

# Amuza Byaruhanga Lucky 論文内容の要旨

主 論 文

*Plasmodium knowlesi* Skeleton-Binding Protein 1 Localizes to the ‘Sinton and Mulligan’ Stipplings in the Cytoplasm of Monkey and Human Erythrocytes  
(サルマラリア原虫 *Plasmodium knowlesi* の細胞骨格結合タンパク質 1 はサルとヒトの赤血球細胞質のシントン・マリガン斑点に局在する)

Amuza Byaruhanga Lucky、坂口美亜子、片貝祐子、川合覚、矢幡一英、  
Thomas J. Templeton, 金子修

PLOS ONE · 11 卷 10 号 e0164272 2016 年

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

最近、普段はサルに感染しているサルマラリア原虫 *Plasmodium knowlesi* がヒトに感染する例が東南アジアで見られるようになった。多くの場合は軽症であるが、重篤化し死に至る場合もある。しかし、この原虫に関する細胞レベルでの研究は少なく、重症化機序もわかっていない。熱帯熱マラリア原虫は、多くのエフェクタータンパク質を赤血球内に放出し、寄生した赤血球を発育に適した環境に改変することが知られている。その中でも赤血球膜直下に新しく構築されるマウレル裂と呼ばれる膜構造物は、赤血球表面に発現し、病原性に関係する接着分子等の輸送中継地として機能し、赤血球膜とテザーと呼ばれる構造で結合している。一方、*P. knowlesi* が寄生した赤血球内で見られる膜構造の変化は、熱帯熱マラリア原虫のものとは異なっており、その赤血球内輸送を担う膜構造はわかっていない。そこで本研究では、熱帯熱マラリア原虫のマウレル裂に局在するタンパク質 Skeleton-Binding Protein 1 (SBP1) とマウレル裂を經由して赤血球表面に発現するタンパク質 Pf2TM に着目し、それらの相同体を *P. knowlesi* で同定し、局在を明らかにすることで *P. knowlesi* 寄生赤血球内の構造物の性格付けを試みた。さらに、SBP1 相同体をマーカーとして *P. knowlesi* がサル赤血球に寄生する場合とヒト赤血球に寄生する場合で、赤血球内に構築される膜構造について差異を検討した。

## 対象と方法

ゲノム配列上のシンテニーによる分子同定にはウェブウェアの PlasmoDB を利用した。Pf2TM の相同対は同様に PlasmoDB のプラットフォームで BLAST 解析により同定した。Myc タグで標識した各タンパク質を発現する遺伝子組換え *P. knowlesi* を in

*vitro* 培養に適応した株を用いて作製し、サル赤血球あるいはヒト赤血球に寄生させ、蛍光免疫染色標本の光学顕微鏡解析と免疫電子顕微鏡法により、局在を検討した。ギムザ染色した *P. knowlesi* 寄生赤血球で観察されるシントン・マリガン斑点との共局在は、免疫蛍光染色像を得た後に、抗体を除去してギムザ染色した血液塗沫標本の同じ場所を観察することで検討した。

## 結 果

まず、熱帯熱マラリア原虫 SBP1 の *P. knowlesi* 相同体 PkSBP1 を種々のマラリア原虫のゲノム配列を用いたシンテニー解析と詳細なアミノ酸配列比較により同定した。免疫抗体染色により、組換え PkSBP1 タンパク質が *P. knowlesi* 寄生サル赤血球の細胞質に点状に観察されたため、*P. knowlesi* は寄生したサル赤血球細胞質内に PkSBP1 を放出することが明らかとなった。段階的に原虫タンパク質を可溶化すると、水溶性画分にはほとんど溶出されず、トリトン X100 で溶出されたため、PkSBP1 はアミノ酸配列から予想される通り、膜にアンカーされていると考えられた。組換え PkSBP1 は、熱帯熱マラリア原虫で発現させるとマウレル裂にある PfSBP1 と共局在し、また、*P. knowlesi* で発現させると寄生赤血球内に観察されるシントン・マリガン斑点と呼ばれる構造と共局在したことから、熱帯熱マラリア原虫のマウレル裂と *P. knowlesi* のシントン・マリガン斑点は機能的に同等の膜構造物である可能性が示唆された。免疫電子顕微鏡法では、組換え PkSBP1 は *P. knowlesi* 寄生赤血球内のスリット状とリング状の構造物に局在しており、これらの構造物が、染色により観察されるシントン・マリガン斑点に相当することが明らかとなり、この構造物の名称を「シントン・マリガン裂」と提唱した。熱帯熱マラリア原虫 Pf2TM の *P. knowlesi* 相同体を同定し Pk2TM-a と名づけ、組換えタンパク質として *P. knowlesi* で発現させた。Pk2TM-a はトリトン X100 でも可溶化されず、膜に強固にアンカーされているタンパク質であると考えられた。免疫蛍光染色法と免疫電子顕微鏡法で、Pk2TM-a は PkSBP1 と同様の局在パターンを示したため、熱帯熱マラリア原虫のマウレル裂と *P. knowlesi* のシントン・マリガン斑点の類似がさらに支持された。一方、赤血球膜上には Pk2TM-a のシグナルは検出されなかった。最後に、組換え PkSBP1 をマーカーとして、*P. knowlesi* がサル赤血球とヒト赤血球に寄生した時に見られるシントン・マリガン斑点の数と、電顕観察による膜構造について比較したが、両者の間で特に差は認められなかった。

## 考 察

今回の研究により、*P. knowlesi* の PkSBP1 および Pk2TM-a を同定し、これらの分子が局在する *P. knowlesi* 寄生赤血球内の構造物が、ギムザ染色で検出されるシントン・マリガン斑点に該当するものであることを明らかにした。さらに、マラリア原虫寄生赤血球内に構築される構造物の数と形態は、宿主赤血球側の因子ではなく、マラリア原虫側の因子により決定されていることも明らかにした。今回の知見から、*P. knowlesi* 寄生赤血球内のシントン・マリガン裂は、熱帯熱マラリア原虫のマウレル裂と同様に、原虫分子が赤血球表面へ輸送される際の輸送中継地として機能している可能性が示唆された。