

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「免疫難病・感染症等の先進医療技術」

研究課題
「マalaria感染成立の分子基盤の解明と新たな
感染阻止法の創出」

研究終了報告書

研究期間 平成14年11月～平成20年3月

研究代表者: 鎮西康雄*
(三重大学大学院医学系研究科客員教授)
(*現在鈴鹿医療科学大学医用工学部教授)

1 研究実施の概要

研究を構想するにいたった経緯・目的

マラリアは年間4-5億人が感染し百万人以上が死亡する感染症である。薬剤耐性マラリア原虫の蔓延や殺虫剤抵抗性媒介蚊の出現で、その対策は困難を極めており、ワクチンを初めとした新しいマラリア対策が求められている。

マラリア原虫のヒトへの感染は、蚊の吸血によって放出されたスポロゾイトが肝実質細胞(肝細胞)に感染することによって成立する。スポロゾイトの肝臓への感染は、マラリア原虫のヒトへの感染の最初のステップであり、ここを標的とすることで、感染そのものを阻止し、マラリアの生活環を完全に断ち切ることができる。また実際に弱毒化したスポロゾイトを用いることで、ヒトおよびマウスに強力な感染阻止免疫が誘導されることが証明されている。

しかしながら、スポロゾイトがいかにして肝臓に到達し、さらに肝実質細胞に特異的に感染できるのか、その機構はこれまでほとんどわかっていなかった。またワクチンの抗原となりうる原虫蛋白質に関してもこのステージで知られているものは非常に少ない。

本研究は、原虫の肝臓感染の分子基盤を解明し、感染に関与する原虫分子を明らかにするとともに、スポロゾイトを標的とする新たなマラリア感染阻止法の開発を目的として行なった。

研究方法

マラリア原虫の感染を、最初の段階である肝臓への感染の段階で阻止できれば、感染そのものが成立しない。肝臓感染のステージで感染を阻止することは抗マラリア戦略として理想的である。しかしながらスポロゾイトの肝臓感染の経路、感染に関与する分子についてはこれまでほとんどわかっていなかった。この原因は、この課題に分子レベルでアプローチする有効な方法が存在しなかったことにある。

一方、マラリア原虫のゲノム配列の解明、マラリア原虫における遺伝子組み換え技術の創出により研究基盤がこのステージでもようやく整ってきた。本研究では、原虫遺伝子の網羅的な発現解析、逆遺伝学的手法を用いた遺伝子の機能解析の手法を用いて、スポロゾイトの肝臓感染に関与する原虫分子を探索し、感染の機構を明らかにすることを試みた。具体的にはスポロゾイトステージのESTデータベースを構築し、肝臓感染に関わる遺伝子の候補を選択するとともに、これらの遺伝子を破壊した原虫を作製し、その表現型を *in vitro* および *in vivo* で解析することで、感染に必要な遺伝子の同定、各遺伝子の機能とそれらが関与する感染過程を解明した。

研究の成果

①肝臓感染の経路とそれに関わる分子の同定

これまでの研究でスポロゾイトが肝臓に感染するために、「細胞通過」能が決定的な役割を果たしていることを明らかにした。

「細胞通過」は、1. スポロゾイトが皮膚の内部を通過し循環系に入る過程、2. 肝類洞壁を越えて肝類洞から肝実質へ侵入する過程、という2つの独立した感染過程でそれぞれ重要な役割を果たしていた。感染蚊の吸血時、スポロゾイトはまず皮膚の組織の中に放出される。野生型では蚊の吸血20分後でも多くのスポロゾイトが皮膚内を移動して、侵入する血管を探索していた。一方細胞通過能を欠いたスポロゾイトは、吸血直後より皮膚内を移動することができなかった。以上の結果よりスポロゾイトは障害となる皮膚内の細胞内を通り抜け血管に到達することが明らかになった。細胞通過能を欠いた原虫ではこの過程で感染効率が数十分の一に低下した。循環系に侵入したスポロゾイトは血流に乗り肝類洞に到達する。その後類洞壁を越えて肝実質に侵入する。我々はスポロゾイトが肝類洞から肝実質へ侵入するさいに Kupffer 細胞を通過していることを証明した。すなわちスポロゾイトは細胞通過によって Kupffer 細胞内部を通り肝実質に到る。細胞通過能を欠いた原虫ではこの過程で感染効率が 1/30 に低下した。

以上の2つの異なる過程で感染効率が低下するため、細胞通過能を欠いた原虫の肝臓への感染性は 1000 分の 1 以下に減少し、事実上蚊からの感染が不可能になった。以上の結果は通過に関わる分子を標的とした感染阻止が可能であることを示唆している。

細胞通過には3種類の原虫蛋白質 (SPECT, SPECT2, Ce1T0S) が必須であった。これらの分子はマイクロネームと呼ばれる分泌性小胞に蓄えられており、宿主細胞への侵入時に原虫から放出されると考えられる。

②肝実質細胞への感染

肝実質に到達したスポロゾイトは次に肝実質細胞に寄生する。この実質細胞の特異的認識に関わる3種の蛋白質を同定した (Pbs36, Pbs36p, Pbs41)。Pbs36p, Pbs41 は GPI アンカーを有し原虫の細胞表面に提示される蛋白質と考えられる。これらの分子を欠いた原虫は、肝実質細胞に遭遇しても、それを障害物として「通り抜けて」しまう。すなわち肝細胞を認識し寄生にコミットすることができない。これら3種の分子は肝細胞感染に特異的に関わることが明らかになった初めての原虫蛋白質である。ノックアウト原虫は肝臓への感染性が約 1/1000 に減少する。細胞通過に関与する蛋白質とともに、感染阻止の標的として有望である。

③肝臓感染に関わる分子を標的とした感染阻止

以上の結果をもとに、同定した原虫蛋白質 (SPECT, Ce1T0S, Pbs36, Pbs36p, Pbs41) に対するモノクローナル抗体を作製し、抗体による感染阻止効果を調べた。作製した抗体のうち、Ce1T0S を除く全ての抗原に対し、マウスへの受動免疫により約 10 倍から 100 倍の感染阻止効果を持つ抗体が得られた。これらの抗体はすべて *in vitro* ではスポロゾイトの細胞侵入を阻止せず、従って宿主の免疫系の中においてのみ阻止効果を

持った。これまで肝臓感染ステージで感染阻止効果が報告されているものは、circum-sporozoite protein に対する抗体のみであった。本研究により多数の新たなワクチン候補抗原が同定された。

④肝実質細胞内での増殖とそれに関わる分子

スポロゾイトは寄生胞を形成し肝実質細胞に侵入すると、寄生胞内で数千の赤血球感染型原虫（メロゾイト）へと発育し、血中に放たれ ‘マラリア’ とよばれる病態をひき起こす。したがって、肝細胞でのメロゾイトへの増殖は、マラリア伝播の成立に極めて重要なステップである。またこのステージはマラリアのライフサイクルの中でも唯一細胞性免疫による感染阻止が可能なステージである。しかしながら、寄生が宿主と原虫のいかなる相互作用の上に成立しているのか、肝細胞内で原虫がどのような蛋白質を発現しているのか、その分子基盤は全く明らかにされてこなかった。そこでまず肝内型原虫研究のための必須技術である感染肝細胞の精製法を確立し、この技術を用い感染肝細胞内での原虫の遺伝子発現を解析した。具体的には肝内ステージで GFP を発現する遺伝子組換え原虫を作製し、この組換え原虫を用いセルソーターで感染肝細胞を精製した。次いで精製した感染細胞から EST データベースを構築した。

構築したデータベースを用い肝細胞内ステージで特異的に発現する遺伝子を同定し、それらノックアウトした原虫を作製して表現型を調べた。その結果肝臓内寄生に必要な原虫蛋白質として、LS1, LS2 の2つの分子を同定した。両者は共に肝内型原虫が宿主細胞に寄生するために形成した寄生胞内に局在しており、これらの蛋白質を欠く原虫の感染性は 1/10 以下に低下した。したがって肝実質細胞内での感染の維持に重要な働きをしていることが明らかになった。この研究は今後、マラリア原虫と宿主細胞の相互作用、すなわち肝細胞内寄生成立の分子基盤を解明するための基礎データを提供する。またこのステージを標的としたマラリアワクチンの開発にも資するものと期待される。

2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

研究開始時点で立案した5年間の研究計画・進め方

本研究は、原虫の肝臓感染の分子基盤を解明し、感染に関与する原虫分子を明らかにするとともに、スポロゾイトを標的とする新たなマラリア感染阻止法の開発を目的として行なった。この目的を達成するために、ヒトマラリア原虫のモデルとしてネズミマラリア原虫 (*Plasmodium berghei*) を用い以下の実験を進めた。

① マラリア原虫スポロゾイトのESTデータベース構築とノックアウト候補遺伝子の選定

マラリア原虫スポロゾイトは蚊の唾液腺に感染することではじめて、肝臓（ヒト）への感染能を獲得する。この事実は、肝臓感染に必要な遺伝子の発現が唾液腺感染後に始まることを意味している。そこで肝臓感染に関わる遺伝子を同定するため、唾液腺感染前と唾液腺感染後の2つの異なるスポロゾイトESTデータベースを構築する。両者を比較し、唾液腺感染後の発現の増加を指標に肝臓感染に関わる原虫遺伝子を選択する。データベースの構築、発現遺伝子の解析は基生研グループが担当する。

② 遺伝子ノックアウト原虫の作製と表現型・機能の解析

上で選択した遺伝子をノックアウトした原虫を作製し、スポロゾイトの肝臓への感染性を解析する。感染性に影響が見られたものについて、運動能、細胞侵入能等を *in vitro* のアッセイ系を用い評価する（三重大グループが担当）。

③ GFP遺伝子導入原虫の作製、*in vivo* imaging による原虫の肝細胞感染プロセスの解明

GFP発現ノックアウト原虫を作製し、リアル・タイム共焦点レーザー顕微鏡で *in vivo* imagingを行ない、実際の組織（皮膚、肝臓）の中で原虫がどのような挙動を示すかを観察し、肝細胞感染プロセスの解明を行なう（三重大グループが担当）。

④ 抗体による感染阻止実験

前述の実験で明らかになった各原虫抗原に対し、抗体による原虫感染の阻止実験を行なう。小麦胚芽を用いた *in vitro* Translation 法により発現させた蛋白質を抗原としてマウスを免疫しモノクローナル抗体を作製する。得られた抗体をマウスの静脈内に注射し、受動免疫を付与した後、スポロゾイトを皮下または静脈内注射によりチャレンジし、各抗体の感染阻止効果を調べる（三重大グループが担当）。

その後の展開で生じた目標

① オオキネートの宿主細胞侵入の分子基盤の解明

スポロゾイトの肝臓感染機構の研究の過程で、同一分子 (CelTOS) がオオキネートにも発現され蚊の中腸への侵入に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに両ステージの EST データベースの比較から、他にも多くの相同分子が両ステージの細胞侵入の過程で機能していることがわかった。そこでスポロゾイト肝臓感染の分子基盤解明の手掛かりを得ることを目的として、オオキネートの感染機構の研究を新たに計画に付け加えた。(三重大グループが担当)

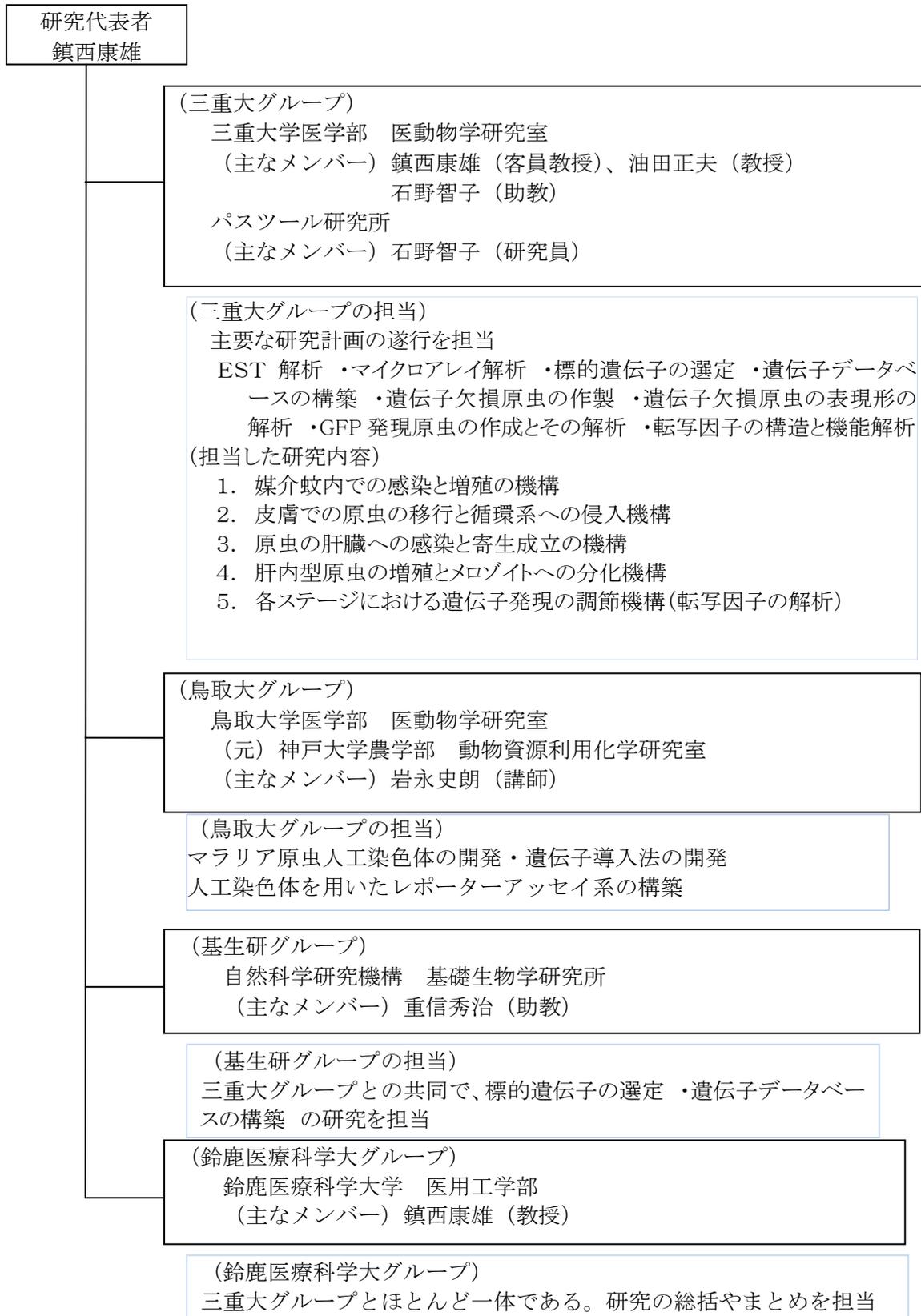
② マラリア原虫の転写調節機構の解明

スポロゾイト期に発現する遺伝子を探索するため転写調節機構の研究を新たに計画に付け加えた (三重大グループが担当)。スポロゾイトは唾液腺感染後に肝臓感染に必要な遺伝子の発現を開始する。唾液腺での遺伝子発現機構を解明すれば肝臓感染において機能する遺伝子をゲノム配列から同定することが可能になる。

③ 人工染色体を利用した新規遺伝子導入法の開発

スポロゾイトステージにおける遺伝子発現調節機構の解明のために、迅速且つ簡便な遺伝子改変原虫作成法が必要となった。そこで新規遺伝子導入法としてマラリア人工染色体の開発を行なった。また作成した人工染色体を利用した新規レポーターアッセイ系の構築を行い、原虫の遺伝子転写調節機構の解析へと応用することを試みた。この研究のため鳥取大グループが新たにプロジェクトに加わった。

(2)実施体制

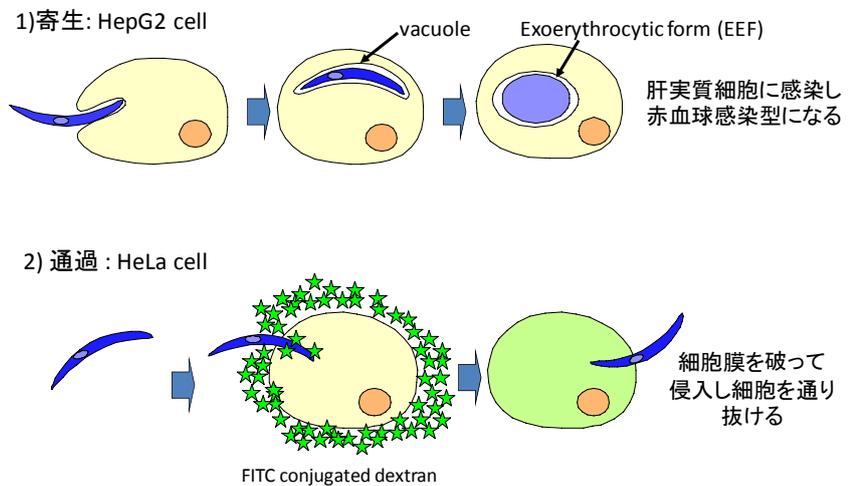


3 研究実施内容及び成果

- ① マラリア原虫スポロゾイトの肝臓感染における「細胞通過」の役割
- ② スポロゾイトの肝実質細胞感染の機構
- ③ 肝臓感染に関与する原虫分子を標的とした感染阻止法の開発
- ④ 肝内型原虫の発育とメロゾイトへの分化に関与する分子の同定
- ⑤ 肝臓感染と蚊中腸細胞感染における細胞侵入機構の類似性
- ⑥ マラリア原虫の転写調節機構の解明
- ⑦ マラリア原虫人工染色体を利用した新規遺伝子導入法の開発と応用

① マラリア原虫スポロゾイトの肝臓感染における「細胞通過」の役割

マラリア原虫スポロゾイトはホストの細胞に侵入する際に「通過」と「寄生」という2種類の侵入様式を示す(右図)。「寄生」はスポロゾイトが肝実質細胞に寄生胞を形成しながら侵入し、その中で最終的に赤血球感染型になる



際の侵入の様式である。一方「通過」は細胞膜を破って細胞内に侵入し、細胞質を通り、再び細胞外へ脱出する「細胞を通り抜ける」侵入様式である。これまでにスポロゾイトが培養細胞を「通過」する能力をもつということはすでに *in vitro* で観察されていたが、「通過」能の *in vivo* での役割は全くわかっていなかった。

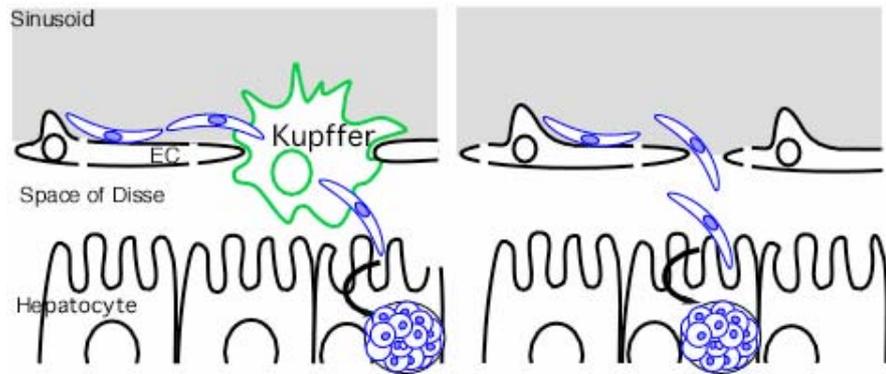
・細胞通過に特異的に関わる遺伝子 SPECT の同定

われわれは後に SPECT (Sporozoite Microneme Protein Essential for Cell Traversal) と名付けた遺伝子が、肝臓感染能を持つスポロゾイトに特異的に発現することを見出した。この分子の機能を解析するためにノックアウト原虫を作製したところ、このノックアウト原虫のスポロゾイトは細胞通過能を完全に欠除していた。一方、寄生能は正常であった。ノックアウト原虫のスポロゾイトをラットに静注し感染性を調べたところ、肝臓への感染性が野生型に比べ約30分の1に低下していた。

・スポロゾイトの肝実質侵入経路の同定と「細胞通過」の役割

スポロゾイトは血流に乗って肝臓へ運ばれると、肝類洞で循環系を脱し肝実質に侵入する。この侵入のためにスポロゾイトは循環系と実質を隔てる類洞壁を越えなければならない。類洞壁は細胞層であり、したがってわれわれはスポロゾイトの細胞通過能は類洞壁の細胞を通過し、肝実質に到達するために必要ではないかと考えた（下図左）。

この仮説を検証するために、ラットを薬剤で処理してKupffer細胞を除去し類洞壁に「孔」を開けた（図右）。このラットでノックアウト原虫の感染



性を調べたところ野生型と全く同じになった。以上の結果から「通過」能は類洞壁を越えてスポロゾイトが肝臓内部に侵入するために必要であることが明らかになった。現在では、マラリア原虫スポロゾイトが Kupffer 細胞を「通過」し肝臓に侵入するというモデルは広く受け入れられるようになった。

・皮膚から循環系への侵入過程における細胞通過の役割

感染蚊の吸血時、スポロゾイトはまず皮膚の組織の中に放出される。われわれは、GFP 発現原虫を作製し、その皮膚内での運動を real time で観察することにより、「通過」能はスポロゾイトが皮膚の中を通過して循環系に入る過程でも重要な役割を担っていることを見出した（投稿中）。野生型では蚊の吸血 20 分後でも多くのスポロゾイトが皮膚内を移動して、侵入する血管を探索していた。一方、細胞通過能を欠いたスポロゾイトは、吸血直後より皮膚内を移動することができなかった。以上の結果よりスポロゾイトは障害となる皮膚の細胞内を通り抜け血管に到達することが明らかになった。細胞通過能を欠いたこれらの原虫では循環系に入るまでの過程で感染効率が数十分の一に低下した。

以上のように細胞通過能は皮膚と肝臓の両方の侵入過程で機能するため、ノックアウト原虫が蚊の吸血によって感染する際の感染性は 1/1000 程度まで低下する。この事実は「通過」に関わる原虫蛋白がマラリア原虫のヒトへの感染に必須であり、マラリア感染防御のための有望な標的であることを意味している。

・スポロゾイトの細胞通過に関わるその他の遺伝子の同定

<SPECT2>

EST 解析によりパーフォリン様分子 (SPECT2) がスポロゾイト期特異的に発現していることを見出した。SPECT2 遺伝子のノックアウト原虫を作製したところスポロゾイト

の細胞通過能は完全に欠如しており、SPECT 同様にスポロゾイトの細胞通過能に必須であることが解った。また、肝細胞寄生能は正常であった。このスポロゾイトをラットに静注し感染性を調べたところ、肝臓への感染性が著明に低下していた。一方オオキネート期に発現されるパーフォリン様分子 (MAOP) はオオキネートが蚊の中腸上皮細胞膜を破壊しその内部へ侵入するのに必須であった。これらの知見は両ステージに共通した細胞侵入機構があることを示唆している (「スポロゾイトの肝臓感染とオオキネートの蚊中腸細胞感染における細胞侵入機構の類似性」の項参照)。

<Ce1T0S>

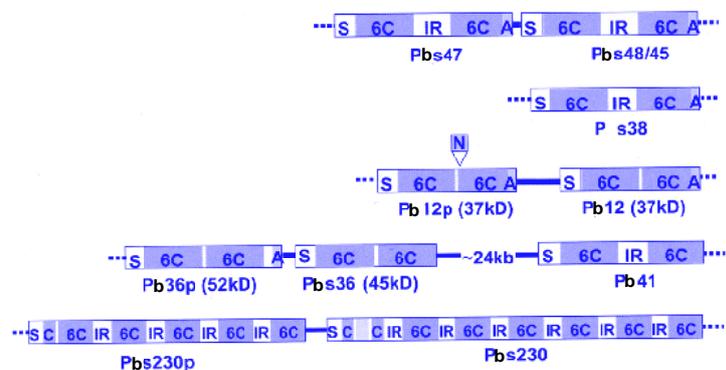
マラリア原虫のオオキネートとスポロゾイトの両ステージで、同一の分子 (Ce1T0S) が原虫の細胞通過に決定的な役割を果たしていることを見出した。Ce1T0S はオオキネートとスポロゾイトの両ステージでマイクロネームに局在していた。Ce1T0S を欠損したオオキネートは蚊の中腸上皮細胞内に侵入できたがその内部を基底膜へ向かって移動できなくなった。またスポロゾイトも細胞通過能をほぼ完全に失い、肝臓への感染性を著明に低下させた。Ce1T0S は分泌性蛋白であり、宿主細胞内に放出されて、原虫が細胞質を移動する際の足場を提供すると考えられる。以上の知見はマラリア原虫の蚊への感染とヒトへの感染に共通の分子基盤が存在することを初めて明らかにしたものである (「スポロゾイトの肝臓感染とオオキネートの蚊中腸細胞感染における細胞侵入機構の類似性」の項参照)。

② スポロゾイトの肝実質細胞感染の機構

蚊の吸血によって放出されたスポロゾイトは、血流により運ばれて肝類洞に達し類洞壁を「通過」して肝実質に侵入する。ここで肝実質細胞に出会うと、細胞侵入様式を「通過」から「寄生」へと切り替え、寄生胞を形成して肝実質細胞に感染する。しかしながら、スポロゾイトがいかにして肝実質細胞を認識し、特異的に感染するのかその分子機構は全くわかっていなかった。この研究は Pbs36 および Pbs36p という 2 つの分子がこのステップで重要な働きをしていること報告したものである。

・細胞寄生に特異的に関わる遺伝子 Pbs36p・Pbs36 の同定

Pbs36p および Pbs36 は、6 つのシステインから成るドメイン (6-cys domain) をもつタンパク質である。このドメインをもつタンパク質はマラリア原虫に特有であり、他の原虫類にも確認されていない。マラリア原虫は 10 種類の 6-cys



domain 蛋白質の遺伝子をもつ（上図）。

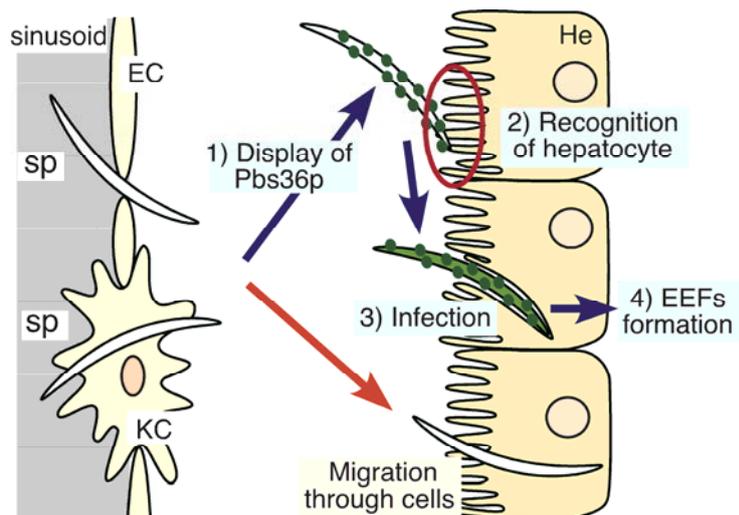
われわれは EST の解析から Pbs36p および Pbs36 が肝臓に感染性をもつスポロゾイト（すなわち蚊の唾液腺感染後）に特異的に発現していることを見出した。そこでこれらの遺伝子を破壊した原虫を作製し、その機能を調べた。ノックアウト原虫は肝臓への感染性が数千分の 1 に低下していた。In vitro での感染実験によって、ノックアウト原虫は肝実質細胞への感染性をほとんど欠いていることがわかった。一方、細胞通過能は正常であった。さらに詳しい表現型の解析から、ノックアウト原虫は肝実質細胞に出会っても「通過」から「寄生」へと切り替えをおこなわず、肝実質細胞をあたかも障害物であるかのように「通過」し続けることがわかった。以上の表現型は Pbs36 および Pbs36p を欠いた原虫が、肝実質細胞を認識できなくなったことを意味する。

この二つの分子は肝実質細胞を認識するのに必要であることが証明された初めての分子である。Pbs36p は GPI アンカー配列をもち、マイクロネームの分泌により原虫表面に提示される。したがって、Pbs36p と肝実質細胞表面分子の相互作用がこの「認識」に関わっている可能性がある。以上の結果に基づき提唱したマラリア原虫スポロゾイトの肝細胞感染のモデルを右図に示す。スポロゾイト (SP) は肝実質に侵入過程で Pbs36p 分子を細胞表面に提示する。

Pbs36p が肝実質細胞の表面分子と結合することで原虫は「寄生」へとコミットする（矢印上）。一方、ノックアウト原虫ではこの切り替えが起こらず、肝実質細胞を「通過」し続ける（矢印下）。

Pbs36 および Pbs36p を手がかりにして、肝実質細胞上のレセプターを同定し、

スポロゾイトの肝臓への特異的感染の機構を解明するのが今後の課題である。なお Pbs36 および Pbs36p はマラリア原虫の雌雄の接合に関わる分子、Pbs48/45 および Pbs47 と構造上ファミリーを形成する（上図参照）。雄雌の認識の機構と肝実質細胞認識の機構の間に意外な相同性がある可能性を示唆し、生物学的にも興味深い。



③ 肝臓感染に関わる原虫蛋白質を標的とした感染阻止

・モノクローナル抗体による感染阻止効果

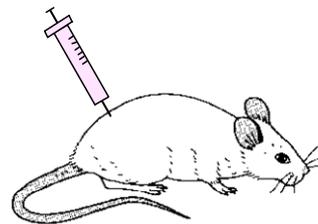
これまでに明らかにした肝臓感染に関わる原虫蛋白質（Pbs36, Pbs36p, Pbs41, SPECT, Ce1T0S）は全て膜蛋白質または分泌性蛋白質であり、抗体による感染阻止の標的となる。そこで、上記の分子の組換え蛋白質の調製し、それらを抗原としてマウスを免疫して、

モノクローナル抗体を作製した。更に各モノクローナル抗体をマウスの静脈内に注射し、受動免疫を付与した後、スポロゾイトを皮下または静脈内に接種して各モノクローナル抗体の感染阻止効果を検討した。その結果、Pbs36, Pbs36p, Pbs41, SPECT に対するモノクローナル抗体が感染阻止効果を持つことを確認した（下図）。一方、Ce1T0S に対するモノクローナル抗体では、同様の効果を確認できなかった。加えて、興味深いことに Pbs36, Pbs36p, Pbs41, SPECT に対する抗体は *in vitro* では感染阻止効果を示さなかった。このことから、これらの抗体は宿主の免疫系の中でのみ機能することが推定され、1. 感染細胞に結合しその排除を促進する、2. 細胞外に残された抗原に結合し免疫系を活性化する、3. スポロゾイトをオプソニン化する等の機序により感染阻止効果を発揮するものと考えられた。このような結果はマラリアワクチン開発研究において報告されておらず、全く新しい知見であった。

抗体を静注



スポロゾイトを皮下注・静注



抗原	monoclonal antibody	感染効率
SPECT	119-2K	1/10-1/100
P36	#10	1/10
P36	#11	1/10-1/30
P36p	1G2	1/10-1/30
P41	1C8	1/10-1/100

現在までに、肝臓感染を阻止する抗体としては、スポロゾイトの表面蛋白質である circum-sporozoite protein (CS protein) に対する抗体しか報告されていない。本研究では、新規に同定した肝臓感染に関わる複数の蛋白質の抗体が、感染阻止効果を持つことを証明した。この結果は肝臓感染ステージを標的にしたワクチンに対する新たな可能性を開くものであると評価される。

④ 肝内型原虫の発育とメロゾイトへの分化の機構

・ 感染肝細胞精製法の確立と EST 解析

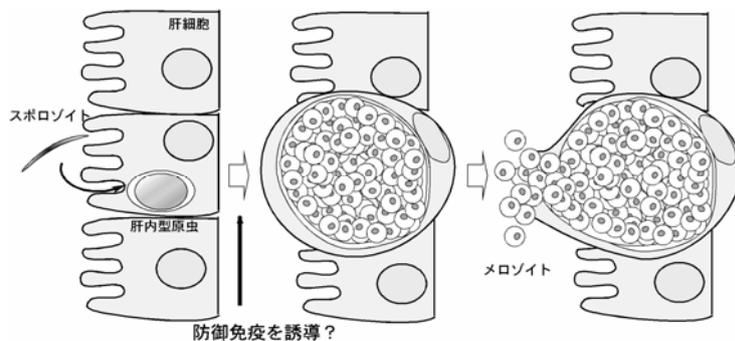
マラリア原虫（スポロゾイト）は蚊を介してヒトの体内に侵入すると、まず肝実質細胞（肝細胞）に寄生する（下図）。寄生したスポロゾイトは肝細胞内で数千個の赤血球感染型原虫（メロゾイト）へと発育し、血中に放たれた後、赤血球への感染を繰り返し、その結果、深刻な病態をひき起こす。このことは肝細胞へのスポロゾイトの感染および肝細胞内でのメロゾイトへの発育・増殖が、マラリア感染伝播の成立において極めて重要なステップであることを示している。しかしながら、研究材料である肝内型原虫の調製が極めて困難であったため、肝細胞内での寄生に関わる宿主-原虫間の相互作用・分子基盤は未解明であった。

そこで、この問題を解決するため本研究ではまず肝内型原虫研究のための必須技術である感染肝細胞の精製法を確立した。すなわち肝内ステージで GFP を発現する遺伝子組換え原虫を作製し、スポロゾイトをラットに感染させ、その肝細胞からセルソーターを用い感染早期の肝細胞を精製した。精製した感染肝細胞から cDNA ライブラリーを作製し EST 解析を行なうとともに、DNA マイクロアレイを用いて肝臓感染ステージでの遺伝子発現を解析した。

肝細胞内ステージは弱毒化した原虫を用い持続的な感染阻止免疫が成立することが実証されている唯一のステージであり、ワクチンの標的としても重要である。本研究で確立した感染肝細胞精製技術によって、肝内型原虫の研究は重要な第一段階をクリアしたと言え、新規ワクチン抗原の発見に大きく貢献すると期待される。

・細胞内寄生の維持に関わる蛋白質の同定

EST 解析をもとに肝細胞感染後特異的に発現される複数の遺伝子を同定した。これらの遺伝子をノックアウトした原虫を作製したところ、2つの遺伝子で肝臓への感染性が著明に低下していた (LS1, LS2)。これ



らの遺伝子がコードする両蛋白質は、感染細胞内に形成される寄生胞に局在していた。寄生胞の役割は不明であるが、宿主細胞との相互作用、例えば、栄養の吸収や宿主のアポトーシスの抑制、宿主からの攻撃の回避に機能していると予想されている。LS1, LS2 分子の原虫の細胞内寄生における機能・役割の解明は今後の課題であると考え (① Yuda et al., 論文校閲中、② Ishino et al., 投稿中)。

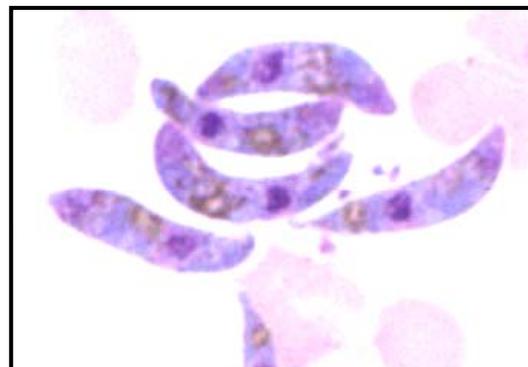
⑤ スポロゾイトの肝臓感染とオオキネートの蚊中腸細胞感染における細胞侵入機構の類似性

マラリア原虫はその生活環の中に3つの宿主侵入ステージ（オオキネート、スポロゾイト、メロゾイト）を持つ。各侵入ステージはマイクロネーム等の細胞内小器官に蓄えた蛋白質を細胞侵入時に放出することにより標的細胞に侵入する。我々は異なる侵入ステージの侵入機構が共通した分子基盤を持つことを見出した。特に蚊の中腸侵入ステージであるオオキネートと肝臓感染ステージであるスポロゾイトの細胞侵入機構には共通点が多く、オオキネートの細胞侵入機構を研究することで、スポロゾイトの肝臓感染機構解明のための手掛かりを得ることができると考えた。以下に記述する様に侵入運動の活性化、滑走運動、宿主細胞膜の破壊、細胞内の移動に共通・類似した蛋白質が使用されていることが明らかとなった。

・マラリア原虫の侵入運動に必須な分子の同定

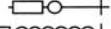
<CTRP>

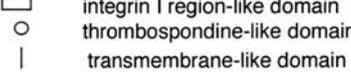
マラリア原虫はメロゾイト、オオキネート、スポロゾイトの各発育ステージで運動性を持つ。これらの各ステージの原虫は鞭毛・繊毛といった細胞表面の運動器官を持っておらず、代わりにマイクロネームとよばれる細胞内のオルガネラの内容物を分泌することによって、運動する（滑走運動）。



我々は既に、オオキネート（蚊の中腸に侵入するステージ・上写真）にCTRPというマイクロネーム蛋白質が発現していることを報告している（Yuda et. al JEM 1999）。

CTRPはvWF及びThrombospondineといった蛋白質に相同なドメインと一個の膜貫通領域を持ち、マラリア原虫スポロゾイト（肝臓感染ステージ）やトキソプラズマ等の他のアピコンプレックス類の運動ステージにも相同蛋白質が発現している（下図）ことが知られている。そこで、

		Size (amino acids)	Species	Stage	Reference	
我々は「このファミリーに属する分子がマラリア原虫（および他のアピコンプレックス類）の侵入運動の中核を担うという仮説を提唱し、遺伝子ノックアウト法を用いて、その証明を試みた。」	PbCTRP		1,905	<i>P. berghei</i>	ookinete	(this paper)
	PfCTRP		2,098	<i>P. falciparum</i>	gametocyte?	5
	TRAP		559-826	<i>Plasmodium</i> spp.	sporozoite	6, 15
	MIC 2		769	<i>T. gondii</i>	tachyzoite	7
	ETP 100		712	<i>E. tellena</i>	sporozoite	8

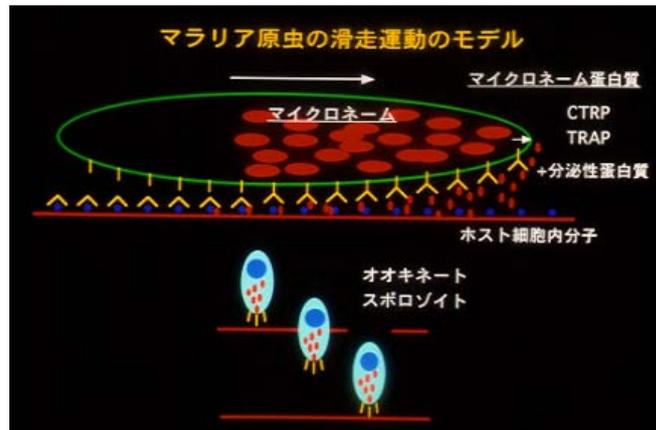


我々は「このファミリーに属する分子がマラリア原虫（および他のアピコンプレックス類）の侵入運動の中核を担うという仮説を提唱し、遺伝子ノックアウト法を用いて、その証明を試みた。」

CTRP をノックアウトしたマラリア原虫は正常な形態を持ったオオキネートを形成した。しかし、これらのオオキネートは運動性を欠失し、蚊の中腸細胞に全く感染できなくなった。一方、ノックアウト原虫はオオキネート以外の全てのステージで正常な感染

性を保持することが確認された。以上のことより CTRP がオオキネートの中腸侵入運動に必須な分子であることが証明された。

この研究で提示した原虫運動のモデルを示す（右図）。マイクロネームから分泌された CTRP は原虫表面に提示され、表面上を後方に移動する（細胞内



のドメインはアクチン／ミオシンのモーターと結合し、動力を伝える)。この際、CTRP の細胞外の接着蛋白様の領域が何らかの外部の足場と結合することで原虫が前進する推力を得る。現在、この侵入運動モデルは、マラリア原虫の運動性の理解において広く、一般化されたものとして受け入れられており、多くの侵入運動の研究に利用されている。

<CDPK3>

マラリア原虫の宿主細胞への侵入運動は宿主細胞認識後に起こる細胞内シグナルによって制御されていると推定される。しかし、原虫内の細胞内シグナル伝達についてはほとんど知見が得られておらず、重要なリン酸化酵素も発見されていない。

一方、我々は EST データベース中にオオキネート特異的に発現するカルシウムイオン依存型リン酸化酵素を見出し、CDPK3 と命名した。この CDPK3 のノックアウト原虫は正常にオオキネートを形成するものの、蚊中腸細胞に対する感染能を著しく欠損し、更に蚊の中腸上皮細胞表面では活発に運動をするものの、内部への細胞侵入ができなくなっていた。加えて、細胞内カルシウムのキレーターの投与によっても同様の表現型を呈することを確認した。以上の結果は中腸細胞への侵入運動が細胞内カルシウムの動員とそれに続く CDPK3 の活性化によって制御されていることを強く示唆するものであり、侵入運動と細胞内シグナル伝達系の関係性を示すものであった。

更に興味深いことに、肝臓感染ステージにおいて CDPK ファミリーに属する他の遺伝子が特異的に発現することが確認された。このことから、すべての宿主細胞への侵入ステージで共通した分子基盤に基づく、細胞内シグナル伝達が存在することが示唆される。今後、CDPK ファミリーの研究を通じ、宿主細胞への侵入・感染に関わる分子基盤が細胞内シグナル伝達を手がかりとして明らかになると期待される。

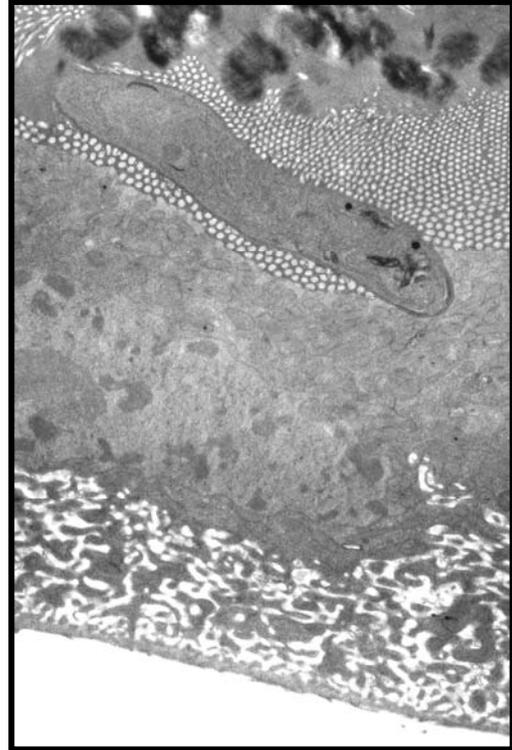
・ 宿主細胞膜の破壊に必須な分子の同定

<MAOP>

マラリア原虫は宿主の組織に侵入する際、その細胞を通過する。マラリア原虫のライフサイクルの中で「細胞通過能」を持つ発育ステージは、蚊の中腸上皮細胞に侵入する

オオキネート及びヒトの肝臓に感染するスポロゾイトの2つのステージである。我々はマラリア原虫の EST 解析によりこの2つのステージに共通してパーフォリン様分子が発現していることを見いだした。このうちオオキネートに発現している分子を MAOP と名づけ、その機能を解明した。

MAOP はオオキネート特異的に発現し、マイクロネームとよばれる分泌性オルガネラに局在していた。MAOP 遺伝子をノックアウトしたマラリア原虫は正常な形態をしたオオキネートを形成したが、蚊への感染性を完全に欠損していた。加えて、通常、観察されるオオキネートの侵入による中腸上皮細胞の破壊が、ノックアウト原虫では全く見られなかった。そこで、電子顕微鏡により詳細に中腸内のオオキネートを観察したところ、大多数の原虫が先端部を上皮細胞の細胞膜に嵌り込めた状態で侵入を停止し、細胞膜表面は深く細胞質側に陥没していたが、細胞膜の破壊は全く観察されなかった（右写真）。以上の結果より、この分子はオオキネートが中腸上皮細胞の細胞膜を破り細胞内に侵入するために必要な分子と結論付けた。



MAOP 分子内のパーフォリン様ドメインの存在は、原虫の細胞侵入時にこの分子が細胞膜内にチャンネルを形成する可能性を示唆している。形成されたチャンネルを通じて他のマイクロネーム蛋白質が細胞内に注入され細胞膜の破壊が起こると推定される。

一方、我々はスポロゾイトのステージに発現するパーフォリン様分子（SPECT2 と命名）がスポロゾイトの細胞通過に必須であり、肝臓への感染に重要な役割を果たしていることを発見した。以上の結果はパーフォリン様分子がマラリア感染防御法の有力なターゲットであることを示唆している。

・細胞内の移動に必要な分子の同定

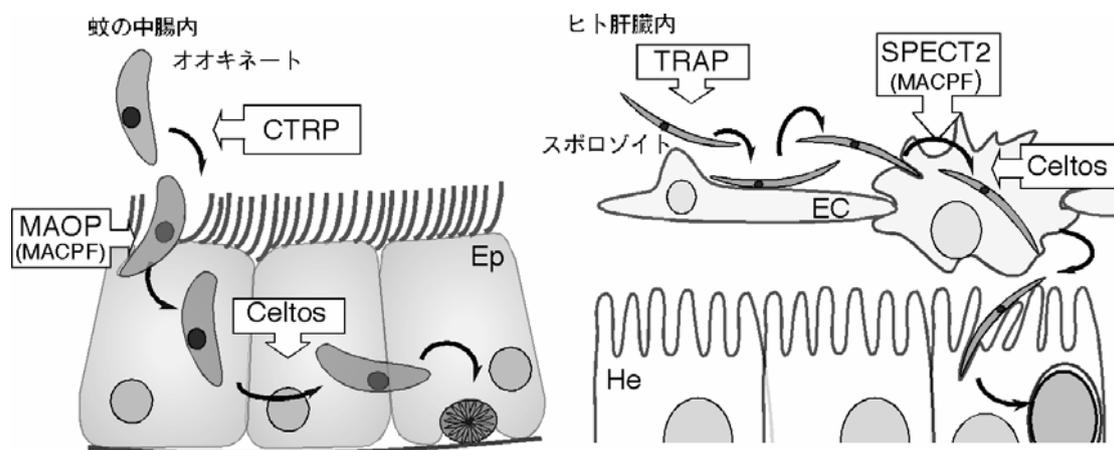
<Ce1TOS>

細胞膜を破り中腸上皮細胞内に侵入したオオキネートは次に細胞質内を通過して基底膜へと移動する。この細胞質内での移動に必要な原虫蛋白質として我々が初めて同定した分子が Ce1TOS (cell traversal protein of ookinetes and sporozoites) である。Ce1TOS はオオキネートとスポロゾイトの両ステージで発現し、マイクロネームに局在していた。Ce1TOS 遺伝子をノックアウトしたマラリア原虫は正常な形態をしたオオキネートを形成したが、蚊への感染性をほとんど欠損していた。中腸内の Ce1TOS ノックアウト原虫

のオオキネートを電子顕微鏡による観察の結果、大多数のオオキネートは上皮細胞の細胞膜を破壊して上皮細胞内へ侵入していたが、細胞内を基底膜に向かって移動出来ず、細胞内に留まっていることが確認された。これらのオオキネートは最終的には中腸の修復機構により、侵入により障害を受けた上皮細胞とともに中腸上皮細胞列より排除された。また CelTOS 遺伝子をノックアウトしたスポロゾイトも細胞通過能をほとんど欠如しており、静脈内投与による肝臓への感染性が 1/30 に低下していた。以上のことよりこの分子はオオキネートとスポロゾイトの両ステージで細胞内の通過に関与していることが示され、両ステージの細胞通過に共通した分子基盤が存在することが明らかになった。

・ スポロゾイトの肝臓感染とオオキネートの蚊中腸細胞感染の共通分子基盤

オオキネートおよびスポロゾイトの両ステージは障害となる宿主細胞を通過することにより寄生部位（中腸基底膜および肝実質）に到達する。この侵入運動はカルシウムの細胞質への動員とそれに引き続く CDPK の活性化によって開始される。細胞内のモーター蛋白質からの侵入運動力の伝達は CTRP および TRAP という接着蛋白質様分子により担われる。また細胞通過時の細胞膜破壊には両者ともパーフォリン様分子が必須である。続く細胞質内の移動には CelTOS という同一の分子が使われている。以上のように原虫の宿主細胞への侵入・感染に共通分子基盤が存在するという概念は我々のグループによって初めて提唱されたものである。このことは将来のワクチン開発を行う際の抗原選択において重要な知見となることは間違いないと思われ、学術的意義のみならず、社会的な意義においても大変、大きな成果であると考えられる。



⑥ マラリア原虫の転写調節機構の解明

宿主細胞侵入時、マラリア原虫は細胞表面や、マイクロネームをはじめとした分泌性オルガネラから大量の膜蛋白質、分泌性蛋白質を放出する。放出された蛋白質は宿主側の分子と特異的に相互作用し細胞の認識、侵入に関わっていると考えられる。これらの

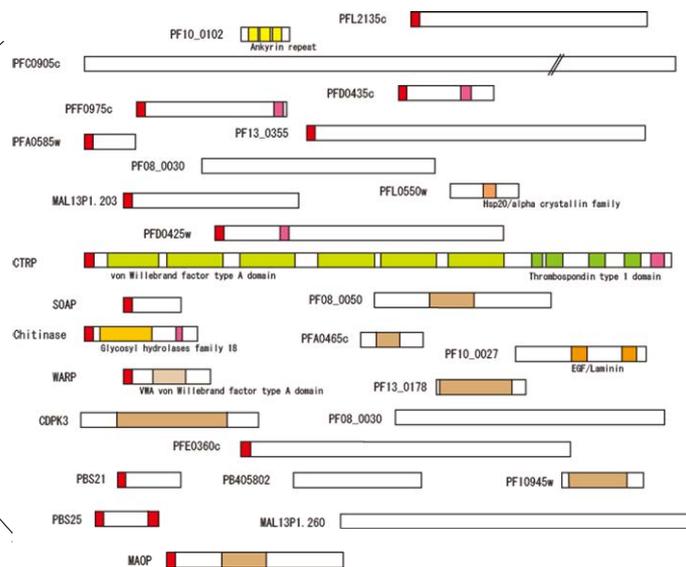
原虫蛋白質は宿主侵入機構を解明するための鍵をにぎっているとともに、有望なワクチン候補抗原でもある。この研究はマラリア原虫の遺伝子発現機構を解明し、ステージ特異的に発現する遺伝子を同定することを目的として行なった。

・マラリア原虫の転写因子の同定

マラリア原虫の遺伝子発現調節機構はこれまでほとんど解明されていない。特に遺伝子の発現調節の核となるはずの『転写因子』がまだ同定されていない。このことが「マラリア原虫は転写因子を用いない遺伝子発現制御を行なっている」という仮説の根拠となっている。

我々はこれまでの研究により AP2 関連遺伝子群 (PARTs) がマラリア原虫の転写因子であることを見出した。このうち PART-0 はハマダラカへの侵入ステージであるオオキネートで特異的に発現し、侵入に関与する遺伝子群 (これまで報告されていたオオキネートの中腸感染に関わる遺伝子全てを含む) の発現をコントロールしていた (下図)。PART-0 遺伝子破壊原虫ではこれらの遺伝子の発現がほとんど視られなくなるとともに、ハマダラカへの感染能を完全に喪失した。また PART-0 はプロモーター上の TAGCTA 配列に特異的に結合し、転写を誘導していることがわかった。人工染色体 (後述) を用いたレポーター・アッセイによりこの配列が実際にオオキネートで cis-acting 配列として機能することを証明した。

転写因子



PARTs のファミリー遺伝子は他の侵入ステージ (肝臓感染ステージ) でも特異的に発現され、感染に必要な遺伝子の発現を制御している。本研究はマラリア原虫ではじめて転写因子およびその結合配列を同定するとともに、ホストの細胞への侵入に関わる遺伝子が 1 個の転写因子によって制御されていることを証明した。この発見はゲノム配列をもとにワクチンの標的分子を探索する新たな方法への道を開いたと評価される。

⑦ マラリア原虫人工染色体を利用した新規遺伝子導入法の開発と応用

マラリア原虫の遺伝子操作法は公開されたゲノム情報を有効に活用し、原虫の寄生・感染・増殖に関わる分子基盤を解明するための必須な技術である。現在、安定的な遺伝子の導入法として遺伝子相同組換えを基盤とする手法が一般的に用いられ、遺伝子欠損原虫の作製に広く利用されている。しかし、遺伝子導入効率の低さ・操作の煩雑さ等に改良の余地が存在し、迅速且つ簡便に遺伝子改変原虫を作製するためには新規遺伝子導入法の開発が必要と考えられている。一方、マラリア原虫の遺伝子操作法として環状プラスミドを用いた手法がある。この手法では比較的容易に原虫内へ遺伝子を導入することが可能である。しかし薬剤選択圧存在下でしか、原虫はプラスミドを安定的に保持せず、薬剤投与が不可能な媒介蚊内の原虫の研究には応用できない致命的な欠陥があるため汎用されるに至っていない。このような技術的課題は多くのマラリア研究において障害となっており、本プロジェクトにおいても例外ではないと考えられた。

そこで、本プロジェクトを技術的な側面から支援することを目的にネズミマラリア原虫人工染色体を作製し、これを利用した新規遺伝子導入法の開発を試みた。すなわち、目的遺伝子を人工染色体に組み込み、染色体様に挙動させ、薬剤非依存的にライフサイクルを通じて安定的に保持させることを試みた。同時に環状の人工染色体を設計し、遺伝子導入効率および操作性の向上を目指し、迅速且つ簡便な遺伝子改変原虫作成法の開発を試みた。最終的に作成した人工染色体を利用した新規レポーターアッセイ系の構築を行い、原虫の遺伝子転写調節機構の解析へと応用することを試みた。

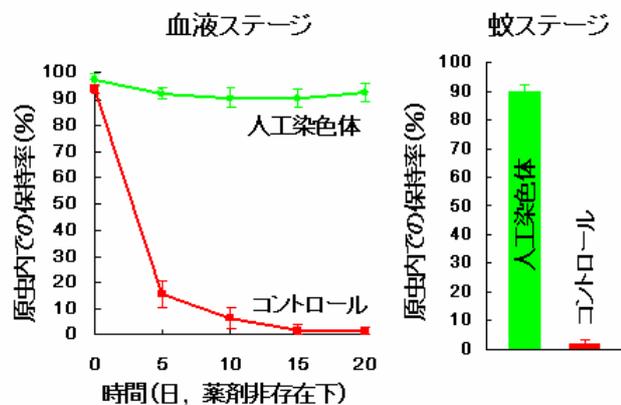
・マラリア原虫人工染色体を用いた遺伝子導入法の開発

一般に人工染色体の開発にはセントロメアが必須な因子である。セントロメアとは動原体とも呼ばれ、細胞分裂時に複製された染色体を娘細胞へ正確に分配するための染色体上の特殊な領域である。セントロメアが組み込まれた DNA 断片は細胞内で複製後、自律的に娘細胞へ分配され、染色体様に挙動すると期待される。一方、マラリア原虫のセントロメアは A/T に富む領域 (>96%=A/T) であると推定されるものの、機能的証明はなされておらず、未

同定のまま

そこで初めにヒト原虫のゲノム情報、お基に構築したネズミ原虫の仮想ゲノム情報 *silico* でセントロメア上の位置を推定し、グした。次にセント

み込んだプラスミド



マラリア原虫およびこれをマラリア原虫を利用し、*in* のゲノムクロロメアを組

を作製し、環

ョン法により導入し、実際に染色体様に挙動するかを調べ、セントロメアの機能的証明を試みるとともに、人工染色体としての利用可能性を評価した。具体的には薬剤非存在下で人工染色体を導入した原虫を長期間、維持し、人工染色体が原虫内での安定性を検討した。

まず、ネズミマラリア原虫の第5番染色体よりセントロメアをクローニングすることに成功した。配列を決定した結果、推定どおり、96%以上がA/Tにより構成されていた。次に構築した原虫人工染色体は原虫のライフサイクル（血液・蚊ステージ）を通じ、ほぼ普遍的・安定的に保持されることを確認した。その安定性は薬剤に非依存的であり、人工染色体が実際に染色体様に挙動した結果であると結論付けられた。細胞分裂あたりの人工染色体の娘細胞への分配効率は99.7%であり、通常のプラスミドの約80%と比較して驚異的な正確性をもつことが明らかとなった。さらに導入した人工染色体は原虫由来染色体とは完全に独立して核内で挙動し、細胞分裂時に染色体に組み込まれることはないことを示した。遺伝子導入効率については従来の方法と比べ、10倍以上向上していると判断され、迅速且つ容易に遺伝子組み換え原虫を作出することに成功した。

この研究の最も大きい成果は世界初のマラリア原虫人工染色体を利用した遺伝子導入法を用い、実験システムを構築する点である。また、酵母人工染色体、大腸菌人工染色体、P1ファージ人工染色体に続き、実践的な人工染色体開発成功の第4例目である点も特筆すべき点である。人工染色体による遺伝子導入法は従来の相同組換えによる方法や環状プラスミドを用いた方法とは原理的に全く異なり、作業の煩雑性・導入遺伝子の安定性・薬剤選択マーカーの少なさ等の問題を解決し、これまで不可能であった実験を可能とする点で、学術的意義は極めて高いと考えられる。以上の点はいずれにおいても、マラリア原虫の分子生物学の発展・生物学的基礎の理解に多大なインパクトを与えることは間違いなく、他の研究に対してもその成功を強力に支援するものと期待される。そのような成果が我が国より発信できたことは国際貢献という観点からも意義深いと考えられる。

・人工染色体を利用した新規レポーターアッセイ系の構築

構築したマラリア原虫人工染色体にレポーター遺伝子として、GFP遺伝子を組み込んだ。続いてGFP遺伝子の5'上流に標的遺伝子のプロモーター領域を連結し、その転写活性を評価した。さらにプロモーター領域中のシスエレメントと推定される配列に変異を加え、転写活性の変化を調べた。

作製した人工染色体にGFP遺伝子を組み込み、レポーターアッセイ系を構築した。次に本プロジェクトで同定された転写調節因子によって制御を受ける遺伝子群から任意にプロモーター領域をクローニングし、その転写活性を検討した。具体的にはオオキネートにおいて転写制御を受ける遺伝子について検討した。その結果、組み込まれたGFP遺伝子はオオキネートにおいてのみ特異的に発現することが確認された。続いて、プロモーター中のシスエレメントと推定される配列に点変異を導入し、GFP遺伝子の転

写・発現の変化を調べた。その結果、変異を導入したプロモーター領域の転写活性は有意に低下することが明らかとなった（シスエレメントに関する詳細はマラリア原虫の転写調節機構の解明で述べた）。以上の結果より、構築したレポーターアッセイ系は実際に有効であることが示された。

マラリア原虫の生活環の分子基盤を理解するためには生育ステージ特異的遺伝子転写制御機構を解明する必要がある。このことは効果的なワクチン開発に必須の知見であり、本プロジェクトにおいてもその重要性を認識し、研究を展開している。この転写制御機構を解明するためにはレポーターアッセイ系の構築は必須の課題であると考えられる。多数の DNA コンストラクトを用いて行うレポーターアッセイには簡便且つ迅速な遺伝子導入技術は不可欠であり、従来法では作業面において制約が大きいと考えられる。この点において構築した人工染色体により遺伝子導入法は有効なものである。加えて、これまで研究対象とすることができなかった媒介蚊内での原虫の遺伝子転写制御機構においても問題なく、レポーターアッセイを行える点も大きな前進であると考えられる。今後、マラリア研究において転写制御研究が一つの潮流となることが、予想されており、今回開発したレポーターアッセイ系が広く一般化されていくと考えられる。

(2)研究成果の今後期待される効果

マラリアワクチンの開発はこれまで血液ステージの原虫を標的としたものが大勢を占めていた。しかしながら実際にフィールドでテストが行なわれた結果、血液ステージに発現される抗原には多型が多い、多重遺伝子が多い等のワクチン抗原としての重大な問題点があることが解ってきた。そのため本研究を申請した時点で我々が予想した様に、肝臓感染ステージが最も有望なワクチンの標的であると考えられる様になった。実際、現在フィールドで唯一効果が認められているワクチンはスポロゾイトの CS 蛋白質を抗原としている。

しかしながら CS 蛋白質はスポロゾイトで最も早く見つけられた分子であり、多くの候補の中から一番有効な抗原として選ばれたものではない。またその蛋白質としての機能も厳密には証明されていない。今回、我々が発見した蛋白質はこの点において、大きく CS 蛋白質を凌駕しており、将来的にマラリアワクチンの中核をなす抗原となる可能性を十分に有している。

マラリアはいまだ最も重要な感染症である。多くの抗マラリア薬がこれまで合成されたが、当初は有効であったこうした薬も数年で耐性原虫が出現し使用出来なくなる例がほとんどである。黄熱病等の熱帯病の例からも解る様に、有効なワクチンの創出が最も強力なマラリアコントロールの手段となるはずである。今後、本研究において同定された抗原が有効なワクチンとして証明されれば、その波及効果は極めて大きいと言える。

4 研究参加者

①三重大グループ(マラリア感染成立の分子基盤の解明と新たな感染阻止法の創出)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
鎮西康雄	三重大学大学院 医学系研究科	客員教授	研究総括/データベース構築	平成14年11月～ 平成20年3月
油田正夫	三重大学大学院 医学系研究科	教授	感染機構を基盤とする感染 阻止法の開発	平成14年11月～ 平成20年3月
伊澤晴彦	三重大学大学院 医学系研究科	博士研究員	宿主リセプターの同定と機能 解析	平成14年11月～ 平成15年3月
狩生 徹	三重大学大学院 医学系研究科	博士研究員	KO原虫の作製と表現型機 能の解析	平成14年11月～ 平成14年12月
石野智子	三重大学大学院 医学系研究科	助教	KO原虫を用いた感染機構 の解析	平成14年11月～ 平成20年3月
矢野和彦	三重大学大学院 医学系研究科	博士研究員	電顕・免疫電顕・組織化学観 察	平成14年11月～ 平成15年3月
森田明広	三重大学大学院 医学系研究科	博士研究員	KO原虫の作製と表現型機 能の解析	平成14年11月～ 平成15年3月
門田君江	三重大学大学院 医学系研究科	CREST 研究員	KO原虫の作製と表現型機 能の解析	平成15年4月～ 平成16年10月
松山高央	三重大学大学院 医学系研究科	CREST 研究員	ワクチン開発	平成15年4月～ 平成16年12月
中島由郎	三重大学大学院 医学系研究科	CREST 研究員	遺伝子機能の解析、感染阻 止法の開発	平成17年6月～ 平成18年12月
竹中由貴	三重大学大学院 医学系研究科	研究補 助員	原虫感染実験等	平成14年11月～ 平成18年3月
金子伊澄	三重大学大学院 医学系研究科	CREST 技術員	遺伝子改変原虫の作成実験 等	平成15年4月～ 平成20年3月
木戸澄奈	三重大学大学院 医学系研究科	CREST 技術員	免疫電顕に関する実験等	平成15年4月～ 平成20年3月
塚崎素子	三重大学大学院 医学系研究科	CREST 技術員	原虫の動態解析等	平成17年1月～ 平成19年3月
加藤知美	三重大学大学院 医学系研究科	CREST 技術員	遺伝子操作を含む実験、蚊 の解剖等	平成15年4月～ 平成20年3月
前田和与	三重大学大学院 医学系研究科	研究補 助員	実験動物飼育等	平成14年11月～ 平成19年3月
岡田貴志	三重大学大学院 医学系研究科	研究補 助員	実験動物飼育等	平成16年5月～ 平成17年3月
木村直子	三重大学大学院 医学系研究科	技術補 佐員	実験動物飼育等	平成14年11月～ 平成20年3月

日下朋子	三重大学大学院 医学系研究科	事務補 佐員	事務全般	平成14年11月～ 平成20年3月
大山康之	三重大学大学院 医学系研究科	大学院 生	KO原虫を用いた感染機構 の解析	平成17年4月～ 平成18年3月
坪井絵莉子	三重大学大学院 医学系研究科	大学院 生	KO原虫を用いた感染機構 の解析	平成18年4月～ 平成19年3月
大久保和洋	三重大学大学院 医学系研究科	大学院 生	KO原虫を用いた感染機構 の解析	平成19年4月～ 平成20年3月

②基礎生物学研究所グループ(マラリア原虫のトランスクリプトーム解析)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
重信秀治	自然科学研究機構 基礎 生物学研究所 岡崎統合 バイオサイエンスセンター	助教	トランスクリプトーム解析	平成18年4月～ 平成20年3月
本多聡子	自然科学研究機構 基礎 生物学研究所 岡崎統合 バイオサイエンスセンター	研究補 助員	実験補助と事務一般	平成18年4月～ 平成19年3月

③鳥取大グループ(マラリア原虫人工染色体の開発・応用)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
岩永史朗	鳥取大学医学部 医動物学教室	講師	マラリア原虫人工染色体の 開発 レポーターアッセイ系の構 築	平成18年10月～ 平成20年3月

(注) 岩永は当初神戸大学農学部所属であったが、2007年4月鳥取大学に移動したため鳥取大学グループとした。

④鈴鹿医療科学大グループ(マラリア原虫感染機構の解析)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
鎮西康雄	鈴鹿医療科学大 学医用工学部	教授	マラリア原虫感染機構の解 析	平成14年11月～ 平成20年3月

6 成果発表等

(1) 原著論文発表 (国際誌 10件)

1. Yuda M., Sakaida H., and Chinzei Y.: Targeted disruption of the *Plasmodium berghei* CTRP gene reveals its essential role in malaria infection of the vector mosquito. *J. Exp. Med.*190:1711-71. (1999)
2. Yuda M., Sawai T., and Chinzei Y.: Structure and expression of an adhesive protein-like molecule of mosquito invasive-stage malarial parasite. *J. Exp. Med.*189:1947-52. (1999)
3. Yuda M., Yano K., Tsuboi T., Torii M., and Chinzei Y.: von Willebrand Factor A domain-related protein: a novel microneme protein of the malaria ookinete highly conserved throughout *Plasmodium* parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* 116: 65-72.(2001)
4. Kariu T., Yuda M., Yano K., and Chinzei Y.: MAEBL is essential for malarial sporozoite infection of the mosquito salivary gland. *J. Exp. Med.*195: 1317-1323. (2002)
5. Ishino T., Yano K., Chiznei Y., and Yuda M.: Cell-passage activity is required for the malarial parasite to cross the liver sinusoidal cell layer. *PLoS Biol.* 2 : 77-84. (2004)
6. Kadota K., Ishino T., Matsuyama T., Chinzei Y., and Yuda M.: Essential Role of membrane-attack protein in malarial transmission to mosquito host. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 16310-16315. (2004)
7. Ishino T., Chinzei Y., and Yuda M.: A *Plasmodium* sporozoite micronemal protein with a membrane attack complex-related domain is required for breaching the liver sinusoidal cell layer prior to hepatocyte infection. *Cell Microbiol.* 7:199-208. (2004)
8. Ishino T., Chinzei Y., and Yuda M.: Two proteins with 6-cys motifs are required for malarial parasites to commit to infection of the hepatocyte. *Mol. Microbiol.* 58 : 1264-751. (2005)
9. Kariu T., Ishino T., Yano K, Chinzei, Y., and Yuda M.: CelTOS, a novel malarial protein that mediates transmission to mosquito and vertebrate hosts. *Mol. Microbiol.* 59:1369-79. (2006)
10. Ishino T, Orito Y, Chinzei Y, and Yuda M.: A calcium-dependent protein kinase regulates *Plasmodium* ookinete access to the midgut epithelial cell. *Mol. Microbiol.* 59:1175-84. (2006)

(2) その他の著作物 (総説、書籍など) (国内誌 1件)

1. Yuda M, Ishino T. Liver invasion by malarial parasites--how do malarial parasites break through the host barrier? *Cell Microbiol.* 2004 Dec;

6(12):1119-25.

2. 鎮西康雄 :マラリア原虫の宿主侵入に関する新たな分子機構 感染・炎症・免疫 37,3: 2-13. (2007)

(3) 学会発表 (国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 学会発表・招待講演 (国内会議 4件、国際会議 9件)

1. Yuda M. (JST, Mie Univ., Dept. Med. Zool.): Sporozoite liver invasion from the skin to the hepatocyte. , Gordon conference, Oxford, UK, (2005. 8)
2. Ishino T., et al. (JST, Mie Univ. Dept Med.Zool.): Molecular mechanisms for malarial sporozoites liver infection. , The 18th Naito Conference Innate Immunity in Biology and Medical Science [II], Kanagawa, Japan, (2005.10)
3. 鎮西康雄 (JST, 三重大学医学部) マラリア感染の分子機構—マラリアワクチン開発への道— 小児感染症学会, 津, 2005.11.
4. Ishino T. (JST, Mie Univ. Dept Med.Zool.) Molecular mechanisms for malarial sporozoite liver infection., US-Japan Cooperative Medical Science Program, Washington DC, USA, (2005.12)
5. Ishino T., et al. (JST, Mie Univ. Dept Med.Zool.) How do malarial parasites arrive at and invade hepatocytes? , American Society of Tropical Medicine and Hygiene 54th Annual Meeting, Washington DC, USA, (2005.12)
6. 鎮西康雄 (JST, 三重大学医学部) マラリア原虫の肝臓感染の分子機構, CREST 「感染と免疫」第2回公開シンポジウム, 東京, (2005.12)
7. 石野 智子 マラリア原虫は如何にして肝臓に到達し寄生を成立させるのか 感染現象のマトリックス, 東京, (2006. 2)
8. Chinzei Y. (JST, Mie Univ. Dept Med.Zool.) Vector-parasite molecular interactions: Molecules essential for invasion of Malarial parasites into the host mosquito tissues., XI International Congress of Parasitology, Glasgow, UK, (2006. 8)
9. Chinzei Y. (JST, Mie Univ. Dept Med.Zool.) Molecules Essential for Infection of Malarial Parasites into the Host Mosquito Tissues., 55th Annual Meeting of American Society of Tropical Medicine and Hygiene, Atlanta, USA, (2006. 11)
10. Chinzei Y. (JST, Mie Univ. Dept Med.Zool.) Malarial Parasite Proteins Essential for Invasion into Vector and Vertebrate Host Cells., Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA, (2006. 11)
11. Ishino T. (JST, Mie Univ. Dept Med.Zool.) Molecular mechanisms for malarial sporozoite liver infection. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan, (2006.6)
12. Chinzei Y. and Yuda M. (JST, Mie Univ. Dept Med. Zool.) Malarial parasite proteins essential for invasion into host vector mosquito and vertebrate liver cells. 第19回アジア太平洋国際生化学分子生物会議 (韓国) 2007年5月

- 1 3. Chinzei Y. and Yuda M. (JST, Mie Univ. Dept Med. Zool.) Vector-parasite molecular interactions : Molecules essential for invasion of malarial parasites into the host mosquito tissues. 国際昆虫生化学昆虫産業会議(韓国) 2007年8月

② 学会発表・口頭発表 (国内会議 19件、国際会議 4件)

1. 石野智子 他 (JST, 三重大学医学部) マラリア原虫は異なる宿主に感染成立させるために共通の分子基盤を利用する 第74回 日本寄生虫学会大会, 米子, (2005.4)
2. 鎮西康雄 他 (JST, 三重大学医学部) MAOP : マラリア原虫がハマダラカ中腸細胞に侵入するのに必須の分子, 日本衛生動物学会, 札幌, (2005.6)
3. Chinzei Y., et al. (JST, Mie Univ. Dept Med.Zool.) Molecular mechanisms of malarial transmission: Novel essential molecules for infection to the vector and vertebrate host cells. The International Symposium on "Molecular Bases Underlying Microbial Infections and the Host Responses., Tokyo, JAPAN, (2005.7)
4. Ishino T., et al. (JST, Mie Univ. Dept Med.Zool.) How do sporozoites arrive at the liver and recognize hepatocytes for infection? The Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, JAPAN, (2005.9)
5. 石野智子 他 (JST, 三重大学医学部) 肝細胞を認識し細胞寄生の切替えに関わるスポロゾイト蛋白の同定, 第4回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム, 東京, (2005.11)
6. 坪井絵莉子 他 (JST, 三重大学医学部) オオカイネートの運動におけるカルシウムシグナル伝達の関与, 第4回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム, 東京 (2005.11)
7. 石野智子 他 (JST, 三重大学医学部) マラリア原虫は如何にして肝臓に到達し寄生を成立させるのか, 第28回日本分子生物学大会, 福岡, (2005.12)
8. 鎮西康雄 他 (JST, 三重大学医学部) 媒介蚊の中腸内移動に必要なマラリア原虫の蛋白質リン酸化酵素, 第58回日本衛生動物学会大会, 長崎, (2006.4)
9. 石野智子他 (JST, 三重大学医学部) A calcium-dependent protein kinase regulates Plasmodium ookinete access to the midgut epithelial cell., 第75回日本寄生虫学会大会, 弘前, (2006.5)
10. 鎮西康雄 他 (JST, 三重大学医学部) マラリア館内型原虫の EST 解析及びメロゾイトへの発育分化に必要な新規分子の同定, 第75回日本寄生虫学会大会, 弘前, (2005.5)
11. 由井克之 他 (長崎大学医学部) マラリア原虫抗原特異的 CD4+記憶細胞の誘導とその機能修飾, 第75回日本寄生虫学会大会, 弘前, (2005.5)
12. 坪井絵莉子 (JST, 三重大学医学部) マラリア原虫オオキネートの運動に関わる CDPK3 のシグナルカスケードの解明, 第14回分子寄生虫学ワークショップ, 草津, (2006.7)
13. Yui, K., et.al. (JST, Mie Univ. Dept Med. Zool.) Non-specific induction of CD4 T-cell anergy during malaria infection. P-026 The 6th Awaji International Forum

of Infection and Immunity. Sep. 4-7, 2006

14. 木村大輔、他（長崎大学医学部）マラリア原虫感染により非特異的に誘導される CD4⁺ T細胞の応答性、第 59 回日本寄生虫学会南日本支部大会 福岡 2006 年 10 月 28, 29 日
15. 由井克之、他（長崎大学医学部）マラリア原虫感染により非特異的に誘導される CD4⁺ T細胞の応答性、第 59 回日本寄生虫学会南日本支部大会 福岡 2006 年 10 月 28, 29 日
16. 木村大輔、他（長崎大学医学部）マラリア原虫感染により非特異的に誘導される宿主 T細胞の IL-2 産生応答性 第5回 分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 東京 2006 年 10 月 28, 29 日
17. Kimura, M. et.al. (Nagasaki Univ., JST,Mie Univ.) Modulation of T-cell function during malaria infection; a study using OVA as a surrogate malaria antigen, D41st Joint Conference on Parasitic diseases Japan-United States cooperative medical science program, Tokyo, February 1-3, 2007.
18. 木村大輔、他（長崎大学医学部）マラリア原虫感染に伴う宿主 CD4⁺ T細胞機能修飾の解析、第 76 回日本寄生虫学会大会 大阪 2007 年 3 月 29、30 日
19. 都田真奈、他（長崎大学医学部）マラリア感染における CD8⁺ T細胞の活性化及びアポトーシス、第 76 回日本寄生虫学会大会 大阪 2007 年 3 月 29、30 日
20. 岩永史朗 他（鳥取大学医学部）*Plasmodium berghei* への新規遺伝子導入法の開発 第 76 回日本寄生虫学会大会, 大阪, (2007.3)
21. Iwanaga S., et al. (Tottori Univ. Dept. Med.) Functional identification of the conserved centromere of *Plasmodium*. The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, (2007. 9)

③学会発表・ポスター発表（国内会議 8 件、国際会議 2 件）

1. 石野 智子 他 マラリア原虫の蚊中腸内移動に必要な植物型リン酸化酵素の同定 「免疫難病・感染症等の先進医療技術」 第 2 回公開シンポジウムプログラム, 東京, (2005. 10)
2. 石野 智子 他 肝細胞寄生に向けての switching 機構の解明 「免疫難病・感染症等の先進医療技術」 第 2 回公開シンポジウムプログラム, 東京, (2005. 10)
3. 大山 康之 他 マラリア原虫の皮膚内移動の分子基盤の解明と、新規防御戦略の開発に向けて 「免疫難病・感染症等の先進医療技術」 第 2 回公開シンポジウムプログラム, 東京, (2005. 10)
4. 織戸 由紀 他 マラリア原虫肝臓内ステージの EST データベースの構築と肝臓内での原虫発育に関わる分子の同定 「免疫難病・感染症等の先進医療技術」 第 2 回公開シンポジウムプログラム, 東京, (2005. 10)
5. 織戸 由紀 他 マラリア原虫の肝内型原虫の EST 解析および感染維持に必要な新規分子の同定, 第 28 回日本分子生物学大会, 福岡, (2005. 10)
6. Ishino T., et al. (JST, Mie Univ. Dept Med.Zool.): Two proteins with 6-cys motifs are required for malarial parasites to commit to infection of the hepatocytes. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, JAPAN, (2005. 9)
7. Ohyama Y., et al. (JST, Mie Univ. Dept Med.Zool.): The participation of

- malarial parasite proteins (SPECT/ SPECT2) in skin traversal and investigation of protective immunity. The 18th Naito Conference Innate Immunity in Biology and Medical Science [II], Kanagawa, Japan, (2005. 10)
8. 坪井絵莉子 他 マラリア原虫スポロゾイトの細胞通過能：皮膚から循環系への侵入 「免疫難病・感染症等の先進医療技術」 第3回公開シンポジウムプログラム, 東京, (2006. 12)
 9. 油田 正夫 他 マラリア原虫の肝細胞感染に関する新規スポロゾイト蛋白質 「免疫難病・感染症等の先進医療技術」 第3回公開シンポジウムプログラム, 東京, (2006. 12)
 10. 岩永史朗 他 マラリア原虫新規遺伝子導入技術の開発 「免疫難病・感染症等の先進医療技術」 第3回公開シンポジウムプログラム, 東京, (2006. 12)

(4)特許出願

①国内出願 (1 件)

1. ネズミマラリア原虫由来の Pbsp1 蛋白質、当該蛋白質をコードする遺伝子, 鎮西康雄 他, 三重大学学長, 平成 15(2003)年 5 月 23 日(出願日), 特願 2003-146698 (出願番号), 平成 18(2006)年 8 月 11 日(登録日), 特許第 3837547 号 (登録番号)

②海外出願 (0 件)

なし

(5)受賞等

①受賞

1. 鎮西康雄 読売東海医学賞 2007 年 3 月 13 日 (読売新聞社)
2. 石野智子 若手研究者奨励賞 2007 年 3 月 29 日 (日本寄生虫学会)
3. 岩永史朗 ベストプレゼンテーション賞 2007 年 3 月 29 日 (日本寄生虫学会)

②新聞報道

1. 1. 2004 年 3 月 18 日、朝日新聞朝刊 1 面、「マラリア発症予防に道原虫が肝臓に入るメカニズム解明」
2. 2. 2004 年 11 月 14 日 朝日新聞朝刊 1 面 「マラリアワクチン」
3. 3. 2005 年 Medical Tribune 誌に記事掲載「マラリア原虫-異なる宿主への感染成立に共通の分子基盤を利用 (Vol.38, No.19)
4. 2007 年 5 月 1 3 日読売新聞朝刊 「マラリアの現状と三重大学での研究」

③その他

なし

(6) その他特記事項

研究分担者の油田正夫は、2007年12月三重大学医学部教授に選任され着任した。また研究協力者の岩永史朗は、2007年4月神戸大学農学部助手から鳥取大学医学部講師に選任され着任した。博士研究員として在籍した伊澤晴彦は2004年厚生省感染症研究所昆虫医科学部研究員に、また石野智子は2005年三重大学医学部の助手（助教）に、狩生徹は2006年熊本大学薬学部助教に採用されている。

7 研究期間中の主な活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2005年12月8日	第28回分子生物学会ワークショップ「寄生・共生という生き方」 世話人：石野智子・嘉糠洋陸	福岡	100人程度	最近のゲノミクス・新手法によるアプローチ・新しいモデルの導入などにより次々と明らかになったこれらの分子戦略について、感染症の征圧にむけた将来像を踏まえ、寄生・共生という美しい生命現象に魅せられた若手研究者の手によって概説したい。

8 結び

(研究成果について)

研究全体を眺めてみた時、このプロジェクト開始時に目指した研究は達成できたのではないかと考えている。また、今後研究を進める上での手段や道筋をしっかりと作り上げその基盤を固めることができた。このプロジェクトを採択していただき担当させていただいたことに感謝し、満足している。ひとつはマラリア生物学の進歩に貢献できたことである。上でも述べたが、これまでのマラリア生物学は、血液ステージであるメロゾイトに極端に偏っており、媒介蚊の中のステージや、蚊の吸血直後の皮膚や肝臓への感染のステージに関する研究がほとんどなかった。ここにわれわれは初めて本格的に切り込んで、多くのことを明らかにしてきた。これまでのマラリア生物学の欠落部分に光を当てることができたと思っている。これらの他にもまだ多くの必須の分子があるはずで、これらを今後も探索して、感染に関わる分子と感染機構の全貌を明らかにするとともに、これらの分子の更なる詳細な機能と作用機構を明らかにしていくことが今後の課題と考えている。もう一つは、新規マラリア防圧法に向けた道筋をつけることができたことである。我々がこの研究で明らかにした感染関連の分子は、抗マラリア薬やワクチ

ンの開発の有力な候補分子である。一部の分子でその抗体が感染を抑制するという結果を得たが、これは有効なワクチンにつながる新たな可能性を示すことができたと思っており、この点が最も大きな成果と考えている。しかし、ワクチンそのものの創出まではいかなかったのは残念であるが、これはそうした易いことではないので、このプロジェクトを超える目標であり、そこに通じる道をつけたこと、可能性を示したことに意義があると自己評価している。今後はこれらの分子をワクチンとして実際に有効なものに作り上げ、有効な感染阻止技術の開発に繋げることが課題であると考えている。

(研究の遂行に関して)

このプロジェクト遂行に当たって、最も難しいと感じたことは、人材の確保である。博士研究員や研究補助の職員は、希望する者は多くいるけれど、期待する人材は来てくれないことを実感した。特に博士研究員は、全く期待した通りには来てくれなかった。当プロジェクトと我々の置かれている特別な条件、すなわち研究対象が寄生虫であること、研究場所が地方大学であることが特に難しくしていたように思う。また、全国的な動向でもあると思うが、大学院生の確保が難しく、このレベルのマンパワーが全く期待できなかったのは研究推進の上でブレーキになった。博士研究員や大学院生に、面白い研究ができるんだということを理解してもらえなかったこと、またそのことを分かってもらおう努力も少し足りなかったかもしれないと思っている。

(研究費)

大きなプロジェクトを動かすことには、楽しみもあるが、一方で大変な苦勞のあることも知った。しかし、こうした大きな競争資金をもらって思う存分な研究ができたことを幸せに思っている。採択していただいたことを感謝している。研究費は我々の規模の研究室としては潤沢であり、手狭となった研究室の拡張のため、マラリア研究のための特別な研究棟を作っていただいた。これが研究遂行上、大変ありがたく、通常では購入することのできない研究装置の購入ができたのは大変な武器になった。研究費の使い方に関しても、例えば、予算区分の変更など大きな融通が効かせられるように配慮されており、研究につきものの予定変更などには大変、好都合でありがたかった。しかし変更の都度事務担当者には迷惑をかけることになり、その点をここでお詫びを申し上げておきたい。

(その他)

長いと思われた5年間もあっという間に終わった。この間に、他の研究グループとの連携関係も生まれた。これは今後も共同戦線が張れるものとなろう。そのほか今後につながる研究基盤ができた。今後もこのプロジェクトの成果として出していけると思う。直接研究に参加してくれた研究者・研究補助員・事務補助員には感謝している。その中で一人一人の成長があったことを願っている。この間ご支援やご指導いただいた研究総

括、アドバイザーの先生方に感謝し、お礼申し上げたい。また、いつも締め切りを守らずご迷惑をかけたCREST大阪事務所の関係者にお詫びとお礼を申し上げる。



