

様式3

令和元年度愛媛大学プロテオサイエンスセンター共同研究報告書

令和2年3月6日

国立大学法人愛媛大学
プロテオサイエンスセンター長 殿

研究代表者

所属機関 : 神戸大学

部局・職名 : 保健学研究科・准教授

氏名 : 入子 英幸

1. 研究課題

熱帯熱マラリア原虫・生殖母体期の寄生胞膜タンパク質のスクリーニング

2. 研究組織

氏名	所属機関・部局	職名	分担内容
研究代表者 入子 英幸	神戸大学・保健学 研究科	准教授	原虫培養、間接蛍光抗体法および免疫 電顕法、論文作成、研究総括
研究分担者 面田 彩馨	神戸大学・保健学 研究科	大学院生	間接蛍光抗体法
石野 智子	愛媛大学・プロテ オサイエンスセンタ ー・寄生病原体学	准教授	論文作成、研究総括

3. 研究成果

別紙のとおり

熱帯熱マラリア原虫・生殖母体期の寄生胞膜タンパク質のスクリーニング

神戸大学大学院 保健学研究科・准教授・入子英幸

研究目的

熱帯熱マラリア原虫は、赤血球侵入時に虫体の周りに「寄生胞膜」を形成する。熱帯熱マラリア原虫の感染赤血球の表面には、ノブと呼ばれる突起状の構造体が形成され、血管内皮細胞に接着性をもつ PfEMP1 (*P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1)などの原虫タンパク質が発現する。赤血球表面への原虫タンパク質の輸送には、寄生胞膜上の *Plasmodium* translocon of exported proteins (PTEX) というトランスロコン複合体が透過装置としての役割を担っている。

赤血球における熱帯熱マラリア原虫は増殖、感染を繰り返す無性生殖期と雌雄に分化し有性生殖へと備える生殖母体期に大別できる。無性生殖期では成熟に伴い感染赤血球表面に接着分子が発現し、血管内皮細胞へと接着するため、末梢血中には未成熟な原虫(リング期)のみが観察される。一方、生殖母体期では、未成熟な段階では接着しているが、成熟すると接着が剥がれ末梢血中に観察される。このことから、生殖母体期では感染赤血球表面への接着タンパク質の輸送に加えて、接着を解除するための原虫タンパク質の輸送が行われていると予想される。本研究では、無性生殖期と生殖母体期の接着性の違いを解明することを目的として、(1)PTEX トランスロコン複合体を構成する PTEX150、HSP101、EXP2、(2)赤血球表面へのタンパク質輸送の中継点となるモーラークレフトの指標分子 SBP1 に着目して、これらのタンパク質の発現及び局在を、無性生殖期と生殖母体間で比較した。

研究内容

マラリアゲノム統合データベースより、PTEX トランスロコン複合体の構成タンパク質 3 種類 (PTEX150, HSP101, EXP2: EXported Protein 2) およびモーラークレフト局在タンパク質 1 種類, SBP1: Skeleton binding protein 1) を選択し、コムギ胚芽無細胞系を用いた組換えタンパク質の合成、特異抗血清の作成を行った。次に、Pfs16 抗体を生殖母体の指標とし間接蛍光抗体法を行い、無性生殖期と生殖母体間の各発育段階における発現及び局在を調べた。

研究成果

(1) 無性生殖期における PTEX トランスロコン複合体・構成タンパク質の発現解析

PTEX150, HSP101, EXP2 の特異抗血清を用いた間接蛍光抗体法により、熱帯熱マラリア原虫の無性生殖期における発現を解析した。無性生殖期は Pfs16 を発現しないことから、間接蛍光抗体法により Pfs16 陰性の原虫を対象とし、形態的特徴からリング期(単核、ヘモゾインなし)、トロホゾイト期(単核、ヘモゾインあり)、シゾント期(複数の核、ヘモゾインあり)の3段階に区分した。PTEX150, HSP101, EXP2 は、リング期、トロホゾイト期、シゾント期において、原虫周囲への発現が確認された。

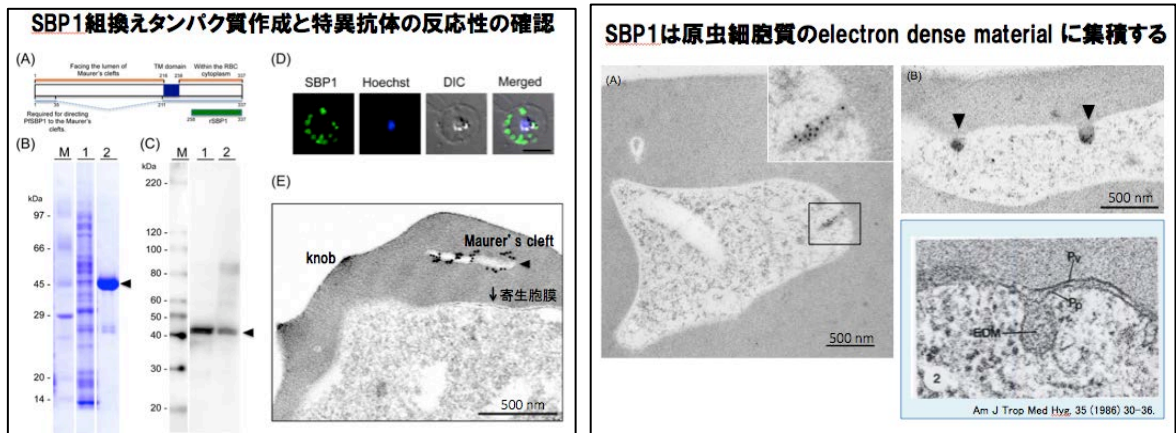
(2) 生殖母体期における PTEX トランスロコン複合体・構成タンパク質の発現解析

生殖母体期の指標として Pfs16 抗体を用いて、PTEX150, HSP101, EXP2 の生殖母体期における発現を解析した。生殖母体は、約 2 週間をかけて成熟し、形態的特徴により、円形型のステージ1、楕円球型のステージ2、棒状型のステージ3、紡錘型のステージ4、両端が丸みを帯び湾曲したバナナ型のステージ5、の5段階に大別される。そのため、間接蛍光抗体法による Pfs16 陽性像の確認し、形態的特徴による発育段階判別を行った。HSP101 は、ステージ1の原虫周囲に強い蛍光が確認されたが、ステージ2では減弱し、ステージ3以降では確認されなかった。EXP2 は、ステージ1、2の原虫周囲に強い蛍光が確認されたが、ステージ3以降では確認されなかった。PTEX150 は、ステージ1から3の原虫周囲に強い蛍光が確認され、ステージ4、5においても減弱した蛍光が観察された。

(3) 無性生殖期・生殖母体期におけるモーラークレフト局在タンパク質 SBP1 の発現解析

SBP1 特異抗血清を用いた間接蛍光抗体法により、熱帯熱マラリア原虫の無性生殖期・生殖母体期における発現時期、局在を解析した。無性生殖期では、リング期、トロホゾイト期、シゾント期において、感染赤血球の細胞質にドット状の光点が確認された。赤血球侵入の初期段階における SBP1 の局在を免疫電顕法により詳細に解析したところ、初期トロホゾイト期の原虫細胞質の electron dense material と呼ばれる電子密度が高い部位に SBP1 の局在を示す金粒子の蓄積が観察された。また、金粒子は、寄生胞スペースにみられる electron dense material、寄生胞膜から伸長した膜構造の周囲にも付着していた。以上の結果から、SBP1 は electron dense material に集積し、Maurer's cleft へと輸送されることが明らかになった(成果発表1)。現在、生殖母体期における SBP1 の局在解析を行な

っている。



今後の課題

熱帯熱マラリア原虫のトランスロコン複合体の構成分子、モーラークレフト分子の特異抗体セットは、原虫タンパク質の輸送を研究するための有用なツールとなる。今後は、免疫電顕法を軸とした解析により、生殖母体期における原虫タンパク質輸送の研究を進めていく予定である。

成果発表

(1) H. Iriko, T. Ishino, M. Tachibana, A. Omoda, M. Torii, T. Tsuboi, Skeleton binding protein 1 (SBP1) of *Plasmodium falciparum* accumulates in electron-dense material before passing through the parasitophorous vacuole membrane, Parasitol. Int. 75 (2020) 102003-4. doi:10.1016/j.parint.2019.102003.