

「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

我々はスポロゾイトの SPECT1 及び SPECT2 と命名した分子が、細胞通過を可能にする分子であることを昨年までの研究で明らかにしてきた。また細胞バリアーを通過した原虫が肝実質に達した後、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、マラリア原虫の転写調節機構がほとんど未解明であり、未同定の転写因子の探索を行い、同定することを大きな目標とした。また、染色体セントロメアーを用いた新たな遺伝子導入法の開発すると共に、これまでに明らかにしてきた機能分子を用いて抗体による感染阻止実験を実施した。

2. 研究実施内容

1. 遺伝子発現の調節機構の解析

原虫は複雑な生活環をもち、異なった宿主に感染する。その都度宿主に適合した分子を作って感染する。このタンパク合成に関わる転写の調節については、原虫では転写因子の同定がされておらず、転写調節機構についてはほとんど未解明である。そこで転写因子の同定を行った。

1) MAP family タンパク質

原虫各ステージの EST の中に、植物で転写因子として知られる分子がもつ AP2 ドメインをもつ遺伝子を見つけた。これらの分子: スポロゾイト (P200)、ガメトサイト (Pb78)、オオキネート (Pb97) を MAP (malaria AP2 protein) と命名し、それぞれ MAP-S、MAP-G、MAP-O とした。

2) MAP-S

MAP-S 遺伝子をノックアウト (KO) した原虫では、オオシストは正常にできるが、スポロゾイトが出来ていないことがわかった。MAP-S は遺伝子発現調節が異常になっていることを示唆した。そこで新たに開発したマイクロアレイにより、MAP-S 遺伝子の KO により、発現が上がるもの下がるものの両方があることを明らかにした。10倍以上に上がるものを調べたところ、すべて肝臓感染に必要な遺伝子であった。即ち MAP-S は蚊唾液腺感染に必要な遺伝子を発現し、肝臓感染に必要な遺伝子の発現を抑えるような遺伝子の発現抑制をしている。そういう調節をする転写因子であることが

示唆された。

3) MAP-G と MAP-O

MAP-G, MAP-O についても KO 原虫を作成して調べたところ、それぞれ異常を示し、発育は停止した。マイクロアレイにより調べると、遺伝子発現が1/10になるものが多数あった。

以上のことから、MAP family 遺伝子がすべてのステージで特異的遺伝子発現を調節していると思われる。肝内型についても候補分子が同定されており、現在分析中である。この研究により、マラリア原虫では始めて転写因子を同定することができ、遺伝子発現調節機構の一端を明らかにした。

2. セントロメアを利用した新規遺伝子導入法の開発

第5染色体のセントロメア Cen5 をプラスミッドに挿入し、選択マーカーとしての pyrimethamine 耐性遺伝子、レポーターとして gfp を入れ、人工染色体を作成した。この人工染色体をメロゾイトに導入し、pyrimethamine により人工染色体を持つ原虫を選抜し、pyrimethamine 除去後、人工染色体がどの位保持されるかを調べた。その結果長期に維持されることがわかった。

この応用例として、人工染色体を用いてスポロゾイト期の遺伝子発現調節エレメントの同定を試みた。これまでのスポロゾイト EST の解析からスポロゾイトで発現する遺伝子が多数見つかったが、それらの遺伝子構造を解析し、転写開始点を推定し上流を調べると、すべての上流に共通な配列 tgcattc/t を見つけた。これがシスエレメントであるかどうか現在検討中である。

これらの研究によりスポロゾイト期の遺伝子発現の調節機構の一端を明らかにすることができた。

3. 抗体による感染阻止実験

唾液腺のスポロゾイトは吸血により皮膚から血管を経由し肝臓の類洞に達し、類洞壁を通過し、肝細胞に寄生する。これまで我々は、原虫の感染ルートとして類洞壁のクッパー細胞を通過することを示し、皮膚および肝臓で機能する必須分子を同定し機能解析をすすめてきた。これらのスポロゾイトタンパク質の多くは原虫の膜タンパク質か分泌性タンパク質である。これらの機能をブロックすることで感染を阻止できるか、抗体による阻止実験を実施した。Pbs36p はスポロゾイトが肝細胞を寄生すべき細胞と認識し、通過しないで寄生するのに重要な機能を持つ分子として我々が同定した分子であるが、この分子の抗体を作製し、感染阻止実験を行なったところ、感染を阻止できず、潜伏期を長くすることができた。抗体による感染阻止が期待できることを示している。

また、人工染色体による免疫での感染阻止実験として、スポロゾイト期の遺伝子 Pbs36p を組み込んだ人工染色体を導入した原虫を感染させ、血液ステージで発現させ、免疫を誘導するか、現在、感染に関わって重要な遺伝子の抗体による感染阻止が可能かについて検討を進めている。

この技術は将来の生ワクチンの開発等に応用できるものと考えて進めている。

3. 研究実施体制

(1)「三重大学」グループ

①研究者名

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

(2)「神戸大学」グループ

①研究者名

岩永 史朗(神戸大学 助手)

②研究項目

・唾液腺スポロゾイト期原虫の遺伝子転写制御配列の同定

(3)「基礎生物学研究所」グループ

①研究者名

重信 秀治(自然科学研究機構・基礎生物学研究所・岡崎統合バイオサイエンスセンター 助手)

②研究項目

・マラリア原虫のトランスクリプトーム解析

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- Tohru Kariu, Tomoko Ishino, Kazuhiko Yano, Yasuo Chinzei and *Masao Yuda (2006) CelTOS, a novel malarial protein that mediates transmission to mosquito and vertebrate hosts. **Molecular Microbiol.** 59:1369-1379, 2006.
- Akihiro Morita, Haruhiko Isawa, Yuki Orito, Shiroh Iwanaga, Yasuo Chinzei and *Masao Yuda (2006) Identification and characterization of a collagen-induced platelet aggregation inhibitor, triplatin, from salivary glands of the assassin bug, *Triatoma infestans*. **FEBS J.** 273:2955-2962, 2006.
- Tomoko Ishino, Yuki Orito, Yasuo Chinzei and *Masao Yuda (2006) A calcium-dependent protein kinase regulates Plasmodium ookinete access to the midgut epithelial cell. **Molecular Microbiol.** 59:1175-1184, 2006.

(2) 特許出願

平成 18年度特許出願:0件(CREST 研究期間累積件数:1件)