

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2022年5月27日

採択番号	2021-共同-3		
研究部門	先端予防治療学分野	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	河津 信一郎
研究課題名	可視化マラリア原虫を用いたオルガネラの三次元構造解析		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	あらか たまさ 荒木 球沙	国立感染症研究所 寄生動物部・任期付研究員	
研究分担者	あんのうら たけし 案浦 健	国立感染症研究所 寄生動物部・室長	
	かわい さとる 川合 覚	獨協医科大学 熱帯病寄生虫病学・教授	
	かくた そういちろう 角田 宗一郎	順天堂大学 形態解析イメージング研究室・准教授	
	かわず しんいちろう 河津 信一郎	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授	
研究期間	2021年4月1日 ～ 2022年3月31日		
目的・趣旨	<p>マラリア原虫は、非常に高度な生活環・増殖制御機構を持つユニークな単細胞の真核生物である。本研究では、そのマラリア原虫の肝内型ステージの増殖期と休眠期における内部オルガネラ分配のメカニズムを明らかにすることを目的に、集束イオンビーム内蔵の走査型電子顕微鏡(FIB-SEM)を使用し、可視化肝内型マラリア原虫のオルガネラ三次元構造解析を試みる。使用するマラリア原虫は、申請者らが既に作製に成功した可視化サルマラリア原虫 <i>Plasmodium cynomolgi</i> (Pcy-GFP) と可視化ネズミマラリア原虫 <i>P. berghei</i> (Pb-mChe) 株を使用し、培養肝細胞を用いた <i>in vitro</i> 感染実験系により調整したサンプルで各種解析を行う。</p>		
研究経過の概要	<p>予定していた河津博士との帯広畜産大学での共同研究の打ち合わせは、新型コロナウイルス蔓延に伴い、オンライン会議にて滞りなく行った(2022年2月)。研究に関しては、おおむね研究計画通りに解析が進み、Pb-mChe の肝内型ステージにおける増殖期の内部オルガネラ構造の三次元構造解析が完了し、今後は、感染早期の原虫等のオルガネラ構造を同様の解析で明らかにし、増殖期におけるオルガネラの発達・増殖機構の網羅的な観察を行う予定である。また、Pcy-GFP 感染実験に関してもおおむね計画通りに研究は進み、Pcy-GFP 感染ハマダラカからスポロゾイトを作製することに成功し、このスポロゾイトを用いてサルマラリア原虫の肝内型ステージにおける増殖期・休眠期の作製 (<i>in vitro</i>) が完了した。現在、これら原虫は、FIB-SEM 解析に進み、内部オルガネラ構造の解析を行っている。</p>		

<p>研究成果の概要</p>	<p>1. 可視化ネズミマラリア原虫 Pb-mChe の FIB-SEM 解析</p> <p><i>mCherry</i> 発現可視化ネズミマラリア原虫 Pb-mChe 株をマウスに感染させ、感染血をハマダラカへ吸血・感染させ唾液腺を回収し、スポロゾイト (SPZ) を大量に得ることが出来た。回収した SPZ は、培養肝細胞 Huh7 へ感染させ、野生型の増殖期にあたる 48 時間後 (多核体の原虫が個々に分裂する直前) に固定し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて <i>mCherry</i> シグナルから原虫の位置の特定を行った。その後、サンプルは電子顕微鏡を用いて観察し、両顕微鏡により得られた像の相関を得る解析手法 CLEM 法 (Correlative light and electron microscopy) を用いて FIB-SEM 解析を行った。得られた複数枚の切片データから、原虫の内部オルガネラ構造の 3D 化がほぼ終わり、増殖時における原虫オルガネラのネットワーク形成の一部を把握することが出来た【図 1】。</p> <p>2. 可視化サルマラリア原虫 Pcy-GFP の FIB-SEM 解析</p> <p>Pb-mChe 同様に、Pcy-GFP 株をアカゲザルに感染させ、得られた SPZ を培養肝細胞へ感染させ、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて GFP シグナルから原虫の位置の特定を行った。観察の結果から、GFP のシグナルが大きく多核形成が認められた原虫 (増殖期) と GFP のシグナルが小さい原虫 (休眠期) を確認することが出来た【図 2】。現在、これら原虫は電子顕微鏡を用いて観察し、CLEM 法を用いた FIB-SEM 解析中である。</p> <div data-bbox="901 331 1449 750"> <p>【図 1】 Pb-mChe 肝内型 (増殖期) を用いた内部オルガネラ構造解析</p> <p>CLEM法 (Correlative Light and Electron Microscopy)</p> <p>同一試料を光学顕微鏡と電子顕微鏡を用いて観察し、両顕微鏡により得られた像の相関を得る解析法</p> <p>1-200 slices/840 slices</p> </div> <div data-bbox="901 862 1449 1243"> <p>【図 2】 Pcy-GFP 肝内型 (増殖期・休眠期) の観察</p> <p>GFP発現サルマラリア原虫 (Pcy-GFP) 感染 8 日後の培養肝細胞: <i>in vitro</i></p> </div>
<p>研究成果の発表</p>	<p>学会発表</p> <ol style="list-style-type: none"> ○荒木球沙、川合覚、角田宗一郎、小林宏尚、中野由美子、久枝一、案浦健「FIB-SEM 解析を用いたマラリア原虫内部オルガネラ構造の解明」第 44 回日本分子生物学会 (横浜:2021 年 12 月) ○荒木球沙、川合覚、角田宗一郎、小林宏尚、中野由美子、久枝一、案浦健「電子顕微鏡 3D 構造解析を用いたマラリア原虫のオルガネラ分配機構の解明」第 5 回日本共生生物学会 (JAMSTEC・オンライン:2021 年 11 月) ○荒木球沙、川合覚、角田宗一郎、小林宏尚、中野由美子、久枝一、案浦健「電子顕微鏡三次元構造解析を用いたマラリア原虫内部オルガネラ構造の解明」第 80 回日本寄生虫学会東日本支部会 (獨協大・オンライン:2021 年 10 月) ○荒木球沙、川合覚、角田宗一郎、小林宏尚、中野由美子、久枝一、案浦健「電子顕微鏡 3D 構造解析を用いたマラリア原虫のオーシスト期・核分裂様式の解明」第 90 回日本寄生虫学会 (奈良・オンライン:2021 年 4 月) <p>受賞 第 5 回日本共生生物学会 若手優秀発表賞 (JAMSTEC:2021 年 11 月)</p>