

オルガネラ制御を中心とした肝内型マラリア原虫の休眠・増殖分子基盤の解明

国立感染症研究所 寄生動物部 第3室 室長
案浦 健

【研究の目的】

世界最大の感染症の一つであるマラリアは、ハマダラカによって媒介されるマラリア原虫がヒト体内において肝細胞内（肝内型）と赤血球内（赤内型）に寄生する疾患であり、様々な対策が行われているが撲滅は困難を極める。肝内型は、撲滅対策を最も困難にする発育期であり、特に肝内型の休眠期に対する新薬開発は実験モデル系の確立が難しく、また休眠原虫の代謝機構やミトコンドリアなどのオルガネラ制御などに関する報告は存在しないことから、新薬開発などの大きな障害となっている。そこで本研究では、代表者が世界に先駆けて作製に成功した休眠モデル実験系などを用いて、肝内型原虫の核やオルガネラ制御などを中心とする休眠・増殖の制御機構・分子基盤の解明を試みた。本研究の遂行により、休眠期原虫のオルガネラを標的とした薬剤開発の可能性が見出されるのみならず、革新的なマラリア治療戦略の可能性も検討され、また新たなワクチン開発に付与する分子基盤となる研究として展開することを試みた。

【研究の内容、背景および成果と今後の見通し】

マラリアは依然として猛威を振るう感染症であり、昨今のコロナ禍はマラリアに様々な負の影響を与えるため、感染者数・死亡者数の増加が WHO より報告されており、ワクチンや新薬の開発など様々な対策がなされているが征圧には至っていない。なぜマラリア撲滅は困難なのだろうか？様々な要因が考えられるが、最も困難な問題の一つとしてマラリア原虫に休眠期が存在することが挙げられる。マラリアの休眠期の治療は、通常のマラリア治療薬（症状を呈する赤内型を標的とする薬）は全く効果を示さないことから、症状が治まった後に改めて異なる治療薬の服薬が必要であり、流行地などでは根治に至らないケースが多発する。また唯一存在する休眠期の治療薬は、副作用が強く、投与禁忌の患者群が存在するなどの理由から新たな薬剤の開発が求められている。この休眠期に関する研究上のボトルネックは、休眠期を有する原虫種が霊長類など限られた宿主にしか感染せず、また感染ハマダラカを維持・使用できる研究施設が非常に限られている（全世界でも数か所、国内では申請者だけが唯一実施可能）ことが挙げられる。

本研究では、代表者らが世界に先駆けて作製に成功した休眠モデル実験系などを用いて、休眠・増殖の制御機構と分子基盤の解明を試みた。①これまでの様々なスクリーニング解析から、代表者らは肝内型マラリア原虫の休眠期を誘導・維持するマスター遺伝子（*set-hyp*）の候補を世界に先駆けて同定した。この SET-hyp は、データベース上は機能

未知のタンパク質として登録されているが、詳細なドメイン解析から休眠期を有するマラリア原虫種において酵素としての活性中心が高度に保存された遺伝子であり、一方で休眠期を有しない原虫種のオルソログ遺伝子では、ドメイン構造が分断されるなど保存性が低かった。この SET-hyp の原虫内での機能を明らかにするため、休眠しないネズミマラリア原虫に *set-hyp* 遺伝子導入し表現型解析を実施した。その結果、強制発現させると肝内型特異的に増殖を停止する表現型を示すことが、*in vitro* および *in vivo* において明らかとなった。また SET-hyp 組換えタンパク質を用いた酵素アッセイから転写・増殖抑制として機能する酵素であり、その基質特異性も極めて高い可能性が示唆された。

②また代表者らが作製に成功した休眠モデル実験系などをより効果的に活用するため、この休眠モデル原虫の可視化原虫の作製を行った。サルマラリア原虫である *P. cynomolgi* を用いて、蛍光タンパク質である GFP と発光タンパク質であるルシフェラーゼを発現する組換え原虫の作製を行った。エレクトロポレーション法により遺伝子導入を行い、選択薬剤を用いて陽性原虫の選抜を行った。得られた陽性原虫 (Pcy GFP-Luc) は、赤内期において GFP の発現が観察され、また同時にルシフェラーゼの活性も検出された。この Pcy GFP-Luc を感染させた血液を用いて、人工膜吸血法によりハマダラカに感染させ、昆虫体内期での GFP の発現を確認したところ、オーシスト期やスポロゾイト期など、全ての発育期において陽性シグナルが検出された。現在、この Pcy GFP-Luc 株を用いて、各種肝細胞への感染実験と霊長類を用いた感染実験を実施しており、良好な結果が得られている。今後、GFP 蛍光シグナルを標的とした感染肝細胞の検出を予定しており、各種電子顕微鏡を用いたオルガネラ動態の解析を予定している。またルシフェラーゼの発光シグナルを用いた定量解析や、*in vivo* あるいは *ex vivo* 解析を予定しており、これまでに良好な結果が得られている。

今後、上記①の実験結果などを元に SET-hyp を中心とする制御機構を明らかにすることで、マラリア原虫の休眠メカニズムの分子基盤を明らかにする。また②の実験結果から、休眠モデル原虫株の可視化と定量解析が可能となることが示唆されており、これらのリポーターシグナルを標的として各種電子顕微鏡を用いた解析を実施することで、原虫のオルガネラ動態の観察を実施する。これらの情報と結果を総合的に解析することで、肝内型マラリア原虫における休眠と増殖におけるオルガネラ制御機構の解明と分子基盤情報の整備を試みる。これらの分子基盤情報は、革新的なマラリア治療戦略の開発に有益であり、また開発が大きく遅れている三日熱マラリアのワクチン開発においても有益な情報となることが期待される。