や各器官の毛細血管内壁に接着することで血流を阻害、最悪のケースではヒトを死に至らしめる。これまでアフリカや東南アジアの特定の地域で見られる、ヘモグロビンSやヘモグロビンCに代表される遺伝性疾患であるヘモグロビン異常が、重篤なマラリアになるリスクを低減させるという報告があり[1]、我々はヘモグロビン異常が、赤血球表面のノブの形状を大きく変化させることを発見し、この形状変化が重篤なマラリアの発症を引き起こすリスクを低減させるというモデルを提案してきた[2]。このモデルでは表面形状の違いにより、寄生虫由来の赤血球表面に発現するタンパク質であるPfEMP-1による細胞接着が低減され、感染細胞が免疫システムにより除去されるのを促進するというものである。およそ60のvar遺伝子からエンコードされるPfEMP-1は、短期間にその発現形態を変化させるため、免疫システムからの除去や感染赤血球をターゲットにしたワクチンの開発を困難にしてきた。これらを明らかにするためには発現後に分子レベルで計測することが必要不可欠であるが、生物化学的手法では現在のところ不可能である。本研究では原子間力顕微鏡（AFM）を用い、PfEMP-1と血管内壁細胞上のレセプターとの相互作用を分子レベルで計測することを目的とする。

当該年度はAFMを用いた相互作用力を一分子レベルで計測可能なシステムを構築すると共に、分子認識プローブを作製する手法を確立する。化学修飾した分子認識プローブは、固定する分子を変更することであらゆる分子間相互作用の単一分子レベルでの計測を可能にし、さまざまな病原体やウイルスと細胞との相互作用を明らかにするための知見を供するものである。

B. 研究方法

AFMを用いた分子間相互作用力計測システムは、

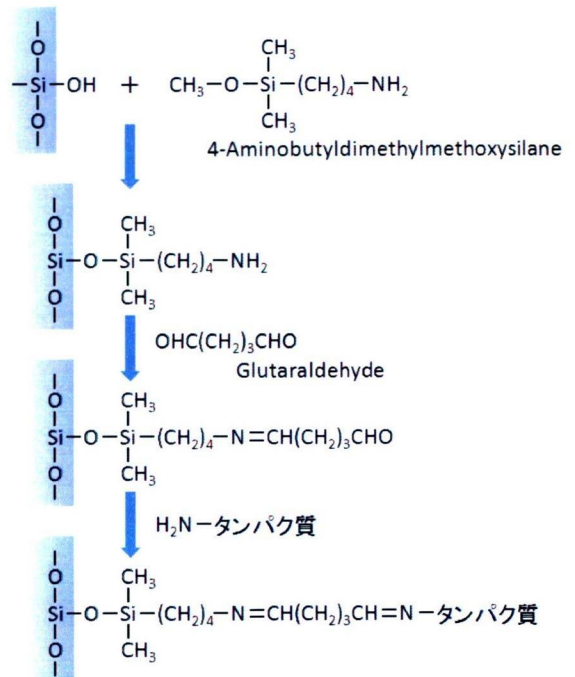


図1 化学修飾プローブ作製のためのタンパク質固定反応

既存のAFMと80μm²まで走査可能な広域スキャナを組み合わせて構築した。

AFMを用いた分子認識のための化学修飾プローブの作製はシランカップリング剤の導入と、アルデヒドを用いた[3]簡便な手法により行った。表面反応の流れを図1に示す。基板としてSiO₂を用い、表面を4-Aminobutyldimethylmethoxysilaneで処理後、グルタルアルデヒドを用いてタンパク質を基板表面に固定した。タンパク質の固定の確認は、蛍光色素標識された抗体をタンパク質に結合し、蛍光顕微鏡で観察して行った。

(倫理面への配慮)

本研究を通して使用するマラリア感染赤血球試料は、米国国立感染症研究所（NIAID）の研究協力者が

東南アジアやアフリカで、NIAIDの定める規程に基づいて患者の同意・協力の下採取し、既に固定された状態で匿名の下取り扱うため、この項目には直接該当しない。

C. 研究結果と考察

構築したAFMシステムは大気中・液中で運用可能であり、細胞表面のタンパク質の分布を大まかに測定する際は大気中で、分子間相互作用を一分子レベルで計測する際は液中でと使い分けることが可能である。しかしながら広域を走査するピエゾスキャナでは回路系のノイズなど、外来ノイズの影響を受け微小な振動が混入しやすくなり、本研究のような単一分子レベルでの計測は困難になる。そこで試料の試料台への固定方法を改善したり、プローブの加振パラメータを最適な値に設定したりすることで、最小限に抑えることが出来、高い精度の計測が可能となることが分かった。

図1の反応を用いた化学修飾プローブの作製では、4-Aminobutyldimethylmethoxysilaneを用いることにより短時間でSiO₂表面に単層膜が作製され、グルタルアルデヒドにより簡便に目的のタンパク質を固定することが出来た。同様の誘導體であるEthoxysilane系のもものでは多層膜になりやすく、均一に塗布することが困難であるが、今回用いたMethoxysilaneでは均一に塗布することが可能である。

今回用いたタンパク質は、マラリア感染赤血球が突起状構造を介して接着する、血管内壁細胞表面に分布しているCD36であるが、他のタンパク質を用いることにより、接着部位の異なるマラリア感染赤血球に対しても計測することが可能であり、さらに他のレセプターの導入により、マラリア以外のさまざまな病原体と細胞間の相互作用計測にも可能することが可能である。

当該年度で確立したSiO₂表面上へのタンパク質固

定法を用いることで、分子間相互作用計測用の化学修飾プローブの作製が可能となったが、単一分子レベルの高感度、高分解能を実現するためには、プローブ先端のみに、数分子レベルでの固定を確立する必要がある。これには先端のみ酸化処理を施し、部位特異的にアミノ基で覆う必要があり、次年度も引き続き、より実用的なプローブ作製手法の確立を実際の細胞試料を用いて行うと共に、異常ヘモグロビンをもった感染赤血球を用いて実際に分子間相互作用計測を行う。

D. 結論

当該年度はAFMを用いた分子間相互作用力計測システムを構築した。また相互作用力計測に用いる化学修飾プローブを簡便な方法で作製した。異なる試料の顕微鏡観察ごとに新しいプローブが必要となる本研究のような実験形態では、簡便で短時間に作製することができる本手法は次年度以降の効率的な実験遂行に繋がることが期待される。

E. 参考文献

- [1] Fairhurst R.M. et al., Nature, 2005, 435, 1117-1121.
- [2] Arie T. et al., J. Struct. Biol. 2005, 150, 163-169.
- [3] Vinchier A. et al., Ultramicroscopy 1995, 57, 337-343.

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

該当無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し
