

## 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

#### マラリア原虫感染赤血球膜タンパク質輸送の解析

研究協力者 長崎大学・熱帯医学研究所・原虫学分野 金子 修

#### 研究要旨

マラリアの中でも最も危険な悪性マラリアを引き起こす熱帯熱マラリア原虫は、病原性に関わる接着分子等を感染赤血球内に形成するマウレル裂と呼ばれる膜構造物を経て赤血球表面に輸送する。原虫分子の輸送を阻害することで病原性を軽減できるため、この分子輸送機構の解明は重要な研究課題である。マウレル裂と感染赤血球表面に局在する接着分子候補で surf 多重遺伝子族がコードする SURFIN は、熱帯熱マラリア原虫以外のマラリア原虫種にも相同体が存在し、かつ感染赤血球に局在する唯一の分子であるため、本研究では、その中でも転写量が最も多いにもかかわらず、感染赤血球へは輸送されないと報告されていた SURFIN<sub>4.1</sub> について再評価を行った。その結果、組換えタンパク質 SURFIN<sub>4.1</sub> は感染赤血球へ輸送されており、その輸送にはアミノ末端側配列が必須で、かつ膜貫通領域周辺配列が輸送効率に大きく影響することがわかった。

#### A. 研究目的

マラリアはいまだに熱帯・亜熱帯地域を中心に世界に蔓延し、早急に対策を進めるべき問題である。マラリアの中でも最も危険な悪性マラリアを引き起こす熱帯熱マラリア原虫は、病原性に関わる接着分子等を感染赤血球内に形成するマウレル裂と呼ばれる膜構造物を経て赤血球表面に輸送する。原虫分子の輸送を阻害することで病原性を軽減できるため、この分子輸送機構の解明は重要な研究課題である。マウレル裂と感染赤血球表面に局在する接着分子候補で surface-associated interspersed gene (surf) 多重遺伝子族がコードする一回膜貫通型タンパク質 SURFIN は、熱帯熱マラリア原虫以外のマラリア原虫種にも相同体が存在し、かつ感染赤血球に局在する唯一の分子であるため、本研究では、マラリア原虫種を通じて保存された輸送機序を明らかにする事を念頭に、SURFIN<sub>4.1</sub> と呼ばれるメンバーについて、その局在を再評価し、マウレル裂への輸送に必要な領域を明らかにすることとした。

#### B. 研究方法

SURFIN<sub>4.1</sub> の相補的 DNA の塩基配列を複数の原虫株において決定した。SURFIN<sub>4.1</sub> の全長を Ty タグ配列と緑色蛍光タンパク質(GFP)と融合した組換え全長 SURFIN<sub>4.1</sub> を発現する組換え熱帯熱マラリア原虫、組換え全長 SURFIN<sub>4.1</sub> から種々の領域を除去した組換え部分 SURFIN<sub>4.1</sub> を発現する原虫、さらに、細胞膜領域周辺の配列を SURFIN とは関係のないタンパク質の相当領域と入れ替えた組換え SURFIN<sub>4.1</sub> を発現する原虫を作製した。間接蛍光抗体法により、組換え SURFIN<sub>4.1</sub> と種々の局在マーカーの共局在を検討した。精製した原虫虫体からトリトン X-100 により抽出した膜タンパク質を免疫沈降することによりタンパク質複合体形成を検討した。

#### C. 結果

□相補的 DNA の塩基配列の再評価を行った結果、以前の報告とは異なり、SURFIN<sub>4.1</sub> は株により、細胞内領域に他の SURFIN 相同体との間で保存しているトリプトファンに富んだ領域を 2 つ含むものと全く含まないものとの

2種類があった。□3D7株の全長SURFIN<sub>4.1</sub>をタグタンパク質との融合タンパク質として発現させたところ、SURFIN<sub>4.1</sub>は感染赤血球へは輸送されていないとした以前の報告とは異なり、感染赤血球内のマウレル裂に局在した。□ブレフェルディンA処理により、粗面小胞体マーカーと共局在を示したため、SURFIN<sub>4.1</sub>は粗面小胞体を経て細胞外へ輸送されることが示唆された。□膜貫通領域は粗面小胞体への移行に必須であった。□SURFIN<sub>4.1</sub>の細胞外領域のシステインに富んだ領域とそれに続く相同体間で多様性に富んだ領域があると、内在性のSURFIN<sub>4.1</sub>と複合体を形成して、マウレル裂へ輸送されてしまうことが分かった。□アミノ末端側にマウレル裂へ輸送されるシグナルが2つ存在する事が分かった。□細胞膜貫通領域と直後の細胞内領域を関係のないタンパク質に置換すると、マウレル裂への輸送効率が落ちた。

#### D. 考察

熱帯熱マラリア原虫が感染赤血球内へ原虫分子を輸送するシグナルとして、輸送される分子のアミノ末端側疎水性領域と5つのアミノ酸からなる *Plasmodium* export element (PEXEL)と呼ばれるモチーフを用いる PEXEL 依存性輸送と、PEXEL モチーフを持たないアミノ末端領域と膜貫通領域を用いる PEXEL 非依存性輸送が知られている。本研究によりSURFIN<sub>4.1</sub>は原虫内では粗面小胞体を経由する古典的分泌経路を用い、マウレル裂への輸送はPEXELモチーフに依存しないものの、アミノ末端領域を必要とし、膜貫通領域が輸送効率に大きく影響することが明らかとなり、SURFIN<sub>4.1</sub>の輸送は既知のPEXEL非依存性輸送と同じ特徴を持つ事が明らかとなった。

#### E. 結論

熱帯熱マラリア原虫以外のマラリア原虫種にも相同体が存在し、かつ感染赤血球に局在する唯一の分子であるSURFINの輸送がPEXEL非依存性輸送と同じ特徴を持つことは、マラリア原虫の赤血球へのタンパク質輸送においてPEXEL非依存性輸送がより古典的である事を意味するのかもしれない。

#### G. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 和文論文

金子修 ノーベル賞の医学の進歩・発展(3) マラリア原虫発見の歴史と今日的課題 最新医学 pp 2828-2830 (2012年67巻12号)

#### 英文論文

Asada M, Goto Y, Yahata K, Yokoyama N, Kawai S, Inoue N, **Kaneko O**, Kawazu S-I. Gliding motility of *Babesia bovis* merozoites visualized by time-lapse video microscopy. *PLoS ONE* 7(4):e352272012 (2012/04).

Tang J, Dai Y, Zhang H, Culleton R1, Liu Y, Zhao S, Wang X, Guan X, **Kaneko O**, Zhu Y. Positive diversifying selection on *Plasmodium vivax* RON2 protein. *Parasitology* 139(6):709-15 (2012/05)

Kaewthamasorn M, Yahata K, Alexandre JSF, Xangsayarath P, Nakazawa S, Torii M, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, **Kaneko O**. Stable allele frequency distribution of the polymorphic region of SURFIN<sub>4.2</sub> in *Plasmodium falciparum* isolates from Thailand. *Parasitol International* 61(2):317-23 (2012/06)

Inoue M, Tang J, Miyakoda M, **Kaneko O**, Yui K, Culleton R. The species specificity of immunity generated by live whole organism immunization with erythrocytic and pre-erythrocytic stages of rodent malaria parasites and implications for vaccine development *Int J Parasitol* 42(9):859-70 (2012/08).

Alexandre JSF, Xangsayarath P, Kaewthamasorn, Yahata K, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, **Kaneko O**. Stable allele frequency distribution of the *Plasmodium falciparum* *clag* genes encoding components of the high molecular weight rhopty protein complex. *Trop Med Health* 40(3):71-7 (2012/09).

Xangsayarath P, Kaewthamasorn K, Yahata K, Nakazawa S, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, **Kaneko O**. Positive diversifying selection on the *Plasmodium falciparum* *surf*<sub>4.1</sub> gene in Thailand. *Trop Med Health* 40(3):79-89 (2012/09).

Tachibana S, Sullivan SA, Kawai S, Nakamura S, Kim HR, Goto N, Arisue N, Palacpac NMQ, Honma H, Yagi M, Tougan T, Katakai Y, **Kaneko**

**O.** Mita T, Kita K, Yasutomi Y, Sutton PL, Shakhbatyan R, Horii T, Yasunaga T, Barnwell JW, Escalante AA, Carlton JM, Tanabe K. *Plasmodium cynomolgi* genome sequences provide insight into *Plasmodium vivax* and the monkey malaria clade. *Nat Genet* 44(9):1051-5 (2012/09).

Zhao H, Konishi A, Fujita Y, Yagi M, Ohata K, Aoshi T, Itagaki S, Sato S, Narita H, Abdelgelil NH, Inoue M, Culleton R, **Kaneko O.** Nakagawa A, Horii T, Akira S, Ishii KJ, Coban C. Lipocalin 2 bolsters innate and adaptive immune responses to blood-stage malaria infection by reinforcing host iron metabolism. *Cell Host & Microbe* 12(5), 705-16 (2012/11)

Morita M, Sanai H, Hiramoto A, Sato A, Hiraoka O, Sakura T, **Kaneko O.** Masuyama A, Nojima M, Wataya Y, Kim H-S. *Plasmodium falciparum* endoplasmic reticulum-resident calcium binding protein is a possible target of synthetic antimalarial endoperoxides, N-89 and N-251. *J Proteome Res* 11(12):5704-11 (2012/12)

Yahata K, Treeck M, Culleton R, Gilberger TW, **Kaneko O.** Time-lapse imaging of red blood cell invasion by the rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii*. *PLoS ONE* 7(12):e50780 (2012/12)

Sakura T, Yahata K, **Kaneko O.** The upstream sequence segment of the C-terminal cysteine-rich domain is required for microneme trafficking of *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen 175. *Parasitol Int* 62(2):157-64 (2012/12)

Zhu XT, Yahata K, Alexandre JSF, Tsuboi T, **Kaneko O.** The N-terminal segment of *Plasmodium falciparum* SURFIN<sub>4.1</sub> is required for its trafficking to the red blood cell cytosol through the endoplasmic reticulum. *Parasitol Int* 62(2):215-29 (2012/12)

## 2. 学会発表

Mutungi JK, Kaewthamasorn M, Culleton R, Sakaguchi M, Yahata K, **Kaneko O.** Expression of PyRON5, a *Plasmodium yoelii* rhoptry neck protein in merozoite and sporozoite. (oral) The 15<sup>th</sup> Japan-Korea Parasitologists' Seminar, Miyazaki Aoshima Palmbeach Hotel, Miyazaki, Japan (2012. May. 23-25)

**金子修**. 共生非依存的に進化したオルガネラによるマトリョーシカ化機構。(oral) 第1回マトリョーシカ型生物学研究会、国立感染症研究所、東京 (2012. July. 20-22)

Xangsayarath P, Kaewthamasorn M, Yahata K, Nakazawa S, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, **Kaneko O.** Positive diversifying selection on the *Plasmodium falciparum* surf<sub>4.1</sub> gene in Thailand. (poster) 第53回日本熱帯医学会大会、とかちプラザ、北海道 (2012. Sep. 5-6)

Jiang N, Sakaguchi M, Alexandre J, Yahata K, Tsuboi T, Chen Q, **Kaneko O.** Role of the C-terminal region of *Plasmodium falciparum* antigen 332 on the location in the parasite-infected red blood cell. (poster) 2012 (23<sup>rd</sup>) Annual Molecular Parasitology Meeting, Marine Biological Laboratory, Woods Hole, USA (2012. Sep. 22-26)

Sakura T, Yahata K, **Kaneko O.** Involvement of the upstream of C-terminal cysteine-rich domain in the microneme trafficking of erythrocyte binding antigen-175 in *Plasmodium falciparum*. (poster) 2012 (23<sup>rd</sup>) Annual Molecular Parasitology Meeting, Marine Biological Laboratory, Woods Hole, USA (2012. Sep. 22-26)

Zhu X, Yahata K, Alexandre JSF, **Kaneko O.** Recombinant *Plasmodium falciparum* SURFIN<sub>4.1</sub> protein is exported to the parasite-infected red blood cell. (poster) 2012 (23<sup>rd</sup>) Annual Molecular Parasitology Meeting, Marine Biological Laboratory, Woods Hole, USA (2012. Sep. 22-26)

佐倉孝哉、矢幡一英、**金子修**. 熱帯熱マラリア原虫EBA-175のマイクロネーム輸送に必要な領域の同定。(oral) 第72回日本寄生虫学会東日本支部会、第10回分子寄生虫・マラリアフォーラム合同大会、群馬大学医学部、群馬 (2012. Oct. 12-13)

宮崎真也、Zhu X、矢幡一英、**金子修**. マラリア原虫の赤血球へのタンパク質輸送機構に関する研究。(oral) 第1回日本細胞共生学会若手の会、下田臨海実験センター、静岡 (2012. Nov. 7-9)

Zhu X, Yahata K, Alexandre JSF, **Kaneko O.**

Deciphering the export signal of *Plasmodium falciparum* protein exported to the parasite-infected red blood cell. (oral) The 6th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases and The 11th Nagasaki-Singapore Medical Symposium, Ryojun Auditorium, Nagasaki University, Nagasaki, Japan (2012. Dec. 10-12)

Lucky A, Yahata K, Iwata N, **Kaneko O**. Trafficking and assembly of malarial exported proteins in the *Plasmodium falciparum*-infected red blood cell. (poster) The 6th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases and The 11th Nagasaki-Singapore Medical Symposium, Ryojun Auditorium, Nagasaki University, Nagasaki, Japan (2012. Dec. 10-12)

Zhu X, Yahata K, Alexandre JSF, Tsuboi T, **Kaneko O**. The N-terminal segment of *Plasmodium falciparum* SURFIN<sub>4.1</sub> is required for its trafficking to the red blood cell cytosol through the endoplasmic reticulum. (poster) The 6th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases and The 11th Nagasaki-Singapore Medical Symposium, Ryojun Auditorium, Nagasaki University, Nagasaki, Japan (2012. Dec. 10-12)

Jiang N, Sakaguchi M, Alexandre J, Yahata K, Tsuboi T, Chen Q, **Kaneko O**. Role of the C-terminal region of *Plasmodium falciparum* antigen 332 on the location in the parasite-infected red blood cell. (poster) The 6th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases and The 11th Nagasaki-Singapore Medical Symposium, Ryojun Auditorium, Nagasaki University, Nagasaki, Japan (2012. Dec. 10-12)

Yahata K, **Kaneko O**. Time-lapse imaging of red blood cell invasion by rodent malaria parasites. (poster) The 6th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases and The 11th Nagasaki-Singapore Medical Symposium, Ryojun Auditorium, Nagasaki University, Nagasaki, Japan (2012. Dec. 10-12)

Asada M, Goto Y, Yamagishi J, Yahata K, Yokoyama N, Inoue N, **Kaneko O**, Kawazu S. *In vitro* imaging of gliding motility on *Babesia bovis* merozoites. (poster) The 6th Nagasaki

Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases and The 11th Nagasaki-Singapore Medical Symposium, Ryojun Auditorium, Nagasaki University, Nagasaki, Japan (2012. Dec. 10-12)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし