

受理年月日	受理番号

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成30年 5月18日

採択番号	29 共同-12		
研究部門	感染免疫研究	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	福本晋也
研究課題名	マラリア原虫の媒介蚊体内ステージにおけるオーシスト形成機構の解明		
研究代表者	(ふりがな) 氏名	所属部局等・職名	
	いかだい ひろみ 筏井 宏実	北里大学獣医学部・准教授・研究総括	
研究分担者	きたはら ゆう 北原 優	北里大学獣医学部・学部学生	
	ふくもと しんや 福本 晋也	帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授	
研究期間	平成29年 4月 1日 ~ 平成30年 3月 31日		
目的・趣旨	<p>マラリア原虫は、宿主動物の赤血球に寄生しているガメトサイトが媒介者である蚊に吸血されると、蚊中腸内において雌雄ガメト、サイゴトを経て運動能を有するオーカイネートに分化する。オーカイネートは、蚊中腸細胞に侵入して基底膜下に到達した後、オーシストへ形態変化を開始する。</p> <p>マラリア原虫の生活環において媒介蚊体内ステージ、特にオーカイネートからオーシスト形成初期の1-2日間は、宿主の環境が大きく変化する事ことから原虫はその変化に対応しつつ形態も劇的に変化させる。さらに、この期間は生存する原虫数が最も減少する、原虫の生き残りにとって非常に重要なステージである。</p> <p>オーシスト形成初期では、まずオーカイネートの細胞膜の構造が変化して早期オーシスト壁が形成され、徐々にオーシスト壁は殻のような特殊な構造物を構成して、成熟オーシストとなると考えられているが、その詳細については不明な点が多い。</p> <p>本共同研究では、オーシストに特有な壁構成蛋白質を探索し、そのオーシスト壁構成蛋白質の発現動態および機能解析を実施することにより、オーシスト形成機構の解明を目的とした。</p>		

受理年月日	受理番号

<p>研究経過の概要</p>	<p>本研究手順は、オーシスト形成期における、①オーシスト壁構成蛋白質の探索、②オーシスト壁構成蛋白質の発現動態および機能解析、および、③原虫オーシスト形成期と媒介蚊中腸細胞の相互因子の解析を行なう事によって実施されている。</p> <p>本年度は、壁形成に重要と思われる蛋白質を5種スクリーニングした。スクリーニングした蛋白質に対する抗体をそれぞれ作製し、抗体とマラリア原虫感染血液を媒介蚊に吸血させた所、2種類の蛋白質 (PbCap184 および PbCap494) に対する抗体が吸血後のオーシスト形成数を減少させ、伝搬阻止効果があることが明らかとなった。さらに、上記2種類の蛋白質について、それぞれ遺伝子欠損 (KO) 原虫、過剰発現 (OE) 原虫および Tag 蛋白質発現組換え原虫の作製を試みた。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>— PbCap184 蛋白質 —</p> <p>✓ <u>新たに4種類の異なるエピトープに対する抗体の作製</u></p> <p>先に作製した伝搬阻止効果のある抗体と新たに4種類の抗体を作製した。それぞれのエピトープに対する抗体の反応性および伝搬阻止試験を実施し、エピトープによる違いを比較検討することにより PbCap184 蛋白質のオーシスト形成時における機能および役割を検討している。</p> <p>✓ <u>遺伝子欠損原虫の作製</u></p> <p>PbCap184 遺伝子の KO 原虫作製を試みたが、赤内型において lethal な遺伝子であることが明らかとなった。そこで、MSP9 プロモータを用いた、コンディショナル KO 原虫の作製を試みた。その結果、コンディショナル KO 原虫の作成・クローニングに成功し、現在表現型の解析を開始している。</p> <p>— PbCap494 蛋白質 —</p> <p>✓ <u>PbCap494 蛋白質の KO 原虫および OE 原虫の作製</u></p> <p>野生型 (WT) 原虫の蚊体内ステージにおける PbCap494 の mRNA 発現動態をリアルタイム PCR にて調べたところ、吸血後 48 時間目において急激に発現を始め、その後は発現量が増加し続けていた。</p> <p>WT 原虫、KO 原虫および OE 原虫の赤内型ステージを比較したところ、赤血球内寄生率の増加、gametocyte 形成率、雌雄 gametocyte 比に違いはみられなかった。</p> <p>WT 原虫および KO 原虫では、蚊体内ステージにおいても、exflagellation 数、ookinete 形成数、および ookinete の形態について差は見られなかった。</p> <p>WT 原虫および KO 原虫を吸血した 13~14 日目のそれぞれの蚊中腸の oocyst 形成数および大きさを比較した所、oocyst 形成数が KO 原虫において明らかに減少しており、大きさは小さかった。</p> <p>WT 原虫、KO 原虫および OE 原虫を感染させた 28 日目以降の蚊の唾液腺から sporozoite を分離し、その運動性について解析を行ったところ、WT 原虫および KO 原虫においては旋回運動に差は見られなかったが、OE 原虫では旋回運動を示さなかった。</p> <p>KO 原虫 sporozoite のマウスへの感染能を調べるために、KO 原虫吸血後 25 日目の蚊を未感染マウスへ吸血させたところ、WT 原虫と同様に吸血後 4-5 日目に赤血球内原虫が出現した。OE 原虫 sporozoite については現在検討中である。</p> <p>RFP タグ付加原虫も作製し (クローニング中)、KO 原虫および OE 原虫の各種</p>

受理年月日	受理番号

	ステージにおける表現型や電子顕微鏡観察など、今後順次解析して行く予定である。
研究成果の 発表	<国内学会発表> 北原優、杉山真言、福本晋也、筏井宏実 <i>Plasmodium berghei</i> Cap494 タンパク質は sporozoite 形成には影響をしない 第87回日本寄生虫学会大会 2018年3月、東京都・新宿区