

地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業）

「寄生虫疾患の病態解明及びその予防・治療をめざした研究」

研究協力者 報告書

マラリア原虫の宿主細胞認識と侵入機序の解析

研究協力者 愛媛大学・大学院医学系研究科・寄生病原体学分野 鳥居本美

研究要旨：

マラリア原虫の生活環において、スポロゾイトは肝細胞、メロゾイトは赤血球にそれぞれ寄生胞を形成して侵入し寄生する。この2つの侵入ステージ原虫のみが先端部にロプトリーと呼ばれる先端部小器官を有することから、その小器官に局在するタンパク質が細胞寄生に重要な役割を果たすことが推測される。しかし、スポロゾイトやメロゾイトが標的細胞に侵入する分子機構、特にロプトリーに局在する分子機能の解析は全く進んでいない。本年度はネズミマラリア原虫(*Plasmodium berghei*)を用いて、メロゾイトのロプトリー分子がスポロゾイトにおいても発現しているか否か、その発現プロファイルと詳細な局在解析を目的として研究を実施した。10個のロプトリー分子各々について、C末端にc-Myc タグを融合した遺伝子改変マラリア原虫を作製した。また2個のロプトリー分子については特異抗体を作製した。12個のロプトリータンパク質について、抗c-Myc抗体および特異抗体を用いてオーシスト内スポロゾイトと唾液腺スポロゾイトにおける当該分子タンパク質の発現および局在を、ウエスタンブロッティング法、間接蛍光抗体法、免疫電子顕微鏡法を用いて詳細に解析した結果、これらのロプトリータンパク質がスポロゾイトにおいて発現していること、また、これらの分子がスポロゾイトのロプトリーに局在することが確認された。

A．研究目的

蚊の吸血の際に哺乳類宿主に注入されたマラリア原虫は、種々の細胞を通過した後肝細胞に寄生胞を形成して侵入し、分裂増殖して赤血球への感染型メロゾイトを形成する。赤血球に侵入して分裂増殖した原虫が次の赤血球へと侵入を繰り返す。マラリア予防法開発の観点から、原虫の宿主細胞への侵入機構の解明が待たれているが、分子レベルでの機序の解析は進んでいない。

マラリア原虫のスポロゾイトは肝細胞に、メロゾイトは赤血球にそれぞれ寄生胞を形成して侵入し寄生する。この2つの侵入ステージ原虫のみが先端部にロプトリーと呼ばれる先端部小器官を有する事から、その小器官に局在するタンパク質の細胞寄生への関与が推測されている。実際、メロゾイトのロプトリー分子のいくつかは、赤血球侵入時

に形成される足場(moving junction)に局在することから、侵入への関与が強く示唆されてきた。一方、スポロゾイトが肝細胞に侵入する分子機構、特にロプトリーに局在する分子の解析は全く進んでいない。

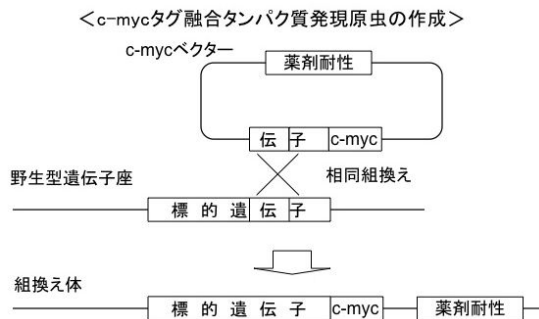
昨年度はスポロゾイトのロプトリー分子の遺伝子発現レベルの探索をRT-PCR法で行った。蚊の唾液腺から回収した成熟したスポロゾイトを用いた場合、解析した12個のロプトリー分子の遺伝子発現は見られなかった。一方、蚊の中腸内のオーシストステージ(中腸スポロゾイト)について解析を行ったところ、12個全てのロプトリー分子の遺伝子発現が認められた。そこで本年度は、これらのロプトリー分子のタンパク質の発現と局在解析を行った。タンパク質の発現と局在解析の為に、10個のロプトリー分子についてはC末端にc-mycタグを融合した遺伝子組

換え原虫を作製し抗 c-myc 抗体を用いて解析を行った。

B．研究方法および結果

本研究では、ネズミマラリア (*Plasmodium berghei* ANKA 株) および媒介蚊であるハマダラカ (*Anopheles stephensi*) を用いて以下の研究を実施した。

研究対象とする 10 個のロプトリータンパク質については、下図に示すような方法により、各々のタンパク質について C 末端に c-myc タグを付加した遺伝子組換え原虫を作製した。



野生型原虫および各遺伝子組換え原虫の感染赤血球を BALB/c マウス (8 週令) に静脈内または腹腔内投与した 4 日後に、羽化 6 日後のハマダラ蚊の雌成虫に吸血させた。十分吸血したものを選別し、20 で飼育した。上記の遺伝子組換え実験については機関内承認を得た上で実施した。また、マラリア原虫感染血液や抗血清を得るための動物実験に関しても、愛媛大学動物実験委員会において実験計画の承認を得、指針を遵守して実施した。

タンパク質発現解析用のサンプルには以下のものを用いた。肝細胞への感染能をもつ成熟スポロゾイトが採取可能となる吸血後 21 から 24 日目に蚊を解剖して、スポロゾイトを含む唾液腺を採取した。同時に蚊の中腸を取り出し、中腸外壁のオーシスト内スポロゾイトを中腸とともに採取した。更に、スポロゾイトの形成が始まる時期に相当する吸血後 13-17 日目のオーシストが付着する中腸を採取して免疫電子顕微鏡用のサンプルを作製した。

また、C 末端に GPI アンカーを持つと予測

された 2 つの分子については、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成法によって作製した組換えタンパク質でウサギを免疫し特異抗体を作製した。

吸血後 21-24 日目の感染蚊から取り出したスポロゾイトを含む唾液腺および感染中腸を材料として、ウエスタンブロッティング法によるタンパク質発現の確認をおこなった。c-myc タグを付加した 10 個の分子については抗 c-myc ウサギ抗体、他の 2 分子は其々の分子に対する特異抗体を用いた。その結果、RON2、RON3、RON4、RON5、RON6、RALP1、RAP1、RhopH2、RhopH3、ASP、RAMA の各タンパク質が唾液腺および中腸オーシスト内のスポロゾイトで発現していることが明らかとなった。

次に、吸血後 21-24 日目の感染中腸および唾液腺を用いた間接蛍光抗体法によりロプトリータンパク質の局在を確認した。その結果、RON2、RON3、RON4、RON5、RALP1、RAP1、RAMA の各タンパク質がスポロゾイトの先端部に局在して反応することが明らかとなった。さらに免疫電子顕微鏡法を用いて、より詳細なタンパク質の局在を解析したところ、RON2、RON4、RON5、RALP1、RAP1、RAMA の各分子がスポロゾイトのロプトリー体部に局在すること、また RON3 がスポロゾイトのロプトリー周囲の細胞膜に局在することが確認された。

以上の研究により、これまでメロゾイトのロプトリーに発現することが報告されながら、スポロゾイトでの発現について全く解析が進んでいなかった複数のロプトリー分子がスポロゾイトのロプトリーに局在することを明らかにすることができた。

E．結論

スポロゾイトにおけるロプトリータンパク質の発現と局在解析を目的として、10 個のロプトリー分子の C 末端に c-myc タグを融合した遺伝子組換え原虫を作製し、抗 c-myc 抗体を用いて解析を行った。C 末に GPI アンカーを有する 2 個のロプトリー分子は、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて作製した組換えタンパク質を用いて特異抗体を作製して解析を行った。複数のロプトリータン

パク質が実際にスポロゾイトにおいて発現していることをウエスタンブロッティング法により明らかにし、また蛍光抗体法、免疫電子顕微鏡法によってこれらのロプトリータンパク質がスポロゾイトのロプトリーに局在することを確認した。

G．研究発表

2．学会発表

徳永順士、村田英理、坪井敬文、石野智子、
鳥居本美　マラリア原虫スポロゾイトの
ロプトリータンパク質の同定と発現解析
第81回日本寄生虫学会、西宮市、2012年3
月23-24日

Tokunaga T, Nozaki M, Murata E, Tsuboi T,
Ishino T, Torii M Screening for
sporozoite rhoptry proteins in *Plasmodium*.
Malaria, Keystone symposia on Molecular
and Cellular Biology. New Orleans, USA,
January 20-25, 2013

H．知的財産権の出願・登録状況

特記すべきものはない