

# 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

研究課題名：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

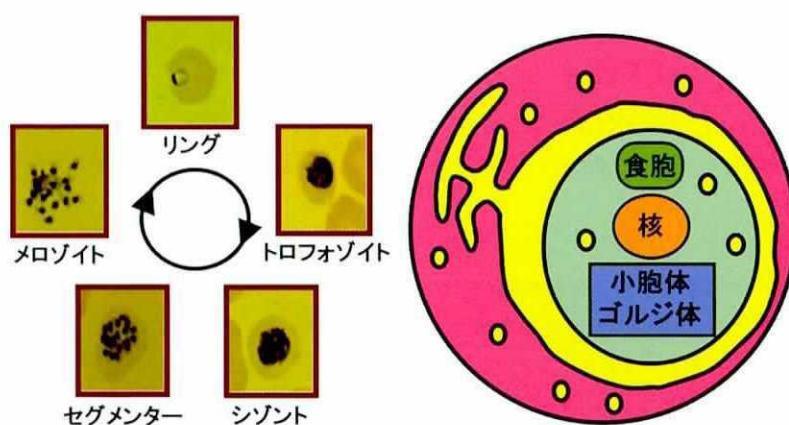
大阪大学微生物病研究所 助教授  
三田村俊秀

## ● 研究のねらい (はじめに)

寄生虫感染症マラリアは、年間3-5億人にもものぼる罹患者と200万人以上の死者をだす地球規模の問題である。その臨床症状は、病原因子である原虫が、生活環中の赤血球サイクルに入ることにより生じることから、このステージの原虫細胞の増殖を押さえることが直接の治療・予防となる。熱帯熱マラリア原虫は、人に感染する4種類のマラリア原虫の中で最も悪性である。現在、流行地において、クロロキンやファンシダールなどの抗マラリア薬が使用されているが、薬剤耐性株の出現と蔓延により、それらの有用性が低下してきている。のみならず、今のところ赤血球期熱帯熱マラリア原虫を標的とした有効なワクチンは存在しない。したがって、新規抗マラリア薬創製につながる標的分子の提供は、マラリア研究において重要な課題の一つである。

赤血球期熱帯熱マラリア原虫は、細胞増殖と脂質代謝・輸送という生物普遍現象において、モデル生物には見られないユニークな現象を呈する。赤血球サイクルは、メロゾイトと呼ばれる1個の親細胞が非感染赤血球に侵入後、リング、トロフォゾイト、シizontといわれる形態変化とともに細胞分裂を行い、最終的に1個の感染赤血球内に8-24個の娘メロゾイト細胞が形成される。そして、赤血球壊裂とともに各娘メロゾイト細胞が放出され、新たな親細胞となりサイクルが繰り返される。この赤血球サイクル維持のために、原虫は、単細胞の下等真核生物でありながら、哺乳動物細胞に代表される多細胞生物に特徴的な血清を要求する。一方、赤血球サイクルの原虫細胞は、そのほとんどの期間を宿主であるヒト赤血球内で生育するため、原虫細胞自身は、原虫そのものの細胞膜、そして寄生液胞・液胞膜、さらには赤血球細胞質・細胞膜、等により、外界から空間的にはっきり隔離された状態にある。このような特殊な環境下で良好な細胞増殖を維持するためには、外界(血液中)から必須な栄養源を細胞内に取り込むために、原虫から見て細胞外に何らかの機構を発達させる必然性が生じる。

赤血球サイクルの熱帯熱マラリア原虫と感染赤血球



我々は、これまでに赤血球期熱帯熱マラリア原虫の細胞増殖における血清の役割を知るために、細胞増殖に必須な血清中因子の精製と解析を行ってきた。結果、脂質を保持した精製血清アルブミンが、血清と同等の細胞増殖促進活性を示すこと、また、限られた組み合わせの飽和・不飽和脂肪酸の混合物(パルミチン酸・オレイン酸が最適)が、血清アルブミンに会合した形で細胞増殖必須因子として機能すること、さらに、この必須因子は、赤血球期原虫の細胞周期進行とそれにとりなう形態変化に不可欠であること、等を明らかにしてきた。本さきかけ研究では、社会的要求度の高い感染症マラリアの治療・予防に資するという応用的側面と、生物普遍現象

における原虫細胞の特異性を明らかにするという学術的意義との両面を考慮に入れ、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の代謝・輸送の分子機構について解析を行った。

## ● 研究結果と考察

### 細胞増殖に必要な血清中脂質パルミチン酸とオレイン酸の代謝産物の解析：トリアシルグリセロールのユニークな代謝と輸送

放射能標識された各脂肪酸を用いた代謝ラベル実験により、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は、双方とも極性脂質であるリン脂質（フォスファチジルコリン(PC)、フォスファチジルエタノールアミン(PE)、フォスファチジルセリン(PS)、フォスファチジルイノシトール(PI))に蓄積されることが確認できた。同時に、中性脂質であるジアシルグリセロール(DAG)とトリアシルグリセロール(TAG)への蓄積も確認できた。これらの脂質代謝産物の見かけの蓄積速度について、原虫細胞の主要な膜構造の構成成分であるPC、PEは、後期リング期以降に対数的に増加するのに対して、TAGは、後期トロフォゾイト期以降から、PC、PEの蓄積速度に比べて、より急速に増加することが明らかとなった。さらに、赤血球サイクルの後期であるシゾント期からセグメンター期に蓄積が最大となるTAGの分解を、パルスチェイス実験により解析したところ、感染赤血球の壊裂直前から分解が進行し、それともない遊離脂肪酸が培地中に放出されることが示された。これらの結果は、TAGの合成と分解が、赤血球ステージのある限られた時期に特異的に起こっていることを示している。一方、中性脂質を特異的に染色するナイルレッド等による染色実験により、TAGの濃縮される細胞内脂質滴は、赤血球サイクルの各ステージでその局在を変えること、そして、赤血球壊裂直前であるセグメンター期においては、寄生液胞膜と原虫細胞の周りに染色像が集中することが示された。さらに興味深いことに、感染赤血球内の脂質滴の合成と輸送は、プレフェルディンA処理により阻害されることも示された。つぎに、TAG合成における最終酵素の一つとして知られているジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ(DGAT)活性の存在を調べたところ、原虫感染特異的にその活性が検出され、さらにこれまでの代謝ラベル実験、ならびに脂質滴の合成に関する染色実験の結果と一致してトロフォゾイト期以降に活性の上昇が確認された。

以上の結果を踏まえて赤血球期熱帯熱マラリア原虫におけるTAGの機能を考えると非常に興味深い可能性が浮上してくる。赤血球期の原虫細胞には、 $\beta$ -酸化に代表される脂肪酸の酸化分解系が存在せず、また、上記代謝ラベル実験の結果から、TAGの合成は、リン脂質(PC、PE、PS、PI)やグリコシルフォスファチジルイノシトールアンカーといった糖脂質の合成に比べて、明らかに遅れている。さらに、合成されたTAGは、再び遊離脂肪酸に分解された後、最終的には細胞外に放出される。これらの事実を総合すると、一般に言われているTAGの機能であるエネルギー貯蔵体、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、赤血球期熱帯熱マラリア原虫のTAG代謝・輸送に関する我々の知見は説明できない。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シゾントの壊裂、またはメロゾイト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、TAG合成の最終酵素の一つDGAT1の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が起こっ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。

### 遺伝学的手法に基づく細胞増殖に必要な血清中脂質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の試み

HB3株とDd2株は、マラリア生物学において遺伝学的手法が使用できる数少ない組み合わせの中の1つである。この組み合わせを、我々がこれまで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。

最初に、30  $\mu$ Mずつの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を調べたところ、HB3株は対数増殖を示すが、Dd2株は1サイクル終了後(48時間後)に細胞増

殖が停止してしまうという表現型を示した。この実験系において、添加する脂肪酸の量的な問題ではないということは、供給する脂肪酸の量を変化させた実験により確認している。つぎに、この親株から派生した26種類のキメラ子孫細胞株について同様の実験を行ったところ、全てのキメラ細胞株は、HB3株もしくはDd2株のどちらかの表現型に帰属することが明らかとなった。これらの結果は、HB3株とDd2株が呈するFAに対する細胞増殖応答の違いは、遺伝的な変異により規定されており、その表現型は、1つの原因遺伝子により支配されている可能性が高いことを示唆している。

つぎに、HB3株とDd2株のFAに対する細胞増殖応答の違いを規定する細胞内反応が何であるかを明らかにするために、放射能標識脂肪酸を用いた代謝ラベル実験を行った。結果、通常のラベル実験により検出される代謝産物(中性、極性脂質)は、HB3株、Dd2株とも質的に同じであった。量的な違いの指標となる各代謝産物の蓄積量については、Dd2株の方がむしろ多かった。しかしながら、FAを含む培地で48時間培養後、ラベル実験をした場合、HB3株における各代謝産物の蓄積量は、通常のラベル実験の結果と大差は見られなかった。それに対して、FAを含む培地で調整したDd2株における各代謝産物の蓄積量は、通常のラベル実験でのそれらに比べて有意に減少していた。さらに、上記の異なる2つの条件を用いて放射能標識されたパルミチン酸の感染赤血球内への蓄積量を分の時間スケールで解析したところ、HB3株は、細胞を調整する条件の違いによる蓄積量の差を示さなかったのに対して、Dd2株は、代謝産物の解析結果同様、FAを含む培地で調整した場合、通常の培地で調整した場合に比べて、蓄積量が有意に減少した。これらの結果は、HB3株、Dd2株ともに細胞増殖に必要な血清中脂肪酸を代謝する能力を持っているが、Dd2株は、血清中脂肪酸の取り込み、もしくは輸送に何らかの異常があるため、結果としてFAに対する細胞増殖応答に違いが現れたという可能性が高いと解釈できる。

## ● 今後の展望

今回明らかにできたTAGのユニークな代謝・輸送に関する研究は、TAGと脂質滴の細胞内での機能、ならびに、それらの合成・輸送に関する原虫因子群の同定、等の解析へと展開させていく。一方、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、もしくは輸送に関する原虫因子の同定の試みについては、原因遺伝子の決定、ならびに、原因遺伝子産物の機能解析へと展開させていく。以上のような研究展開をはかることにより、生物普遍現象である脂質代謝・輸送について、赤血球期熱帯熱マラリア原虫が呈するユニークな分子機構を浮かび上がらせると同時に、モデル生物、特に哺乳動物細胞との違いを明確にさせることが可能になると考えている。そして、最終的には、社会的要求が高い新規抗マラリア薬創製のための標的分子の提供につなげたい。

---

## 主要業績リスト

1. N. M. Q. Palacpac, Y. Hiramine, 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. Hiramine, 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. *Microbes Infect.* 5; 545-552, 2003.