

研究題目 マラリア原虫感染機構解明のための宿主細胞との相互作用解析

研究組織

研究代表者：石野 智子（東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 寄生虫学・熱帯医学分野）

共同研究者：小迫 英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：新澤 直明（東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 寄生虫学・熱帯医学分野）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

マラリア原虫は、2種類の感染型ステージ（メロゾイトとスポロゾイト）を持ち、それぞれ赤血球と肝細胞に寄生する。寄生成立を担う分子基盤は未だ多く未解明である。マラリア原虫の侵入関連分泌型タンパク質に BioID タグを融合させた遺伝子改変マラリア原虫を作出し、これをビオチン存在下で培養、あるいは宿主細胞に感染させることで、標的分子と相互作用する原虫、あるいは宿主細胞分子を同定する。これにより、マラリア原虫の感染機構を、宿主-寄生体相互作用の観点から明らかにすることを目的とする。

マラリア原虫の肝細胞感染関連分子は、申請者らのチームなどから複数報告されてきたが、宿主細胞との相互作用については、ほとんど解明されていない。原因の一つとして、マラリア原虫の特に肝臓感染ステージは、十分量の実験材料を得ることが極めて困難なため、生化学的な解析が適応できなかつたことが挙げられる。近年開発された、BioID による相互作用タンパク質の同定法は、上記の問題点を克服し、マラリア原虫の感染機構の理解を促進することが期待される。本研究では、特異性、感度ともに高いとされる AirID を用いる。本解析を実施するには、高感度の質量分析解析が欠かせず、高い技術と多くのご経験をお持ちの小迫先生にご協力いただくことで初めて遂行可能となる。挑戦的な本課題ではあるが、共同で取り組みば全く新しいマラリア原虫と宿主細胞との

相互作用解析へと切り込むことが十分可能と考える。

[1-2]研究の方法・経過

ネズミマラリア原虫 (*Plasmodium berghei*) の細胞侵入に関わる分泌型タンパク質群に、近位依存性ビオチン化酵素 AirID を融合した遺伝子改変原虫を作出する。今年度は、感染に関わる分泌型分子のうち、ロプトリーと呼ばれるオルガネラ内に局在する Rhoptry neck protein 4 (RON4) を選択した。私たちがすでに、肝細胞侵入に重要な役割を担うことを明らかにした原虫分子であり、材料を集めやすいメロゾイト期にも発現していること、他のロプトリー分子と複合体を形成することが免疫沈降法により示されているので、本実験系の確立に最適と考えた。加えて、肝細胞に侵入後に発現し、原虫と肝細胞を隔てる膜上に局在する原虫タンパク質 2 種類 (upregulated in infective sporozoites 4; UIS4, liver stage specific protein 1; LISP1) についても、同様に肝細胞側に露出していると予想される C 末端側に AirID タグを融合させた遺伝子改変原虫を作出した。

RON4-AirID, UIS4-AirID, LISP1-AirID については、内在性の遺伝子座と融合タンパク質発現コンストラクトを置換した遺伝子組換えネズミマラリア原虫を作出できた。それぞれのタンパク質と AirID の境に、エピトープタグを挿入し、融合タンパク質の発現を検出した。IFA により、それぞれ native なタンパク質と同様の

局在を示した。また、感染効率が野生型と同レベルであることから、タグ融合によるタンパク質機能への影響は大きくないと考えられた。

RON4 については、感染させた赤血球を、ビオチン、ATP 存在化で分裂期に同調させ、密度勾配遠心にて感染赤血球を精製した。UIS4, LISP1 については、遺伝子改変原虫を蚊に感染させ、唾液腺からスポロゾイトを回収後、肝癌由来培養細胞に添加し、ビオチンと共に 2 日間培養した。これらの原虫/宿主細胞タンパク質懸濁液を作成し、トリプシン処理後タマビジンビーズにてビオチン化ペプチドを精製し、質量分析解析を実施していただく。なお、陰性コントロールとして、局在の異なるタンパク質に同じタグを融合させたものを陰性コントロールとして作出し、同様に処理する。

研究の分担としては、東京医科歯科大学で、遺伝子改変原虫の作出、培養、感染実験を行い、タンパク質懸濁液まで作成したのちに送付し、小迫先生に質量分析をお願いする。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

RON4-AirID 発現マラリア原虫の分裂期のタンパク質懸濁液を用いて、質量分析解析を実施した。陰性コントロールとして用いた mCherry-AirID 発現原虫と比較して、有意に多く検出された原虫タンパク質が 37 種類得られた。RON4 は複合体を形成することが既に知られているが、その構成分子である RON2, RON5 もビオチン化されたタンパク質として検出され、本実験系の有用性が示された。さらに、これまで相互作用が報告されていない複数の新規分子も相互作用候補分子として見出された。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

今後は、得られた相互作用候補分子について、局在解析、近位ライゲーション法 (PLA 法) などにより、原虫内での相互作用を検証する。また、他のサンプルについても、同様に質量分析を実施していただき、相互作用候補分子の同定を進める予定である。

マラリア原虫は、哺乳類細胞に比べてとても小さく、また、特にスポロゾイトや、感染肝細胞を高い純度で十分量得ることは非常に困難なために、これまで生化学的な解析が大きく遅れてきた。本共同研究で採用した BioID 法は、免疫沈降法などと比べて、検出感度が高く、さらに細胞内の相互作用を反映する点で、本研究目的に最適であることが示された。今後はさらに、宿主細胞分子との相互作用解明へと展開させることで、原虫の寄生戦略の全貌解明につながることを期待できる。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

なし

[3-2]学会発表

1. 秋山桃歌、新澤直明、馬場みなみ、澤崎達也、小迫英尊、石野智子 「マラリア原虫肝細胞ステージの発育に関わる宿主側因子の探索」 第 93 回日本寄生虫学会大会、東京、2024 年
2. 新澤直明、窪田理恵、関根崇、Addo-Gyan Daniel, 小迫英尊、澤崎達也、石野智子 「新規ビオチン化酵素 AirID を用いた近位依存性ビオチン標識法による RON4 相互作用分子の同定」 第 93 回日本寄生虫学会大会、東京、2024 年

[3-3]成果資料等

なし

【4】今後の課題等

RON4 については、得られた相互作用候補分子のうち特に新規なものについて、原虫内での相互作用を局在解析や近位ライゲーション法などで検証する。ついで、相互作用分子の発現抑制原虫を作出することで、機能解析を行う。また、相互作用に関わる領域が同定できれば、そこに変異を導入することで、相互作用による役割を明らかにできる。他の分子については、引き続き質量分析解析をお願いしたい。また、原虫タンパク質のトポロジーを考慮し別の領域に AirID タグを融合する、あるいは、異なる BioID タグ(UltraID など)を検討し、宿主細胞との相互作用解明へと展開したい。