

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2月26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：東京医科歯科大学

部局・職名：大学院医歯学総合研究科・助教

氏名：新澤 直明

1. 研究課題

マラリア原虫の赤血球侵入メカニズムの解析

2. 研究組織

氏名	所属機関・部局	職名	分担内容
研究代表者 新澤 直明	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科	助教	遺伝子組換えマラリア原虫の作出
研究分担者 高島 英造	愛媛大学プロテオサイエンスセンターマラリア研究部門	准教授	組換え原虫を用いた表現型解析
森田将之	愛媛大学プロテオサイエンスセンターマラリア研究部門	講師	組換え原虫を用いた表現型解析

3. 研究成果

別紙のとおり

【目的】

マラリアは熱帯・亜熱帯地域において毎年 2 億人以上が罹患し、40 万人以上が死に至る重篤な寄生原虫感染症である。原因病原体であるマラリア原虫はヒト体内で赤血球への侵入と破壊を繰り返すことでマラリア症状を引き起こす。そのため赤血球侵入メカニズムの解明がマラリア発症阻止ワクチンや抗マラリア薬の開発に重要である。マラリア原虫の侵入型ステージであるメロゾイトによる赤血球への侵入は、感染赤血球からの脱出、新しい赤血球への接着、先端部の方向転換、寄生胞を伴った侵入、侵入後のステージ転換などのステップからなる複雑な現象である。この過程には、メロゾイト表面タンパク質や先端部小器官局在タンパク質、原虫膜下のモーター複合体など多数の分子が関与する。中でも先端部小器官は原虫特異的なタンパク質が多数内包されており、原虫侵入時に重要な役割を果たす。その一つである先端部小器官であるデンスグラニュールに内包される分子は赤血球侵入過程の後期に分泌されることが明らかになっているが、それらの赤血球侵入における機能が依然として不明である。デンスグラニュール分子の中でも RbgA に対する抗 RbgA 抗体が侵入阻害活性を示すことから、RbgA は赤血球侵入に重要な分子と考えられている。しかし、原虫生存に必須な侵入関連分子は遺伝子破壊による機能解析が不可能であり、RbgA もその例に漏れないことが予想される。そこで本研究では、CRISPR/Cas9 法を用いて化合物誘導性 RbgA コンディショナルノックダウン原虫を作出し、侵入時特異的に RbgA 遺伝子発現を減弱させることで、RbgA 遺伝子の赤血球侵入における機能解析を行う。PROS マラリア研究部門と共同で、作出した組換え原虫による赤血球侵入リアルタイムイメージングを行い、他の赤血球侵入関連分子の時空間挙動を観察することで、赤血球侵入における RbgA の機能を明らかにする。本研究を足がかりとして、DG 分子の赤血球侵入における役割解明を行っていく

【研究成果】

RbgA コンディショナルノックダウン原虫の作出

デンスグラニュール分子である RbgA のコンディショナルノックダウンには、Glucosamine 添加により遺伝子発現の減弱が可能となる glmS リボザイムを用いた (Prommana et al., *PLoS One* 2013)。glmS によるコンディショナルノックダ

ウン原虫作出のため、CRISPR/Cas9 法によって RbgA 遺伝子の終止コドン直下に glmS リボザイム配列を挿入した。CRISPR/Cas9 法は我々が独自に開発した Cas9 nuclease を恒常発現する組換え熱帯熱マラリア原虫株 (pfcas9) を用いた (論文投稿中)。pfcas9 を用いた CRISPR/Cas9 では、single guide RNA (sgRNA) 発現プラスミドと相同組換え修復用ドナーDNA の同時遺伝子導入による高効率なゲノム編集が可能である。RbgA 遺伝子の終止コドン付近をターゲットとする sgRNA と RbgA ORF の 3' 付近と 3' UTR 領域で glmS を挟んだドナーDNA を設計し、pfcas9 原虫に遺伝子導入を行った (図 1A)。その結果、遺伝子導入後 19 日目に genotyping PCR によって、組換え体 (*rbgA*-glmS) の検出に成功した。Genotyping PCR の結果では、野生型の残存は検出されなかったことから、組換え効率は 100% であった (図 1B)。

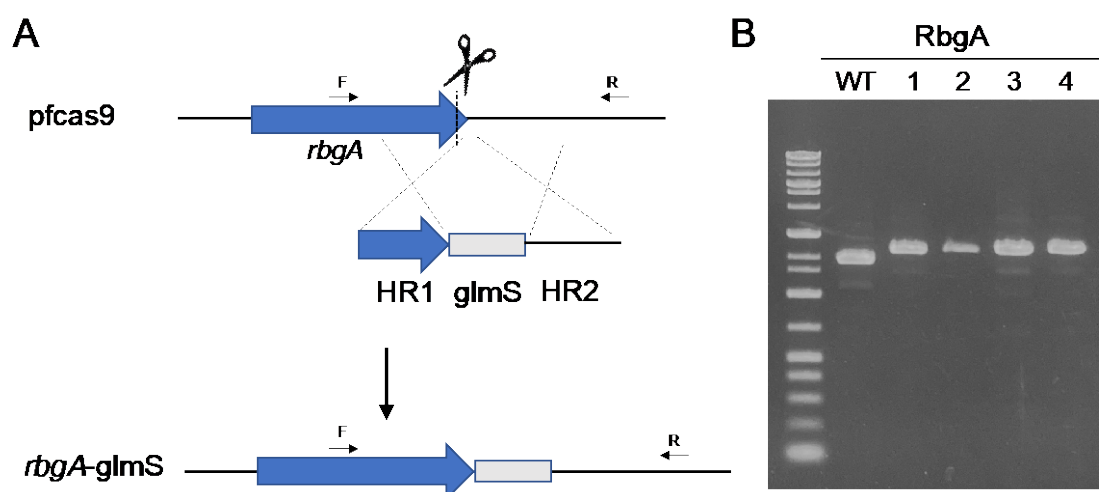


図 1 *rbgA*-glmS 原虫の作出

(A) pfcas9 を用いた CRISPR/Cas9 法による遺伝子組換えの概要。RbgA 遺伝子をターゲットとする sgRNA と glmS を含むドナーDNA を設計し、pfcas9 原虫に遺伝子導入し、RbgA 遺伝子終止コドン直下に glmS の挿入を行った。(B) Genotyping PCR による組換え体の検出。相同領域外側に設計したプライマーセットによる Genotyping PCR の電気泳動結果。WT は pfcas9 原虫、1 から 4 は組換え原虫を示す (培養フラスコ別)。

RbgA コンディショナルノックダウンのウエスタンブロッティングによる確認

限界希釈法により *rbgA*-glmS 原虫のクローン化を行った。シゾント期に同調した培養クローン (*rbgA*-glmS-5E) に 4 mM Glucosamine を添加し、そのまま 42 時間培養した。原虫感染赤血球を回収し、ウエスタンブロッティングにより RbgA タンパク質の検出を行った。その結果、コントロールと比較して当該タンパク質

の発現量に減弱は見られなかった。

【成果発表】

該当なし

【今後の課題】

今年度は Glucosamine による RbgA タンパク質のノックダウンは観察できなかった。glmS リボザイムシステムでは mRNA の分解により標的タンパク質の発現がノックダウンされる。そのため、今後の課題として *rbgA* mRNA の量的変化を検証する必要がある。また、添加する Glucosamine の濃度と作用させる時間について、さらなる検討を行う予定である。