

「免疫難病・感染症等の先進医療技術」

平成 14 年度採択研究代表者

鎮西 康雄

(三重大学大学院医学系研究科・病態解明医学講座 医動物感染医学分野 教授)

「マラリア感染成立の分子基盤の解明と新たな感染阻止法の創出」

1. 研究実施の概要

マラリアの制御法開発の基礎研究を進めるため、スポロゾイトの肝臓への感染に注目している。肝細胞感染にかかわる分子を同定し機能を解析して、原虫の肝細胞感染の分子機構を解明すると共に感染阻止ワクチン分子を創出するのが目的である。マラリア原虫の宿主細胞へ侵入するすべてのステージの EST データベースを構築し、肝臓感染ステージに特異的に発現する遺伝子を選択し、遺伝子欠損原虫の作出による機能解析を行うことで、スポロゾイトが肝臓に感染するのに必要な分子を明らかにし、原虫伝播成立における分子機構の一端を明らかにした。

2. 研究実施内容

研究目的（これまでの経過と研究目的）

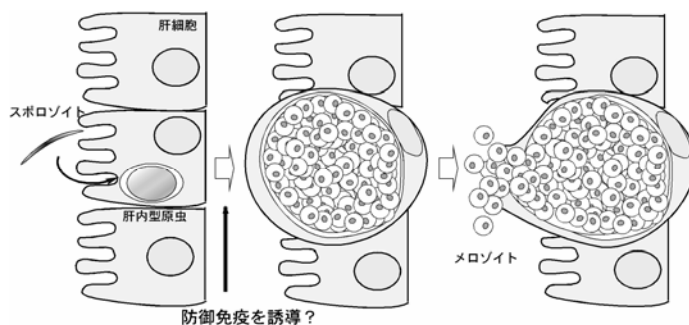
昨年度までの研究によって、我々はスポロゾイトが細胞通過能をもつこと、SPECT1 及び SPECT2 と命名した分子が、この能力を発揮するために必須であることを明らかにした。また細胞通過能はスポロゾイトが循環系と肝実質を隔てる肝類洞細胞壁（血液／肝実質バリア）を通過し、肝実質に侵入するために必要であることを明らかにした。また、肝実質に達した原虫が、肝細胞を寄生すべき細胞として認識するのに必要な分子（Pbs36p 及び Pbs36）を同定し、機能を解析した。これによって原虫は、通過から寄生へのスイッチングを行ない肝細胞に寄生することを明らかにした。

今年度は肝細胞に寄生した後増殖し赤血球感染性をもつメロゾイトに分化する過程で機能する分子の解析、マラリア原虫が蚊の中腸に感染する過程が細胞通過を必要とする類似の侵入過程であることに着目し、中腸侵入ステージの遺伝子の機能を解析した。

結果・考察

(1) 寄生の維持に関わる蛋白の同定

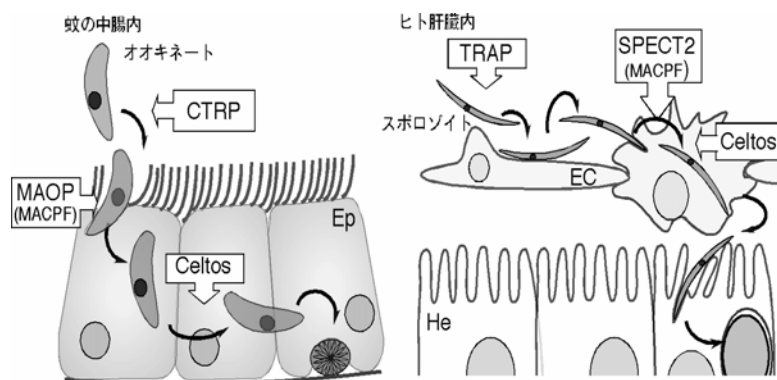
「寄生」成立後、次の分化に必要な蛋白を2種類見いだした。これらの遺伝子の欠損原虫は、細胞通過、寄生ともに正常であるが、



ラットへの感染性は、1/10,000 程度に減少した。これらの蛋白はどちらも、寄生胞に局在し、宿主細胞との相互作用、例えば、栄養の吸収や宿主のアポトーシスの抑制、宿主からの攻撃の回避に機能している可能性がある。肝細胞内で原虫は数千ものメロゾイトへと分化するが、この過程にヒトマラリアは約 7 日要する。従ってこのステップは、感染そのものを引き起こさない薬剤の標的として期待でき、原虫の寄生戦略を分子レベルで解明することはマラリア防御法を考える上で重要である。(Yuda et al., revise 中、Ishino et al Orito et al., 投稿中)

(2) 異なるステージ間での原虫の寄生戦略の比較検討

スポロゾイトの細胞通過に関わるもう一つの蛋白として、CelTOS (Cell traversal ookinete sporozoite protein) が同定された。この蛋白は、蚊の中腸に感染するステージであるオオキネートでも発現することが見出された。遺伝子欠損原虫は、中腸上皮細胞内で留まることから、細胞内の移動に関わる事が示された。また、SPECT2 と共通するドメインを有する蛋白として MAOP (Membrane Attack Ookinete Protein) がオオキネートステージに発現することを見出した。この蛋白は、SPECT2 と同様に、中腸上皮細胞の細胞膜を破るところに必要なであることを明らかにした。図に示すように、肝臓に感染を成立させるステップと、蚊の体内に入った原虫 (オオキネート) が中腸細胞上に感染するステップは、自身の複製の場に到達するまでに「細胞層」



異なる宿主への感染の分子基盤は共通

を越えなければならない、という点で共通している。原虫は、運動、細胞膜の破壊、細胞内の移動という各ステップにおいて、相同あるいは同一の蛋白を利用することで、この共通の問題を克服していることを明らかにしてきた。この新しい見解は、マラリアの感染サイクルを包括的に理解するためには、ステージ間の比較検討が必要であることを示した。肝臓感染のステップを他のステージと比較検討し、その機構を拡張して解釈したことが、非常に独創的な点だと言える。

さらに、オオキネートの移動に関わる蛋白として Calucium Dependent Protein Kinase 3 (CDPK3) を見出した。遺伝子改変原虫の作出により、この蛋白、およびカルシウムシグナル伝達が、オオキネートの運動に必須であることを明らかにした。一方で、CDPK の関連蛋白がスポロゾイトステージで見つかり、また薬剤を用いた研究よりスポロゾイトの移動にカルシウムシグナル伝達が必要であることが示唆されていることから、同様の機構の存在が期待される。CDPK は、植物に多く存在するリン酸化酵素であり、これまでは乳類では見つかっていない。従って、効果的な薬剤の標的として期待される。

今後の展望

ここまでの研究により、蚊の吸血から肝実質細胞への感染までの主要な経路と、それに関わる分子を明らかにした。原虫は肝臓へ感染するために複数のバリアーを超えなければならず、そのために特殊な分子機構を発達させてきたことを明らかにした。またバリアーである細胞と肝実質細胞を判別するための分子機構が存在していることもわかった。

今後はこれらの原虫分子を標的とすることにより、実際に感染を阻止ができることを実証することが重要である。さらに現在、肝臓内での増殖とメロゾイトへの分化に関わる分子の同定も進めている。肝実質細胞内への寄生の分子機構の詳細を明らかにすることも今後の目標である。

マラリア原虫は血液感染ステージになると蚊に伝播することが可能となる。その前段階である肝臓感染ステージを標的とした感染阻止法は、マラリア原虫の生活環を断ち、ひいてはマラリア撲滅を可能にする唯一の手段である。今後の研究により、さらに詳細に感染の分子基盤を解明し、感染阻止法の確立につなげたい。

3. 研究実施体制

「三重大学」グループ

①研究分担グループ長：鎮西 康雄（三重大学、教授）

②研究項目：マラリア感染成立の分子基盤の解明と新たな感染阻止法の創出

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（1）論文（原著論文）発表

- Tomoko Ishino, Yasuo Chinzei, Masao Yuda (2005) A Plasmodium sporozoite protein with a membrane attack complex domain is required for breaching the liver sinusoidal cell layer prior to hepatocyte infection. *Cell. Microbiol.* **7**: 199-208.
- Tomoko Ishino, Yasuo Chinzei, Masao Yuda (2005) Two proteins with 6-cys motifs are required for malarial parasites to commit to infection of the hepatocyte. *Mol. Microbiol.* **58** : 1264-75
- Tomoko Ishino, Yuki Orito, Yasuo Chinzei, Masao Yuda. (2006) A calcium-dependent protein kinase regulates Plasmodium ookinete access to the midgut epithelial cell. *Mol. Microbiol.* **59** :1175-84.
- Tohru Kariu*, Tomoko Ishino*, _Kazuhisa Yano, Yasuo Chinzei, Masao Yuda. (*: equally contributed) (2006) CelTOS, a novel malarial protein that mediates transmission to mosquito and vertebrate hosts. *Mol. Microbiol.* **59** :1369-79.

（2）特許出願

H17 年度出願件数：0 件（CREST 研究期間累積件数：1 件）