

二国間交流事業 共同研究報告書

平成23年 4月1日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

共同研究代表者所属・部局 長崎大学・熱帯医学研究所

職・氏名 ^(ふりがな) 教授・金子 修 ^(かねこ おさむ)

1. 事業名 相手国(ドイツ)との共同研究 振興会対応機関 (DFG)
2. 研究課題名 マラリア原虫の細胞内小器官ロプトリーへの輸送シグナルの同定

3. 全採用期間

平成21年4月1日 ~ 平成23年3月31日 (2年0ヶ月)

4. 研究経費総額

(1) 本事業により交付された研究経費総額 5,000 千円

初年度経費 2,500 千円、 2年度経費 2,500 千円、 3年度経費 0 千円

(2) 本事業による経費以外の国内研究経費総額 2,200 千円

5. 研究組織

(1) 日本側参加者

氏名 (ふりがな)	所属・職名	研究協力テーマ
かねこ おさむ 金子 修	長崎大学熱帯医学研究所・教授	日本側研究総括
やはたかずひで 矢幡一英	長崎大学熱帯医学研究所・助教	マラリア原虫細胞侵入タイムラプス解析
さかぐちみ あこ 坂口美亜子	長崎大学熱帯医学研究所・助教	形態学的解析
さくらたかや 佐倉孝哉	長崎大学医歯薬学総合研究科・大学院生	マラリア原虫の細胞内輸送シグナル
ちゅう しいあおとうおん 朱 曉 彤	長崎大学医歯薬学総合研究科・大学院生	マラリア原虫の細胞内輸送シグナル
じーん あれきさんだー Jean Alexandre	長崎大学医歯薬学総合研究科・大学院生	マラリア原虫の細胞内輸送シグナル
もらこつと Morakot	長崎大学医歯薬学総合研究科・大学院生	解析用ネズミマラリア原虫の調整
かえたまそーん Kaewthamasorn		
じょう むとうんぎ Joe Mutungi	長崎大学医歯薬学総合研究科・大学院生	解析用ネズミマラリア原虫の調整
ばんばでいっと Phonepadith	長崎大学医歯薬学総合研究科・大学院生	解析用ネズミマラリア原虫の調整
さん さやらーと Xangsayarath		
いのうえめぐみ 井上愛美	長崎大学医歯薬学総合研究科・大学院生	解析用ネズミマラリア原虫の調整

(2) 相手国側研究代表者

所属・職名・氏名 ベルンハルト・ノッホ熱帯医学研究所・主任研究者・Tim-Wolf Gilberger

(3) 相手国参加者（代表者の氏名の前に○印を付すこと）

氏名	所属・職名（国名）	研究協力テーマ
○Tim Wolf Gilberger	ベルンハルト・ノッホ熱帯医学研 究所・主任研究者（ドイツ）	ドイツ側研究総括
Moritz Treeck	同・大学院生	マラリア原虫細胞侵入タイムラプス解析
Klemens Engelberg	同・大学院生	マラリア原虫細胞侵入
Ana Cabrera	同・大学院生	マラリア原虫細胞侵入
Maya Kono	同・大学院生	マラリア原虫細胞侵入
Susann Herrmann	同・大学院生	マラリア原虫細胞侵入
Tobias Spielmann	同・研究員	マラリア原虫の細胞内輸送シグナル
Christof Gruumlring	同・大学院生	マラリア原虫細胞内輸送タイムラプス解析
Arlett Heiber	同・大学院生	マラリア原虫の細胞内輸送シグナル
Ulrike Ruch	同・大学院生	マラリア原虫の細胞内輸送シグナル

6. 研究実績概要（全期間を通じた研究の目的・研究計画の実施状況・成果等の概要を簡潔に記載してください。）

研究の目的

マラリア原虫はヒト体内では赤血球内部に寄生し、ヒト防御機構から逃れている。原虫は 48 時間周期で分裂し、寄生していた赤血球をから抜け出し、長くても数分以内に新しい赤血球に再侵入する。この期間、宿主免疫は直接、原虫を認識することが出来るため、赤血球侵入型原虫の細胞表面に局在する分子はワクチン開発の標的候補となる。また、これらの分子は赤血球侵入型原虫に存在する細胞内小器官から原虫表面に放出されるため、分子が正しい細胞内小器官に輸送され、正しいタイミングで表面に放出されることは原虫の赤血球侵入に取って必須であり、これらの経路は創薬の標的候補となると考えられる。

一方、マラリア原虫の細胞内小器官ロプトリーに局在する赤血球侵入関連分子 RhopH2 の粗面小胞体移行シグナル配列を含む 24 アミノ酸を付加するだけで、緑色蛍光タンパク質 (GFP) がロプトリーに輸送されるという報告と、別の細胞内小器官に局在するマイクロネームに局在するタンパク質のシグナル配列と融合した GFP はロプトリーに輸送されないという報告、二つの以前の報告があったため、RhopH2 あるいはロプトリータンパク質の ER シグナルと考えられていた配列がロプトリーへの輸送シグナルとして作用している可能性があると考え、本研究では、赤血球侵入型原虫に存在する細胞内小器官ロプトリーに局在する分子を中心に、細胞内小器官への細胞内分子輸送シグナルを明らかにすることを目的として研究を開始した。

研究計画の実施状況

まず、熱帯熱マラリア原虫のロプトリータンパク質 RhopH2 のプロモーター領域を MultiSite-Gateway 法 (Invitrogen 社) により pENT41 プラスミドとしてをクローニングした。続いて、熱帯熱マラリア原虫のロプトリータンパク質 (RhopH1、RhopH2、RhopH3、RAP1、RAP2) のシグナルペプチド周辺部位と、そのコントロールとしてマイクロネームやデンスグラニュール、細胞表面等に局在するタンパク質の相当部位を含む pENT12 プラスミドを構築した。MultiSite-Gateway 法により GFP が、上記のシグナル配列の下流から発現するコンストラクトを構築した。

これらのプラスミドのうち、RhopH2、RhopH3 とマイクロネームタンパク質 EBA175 のシグナル部位から GFP を発現するコンストラクトを熱帯熱マラリア原虫に遺伝子導入し、薬剤選択下で培養し、エピソードとして発現コンストラクトを保有する薬剤耐性原虫を得た。得られた遺伝子導入熱帯熱マラリア原虫において、GFP を蛍光顕微鏡にてライブ観察し、タンパク質発現を確認した。この原虫を用いた初年度の予備的検討では EBA175 のシグナル配列では GFP は先端部へは局在しないと考えた。一方、エピソードで発現している原虫を用いると蛍光シグナルの強度にバラつきがあることがわかり、安定的に組換えタンパク質を発現させて、より詳細な検討を行うためにゲノムへの挿入ができる様にコンストラクトを作り変え、RhopH2、RhopH3、EBA175 のシグナル配列から GFP を発現する遺伝子組換え原虫をさらに作成した。これらの原虫を用い、また、ロプトリーマーカータンパク質である Clag3.1 を用いた間接免疫蛍光抗体法にて、詳細に局在を検討したところ、RhopH2、RhopH3、EBA175 のシグナル配列の全てで GFP は原虫の先端部に局在しているが、ロプトリーマーカーとは完全には共局在を示さないことがわかり、残念ながら、以前の「RhopH2 の粗面小胞体移行シグナル配列を含む 24 アミノ酸を付加するだけで、GFP がロプトリーに輸送される」という概念は誤りであると結論付けた。

一方、上記の GFP タンパク質の原虫内部での細胞内分子輸送や、マラリア原虫が赤血球に侵入する際の分泌過程を観察するために、矢幡一英がドイツに出張し、タイムラプス解析の系をベルンハルト・ノッホ熱

帯医学研究所の共同研究者から技術移転を受けた。その結果、長崎大学にて熱帯熱マラリア原虫の赤血球侵入過程を観察する系を観察できるようになったとともに、ネズミマラリア原虫においても、世界で初めて赤血球侵入過程を観察する系を確立することができた。また、最先端の共焦点レーザー顕微鏡を用いた詳細な分子局在解析の一部は佐倉孝也がドイツに出張し、ベルンハルト・ノッホ熱帯医学研究所にて行った。

成果

1. RhopH2 の粗面小胞体移行シグナル配列を含む 24 アミノ酸を付加するだけで、GFP がロプトリーに輸送される、という以前の報告が誤りであることを明らかにした。
2. 世界で初めてネズミマラリア原虫が赤血球に侵入する過程をタイムラプス解析する系を確立した。
3. 上記 2 点に加えて、EBA175 の第六領域に加えて第五領域がマイクロネームへの輸送に必要であることを明らかにした。すなわち、細胞内小器官マイクロネームに局在する EBA175 のシグナル配列と融合した GFP をコントロールとして使用したが、EBA175 のシグナル配列が本来の粗面小胞体移行シグナル配列として作用することを確認するため、EBA175 の予想シグナル配列に加え、マイクロネームへの輸送に必要と報告されている EBA175 の第六領域と呼ばれる膜貫通領域周辺領域を付与した GFP 組換えタンパク質を発現する原虫を作成し局在を確認したところ、この原虫についても以前の報告が再現できず、以前の報告が誤りである可能性が高いと考えた。しかし、この領域を破壊するとマイクロネームへの輸送が阻害されることが複数のグループの結果から報告されているため、第六領域だけではマイクロネームへの輸送シグナルとしては不十分である可能性があると考え、第二領域から順番に領域を削った組換え EBA175 を発現する組換え熱帯熱マラリア原虫を作成し、局在を解析したところ、第六領域に加えて第五領域がマイクロネームへの輸送に必要であることを明らかにすることができた。