

様式3

令和2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3年3月3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(*Plasmodium falciparum*)は、ヒト血流中において赤血球に寄生し、発育・増殖を繰り返す。このサイクルにおいて、一部の原虫は蚊体内における有性生殖に向けて「生殖母体」と呼ばれるステージに変化する。熱帯熱マラリア原虫の生殖母体は、他のマラリア原虫種と比較して、形態的にも、また発育に極めて時間がかかるという点でも特徴的である。しかしながら、発育ステージ分類などの基盤情報は形態的な記述にとどまり、分子レベルの解析がほとんど行われていないのが現状である。

そこで本研究では、熱帯熱マラリア原虫の生殖母体期において、発育ステージ分類の指標となるタンパク質を見出すことを目的とした。特に、原虫と宿主細胞(赤血球)のインターフェースとなる寄生胞膜に着目し、寄生胞膜に局在する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

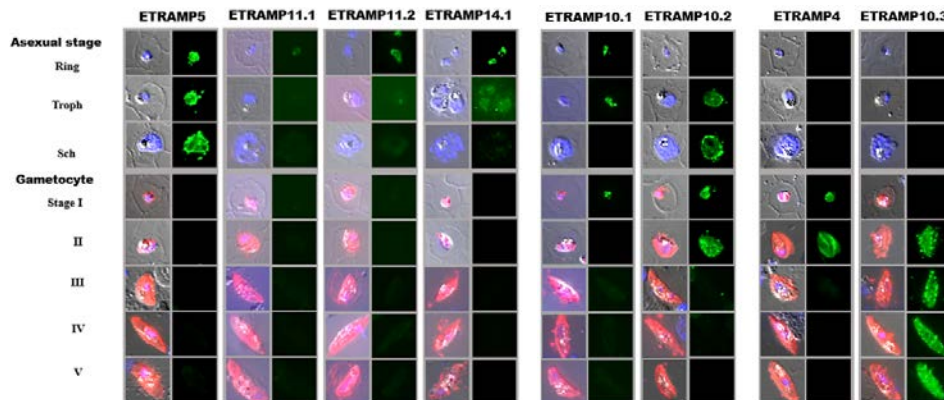
マラリアゲノム統合データベースより①寄生胞膜の主要な構成タンパク質である ETRAMP (Early Transcribed Membrane Protein) ファミリー14 分子、②寄生胞膜に形成される *Plasmodium* translocon of exported proteins (PTEX) トランスロコン複合体、③赤血球表面へのタンパク質輸送の中継点となる Maurer's cleft の指標分子 SBP1 (Skeleton binding protein 1) に着目し、コムギ胚芽無細胞系を用いた組換えタンパク質の合成、特異抗血清の作成を行った。次に、これらの特異抗体と生殖母体の指標である Pfs16 抗体を用いた間接蛍光抗体法(二重染色)を行い、無性生殖期と生殖母体間の各発育段階における寄生胞膜分子の発現及び局在を調べた。

研究成果

本研究では、コムギ胚芽無細胞系タンパク質合成系を技術基盤として、寄生胞膜関連分子の特異抗体セットを作成し、熱帯熱マラリア原虫・生殖母体期の寄生胞膜関連タンパク質のスクリーニング系を確立した。

①生殖母体期における寄生胞膜関連分子の発現プロファイル解析

寄生胞膜の主要な構成タンパク質である EXP1 (Exported Protein 1)、ETRAMP (Early Transcribed Membrane Protein) ファミリー14 分子の特異抗体を用いて、間接蛍光抗体法による発現時期の解析を行った。EXP1 は、リング期からシゾン期までの全ての無性生殖期の寄生胞膜に発現し、メロゾイトではデンスグラニュールに局在することが明らかになった(論文1)。ETRAMP ファミリーは、赤血球寄生ステージにおいて8 分子(ETRAMP4, 5, 10.1, 10.2, 10.3, 11.1, 11.2, 14.1)の発現が確認された。さらに、無性生殖期、生殖母体期の各発育ステージを対象として、詳細な発現プロファイル解析を行った結果、ETRAMP ファミリーには (i)無性生殖期のみが発現するもの、(ii)無性生殖期と生殖母体期の両方で発現するもの、(iii)生殖母体期のみが発現するもの、の3 つに大別されることが明らかになった。



②PTEXトランスロコン複合体の構成分子の発現プロファイル解析

寄生胞膜に形成される PTEX トランスロコン複合体を構成する3種類のタンパク質 PTEX150, HSP101 (Heat shock protein 101), EXP2 (Exported Protein 2) の特異抗体を用いて、間接蛍光抗体法による発現時期の解析を行った。

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

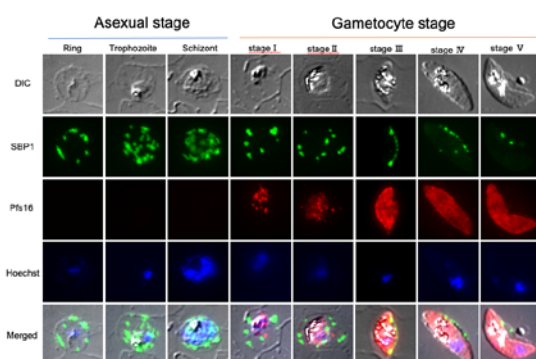
認められたが、ステージ3以降では確認されなかった。PTEX150 は、ステージ1から3の原虫周囲に強い蛍光が確認され、ステージ4、5においても減弱した蛍光が観察された。

③Maurer's cleft 局在タンパク質 SBP1 の発現プロファイル解析

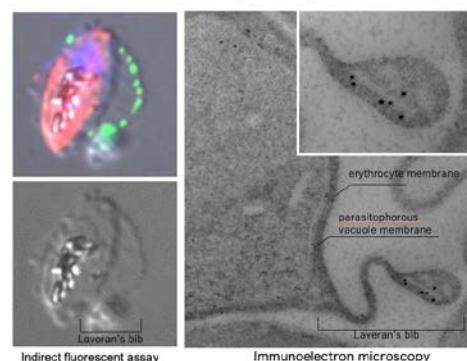
SBP1 特異抗血清を用いた間接蛍光抗体法により、熱帯熱マラリア原虫の無性生殖期・生殖母体期における発現時期、局在を解析した。無性生殖期では、リング期、トロホゾイト期、シizont期において、感染赤血球の細胞質にドット状の光点が確認された。赤血球侵入の初期段階における SBP1 の局在を免疫電顕法により詳細に解析したところ、初期トロホゾイト期の原虫細胞質の electron dense material と呼ばれる電子密度が高い部位に SBP1 の局在を示す金粒子の蓄積が観察された。また、金粒子は、寄生胞スペースにみられる寄生胞膜から伸長した膜構造の周囲にも付着しており、SBP1 は electron dense material に集積し、Maurer's cleft へ輸送されることが明らかになった(論文 2)。

生殖母体期における SBP1 特異抗血清を用いた間接蛍光抗体法では、未成熟段階(ステージ1, 2)では感染赤血球細胞質にドット状の光点、成熟段階(ステージ3~5)では感染赤血球膜近傍に偏在した光点が確認された。さらに、免疫電子顕微鏡法により SBP1 の分子局在を解析したところ、感染赤血球の Laveran's bib に Maurer's cleft が観察され、その周囲に二次抗体の結合を示す金コロイド粒子が確認された。以上の結果から、生殖母体感染赤血球の Maurer's cleft に SBP1 が局在することが明らかとなった。

Expression profile of SBP1 during *P. falciparum* erythrocytic stages



Localization of SBP1 in immature gametocytes infected erythrocyte



今後の課題

本研究により作出した寄生胞膜関連分子の特異抗体セットは、寄生胞膜タンパク質のスクリーニングに有用であり、熱帯熱マラリア原虫・生殖母体期の生物学的研究の基盤とな

ると考えられる。今後は、生殖母体期の感染赤血球の構造改変の仕組みを解明することを目的として、原虫タンパク質の機能解析を実施する予定である。

成果発表

1. 学術論文

- (1) Iriko H, Ishino T, Otsuki H, Ito D, Tachibana M, Torii M, Tsuboi T. *Plasmodium falciparum* Exported Protein 1 is localized to dense granules in merozoites. *Parasitol Int.* 67(5): 637–639. (2018).
- (2) 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.

2. 国際学会

- (1) Iriko H, Ishino T, Otsuki H, Tachibana M, Torii M, Tsuboi T. Morphological observation of parasitophorous vacuole membrane during hemoglobin uptake of *Plasmodium* gametocyte stages. COPA 2018:14th International congress of parasitology. Daegu, Korea (2018).
- (2) Omoda A, Kulamahan J, Yamasaki N, Tachibana M, Ishino T, Torii M, Iriko H. Skeleton binding protein 1 (SBP1) of *Plasmodium falciparum* is localized in Maurer's cleft of gametocyte infected erythrocyte. 日本原生物学会 JSP/KSOP Joint Online Meeting. (2020).

3. 国内学会

- (1) 入子英幸、橘真由美、石野智子、大槻 均、鳥居本美、坪井敬文. ETRAMP4は熱帯熱マラリア原虫の生殖母体期に発現する寄生胞膜分子である. 第 87 回日本寄生虫学会大会. 東京都 (2018)
- (2) 入子英幸、山崎 望、大槻 均、石野智子、橘真由美、鳥居本美、坪井敬文. 熱帯熱マラリア原虫の寄生胞膜分子の発現プロファイル解析. 第26回分子寄生虫学ワークショップ／第16回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会. 愛媛県 (2018).
- (3) 入子英幸、山崎 望、大槻 均、石野智子、橘真由美、鳥居本美、坪井敬文. 熱帯

熱マラリア原虫の寄生胞膜分子の発現プロファイル解析. 第 88 回日本寄生虫学会大会. 長崎県(2019).

- (4) 面田彩馨、山崎 望、橘真由美、石野智子、鳥居本美、坪井敬文、入子英幸. 熱帯熱マラリア原虫・生殖母体期におけるモーラークレフト分子の発現プロファイル解析. 第27回分子寄生虫学ワークショップ／第17回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会. 愛媛県 (2019)
- (5) 入子英幸、面田彩馨、山崎 望、石野智子、橘真由美、鳥居本美、坪井敬文. 熱帯熱マラリア原虫の Skeleton binding protein 1(SBP1)は寄生胞膜通過前に electron dense material に集積する. 第27回分子寄生虫学ワークショップ／第17回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会. 愛媛県 (2019)
- (6) 面田 彩馨、山崎 望、橘 真由美、石野 智子、鳥居 本美、坪井 敬文、入子 英幸. 熱帯熱マラリア原虫・生殖母体期におけるモーラークレフト分子の発現プロファイル解析. 第 88 回日本寄生虫学会大会. 誌面開催 (2020).
- (7) 入子英幸、面田彩馨、石野智子、橘真由美、坪井敬文、鳥居本美. 熱帯熱マラリア原虫の Skeleton binding protein 1(SBP1)は寄生胞膜通過前に electron dense material に集積する. 第 88 回日本寄生虫学会大会. 誌面開催 (2020).