

研究課題別評価

1 研究課題: 赤血球期マラリア原虫の細胞増殖と脂質代謝・輸送の分子機構の解明

2 研究者氏名: 三田村 俊秀

グループメンバー: Nirianne Marie Q. Palacpac (研究期間: H14.4.1～H16.11.30)

瀬戸 真太郎 (研究期間: H15.4.1～H16.3.31)

3 研究の狙い:

地球規模の問題であり、未だ人類に脅威を与えつつけている寄生虫感染症マラリアの臨床症状、ならびに複雑な病理は、病原因子であるマラリア原虫がその生活環中の赤血球サイクルに入った時のみ生じる。熱帯熱マラリア原虫は、人に感染する原虫種の中で最も悪性な種であり、かつ、汎用されている抗マラリア薬に対する耐性株が蔓延している。さらにはこの原虫種に対する有効なワクチンが実用化されていない。このような現状において、新規抗マラリア薬の開発は、ワクチン開発と同様急務の課題である。

本研究では、熱帯熱マラリア原虫が呈するモデル生物、特に哺乳動物には見られない細胞増殖と細胞内物質輸送に関するユニークな現象に着目し、赤血球期熱帯熱マラリア原虫の細胞増殖に必須な血清中脂質成分の代謝・輸送の分子機構の解析を通して、感染症マラリアの治療・予防に資する新規抗マラリア薬開発につながる標的分子の提供を目指した。

4 研究成果:

(1) トリアシルグリセロールのユニークな代謝・輸送

赤血球期熱帯熱マラリア原虫におけるトリアシルグリセロール (TAG) の代謝・輸送については、原虫細胞が、赤血球サイクル後期に TAG を蓄積するということがほぼ 20 年前に報告されて以来、長らく報告がなかった。そこで、我々は、TAG の代謝・輸送が感染赤血球内で実際に機能しているのかを検証し、その生物学的意義を考察した。赤血球サイクル全体にわたる精査の結果、以下の4点が明らかとなった。1) TAG の見かけの蓄積速度は、原虫細胞の主要な膜構造の構成成分であるホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミンのそれらに比べて、明らかに遅れて、かつより急速に増加すること。さらに、赤血球サイクルの後期に蓄積が最大となる TAG は、感染赤血球の壊裂直前から分解が進行し、それにともない遊離脂肪酸が培地中に放出されること。2) TAG が濃縮される細胞内脂質滴を可視化し、赤血球サイクルの各ステージでその数が増加するとともにそれらの局在を変え、赤血球壊裂直前のステージにおいては、寄生液胞膜と原虫細胞の周りに集中すること。また、その数と局在の変化は、ブレフェルدين A に感受性であること。3) TAG 合成の最終酵素として知られるジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (DGAT) 活性は、1)、2) の結果と一致して、赤血球サイクル後期に上昇すること。4) TAG をエネルギー貯蔵体として利用する上で重要な位置を占める脂肪酸の酸化分解系、その代表である β -酸化について、熱帯熱マラリア原虫の活性は、哺乳動物のミトコンドリア内に存在するそれと比較し、少なくとも 1/300 以下であること。

今回明らかにした赤血球期熱帯熱マラリア原虫の TAG 代謝・輸送に関する上記の知見は、一般に言われている TAG の機能であるエネルギー貯蔵体として、もしくは脂質代謝のアシル供与体として、生体の恒常性の維持に関与しているという概念では説明できない。つまり、赤血球期原虫において、TAG は、これまでにない新規の機能、我々の解析結果から考えると感染赤血球の壊裂、または感染赤血球からの娘細胞の遊離の段階において、原虫特異的な重要な機能を果たしているという可能性が考えられる。この仮説を支持するひとつの証拠として、DGAT 活性を担う酵素の1つとして知られる DGAT1 の熱帯熱マラリア原虫オルソログ遺伝子 (PfDGAT1) を破壊した原虫株

を樹立しようと試みたが、PCR 法による遺伝子破壊はできているという証拠は得ることができたにもかかわらず、遺伝子破壊株を濃縮することはできなかった。この結果は、PfDGAT1 が、赤血球期熱帯熱マラリア原虫の細胞増殖において必須の役割を果たしている可能性が高いと解釈できる。

(2) 血清中細胞増殖必須脂肪酸の感染赤血球内への取り込み・輸送に関与する原虫側因子

マラリア生物学において遺伝学的手法が使用できる HB3 株と Dd2 株、さらにはこれらの親株から派生した 26 種類のキメラ子孫細胞株を用いて、赤血球期熱帯熱マラリア原虫の細胞増殖に必要な血清中脂肪酸であるパルミチン酸とオレイン酸の取り込み・輸送に関与する原虫因子の同定につなげることができないかを検討した。結果、以下の 3 点が明らかとなった。1) パルミチン酸とオレイン酸を会合させた脂質フリーのウシ血清アルブミン(FA)に対する細胞増殖応答は、HB3 株は通常の数増殖をするのに対して、Dd2 株は明らかな異常を示すこと。そして、Dd2 株が呈した異常は、用いた FA の量的問題ではなく、細胞機能そのものの違いである可能性が高いこと。2) 全てのキメラ子孫細胞株の FA に対する細胞増殖応答は、親株である HB3 株型、もしくは Dd2 株型のどちらかに分類できることから、FA に対する細胞増殖応答の違いを規定する原因遺伝子は、1 遺伝子である可能性が高いこと。3) Dd 株が呈する FA に対する細胞増殖応答異常は FA の代謝系における異常ではなく、むしろ、FA の取り込み、もしくは輸送に何らかの異常が生じたことにより、結果として細胞増殖応答異常という表現型となった可能性が高いこと。ここで、2002 年に発表された熱帯熱マラリア原虫の全ゲノム配列中には、これまで他種生物で確認されている脂肪酸トランスポーターや脂肪酸輸送蛋白質の原虫オルソログは存在しないことから、今回その存在が示唆された脂肪酸の取り込み、もしくは輸送に関与する原虫因子は、マラリア原虫固有な新規なものである可能性が強く示唆された。

5 自己評価:

我々自身が明らかにしてきた赤血球期熱帯熱マラリア原虫の細胞増殖に必要な血清中脂質成分であるパルミチン酸とオレイン酸の代謝・輸送について、モデル生物、特に哺乳動物細胞には見られないユニークな点を明確にするという研究の方向性のもとに、新規抗マラリア薬創製につながる標的分子の提供を目指し、本さきがけ研究を提案した。3 年間の成果としては、

- (1) これまでほとんど手がつけられていなかった TAG の代謝・輸送が、確かに熱帯熱マラリア原虫感染赤血球内において機能しているという証拠を複数の方法により示すことができた。さらに、我々の実験結果から、熱帯熱マラリア原虫において、TAG は、これまでに確立されてきた機能ではなく、原虫特有の機能を提唱することができた。
- (2) 細胞増殖に必要な血清中脂肪酸であるパルミチン酸とオレイン酸の熱帯熱マラリア原虫感染赤血球内への取り込み、もしくは輸送に関与する因子の分子同定がより現実的であることを示す証拠が示せた。さらに、熱帯熱マラリア原虫のゲノム情報から、この候補遺伝子は、これまでに報告されていない新規の脂肪酸トランスポーター、もしくは脂肪酸輸送蛋白質である可能性が高いと判断できた。

以上のように、一定の成果を上げることはできたが、細胞レベルでの解析に思った以上に時間をとられてしまい、全体としては赤血球期熱帯熱マラリア原虫特有のユニークな現象を明確にさせたというところにとどまり、当初目標としていた各項目について、分子同定とそれらの機能解析によるユニークな現象を分子レベルで説明するということまでは踏み込めなかった。また、成果を正式な形で公表する前の投稿準備段階の論文を幾つかかかえてしまったことは反省点として残った。今後は、分子レベルでの解析を継続させ、脂質代謝・輸送に関して、熱帯熱マラリア原虫と哺乳動物細胞との違いを明確にすることにより、マラリア化学療法の新規標的分子となりえる因子の提供、さらには新規抗マラリア薬の創製につなげるよう研究を発展させたい。

6 研究総括の見解:

赤血球期マラリア原虫の細胞増殖に必須な血清中脂質成分の代謝・輸送の分子機構を解析し、マラリアの治療・予防のための新規抗マラリア薬開発につながる標的分子の発見を目指した研究である。熱帯熱マラリア原虫のトリアシルグリセロールが熱帯熱マラリア原虫感染赤血球内において機能している分子であり、また血清中脂質成分であるパルミチン酸とオレイン酸の熱帯熱マラリア原虫感染赤血球内への取り込みもしくは輸送に関与する因子を同定することが出来た。しかしながら、初期の目的を達成する成果を挙げることは出来ていない。今後の発展に期待したい。

7 主な論文等:

論分・総説

1. N. M. Q. Palacpac, Y. Hiramane, S. Seto, R. Hiramatsu, T. Horii, and T. Mitamura. Evidence that *Plasmodium falciparum* diacylglycerol acyltransferase is essential for intraerythrocytic proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321; 1062–1068, 2004.
2. N. M. Q. Palacpac, Y. Hiramane, F. Mi-ichi, M. Torii, K. Kita, R. Hiramatsu, T. Horii and T. Mitamura. Developmental-stage-specific triacylglycerol biosynthesis, degradation and trafficking as lipid bodies in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte. *J. Cell Sci.* 117; 1469–1480, 2004.
3. T. Mitamura and N. M. Q. Palacpac. Lipid metabolism in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte: possible new targets for malaria chemotherapy. (Review) *Microbes Infect.* 5; 545–552, 2003.

学会発表

国内 13 件(招待講演 4 件を含む) / 国際 5 件