

マラリア原虫のヘモグロビン輸送・代謝の分子基盤

神戸大学 大学院・保健保健学研究科

国際保健学領域・感染症対策分野

入子 英幸

1. はじめに

マラリアは、熱帯・亜熱帯地域を中心に流行する寄生虫感染症である。その病原体は、マラリア原虫と呼ばれる寄生性の単細胞真核生物であり、特に、熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) により引き起こされる熱帯熱マラリアは致死性が高く、年間に60万人もの犠牲者を出している。マラリアによる死者数は、アルテミシニンを基軸とした多剤併用療法の普及により減少傾向にあるが、近年では、東南アジアにおいてアルテミシニン耐性原虫が出現しており、感染者の増加と流行地域の拡大が懸念されている。そのため、マラリア原虫の寄生適応の分子機構を解明し、新規薬剤やマラリアワクチンなどの有効なマラリア対策法の開発に繋げることが急務とされている。

マラリア原虫は、ヒトの体内において赤血球に侵入し、「寄生胞膜」に覆われた寄生胞のなかに身を潜めながら、ヘモグロビンをアミノ酸供給源として栄養源として発育・増殖を繰り返す。この寄生胞膜は宿主免疫などの攻撃から守る障壁として機能する一方で、マラリア原虫をヘモグロビンから隔離するという側面をもつ。そのため赤血球期マラリア原虫は、寄生胞膜と原虫細胞膜の2枚の膜を同時に内側に陥入させた「サイトストーム」と呼ばれる特徴的な構造を形成し、そこからヘモグロビンを細胞内に取り込んでいる。こうして取り込まれたヘモグロビンは、2枚の膜で構成された輸送小胞に内包され、代謝の場である「食胞」へと運ばれる。食胞は、原虫特有のプロテアーゼ群・遊離ヘム重合化分子を含む酸性単膜オルガネラであり、主にマラリア原虫のヘモグロビン代謝を担っている。これまで食胞およびヘモグロビン代謝経路は、キニーネやクロロキンなどのマラリア治療薬の標的となるため注目を集めてきたが、ヘモグロビンの取り込み・輸送の分子機構は全く明らかにされていない。そこで本研究では、ヘモグロビン輸送過程を免疫電顕法を用いて詳細に観察する事を目的とし、まず始めにヘモグロビン取り込みの指標分子の同定を試みた。

2. 方法

(1) 赤血球期マラリア原虫の寄生胞膜分子の選択

赤血球期マラリア原虫の寄生胞膜に発現する分子群のなかには、ヘモグロビン輸送の指標となる分子があると考えた。そこで、熱帯熱マラリア原虫のゲノム統合データベース (PlasmoDB: <http://plasmodb.org/plasmo/>) を用いて、赤血球期マラリア原虫の寄生胞膜に発現すると予想される分子群を検索した。

(2) コムギ胚芽無細胞系を用いた組換えタンパク質の発現および特異抗体の作成

熱帯熱マラリア原虫は、ゲノムのAT含有量が平均78%と非常に高く、真核細胞型のタンパク質のフォールディングを行い、タンパク質の糖鎖付加が起らないなど、特徴のある生物であり、大腸菌や酵母などのタンパク質合成系では組換えタンパク質の発現が出来ないことが多い。そこで、これらの条件を兼ね備え、高効率で熱帯熱マラリア原虫の組換えタンパク質発現が可能なコムギ胚芽無細胞系を用いてタンパク質を合成した(参考1)。まず、熱帯熱マラリア原虫のcDNAを鋳型とし、候補分子の特異的プライマーを用いてRTP-PCRを行い、増幅した遺伝子産物をコムギ胚芽無細胞系ベクター (pEU-E01-GST-TEV-N2) にクローニングし、GST融合型組換えタンパク質発現コンストラクトを作成した。合成した組換えタンパク質は、グルタチオンセファロースビーズを用いて精製した。精製タンパク質を抗原として、フロイントアジュバントを用いてマウス、ウサギに免疫し、特異抗血清を作製した。

(3) 間接蛍光抗体法

ヒト赤血球を用いて同調培養した熱帯熱マラリア原虫 (3D7株) を用いて塗抹標本を作製し、それを抗原として間接蛍光抗体法を行い、寄生胞膜分子のタンパク質発現時期を解析した。ヒト赤血球は、日本赤十字社より譲渡された血液を使用した。譲渡血液の使用については、「献血血液の研究開発等での使用に関する指針」に基づく公募の申請課題として承認を受けている(課題名: 熱帯熱マラリア原虫の細胞内物質輸送機構の解析、受付番号: 27J0018)。まず、塗抹標本を10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で5分間、氷上で固定し、PBSで洗浄後、寄生胞膜分子の特異抗血清と37°C、1時間反応させた。その後、PBSで洗浄し、蛍光標識二次抗体 (抗ウサギ IgG-Alexa488) と反応させ、蛍光顕微鏡 (AxioVert-A1, カールツァイス) を用いて解析した。

(4) 免疫電顕法

同調培養した熱帯熱マラリア原虫(3D7株)を1% パラホルムアルデヒド/0.3 % グルタルアルデヒド混合液で30分間、氷上で固定し、アルコール系列で脱水後、LR-white樹脂で42°C、5日間重合した。作製したブロックを用いて、ミクロトーム(Reichert Ultracut S1, ライカ)により厚さ60 nmの超薄切片を作製した。免疫染色は、5% スキムミルクでブロッキング(37°C, 1時間)し、一次抗体(特異抗血清、100倍希釈、4°C, 12時間)と反応させた後、金粒子標識二次抗体(抗ウサギIgG-15nm Gold)と反応させた。電子顕微鏡観察は、透過型電子顕微鏡(HT-7100, 日立)を用いて行い、CCDカメラ(C4742-95, 浜松フォトニクス)を用いて画像を取得した。

3. 結果

(1) 赤血球期マラリア原虫の寄生胞膜分子の選択

遺伝子発現時期および先行論文の記載から候補分子として、EXported Protein 1, 2 (EXP2, EXP2), Early TRAnscribed Membrane Proteinファミリー (ETRAMPファミリー: 14分子)の計16分子を選択した。これまでの著者らの研究により、EXported Protein 1, 2 (EXP2, EXP2)の特異抗血清は既に作製済みであり、免疫電顕において良好な反応を示すことを確認していたため、これらを陽性コントロールとして以降の実験に用いた。

(2) 寄生胞膜分子の組換えタンパク質合成および抗血清の作製

コムギ胚芽無細胞系により、前述した16種類の寄生胞膜分子の組換えタンパク質を合成した。これらの組換えタンパク質は全て可溶性画分として回収することができたことから、マウス、ウサギに免疫し、特異抗血清を作製した。作製した抗血清は、ウエスタンブロットおよび間接蛍光抗体法により、目的とする原虫タンパク質に特異的に反応することを確認した。

(3) 赤血球期マラリア原虫の寄生胞膜分子の発現時期

熱帯熱マラリア原虫(3D7株)を高度に同調培養し、赤血球侵入から8時間ごとに6回のサンプリング(赤血球侵入からの経過時間が0, 8, 16, 24, 32, 40時間)を行い、それぞれの塗抹標本を作製した。得られた標本を用いて、16種類の寄生胞膜分子に対する特異抗血清による間接蛍光抗体法を行い、タンパク質の発現時期を解析したところ、赤血球侵入直後から破裂までの赤血球期全体に発現するものが4分子(EXP1, EXP2, ETRAMPファミリー2分子)、赤血球侵入直後に発現するものが5分子(ETRAMPファミリー5分子)、赤血球侵入後16-24時間に発現するもの1分子(ETRAMPファミリー1分子)であることが明らかになった。また残りのETRAMPファミリー6分子は、赤血球期での発現は確認されず、肝臓および蚊ステージにおいて発現する分子であることが示唆された。

(4) ヘモグロビン輸送過程における寄生胞膜動態の解析

赤血球期マラリア原虫のヘモグロビン代謝は、赤血球侵入後16-24時間程度のトロホゾイト期において最も活発であることから、この時期に特異的に発現するETRAMP4に着目し、免疫電顕法を用いて詳細な分子局在の解析を行った。その結果、ETRAMP4は、初期トロホゾイト期の寄生胞膜に局在し、サイトストームおよび輸送小胞に移行することが明らかになった。さらに、輸送小胞と食胞の融合過程を観察したところ、初めに、輸送小胞の原虫細胞膜由来の膜と食胞膜の膜融合が起こり、次いで、寄生胞膜由来の膜が崩壊することが明らかになった。また、食胞内部には、抗ETRAMP4抗体に反応を示す膜の残骸が確認され、寄生胞膜由来の膜は食胞内部で分解されることが示された(論文投稿準備中)。また、赤血球期全体に発現するETRAMP5や生殖母体期に特異的に発現するETRAMP10.3についても、免疫電顕による解析を行ったところ、これらの分子もサイトストームおよび輸送小胞に局在することが明らかとなり、ETRAMPファミリーがヘモグロビン輸送の指標となる可能性が示唆された。

4. 考察 まとめ

赤血球期マラリア原虫において、ヘモグロビンの取り込み・輸送、代謝は、赤血球内での寄生適応を支える重要な仕組みである。その分子基盤の解明は、寄生現象の解明に寄与するだけでなく、新規マラリア治療薬の開発に繋がるなど応用面における広がり期待できる。マラリア原虫のヘモグロビン輸送に関わる膜構造は、1970年代に透過型電子顕微鏡による形態観察により報告されていたが、免疫電顕による分子局在の解析が進まず、指標となる分子は同定されていなかった。これは、マラリア原虫の組換えタンパク質発現が困難であり、反応性の高い特異抗体を作製できなかったことに起因している。本研究ではコムギ無細胞タンパク質合成系を用いることで、この問題を解決し、ETRAMP4が赤血球期の熱帯熱マラリア原虫におけるヘモグロビン輸送の指標となることを明らかにした。さらに本分子を指標としてヘモグロビン輸送過程を電子顕微鏡レベルで観察することに成功した。また、赤血球期全体および生殖母体期におけるヘモグロビン輸送の指標分子(ETRAMP5, 10.3)を同定することが出来た。今後は、ヘモグロビン輸送過程における膜動態の詳細を明らかにすると共に、これらの指標分子の遺伝子改変原虫を作製し、ヘモグロビン輸送における機能解析を行う予定である。

5. 発表論文、参考文献

- (1) Tsuboi T, Takeo S, Iriko H, Jin L, Tsuchimochi M, Matsuda S, Han ET, Otsuki H, Kaneko O, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, Sawasaki T, Torii M, Endo Y. Wheat germ cell-free system-based production of malaria proteins for discovery of novel vaccine candidates. *Infect Immun.* (2008) 76(4):1702-1708.
- (2) Aguiar JC, Bolton J, Wanga J, Sacci JB, Iriko H, Mazeika JK, Han ET, Limbach K, Patterson NB, Sedegah M, Cruz AM, Tsuboi T, Hoffman SL, Carucci D, Hollingdale MR, Villasante ED, Richie TL. Discovery of Novel *Plasmodium falciparum* Pre-Erythrocytic Antigens for Vaccine Development. *PLoS One.* (2015) 10(8):e0136109.
- (3) Tachibana M, Suwanabun N, Kaneko O, Iriko H, Otsuki H, Sattabongkot J, Kaneko A, Herrera S, Torii M, Tsuboi T. *Plasmodium vivax* gametocyte proteins, Pvs48/45 and Pvs47, induce transmission-reducing antibodies by DNA immunization. *Vaccine.* (2015) 33(16):1901-1908.