

マラリア原虫の細胞増殖における血清中必須因子の役割について

Evaluation of serum essential factors with respect to the intraerythrocytic development and cell cycle progression of *Plasmodium falciparum*

研究代表者 大阪大学微生物病研究所 助手 三田村俊秀

Research Associate, Research Institute for Microbial Diseases,
Osaka University

Toshihide MITAMURA

Malaria is clinically manifested only when the human malaria parasites in genus *Plasmodium* enter the obligatory intraerythrocytic life cycle. Elucidation of the roles of serum, the key nutrient, and its components is then deemed essential for thorough understanding on the proliferation of *Plasmodium* cells at the erythrocytic stage. We have recently demonstrated that palmitic and oleic acids in association with lipid-free bovine serum albumin are among the serum essential factors for intraerythrocytic proliferation of *P. falciparum*. In this study we evaluated these fatty acids with respect to the intraerythrocytic development and cell cycle progression of *P. falciparum* through biochemical and morphological analysis. Results showed that the deduced serum essential fatty acids indeed exert crucial roles for the intraerythrocytic development and cell cycle progression of *P. falciparum*.

1. 研究目的

マラリアは、未だ人類、特に熱帯地域の発展途上国の人々に多大なる影響を与えている寄生虫感染症である。マラリア症状は、病原因子であるマラリア原虫が、生活環中の赤血球期に入ることにより発症する。したがって、赤血球期原虫細胞の増殖を抑えることが、マラリアの直接の治療となる。

一方、原生動物界に属する単細胞の下等真核生物であるマラリア原虫は、赤血球期の細胞増殖形態において、数々のユニークな特徴を有する。なかでも、メロゾイトと呼ばれる1個の細胞が宿主である赤血球に侵入後、リング、トロフォゾイト、シズントといわれる形態変化を経て、最終的には

8-24個のメロゾイトを放出し1サイクルが終了するという現象、また、この赤血球期原虫の *in vitro* の細胞培養には、基礎培地 (RPMI1640) にヒト血清 (または血漿) の添加が必須であるという事実は、我々が特に着目している特徴である。我々は、生物学的興味とマラリア治療への応用との両面を考慮に入れ、赤血球期マラリア原虫の細胞増殖機構の分子レベルでの解明を目標に研究を続けている。

本研究では、我々がこれまでに明らかにしてきた血清中必須因子である、血清アルブミンに結合した飽和・不飽和脂肪酸の混合物 (パルミチン酸・オレイン酸) の赤血球期マラリア原虫細胞の形態変化と細胞周期進行における役割に関して

検証した。

2. 研究経過

2. 1. 方法

半合成培地での熱帯熱マラリア原虫の継代培養

限られた組み合わせの飽和・不飽和脂肪酸混合物を脂質フリーの血清アルブミン (lipid-free BSA) に再構成させ、それぞれの生成物を基礎培地 (BM) に加える。これらの培地を用いて、3種類の熱帯熱マラリア原虫株 (Honduras 1、FCR3/Gambia、3D7) の継代培養を行った。脂肪酸混合物は、パルミチン酸・オレイン酸、パルミチン酸・リノール酸、ステアリン酸・オレイン酸、ステアリン酸・リノレン酸、ステアリン酸・アラキドン酸の5種類の組み合わせを使用した。継代培養は、4日ごとに0.1% 感染率になるように希釈し、これを計28日間継続した。陽性コントロールとして、ヒト血清 (HS) と脂質を保持した精製血清アルブミン (intact BSA) それぞれを BM に添加した培地を用いた。

熱帯熱マラリア原虫の形態変化におけるパルミチン酸・オレイン酸の役割

熱帯熱マラリア原虫 Honduras 1 株を、パーコール処理、それに続くソルビトール処理により、4時間以内に同調させ、各培地で培養する。一定時間ごとに異なる培地に移行させた後、計時的にサンプリングを行い、ギムザ染色薄層塗抹標本を作成する。顕微鏡下で形態変化を観察すると同時に、58時間後 (1 サイクルが完全に終了している時間) における新たなリング期細胞の出現頻度を、直接細胞数を数えることにより、定量的に測定する。使用した培地は、BM のみ、lipid-free BSA を BM に添加したもの (LBSA)、脂肪酸を再構成させた lipid-free BSA を BM に加えたもの [パルミチン酸のみ (P)、オレイン酸のみ (O)、または、その両方 (P/O)]、さらに、陽性コントロールとして、intact BSA を BM に加えたも

の (IBSA) を用いた。

熱帯熱マラリア原虫の細胞増殖促進活性の測定

ソルビトール処理により、リング期に同調させた原虫細胞を、各種の培地で96時間培養後、ギムザ染色薄層塗抹標本を作成する。各添加物の原虫細胞増殖促進活性を、上記の方法と同様にして定量的に測定する。

2. 2. 結果および考察

今回調べた3種類の原虫株に関しては、28日間の継代培養期間中、intact BSA は、HS とほぼ同程度に原虫細胞の増殖を支持することが示された。飽和・不飽和脂肪酸混合物を再構成させた lipid-free BSA を用いた場合、パルミチン酸・オレイン酸の組み合わせが、3株すべてにおいて最もよい細胞増殖を支持した。ステアリン酸・リノール酸の組み合わせも、3株すべての継代培養を支持することができたが、その増殖速度は、パルミチン酸・オレイン酸に比べて、明らかに低かった。一方、他の組み合わせの中で、全ての株の継代培養を支持できる組み合わせは他になく、また、各株の増殖速度に与える影響に関しても共通性は見られる組み合わせはなかった。以上の結果より、これまで明らかにしてきた、血清中必須因子がパルミチン酸・オレイン酸を結合した lipid-free BSA であるという知見は、熱帯熱マラリア原虫一般に見られる現象であることが示唆された。

これまでの我々の解析から、血清中必須脂肪酸であるパルミチン酸とオレイン酸は、赤血球期原虫細胞の形態変化と細胞周期進行において、不可欠な因子であるという結果を得ている。本研究では、まず4時間以内に同調された原虫細胞を各種の培地で培養し、形態変化を観察した。結果は、BM、LBSA、P の場合、形態変化はトロフォゾイト以降進行しないが、O で培養した場合、シャイゾントまでの形態変化は、コントロールと同様に進行する。しかしながら、シャイゾント以降

の形態変化に明らかな異常が見られる。これらの結果は、トロフォゾイトまでの形態変化には、血清中因子は必要なく、トロフォゾイトからシャイゾントへ移行には、オレイン酸が、さらにシャイゾント以降、次のリングへの移行には、パルミチン酸とオレイン酸の両方が必要であることを示唆している。

必須脂肪酸の要求時期をさらに明確にするために、各ステージへの移行時期前後における各脂肪酸の形態変化に与える影響を調べた(表1)。BMで培養してきた原虫は、22時間以前にP/O、IBSAに戻さなければ、新たなリング期細胞の出現数に大きな影響を与えることが示された。同様に、Oで培養してきた原虫は、30時間以前にP/O、IBSAに戻さなければ、新たなリング期細胞の出現数に大きな影響を与えることも示された。さらに、パーコール処理によりセグメントシャイゾント(セグメンター)を濃縮し、各種培地で培養したところ、セグメンター以降の形態変化には、血清中成分は、それほど大きく影響しないことが示された(表2)。これらの結果をまとめると、リングからトロフォゾイトに移行する時期からオレイン酸が必要となり、次にトロフォゾイトからシャイゾントに移行する時期からオレイン酸に加えて、パルミチン酸も必要となる。しかし、セグメンターに移行して以後は、血清中成分の必要性がなくなることが示された。

DNA合成はトロフォゾイト期以前から始まるという我々の結果とを考え合わせると、DNA合成を開始するためには、血清中必須脂肪酸を必要としないが、これを持続させるためには、少なくともオレイン酸を必要とするということを示唆していると考えられる。もしくは、DNA合成を持続されるための初期の段階ではオレイン酸を、後期の段階ではオレイン酸に加えてパルミチン酸も必要とするという可能性も考えられる。いずれにしても、本研究で得られた結果は、これら

2種類の飽和・不飽和脂肪酸が、赤血球期原虫細胞の形態変化と細胞周期進行において、独立した役割を担っていること示唆している。

2. 3. 副次的研究結果

本研究を遂行中、intact BSAでの細胞増殖速度が、HSのそれに比べて半分以下である原虫株を発見した。他の株においては、intact BSAは、HSと同レベルの細胞増殖促進活性を示すことから、このような表現形を示す原虫株は、細胞増殖における変異株であると考えられ、このような変異株は、細胞増殖の分子機構の解析に、非常に有用な材料となると考えられる。

マラリア原虫感染赤血球内への血流中必須栄養源(アミノ酸、核酸前駆体など)の取り込みに関与していることが示唆されている。感染赤血球特異的に形成される膜構造の主な構成成分であるスフィンゴミエリンの代謝に関わる酵素の一つスフィンゴミエリナーゼの存在を明らかにすることに成功した。

3. 研究成果

血清アルブミン由来のパルミチン酸とオレイン酸は、赤血球期熱帯熱マラリア原虫の細胞増殖において、血清中必須因子であり、原虫細胞の形態変化と細胞周期進行において、それぞれが独自の機能を果たしている可能性を示唆する結果を得た。さらに、細胞増殖に関する(血清中必須因子の要求性に違いがある可能性が高い)変異株の取得と、原虫細胞の増殖に必要な血中因子の取り込みに関与する(血清中必須脂肪酸の取り込みにも関与することが十分に考えられる)可能性のある酵素を同定することができた。

4. 今後の課題と発展

必須脂肪酸が必要とされる各時期において、各脂肪酸がどのような代謝産物に変換されるのか、さらにこれらの産物がどのような分子機構で形

表 1. 赤血球期熱帯熱マラリア原虫の形態変化における必須脂肪酸の要求時期

移行時間 (hr)	感染率 (%)				
	初期培地				
	BM		O		
	IBSA	P/O	IBSA	P/O	P
control*	4.73	2.68	4.73	2.68	
6	3.24	2.41			
10	3.85	2.65			
14	3.54	2.77			
18	4.09	2.38			
22	3.68	2.58	4.62	2.79	
26	1.58	0.22	5.59	2.66	
30			4.14	2.86	0.00
34			2.33	1.98	0.00

感染率を 1% にあわせて各初期培地で培養を開始し、58 時間後の感染率を測定した。Control は、IBSA P/O を初期培地とし、培地の変更は行わずに 58 時間後の感染率を測定した。

表 2. 血清中必須脂肪酸がメロゾイトの放出と非感染赤血球への再侵入に与える影響

	感染率 (%)	
	セグメンター	リング
IBSA	0.78%	4.25%
P/O	0.78%	4.50%
LBSA	0.78%	4.23%
BM	0.78%	3.57%

態変化と細胞周期進行に寄与しているのかを、明らかにしていく必要がある。さらに、副次的に得られた知見に関しても、変異株の解析とその変異遺伝子の同定、また、感染赤血球特異的に形成される膜構造の必須脂肪酸取り込みへの関与などの解析を進めていく必要がある。これらの解析を継続することにより、赤血球期マラリア原の細胞増殖と脂肪酸代謝・輸送との機能的関係について、生物学的に重要な知見を得ることが期待で

きると同時に、得られる分子論的知見は、マラリア化学療法における、新規標的分子の提供につながる事が期待される。

5. 発表論文リスト

1. Neutral sphingomyelinase activity dependent on Mg^{2+} and anionic phospholipids in the intraerythrocytic malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Hanada K, Mitamura T, Fukasawa M, Magistrado PA, Horii T, Nishijima M. *Biochem. J.*, 2000, 346, 671-677.
2. Serum factors governing intraerythrocytic development and cell cycle progression of *Plasmodium falciparum*. Mitamura T, Hanada K, Mitamura-Ko EP, Nishijima M, Horii T. *Parasitol. Int.* In press.