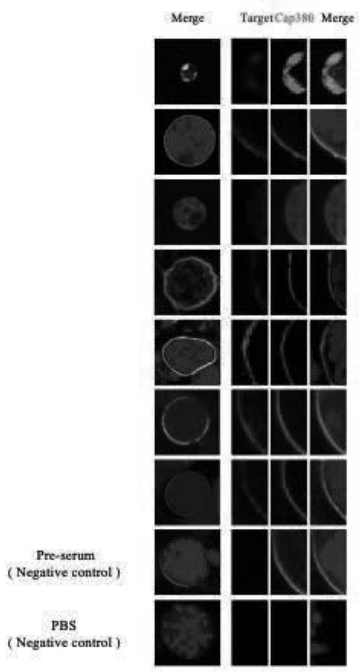
帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2025 年 4 月 28 日

採択番号	2024 共同-16		
研究部門	診断治療研究部門	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	マラリア原虫オーシスト形成・分化に関する分子機構の解明: 壁構成蛋白質の探索から		
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・教授	
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	2024 年 4 月 1 日　～　2025 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	マラリア原虫はオーシスト形成時に媒介蚊と相互作用する事により、オーシスト壁という特殊な構造物を形成する。 本研究は、マラリア原虫のオーシスト形成・分化に関する分子機構の解明を目的とし、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それらオーシスト壁構成蛋白質の発現動態および機能解析、③原虫オーシスト形成期のトランスクリプトーム解析、④オーシスト形成抑制ワクチン抗原への応用検討を行なう。		
研究経過の概　要	ハマダラカがマラリア原虫の感染を受けるオーカイネートからオーシスト形成期は原虫数が最も減少し、原虫感染に対して重要な防御免疫応答を起こす時期である。媒介蚊体内における原虫オーシスト形成期に関する生物学的特徴を明らかにするため、以下の検討を実施した。 申請者は媒介蚊に GFP 発現マラリア原虫のオーカイネートをマイクロインジェクションすることによりオーシスト感染モデルを作製した。このモデルは感染後成熟期(感染 10-15 日)のオーシストを蚊の中腸細胞を含めずに GFP 蛍光を確認しながら容易に単離回収できる特徴がある。 単離回収オーシストの壁構成蛋白質の探索のため粗精製したオーシスト壁蛋白質画分を用いて、LC-MS/MS によるショットガンプロテオミクス解析を実施した。その結果、オーシスト壁に存在する壁構成蛋白質および輸送タンパク質の候補が複数得られた。これらの候補タンパク質について、ペプチド抗体を作製し、免疫蛍光抗体法および共焦点レーザー顕微鏡を用いてその局在を確認した。		

研究成果の概　要	媒介蚊にマラリア原虫オーキネートをマイクロインジェクションすることにより感染モデルを作製した。このモデルは感染後成熟期（感染 10-15 日）のオーシストを蚊の中腸細胞を含めずに GFP 蛍光を確認しながら容易に単離回収できる特徴がある。さらに、本感染により形成されたオーシスト内のスポロゾイトは正常に分化・発育していることも確認された。 オーシスト壁の多くは不溶化すると考えられることから、2000 個のオーシスト内の可溶化成分除去を凍結融解により行ない、この粗精製したオーシスト壁蛋白質画分を用いて、LC-MS/MS によるショットガンプロテオミクス解析を網羅的に実施し、オーシスト壁構成蛋白質の同定を試みた。197 種の原虫蛋白質が得られ、GO 解析、SOSUI 解析、Probability 75%以上など選別を行った。 本解析結果には、既知のオーシスト壁の表面蛋白質 PbCap380 および構成蛋白質 CSP が含まれていることを確認し、最終的に 5 種のトランスポーター蛋白質と 4 種の新規オーシスト壁構成蛋白質の情報が得られた。 これら 9 種タンパク質について抗血清を作成し、共焦点レーザー顕微鏡によりオーシストにおける局在解析を実施した（右図）。並行して発現動態解析のための KO 原虫作成等、順次研究を進めている。 
研究成果の発　表	1. Nakayama, K., Haraguchi, A., Hakozaki, J., Nakamura, S., Kusakisako, K., **Ikadai, H.*** 2024. The C-terminal region of the *Plasmodium berghei* gamete surface 184-kDa protein Pb184 contributes to fertilization and male gamete binding to the residual body. *Parasit. Vectors* 17: 304. 2. Haraguchi, A., Takano, M., Fujiwara, K., Hakozaki, J., Nakayama, K., Nakamura, S., Yoshikawa, Y., Fukumoto, S., Kusakisako, K., **Ikadai, H.*** 2024. Searching for new molecules involved in *Anopheles* mosquitoes' response to *Plasmodium* infection. *J. Vet. Med. Sci.* 86: 485-492. 3. Haraguchi, A., Takano, M., Hakozaki, J., Nakayama, K., Nakamura, S., Yoshikawa, Y., Fukumoto, S., Kusakisako, K., **Ikadai, H.*** 2023. Formation of free oocysts in *Anopheles* mosquitoes injected with *Plasmodium* ookinetes. *J. Vet. Med. Sci.* 85: 921-928. 4. Haraguchi, A., Gonda, M., Nakayama, K., Fujiwara, K.., Hakozaki, J., Nakamura, S., Kusakisako, K., **Ikadai, H.*** 2024. Effect of a bloodmeal on *Plasmodium* oocyst growth using the enema-injection method. *Vector Borne Zoonotic Dis.* in press. 5. Boonyakida,J., Nakayama,K., Kusakisako, K., **Ikadai, H.**, Park, E.Y. 2024. Dual display of *Plasmodium yoelii* circumsporozoite surface protein and merozoite surface protein-1 on norovirus-like particles. *Bioconjug. Chem.* 35: 1933-1943.

	6. Obayashi, M., Kimura, M., Haraguchi, A., Gotanda, M., Kitagawa, T., Matsuno, M., Sakao, K., Hamanaka, D., Kusakisako, K., Kameda, T., Ibrahim, H. R., **Ikadai, H.***, Miyata, T.* 2024. Bovine lactoferrin inhibits *Plasmodium berghei* growth by binding to heme. *Sci. Rep.* 14: 20344.