

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（東京科学大学 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（東京科学大学 医歯学総合研究科 寄生虫学・熱帯医学分野）

*2024 年 10 月に大学名が変更になりました。

【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。特にヒトへの感染成立段階である肝細胞寄生の分子基盤については、未だ多く未解明である。原因の一つとして、肝臓感染ステージ原虫（スポロゾイト）は、感染蚊の唾液腺からしか得られず、生化学的解析に十分量の実験材料を得ることが極めて困難なことが挙げられる。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全貌を解明することが期待される。前年度までに、材料がより得やすいメロゾイトステージを用いて同様の研究をスタートさせ、実験系を確立している。

私たちのこれまでの研究から、スポロゾイトの先端部小器官（ロプトリー）に内包される分泌型タンパク質の多くが、蚊の唾液腺侵入と哺乳類肝細胞感染の両方に重要であることが判明している。そこで、ビオチン化酵素の中でも感度が高く、かつ分子量が小さい ultraID を活用することで、スポロゾイトのロプトリーに局在するタンパク質を網羅的に探索しようとする。ネズミマラリア原虫（*Plasmodium berghei*）をモデルとして用い、スポロゾイトのロプトリーにおいて十分量発現することを報告した Rhoptry neck protein 12 (RON12) (Oda-Yokouchi, ..., Ishino*, 2019) を選択した。スポロゾイトは媒介蚊（*Anopheles stephensi*）の体内で形成され、唾液腺に集積する。研究代

表者らのチームは、マラリア原虫の遺伝子改変、蚊への感染、蚊からスポロゾイトの回収という全てのステップが実施可能である。さらに、高感度の質量分析解析が欠かせず、高い技術と豊かな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。

[1-2] 研究の方法・経過

ネズミマラリア原虫のスポロゾイトのロプトリーに局在する RON12 の C 末端側に、近位依存性ビオチン化酵素（ultraID）を融合された遺伝子改変原虫を作出する。RON12 と ultraID の境に、AGIA タグを挿入し、抗 AGIA 抗体により、融合タンパク質の発現を検出できるようにした。なお、対照群として、mcherry-ultraID を細胞質に発現させる組換え原虫を合わせて作成した。得られた遺伝子改変原虫をクローン化したのち、蚊に感染させて消化管上に形成されたスポロゾイトを単離し、western blotting を行ったところ、RON12-ultraID タンパク質の発現が検出できた。IFA により、RON12-ultraID が native RON12 と同様にロプトリーに局在することを見出した。

そこで、感染マウスを蚊に吸血させて 11 日目から 3 日間、ビオチンを砂糖水に混ぜたものを与えて、その後、スポロゾイトを単離した。懸濁液を SDS-PAGE で分離、膜に転写したのちストレプトアビジンで検出したところ、RON12-ultraID の自己ビオチン化と思われるバンドに加えて複数の特異的なシグナルが得られた。そこで、これらのスポロゾイトタンパ

ク質懸濁溶液を作成し、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いた。

研究の分担としては、東京科学大学で、遺伝子改変原虫の作出、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担っていただいた。ビオチン化される分子が同定されたら、それらのたんぱく質の局在を明らかにしたのち、機能欠損原虫の作出により感染機構の解明をめざす。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

RON12-ultraID 発現ネズミマラリア原虫スポロゾイト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比較して、有意に多く検出された原虫タンパク質が 56 種類得られた。その中には RON12 も含め、既知のロプトリー分子が 11 種類含まれていた。したがって、ロプトリー分子の網羅的探索として系が確立されたと判断できる。分泌シグナルを持つ局在不明の分子群の中から 6 種類選んでそれらの C 末端側に AGIA タグを融合させた遺伝子改変原虫を作出し、局在を解析した。その結果、1 種類 (Plasmodium rhoptry protein 1, PRP1) について、スポロゾイトに発現し、免疫電顕法によりロプトリーに局在することを新たに見出した。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

他の候補分子についても、局在解析を実施し、新規スポロゾイトロプトリーたんぱく質の網羅的な探索を展開する。また、ロプトリーへの局在が認められたものについては、生活環における発現解析など詳細な性状解析を実施する。ついで、薬剤誘導方式の遺伝子欠損原虫を作出し、新規ロプトリー分子のスポロゾイトにおける機能を明らかにする。これらの研究成果は、これまでとは異なり、近縁寄生原虫（トキソプラズマ）や、マラリア原虫の赤血球感染ステージには発現しない新規ロプトリー分子と、ステージ特異的な感染機構の解明につながることで期待される。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表

該当なし（現在 2 報準備中）

[3-2] 学会発表

Oundavong Sunti, Naoaki Shinzawa, Takashi Sekine, Tatsuya Sawasaki, Hidetaka Kosako, Tomoko Ishino. Screening for interaction proteins of Plasmodium RON3, an important secretory protein for malaria parasite proliferation in the blood stage. 2024.11.06

石野智子、新澤直明、Sunti Oundavong、窪田理恵、馬

場みなみ、小迫英尊、澤崎達也、マラリア原虫

の感染基盤を統合的に明らかにすることを目指して、

分子生物学会 2024.11.27 福岡

石野智子、Oundavong Sunti、鳥居本美、小迫英尊、

新澤直明 マラリア原虫スポロゾイトロプトリー分子

の網羅的探索 日本寄生虫学会 2025.3.17 大阪

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

今回、スポロゾイトに特異的に発現する新規ロプトリー分子を少なくとも一つ同定することができた。近接するタンパク質を高感度にビオチン化する ultraID を用いたことが、上記の新たな発見を導いたと考えられる。同様の方法で、スポロゾイトが肝細胞に侵入する際の肝細胞上レセプター分子、侵入関連分子の複合体、さらには、肝細胞侵入後の寄生胞膜上の宿主細胞分子との相互作用などを、探索していくことを企画している。BioID 法により、これまで材料の得にくさのために進められなかった寄生戦略の解明に初めてアプローチすることが可能になった。特に、宿主細胞との攻防を分子レベルで明らかにすることができれば、寄生現象を包括的に理解できるとともに、効率的な感染阻止法考案に向けた論拠を提唱することが期待される。