

| | |
|-------|------|
| 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

令和元年 5月22日

| | | | |
|-------|---|------------------------|------|
| 採択番号 | 30 共同-10 | | |
| 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 | | | |
| | | | |
| | | | |
| | 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30年 4月 1日 ~ 平成31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ート、ザイゴー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>① <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> 先に作製した伝搬阻止効果のある抗体と新たに作製した4種類の抗体の計5種類の抗体について伝搬阻止試験を実施し、そのエピトープの違いによる反応性を比較検討中である。</p> <p>② <u>遺伝子欠損原虫および Tag 原虫の作製</u> 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 原虫の作製を試みクローニングに成功し、赤内型および蚊体内ステージにおける表現型について解析中である。</p> <p>— PbCap494 蛋白質 —</p> <p>① <u>PbCap494 蛋白質の遺伝子欠損 (KO) 原虫および過剰発現 (OE) 原虫の作製</u> 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。 WT 原虫、KO 原虫および OE 原虫の赤内型および蚊体内ステージについて比較したところ、赤血球内寄生率の増加、gametocyte 形成率、雌雄 gametocyte 比、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。さらに、28 日目以降の蚊の唾液腺から sporozoite を分離し、その運動性およびマウスへの感染能についても解析を行ったが差は見られなかった。 WT 原虫、KO 原虫および OE 原虫を感染させて吸血後 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、KO 原虫において oocyst 形成数は減少し、大きさも小さかった。透過型電子顕微鏡による観察を行ったところ、KO 原虫および OE 原虫の oocyst は WT 原虫に比べて発育が遅延していた。さらに、KO 原虫の oocyst 壁は WT 原虫に比べて菲薄化していた。 以上、PbCap494 は蚊体内ステージにおける初期の oocyst 壁形成に関与していると推察された。</p> <p>② <u>抗 PbCap494 抗体を用いた局在解析および運動性試験</u> 抗 PbCap494 抗体を用いて間接蛍光抗体により PbCap494 の ookinete 細胞膜における局在解析を行った。ookinete は PFA 固定/TritonX-100 処理および PFA 固定/未処理、生鮮状態のものを用いた。いずれも PbCap494 が ookinete の細胞膜表面で強く反応していた。 抗 PbCap494 抗体と反応させた ookinete と抗体未反応の ookinete の運動性を比較したところ、抗 PbCap494 抗体と反応させた ookinete の運動性は明らかに低下していた。 以上、PbCap494 は ookinete の細胞膜表面に発現し、運動性に関わるタン</p> |

| 受理年月日 | 受理番号 |
|-------|------|
| | |

| | |
|-------------|---------------|
| | パク質であると示唆された。 |
| 研究成果の 発表 | |