

研究課題別評価

1 研究課題名: マラリア原虫の酸化ストレス応答メカニズムの解明と新規治療戦略

2 研究者氏名: 河津 信一郎

研究員: 安田 加奈子 (研究期間 H16.1.1~H19.3.31)

研究員: 竹前 等 (研究期間 H16.4.1~H17.7.31)

技術員: 木村 理沙 (研究期間 H16.5.1~H19.3.31)

3 研究のねらい:

熱帯熱マラリアは、ヒトの 4 種類のマラリアのうち最も重篤な感染症で、ヒトはハマダラカの吸血によって熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) に感染する。世界人口の約半数がマラリアのリスクの下に生活しており、年間 200-300 万人がこの感染症によって命を落としている。赤血球内に寄生し、活発な DNA 合成、ヘム代謝の過程で多量の過酸化物を産生するマラリア原虫にとって、細胞内レドックス(酸化・還元)バランスの制御は、宿主内適応、発育および増殖の成否を左右する重要なメカニズムで、その解明はマラリアの新しい制御法開発の起点になると考える。このような観点から、私達の研究グループでは、マラリア原虫細胞で過酸化物の還元主に機能する抗酸化タンパク質、ペルオキシレドキシン(Prx)の原虫細胞内レドックス制御における役割を、熱帯熱マラリア原虫ならびにローデント(ネズミ)マラリア原虫 (*P. berghei*) を用いて解析してきた。本課題では、Prx subfamily を対象に、マラリア原虫の酸化ストレス応答メカニズムを解明し、マラリア原虫寄生適応の生物学に新たな知見を提示するとともに、この機構に係わる分子群を同定し、それらを標的とする新規マラリア治療法の開発につながる基礎的研究を展開することを目的とした。

4 研究成果:

(1) マラリア原虫 Prx の発現プロファイル

マラリア原虫の細胞質には、1-Cys 型と 2-Cys 型の 2 種類の Prx が局在し、1-Cys 型が赤内期のトロホゾイトで特異的に発現するのに対し、2-Cys 型は蚊体内での発育型を含めた全発育環を通じてほぼ構成的に発現した。これら Prx の発現は、mRNA とタンパク質の発現プロファイルが完全に一致することから、遺伝子の転写段階で調節されていると考察される。一方、マラリア原虫のゲノムに見出されたもう一つの 2-Cys 型 Prx、チオレドキシンペルオキシダーゼ-2 (TPx-2) がミトコンドリアに局在することも確認した。

(2) マラリア原虫 Prx の機能解析

細胞質に局在する 1-Cys 型、2-Cys 型 Prx について、リバースジェネティクス的手法を用いて、原虫細胞の発育・増殖に関連した機能を推定した。1-Cys 型 Prx を過剰発現した熱帯熱マラリア

原虫では、クロロキン(ヘム代謝阻害薬)に対する感受性が低下した。組換え体タンパク質を用いた生化学的検討から、1-Cys 型 Prx は、哺乳動物の赤血球内で無性的に増殖するマラリア原虫のヘム代謝に関連して機能する抗酸化タンパク質であることが示唆された。一方、2-Cys 型 Prx を欠損するローデントマラリア原虫では、ガメトサイト(生殖母体)形成、スポロゾイト(感染型原虫)形成、ならびにその哺乳類宿主への感染性に関連した表現型が観察され、同分子がマラリア原虫の有性生殖から蚊体内の発育、哺乳動物への伝播にかけてのステージで機能する抗酸化タンパク質であることが示唆された。

(3) マラリア原虫 Prx 遺伝子転写調節メカニズムの解析

Prx 遺伝子 5' にプロモーター(enhancer)領域を同定した。1-Cys 型 Prx 遺伝子の発育期特異的な転写調節に、(1)プロモーター領域上の *cis*-element(enhancer)および、その配列特異的に結合する転写因子(*trans*-acting factor)が関与すること、また(2)トロホゾイト期特異的な転写活性化には、ヒストンアセチル基転移酵素 PfGCN5 を介したプロモーター領域周囲のヒストンアセチル化(epigenetic な制御機構)が関与することが示唆された。

(4) マラリア原虫チオレドキシン(Trx)相互作用分子の同定

Prx をはじめ様々なタンパク質の s-s 結合への電子供与体として、チオレドキシンシステムの中で機能する生体チオール、チオレドキシン(Trx)について、同分子と原虫細胞質内で相互作用する分子種の同定を試みた。Trx の標的分子還元機構を応用したアフィニティークロマトグラフィーを用いて、トロホゾイトの細胞質に Trx と相互作用し還元される分子が約 100 存在することを見出し、LC/MS/MS 解析を用いてこれらのうち 20 種を同定した。

5 自己評価:

マラリア原虫のゲノムにはカタラーゼとグルタチオンペルオキシダーゼが存在せず、同原虫細胞内での過酸化物は主に Prx によって還元されると考えられている。このことから、私達は Prx subfamily を対象に、どのような刺激のもとにどのような因子が働いてこれら分子の発現を調節し、細胞内でのレドックスバランスを制御し、原虫の生理にどう作用するのかを明らかにすることを目的として、今回のさきがけ研究を提案した。

一連の研究から、これまでに殆ど解っていなかった、マラリア原虫細胞での抗酸化系(細胞内レドックスバランス制御)の生理的な意義、また、同原虫での遺伝子発現メカニズムに関連して、幾つかの新たな知見を提示することが出来たと考える。

リバースジェネティクスの手法を用いておこなった Prx 生理機能の解析では、当初の予想に反し、Prx 欠損原虫に赤血球寄生期での致死あるいは増殖障害などの表現型を見ることができなかった。一方、同欠損原虫のライフサイクルを通じた観察からは、ガメトサイトの形成不全や蚊体内での発育障害など興味ある表現型を見出すことが出来たが、これら表現型を説明する分子メカニズムの解明にまでは至らなかった。ガメトサイト、スポロゾイトは原虫ライフサイクル維持の要点とな

るステージで、その形成阻害はマラリアコントロールの有効な作用点になると考える。また、細胞の分化・増殖過程に Prx が関連して機能するとの知見は、マラリア原虫細胞でのレドックスシグナルの意義を示唆するものであり、他生物種で先行する同分野の研究にも基礎的な知見を提供することが出来ると考える。これらのことから、今回得られた表現型の分子メカニズムについてさらに解析を進め、目的の達成に向けて、この研究を発展させていきたいと考えている。

Prx 発現調節メカニズムの解析では、同遺伝子の発現(この発現プロファイルが同分子の機能を規定する一つの要素と考えている)に、5' のプロモーター(enhancer)領域と、その領域に結合する転写因子(*trans*-acting factor)、および epigenetic な制御機構が関与することが強く示唆されたが、このメカニズム解明の中心となる転写因子を同定することが出来なかった。マラリア原虫では、そのゲノム構造の特殊性から転写因子の同定に至る独自の戦略が必要で、その構築に予想以上に手間取ったのが主な原因であった。今後は、当初の目標に従い、(1)同因子の単離・同定を進め、(2)同定した転写因子の活性化のメカニズムからマラリア原虫細胞内でのレドックスバランス制御(酸化ストレス応答)の仕組みを解明し、さらに、(3)リバースジェネティクスの手法を用いて同因子の下流で制御を受ける遺伝子群を同定する方向で、この研究を発展させていきたいと考えている。

マラリア原虫 Trx と相互作用するタンパク質には、これまでの他生物種での研究からも報告のない数種類の分子(解糖系酵素、RNA ヘリカーゼ等)が含まれていた。今後、原虫細胞内のレドックスバランスと、これら分子の活性調節との関連を解析し、マラリア原虫での細胞内レドックスバランス制御(酸化ストレス応答)の特性を見出したいと考えている。

マラリア原虫では、熱帯熱マラリア原虫、ローデントマラリア原虫と幾つかのゲノムプロジェクトが終了しているが、遺伝子の転写制御メカニズム、抗酸化システム(レドックス制御メカニズム)等の、全ての細胞に備わる極めて基盤的メカニズムの解明が他生物種と比較して著しく遅れている。私たちは、マラリア原虫の酸化ストレス応答とそれに付随した遺伝子発現メカニズムを詳細に調べることで、このような生命現象の根幹に係わる機構のうち、何が他生物種と同じで何がマラリア原虫にユニークなのかを明らかにし、ゲノム情報に立脚した新規マラリア制御法の開発研究に貢献していきたいと考えている。

6 研究総括の見解:

マラリア原虫にとって、細胞内レドックス(酸化・還元)バランスの制御は、宿主内適応、発育および増殖の成否を決める重要なメカニズムである。本研究では、熱帯熱マラリア原虫とネズミマラリア原虫における細胞内レドックスバランスの制御の生理的意義と同原虫の遺伝子発現のメカニズムについて、新たな知見を見出し、今後の新規マラリア制御法開発研究の基盤を提供した。

7 主要な論文等 論文

1. Yano K., Komaki-Yasuda K., Tsuboi T., Torii M, Kano S. and Kawazu S. 2-Cys peroxiredoxin TPx-1 is involved in gametocyte development in *Plasmodium berghei*. *Mol. Biochem.*

Parasitol. 148:44–51,2006

2. Kawazu S., Ikenoue N., Takemae H., Komaki-Yasuda K. and Kano S. Roles of 1-Cys peroxiredoxin in heme detoxification in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *FEBS J.* 272:1784–1791, 2005
3. Yano K., Komaki-Yasuda K., Kobayashi T., Takemae T., Kita K., Kano S. and Kawazu S. Expression of mRNAs and proteins for peroxiredoxins of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in the blood stage. *Parasitol. Int.* 54:35–41, 2005

総説

1. 河津信一郎:マラリア原虫のゲノムと病原遺伝子. 細胞工学 22:1164–1167,2003
2. 駒木-安田加奈子, 河津信一郎:寄生性原虫の転写制御:“七変化早替わり”を支える分子メカニズム. 細胞工学 25:806–810,2006

特許

なし

受賞

日本熱帯医学会:第13回研究奨励賞. 2003年10月10日

招待講演等

1. 河津信一郎:「寄生虫側からの適応」:酸化ストレスに対する適応の分子メカニズム. 第15回日本生体防御学会学術総会(シンポジウム), 2004年7月8日, 長崎
2. Kawazu S., Ikenoue N., Takemae H., Komaki-Yasuda K. and Kano S.: Roles of 1-Cys peroxiredoxin in heme detoxification in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. 11th Korea-Japan Parasitologists' Seminar 'Forum Cheju 11' (Symposium), 2005.6.4. Seoul
3. 河津信一郎:マラリア原虫の宿主寄生戦略:酸化ストレスへの適応の分子メカニズム. 第74回日本寄生虫学会大会(シンポジウム), 2005年4月8日, 米子