

# 外川 裕人 論文内容の要旨

## 主 論 文

Critical role of Erythrocyte Binding-Like protein of the rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii* to establish an irreversible connection with the erythrocyte during invasion

(ネズミマラリア原虫 *Plasmodium yoelii* の Erythrocyte Binding-Like タンパク質は赤血球侵入過程における不可逆的結合形成に重要である)

外川裕人, 麻田正仁, 石崎隆弘, 矢幡一英, 金子修

Parasitology International 2018 年 (in press)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 新興感染症病態制御学系専攻  
(主任指導教員：金子 修 教授)

## 緒 言

マラリアは世界の熱帯・亜熱帯地域において今なお年間に 2~3 億人が罹患し、40 万人以上が死亡している重篤な感染症である。マラリア原虫は感染媒介蚊の吸血によりヒト体内へ侵入後、肝臓での赤外期を経たのちに、血流中で赤血球への侵入、分裂、赤血球侵入型のメロゾイト期原虫の赤血球からの放出、新たな赤血球への再侵入を繰り返すことで増殖する。この赤内期にマラリアの症状が起こり、特に赤血球侵入能力と感染赤血球の細胞接着能力は、マラリア病原性と密接に関連している。メロゾイト期のマラリア原虫が赤血球へ侵入するためには、原虫細胞小器官由来の種々の侵入関連分子の活性化や放出が必要であるが、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。ワクチン標的抗原として研究がされてきた **Erythrocyte Binding-Like** タンパク質(以下 **EBL**)は赤血球を認識するリガンドとして侵入過程で作用と考えられおり、異なるマラリア原虫種間で幅広く保存されている。熱帯熱マラリア原虫において **EBL** をコードする *ebl* 遺伝子は多重遺伝子族を形成し、**EBA175**、**EBA140**、**EBA165** 等の複数のタンパク質が存在することから、**EBL** の機能解析は容易ではなく侵入メカニズムにおける役割の全貌は未だ明らかとなっていない。**EBL** の必須性についても、*ebl* 遺伝子欠損株を得る過去の試みが失敗しているため、生存に必須ではないかと間接的には考えられているものの、直接的には示されていない。本博士論文研究ではネズミマラリア原虫 *Plasmodium yoelii* で *ebl* 遺伝子が多重遺伝子族を形成しておらず、一つの **EBL** のみが発現していることに着目し、テトラサイクリン誘導に伴う遺伝子のコンディショナルノックダウン系(以下 **Tet-Off** 系)を *P. yoelii* において確立し、**EBL** が侵入機序で果たす役割を解明することを目指した。

## 対象と方法

*P. yoelii* 17XL株と 17XNL株のメロゾイト表面における EBL の局在は間接免疫蛍光抗体法により検討した。*P. yoelii* における Tet-Off 系の検討には、17XL 株を用いて無水テトラサイクリン (ATc) 投与下で蛍光タンパク質 mCherry の発現が抑制されるように設計した遺伝子組換え *P. yoelii* (mCherry Tet-Off) を作製した。EBL の機能解析には、17XL 株を用いて ATc 投与下で EBL の発現が抑制されるように設計した遺伝子組換え *P. yoelii* (Pyeb1 Tet-Off) を作製した。EBL の発現抑制効果は定量 RT-PCR とウェスタンブロットで検討した。EBL の発現抑制に伴う表現型解析は、原虫感染率のモニタリングと赤血球侵入試験により行った。EBL のより詳細な機能解析は、精製した遊離メロゾイトと新鮮赤血球を用いたタイムラプスイメージング手法を用いて行った。

## 結 果

最初に、EBL が *P. yoelii* 17XL 株と 17XNL 株の両方でメロゾイト表面に放出されることを明らかにした。組換え原虫 mCherry Tet-Off をマウスに感染させ、連日 ATc を経口投与したところ mCherry の発現が抑制されたことから *P. yoelii* において Tet-Off 系が作動することが確認された。次に、組換え原虫 Pyeb1 Tet-Off 感染マウスに対し ATc を皮下投与し、*eb1* の転写産物量と EBL タンパク質量を検討したところ共に ATc 投与後 12 時間で顕著に減少していることが確認された。表現型解析の結果、Pyeb1 Tet-Off 原虫は ATc の投与 12 時間後には感染率が低下し、投与 18 時間後と 24 時間後には有意な感染率の減少が確認された。赤血球侵入試験の結果、EBL の発現が抑制されたメロゾイトは、ほとんど赤血球へ侵入できなくなることがわかった。タイムラプスイメージングによる詳細な解析の結果、EBL の発現を抑制した場合、メロゾイトが接触した赤血球の変形は起こるものの、その次のステップに移行せず、赤血球から離れるメロゾイトの数が有意に多いことが分かり、原虫と赤血球の間で起こる不可逆的な結合が形成されていないことが示唆された。

## 考 察

今回の研究では、世界で初めて *P. yoelii* の遺伝子抑制系の開発に成功した。本遺伝子抑制系を用いて EBL の発現を抑制することによりメロゾイトの赤血球侵入が阻害されることを直接的に示すことができ、EBL は赤血球侵入に重要な役割を果たしていることが証明された。また、マラリア原虫の赤血球侵入のタイムラプスイメージング解析についても、精製したメロゾイトを低温下で保持するなど、多くの条件の最適化を行い、メロゾイトが赤血球に侵入している多くの動画を短時間に撮影する系を確立することに成功した。それにより、EBL が原虫と赤血球の間の不可逆的な結合に必要なことを初めて定量的に示すことができ、密着接合形成に EBL が関与していることを強く示唆することができた。