

佐倉孝哉 論文内容の要旨

主 論 文

The upstream sequence segment of the C-terminal cysteine-rich domain is required for microneme trafficking of *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen 175

(熱帯熱マラリア原虫 Erythrocyte binding antigen 175 のマイクロネーム輸送には C 末端側のシステインに富んだ領域の上流領域も必要である)

Takaya Sakura, Kazuhide Yahata, Osamu Kaneko
佐倉孝哉、矢幡一英、金子修

Parasitology International (in press)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御学系専攻
(主任指導教員：金子 修教授)

緒 言

マラリアはいまだに熱帯・亜熱帯地域を中心に世界に蔓延し、早急に対策を進めるべき健康問題として残っている。マラリアを引き起こすマラリア原虫はヒト体内では赤血球への再侵入を繰り返すことで増殖するが、その際に一回膜貫通型タンパク質の *Plasmodium* erythrocyte-binding-like (EBL) と呼ばれる原虫分子により、赤血球を認識することが必須である。そのため、EBL の細胞外領域アミノ末端側に存在する赤血球結合領域はワクチン開発の標的部位として研究が進められている。一方、EBL 細胞外領域のカルボキシル末端側には相同体間で保存されたシステイン残基に富んだ第 6 領域と呼ばれる部位があり、EBL を分泌する小器官マイクロネームへの細胞内分子輸送に必要であると提唱されている。最近、ネズミマラリア原虫 *Plasmodium yoelii* の EBL において、第 6 領域の一アミノ酸置換により EBL の局在がマイクロネームからデンスグラニュールと呼ばれる別の小器官に変化し、原虫が強毒化する事が報告された。ネズミマラリア原虫 *P. yoelii* と同様の感染様式を示すヒト感染性の三日熱マラリア原虫でも、同様の变化により原虫の宿主細胞指向性が変化し、原虫が強毒化する可能性も考えられるため、どのような機序で EBL の細胞内輸送が変化したのかを理解する事は重要だと考えられる。そこで本研究では培養が可能な熱帯熱マラリア原虫の EBL である EBA175 を用いて EBL のマイクロネーム輸送に必要な配列の同定を行った。

対象と方法

EBA175 の粗面小胞体移行シグナル配列、第 6 領域、膜貫通領域、細胞内領域を含む配列に緑色蛍光タンパク質タグを付加したものを基礎とし、種々の領域を付加したり、アミノ酸残基を置換したりした組換え EBA175 を発現する発現ベクターを構築した。発現ベクターを部位特異的組換えによって原虫ゲノムに挿入する方法により種々の組換え熱帯熱マラリア原虫を作成し、マイクロネームマーカータンパク質と二重染色し、間接蛍光抗体法により、各種の組換え EBA175 の局在解析を行った。

結 果

粗面小胞体移行シグナル配列、第 6 領域、膜貫通領域、細胞内領域を含む EBA175 を発現する原虫を作成し、局在を観察したところ組換えタンパク質はマイクロネームマーカールと共局在を示さなかった。そこで EBA175 の上流配列を挿入したところ、組換えタンパク質はマイクロネームマーカールと共局在し、第 6 領域上流の配列もマイクロネーム輸送に必要であることが示唆された。挿入した配列から徐々に配列を削っていったところ、第 5 領域中のアミノ酸位置 1236 から以降がマイクロネームへの輸送に必要である事が明らかとなった。これまで第 5 領域は多様性に富むため、保存された機能はないと考えられてきたが、アミノ酸配列を詳細に比較したところ第 5 領域のアミノ酸位置 1257 から 1265 が相同体間で比較的保存されていたため、この配列を欠損させたところ、輸送が阻害される事が明らかとなった。さらに相同体間で比較的保存されているアミノ酸位置 1258 のアルギニンあるいは 1265 のフェニルアラニンをアラニンに置換すると、マイクロネームマーカールとの共局在を完全にあるいは部分的に示さなくなる事を明らかにした。

考 察

今回の研究により、EBA175 のマイクロネーム輸送には第 6 領域上流の第 5 領域中の保存された領域も必要である事を示すことができた。第 6 領域の変異によりマイクロネーム輸送が障害されることが知られているため、EBA175 の第 5 領域から第 6 領域を認識する輸送タンパク質の存在が示唆される。また一アミノ酸置換により部分的にマイクロネームマーカールと共局在を示すものが得られたが、これは、置換による立体構造の変化により EBA175 と輸送タンパク質との結合が部分的に阻害されたためではないかと考えている。EBA175 の第 5 領域の上流の部分配列も輸送に必要であるという今回の知見は、EBL のマイクロネーム輸送機序の一端を明らかにした意義を持つとともに、EBL の輸送タンパク質を同定するための重要な基盤情報を提供するものである。