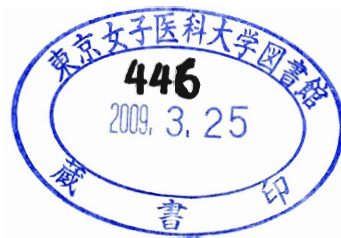

マラリア感染に関わる
赤血球膜の脂質ダイナミズムの解析

(研究課題番号 18590408)

平成18年度～平成19年度 科学研究費補助金
(基盤研究(C)) 研究成果報告書



平成20年5月

研究代表者 高桑 雄一

東京女子医科大学 医学部 教授



マラリア感染に関わる赤血球膜の
脂質ダイナミズムの解析

18590408

平成18年度平成19年度科学研究費補助金
(基盤研究(C)) 研究成果報告書

平成20年4月

研究代表者 高 桑 雄 一
東京女子医科大学 医学部 教授

研究 成 果

はしがき

マラリアは1日約 6000 人が死亡している世界最大の感染症であり、地球温暖化に伴い日本でもその発生が危惧されている。マラリア原虫のヒト体内での生活環の中で増殖の場を提供するのは赤血球であるにも関わらず、赤血球への侵入機構には不明な点が多い。

本研究は、マラリア原虫が赤血球に侵入する際の必要・十分条件について、赤血球膜の脂質ダイナミズムの観点から検証した。具体的にはマラリア原虫は赤血球に侵入する際に水平方向の脂質ダイナミズム（脂質ラフト）に集積する情報伝達系を利用すること、およびその他の宿主側の条件が満たされないとマラリア原虫の赤血球への侵入（感染）が阻止されること、を示し、それらに寄与する薬剤を見いだすことで新たなマラリア治療・予防法を模索した。

研 究 組 織

研究代表者	：	高桑 雄一	（東京女子医科大学 医学部 教授）
研究分担者	：	萬野 純恵	（東京女子医科大学 医学部 講師）
研究分担者	：	布村 涉	（東京女子医科大学 医学部 助教）
研究分担者	：	越野 一郎	（東京女子医科大学 医学部 助教）

交付決定額（配分額）

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成18年度	1,800,000	0	1,800,000
平成19年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	3,500,000	510,000	4,010,000

研究成果

[緒言]

マラリアは熱帯・亜熱帯の地域に分布する世界最大の感染症であり、年間3～5億人が感染し、死者は1日約6000人に達している。近年、流行地域における薬剤耐性マラリア原虫の蔓延のみならず、地球温暖化などにより2020年には流行地域が日本（九州）に及ぶと予測されている。ハマダラ蚊の媒介によりヒトに感染したマラリア原虫（熱帯熱マラリア原虫（*P. falciparum*）など）は肝細胞内で増殖し多数のメロゾイト（merozoite）となり、肝細胞を破壊して血流中に放出され、標的の赤血球に侵入する。マラリア原虫は核も細胞内小器官ももたない赤血球内で我が物顔でヘモグロビンを分解したアミノ酸を材料に自分に都合のよい蛋白質を合成し、輪状体（ring form）、栄養体（trophozoite）、分裂体（schizont）へ順次分化しながら8から24個のメロゾイトを産み、ついには赤血球膜を破壊して血流中に放出され、新たな赤血球に侵入する（図1）。*P. falciparum*の場合、この増幅感染サイクル（生活環）は約48時間で完結し、この過程で三大症状である発熱、貧血、脾腫がみられる。死亡原因は高度の貧血と血管壁への粘着性の増した感染赤血球による脳血管閉塞である。これらの深刻な病態に至る元を正せば赤血球膜を舞台に引き起こされる原虫と赤血球のせめぎ合いこそ、マラリア感染症の本質と捉えられる。

ヒト成熟赤血球は中窪みの円盤形（直径約8 μ m、厚さ約1-2 μ m）で、核や細胞内小器官（ミトコンドリア、小胞体など）を全く持たず、そのかわりにヘモグロビン（Hb）を高濃度に含んでいる。赤血球膜は脂質二重層を基本構築とし、リン脂質はその外層と内層に非対称に分布している。一部に特定の脂質と蛋白質が集合した“マイクロドメイン（ラフト rafts；筏の意味）”の存在も想定されている（図2）。膜蛋白質には膜を貫通するものと膜を細胞質側から裏打ちする膜骨格（membrane skeleton）を構成するものがある。

メロゾイトは赤血球膜表面で回転して頭頂部で結合し、赤血球膜を内方陥没させながら内部に侵入することが観察されている（図3）が、赤血球膜を構成する膜脂質の関与についての詳細は不明である。本研究では主に水平方向のダイナミズム（ラフト）のマラリア原虫侵入過程への関与について検討した。

[成績概要]

ラフトとは、膜を非イオン性界面活性剤 (Triton X-100 など) で処理し、シヨ糖密度勾配遠心で得られる難溶性の画分 (DRM: Detergent resistant microdomain) を指す。ラフトはコレステロール (cholesterol) とスフィンゴ脂質に富み、種々の蛋白質が集積しているが、膜を介する情報伝達の間としてラフトが重要であることは示されていない。

本研究では、1) 膜脂質量を変化させずにラフト構造の有無を調節した赤血球 (リドカイン (Lidocaine) 処理およびリドカイン除去赤血球)、2) コレステロール量を減少させた赤血球 (MBCD (methyl- β -cyclo dextrin) 処理赤血球)、3) スフィンゴミエリン (Sphingomyelin) 量を減少させた赤血球 (スフィンゴミエリナーゼ (SMase) 処理赤血球) を調製し、ラフト構造の有無、情報伝達系の機能を確認した上でマラリア原虫の侵入に対するラフトの効果を検討した。その結果、マラリア原虫は赤血球に侵入する際に水平方向の脂質ダイナミズム (ラフト) に集積する情報伝達系を利用することが明らかになり、可逆的にラフトの構造と機能を消失させるリドカインの治療への応用の可能性が示された。

- 1 赤血球膜を Triton X-100 処理し、シヨ糖密度勾配下で遠心することにより6画分を回収し (図4)、コレステロールおよびラフトマーカー蛋白質 (Flotillin-1 および Gs α) の分布を検討し、赤血球には低密度でコレステロールに富み、Flotillin-1 が集積したラフト画分が存在することを明らかにした。
- 2 赤血球を局所麻酔剤であるリドカイン (図5) 処理すると、リドカインは主に膜に取り込まれ (表1) 上記1で示したラフト画分は消失し、脱脂肪処理した牛血清アルブミン (BSA) を用いて赤血球膜に取り込まれたリドカインを洗浄除去すると再びラフト画分の回収が可能になったことから (図6、7)、リドカインは可逆的にラフトを消失させることが明らかになった。
- 3 リドカイン処理の有無によりラフト画分の存在を調整 (Gs α のラフト画分への集積で確認 (図8)) した赤血球を用いて、アデノシン (Adenosine) 刺激による情報伝達系の活性化を (1) 赤血球内 cAMP 量の増加、(2) PKA 活性化による基質蛋白質 (Adducin) のリン酸化で確認した (図9)。以上をまとめると、リドカイン処理 (ラフト画分の消失) により情報伝達は

遮断されたが、リドカイン除去（ラフト画分の再構築）により情報伝達の回復を確認した（図10）。このリドカインの効果は他の構造類似麻酔薬でも認められた（図11）。

- 4 上記3と同様に、リドカイン処理と除去によりラフト画分の有無を調節した赤血球を用いて、マラリア感染・増殖率を検討した。リドカイン処理（ラフト画分の消失）により感染・増殖率は低下し、リドカイン除去（ラフト画分の再構築）により感染・増殖率は回復した（図12）。さらに、分化段階を分裂体に同期した原虫（図13）を用いて赤血球への侵入効果を検討した。侵入は2 mM 以上のリドカイン処理でほぼ完全に阻止された（図14）。
- 5 MBCD 処理（常法）によるコレステロールの減少に伴いラフト画分は消失した（図15）。
- 6 スフィンゴミエリナーゼ処理により赤血球膜のスフィンゴミエリンは約60%減少し（図16）、コレステロール量が維持されていても（図17）ラフト画分は消失した（図18-20）。
- 7 スフィンゴミエリナーゼ処理（上記6）および MBCD 処理（上記5）によりラフト画分から $G\alpha$ が消失し（図21）、情報伝達も遮断された。

以上を総括するとマラリア原虫は何らかの刺激により $G\alpha$ を介して膜骨格蛋白質をリン酸化し、水平方向の脂質ダイナミズムを利用して膜の内方陥没（原虫の侵入）を容易にすると考えられる。リドカインはすでに局所および全身麻酔に用いられている可逆的麻酔薬であり、本研究で新たに見出されたラフトに依存する $G\alpha$ を介する情報伝達の可逆的作用がマラリア原虫の赤血球への侵入を阻止する可能性が期待される。

図および表

- 図 1 マラリア原虫の生活環
- 図 2 赤血球膜構造
- 図 3 マラリア原虫の赤血球への侵入機構
- 図 4 ラフトの回収法

- 図 5 リドカインの構造
- 表 1 添加リドカインの分布と BSA 処理効果
- 図 6 リドカイン処理およびリドカイン除去後のコレステロールの分布
- 図 7 リドカイン処理およびリドカイン除去後の Flotillin-1 の分布
- 図 8 リドカイン処理およびリドカイン除去後の $G_{s\alpha}$ の分布
- 図 9 リドカイン処理およびリドカイン除去後の cAMP 量と adducin のリン酸化
- 図 10 リドカイン処理によるラフトの構造と機能への効果
- 図 11 他の麻酔薬によるラフトの構造への影響 (Flotillin-1 の分布)
- 図 12 リドカイン処理およびリドカイン除去後の赤血球へのマラリア原虫の感染
- 図 13 同期したマラリア原虫の回収法
- 図 14 マラリア原虫侵入に対するリドカインの効果の濃度依存性
- 図 15 MBCD 処理によるラフトの回収
 - A: コレステロールの分布
 - B: Flotillin-1 の分布
- 図 16 スフィンゴミエリナーゼ処理の時間依存性
- 図 17 スフィンゴミエリナーゼ処理による赤血球膜スフィンゴミエリンおよびコレステロール量の変化
- 図 18 スフィンゴミエリナーゼ処理後の Flotillin-1 の分布
- 図 19 スフィンゴミエリナーゼ処理後のスフィンゴミエリンの分布
- 図 20 スフィンゴミエリナーゼ処理後のコレステロールの分布
- 図 21 スフィンゴミエリナーゼ処理後の $G_{s\alpha}$ の分布

[原著論文および総説]

1. 赤血球はマラリア原虫の侵入に抵抗できるか.
高桑雄一.
膜, Vol.31 : 253-257. 2006.
2. Erythrocyte Shape Change Prevents Plasmodium falciparum Invasion.
Johnson Nyarko Boampong, Sumie Manno, Ichiro Koshino, Yuichi Takakuwa.
膜, Vol.32 : 95-102. 2007.
3. 翻訳後修飾による赤血球膜機能の調節
萬野純恵, 高桑雄一.
膜, Vol.32 : 122-128. 2007.
4. 赤血球膜とマラリア原虫
高桑雄一, 萬野純恵, 越野一郎.
検査と技術, 第36巻 164-166, 2008
5. Functional evidence for presence of lipid rafts in erythrocyte membranes: Gs α in rafts is essential for signal transduction.
Kotoe Kamata, Sumie Manno, Makoto Ozaki, Yuichi Takakuwa.
American Journal of Hematology, 83:371-375, 2008

[学会発表]

(国内)

1. 麻酔薬リドカインはラフトを介する細胞内情報伝達系を抑制する.
鎌田ことえ, 萬野純恵, 尾崎 眞, 高桑雄一.
日本膜学会第28年会, 2006年6月8-6月9日, 北海道札幌市.
2. マラリア原虫の増殖に対するリドカインの影響
越野一郎, 鎌田ことえ, Boampong J, 萬野純恵, 高桑雄一.
日本膜学会第28年会, 2006年6月8-6月9日, 北海道札幌市.
3. ラフトを介する情報伝達系に対するシクロデキストリン効果の検討.
鎌田ことえ, 萬野純恵, 尾崎 眞, 高桑雄一.
日本膜学会第29年会, 2007年5月10-5月11日, 東京都新宿区.
4. リドカインはラフトを介する細胞内情報伝達系を抑制する.
鎌田ことえ, 萬野純恵, 尾崎 眞, 高桑雄一.
日本麻酔科学会第54回学術集会, 2007年5月31日-6月2日, 北海道札幌市.

幌市.

5. ラフトを介した細胞内情報伝達系に対するシクロデキストリンの効果.
鎌田ことえ, 萬野純恵, 尾崎 眞, 高桑雄一.
第 80 回日本生化学会大会, 2007 年 12 月 11-12 月 15 日, 神奈川県横浜市.
6. 熱帯熱マラリア原虫の赤血球侵入における赤血球膜蛋白質のリン酸化の影響.
越野一朗, 高桑雄一.
第 80 回日本生化学会大会, 2007 年 12 月 11-12 月 15 日, 神奈川県横浜市.
7. ラフトを介する情報伝達系に対するシクロデキストリン (MBCD) 効果の検討.
鎌田ことえ, 萬野純恵, 高桑雄一, 尾崎 眞.
日本麻酔科学会第 55 回学術集会, 2008 年 6 月 12 日-6 月 14 日, 神奈川県横浜市
8. リドカインの抗マラリア作用機序に関する検討
越野一朗, 高桑雄一.
日本膜学会第 30 年会, 2008 年 5 月 15 日, 東京都新宿区
9. Effect of sphingomyelinase treatment on erythrocyte membrane lipid rafts.
Mark OFOSUHENE, Ichiro KOSHINO, Sumie MANNO, Yuichi TAKAKUWA.
日本膜学会第 30 年会, 2008 年 5 月 15 日, 東京都新宿区
10. Reversible Inhibition of Lidocaine on the Gs α Coupled Signal Transduction via Disruption of Lipid Raft.
Kotoe Kamata, Sumie Manno, Yuichi Takakuwa, Makoto Ozaki.
20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 18-23 June 2006, Kyoto, Japan.
11. Effect of an anesthetic reagent on erythrocyte infection of Plasmodium falciparum.
Ichiro Koshino, Kotoe Kamata, Johnson Nyarko Boampong, Sumie Manno, Yuichi Takakuwa.
20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 18-23 June 2006, Kyoto, Japan.

(海外)

1. Inhibitory Effect of Lidocaine on GPCR Signal Transduction via Disruption of Lipid Rafts.
Kotoe Kamata, Sumie Manno, Yuichi Takakuwa, Makoto Ozaki.
15th Annual Meeting of the International Society for Anaesthetic Pharmacology (ISAP2006), 13 October 2006, Chicago, USA.
2. Inhibitory Effect of Lidocaine on GPCR Signal Transduction via Disruption of Lipid Rafts.
Kotoe Kamata, Sumie Manno, Yuichi Takakuwa, Makoto Ozaki.
2006 Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists (ASA2006), 14–18 October 2006, Chicago, USA.
3. Effects of Methyl- β -cyclodextrin (MBCD) on the Rafts Dependent Signal Transduction.
Kotoe Kamata, Sumie Manno, Makoto Ozaki, Yuichi Takakuwa.
16th Annual Meeting of the International Society for Anaesthetic Pharmacology (ISAP2007), 12 October 2007, San Francisco, USA.
4. Study on Effect of Cyclodextrin on the Rafts Dependent Signal Transduction.
Kotoe Kamata, Sumie Manno, Makoto Ozaki, Yuichi Takakuwa.
2007 Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists (ASA2007), 13–17 October 2007, San Francisco, USA.

图 1

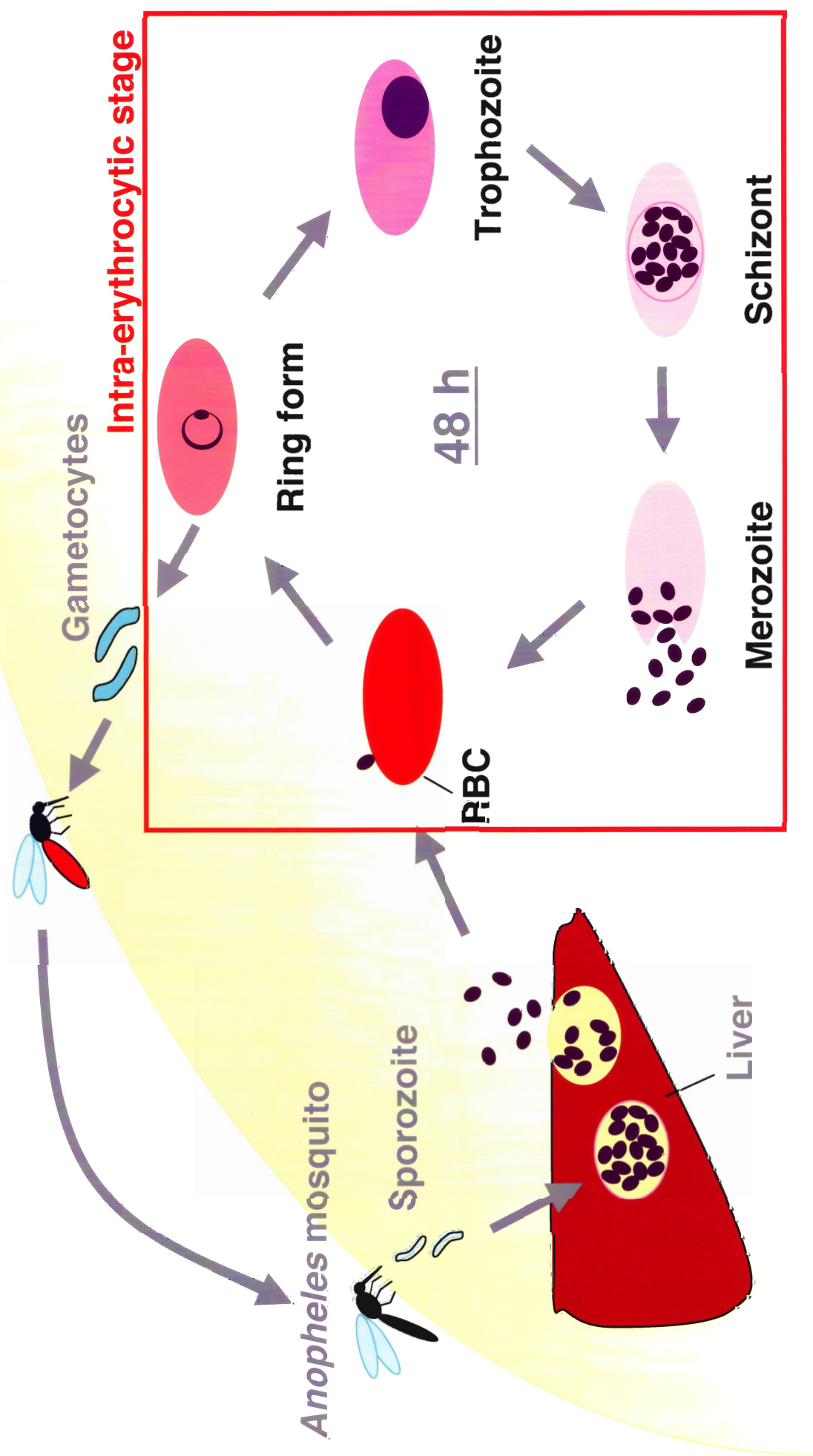


图 2

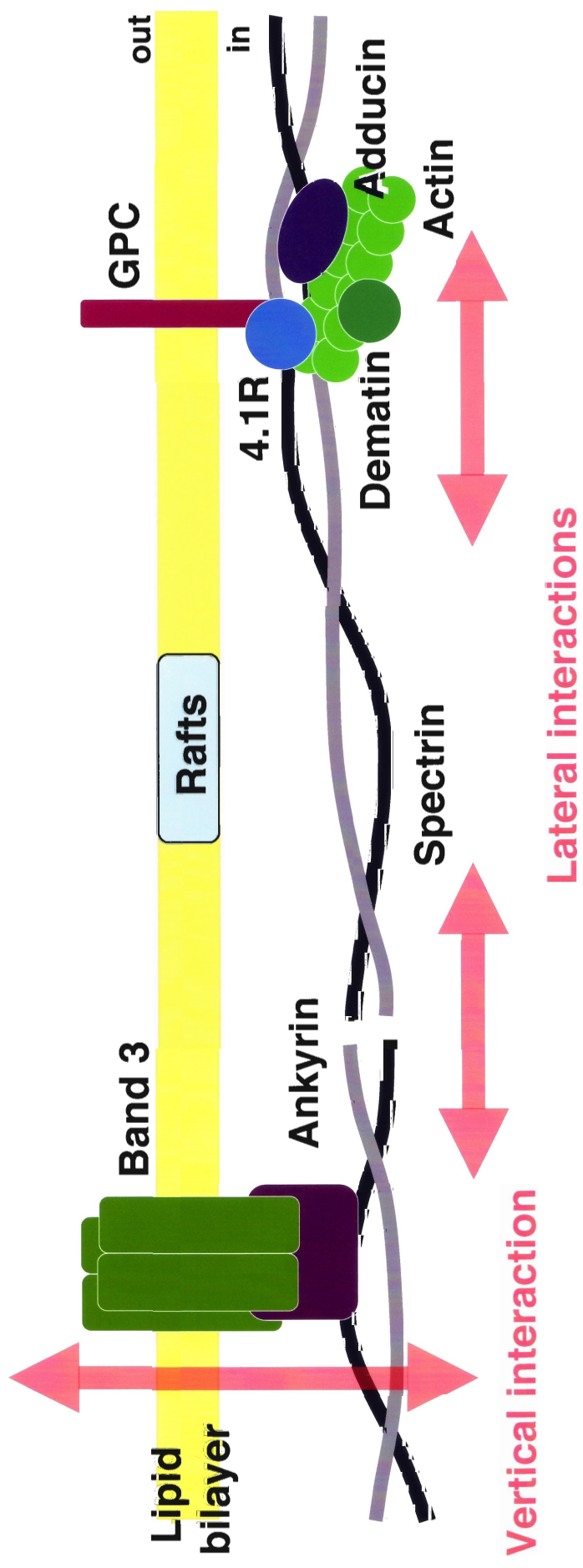


図 3

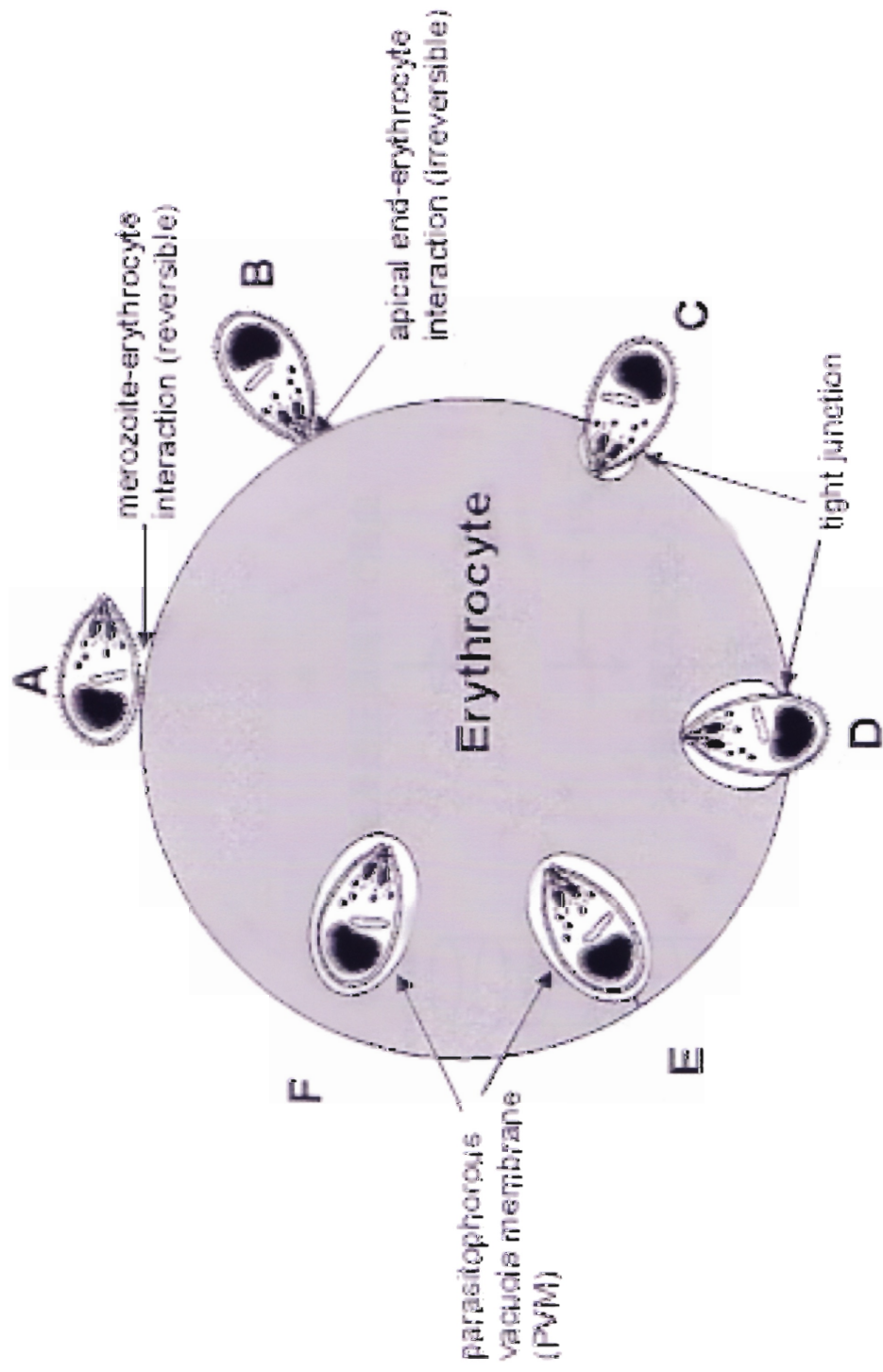


図4

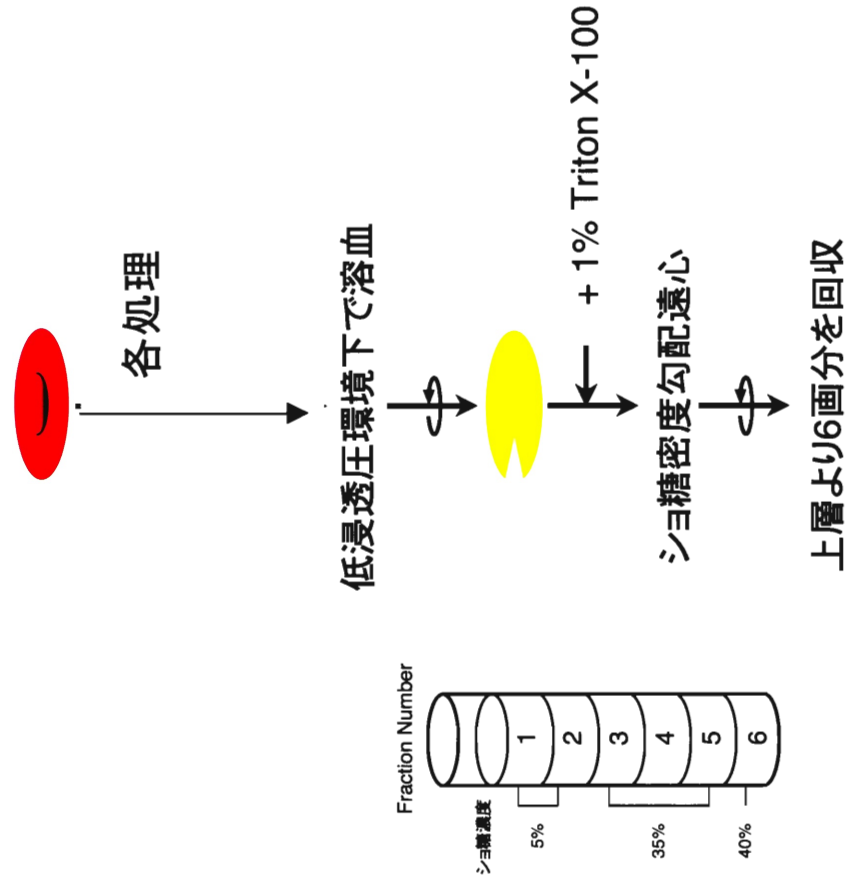


图 5



表 1

	Lidocaine content ($\mu\text{g}/1 \times 10^{10}$ cells)	Lidocaine (%)
Total Lidocaine Content	30000	100
Membrane Lidocaine Incorporation	444	1.5
Lidocaine Remained Following BSA Washing	62	0.2

图 6

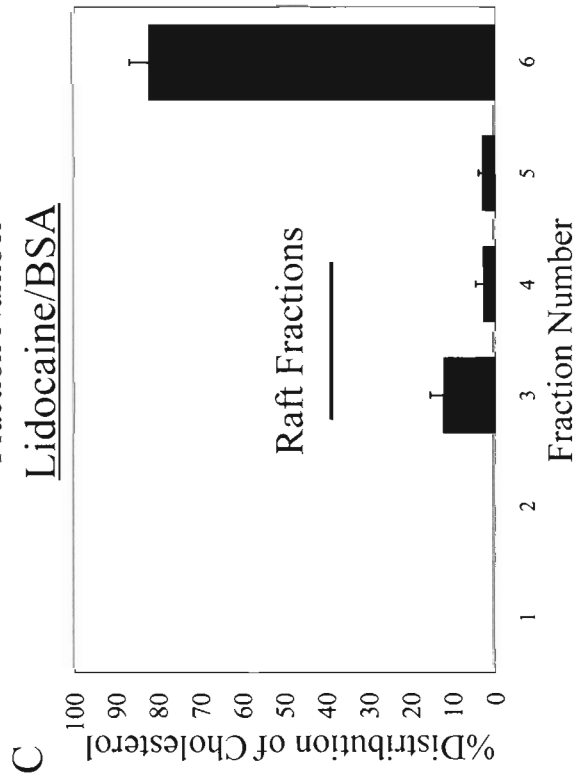
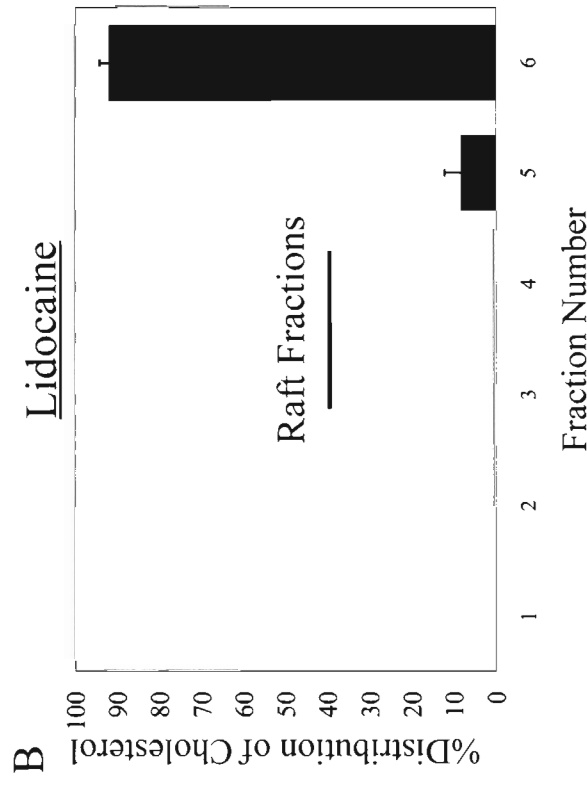
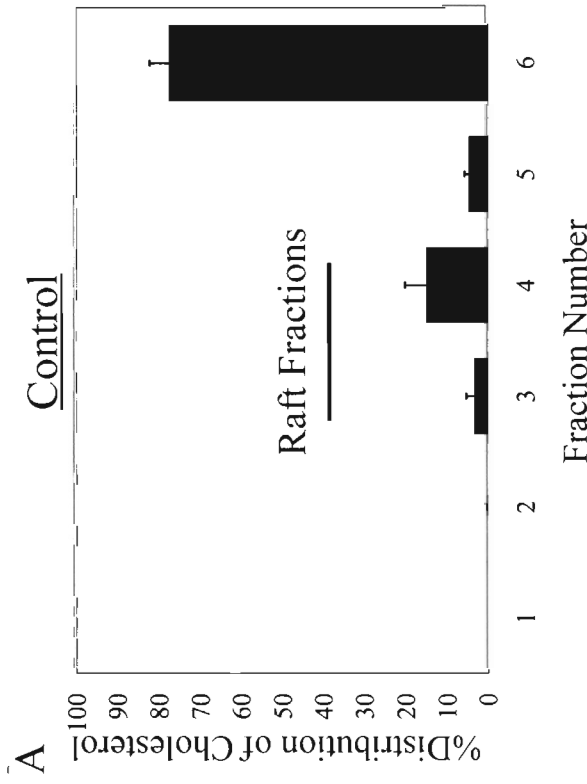
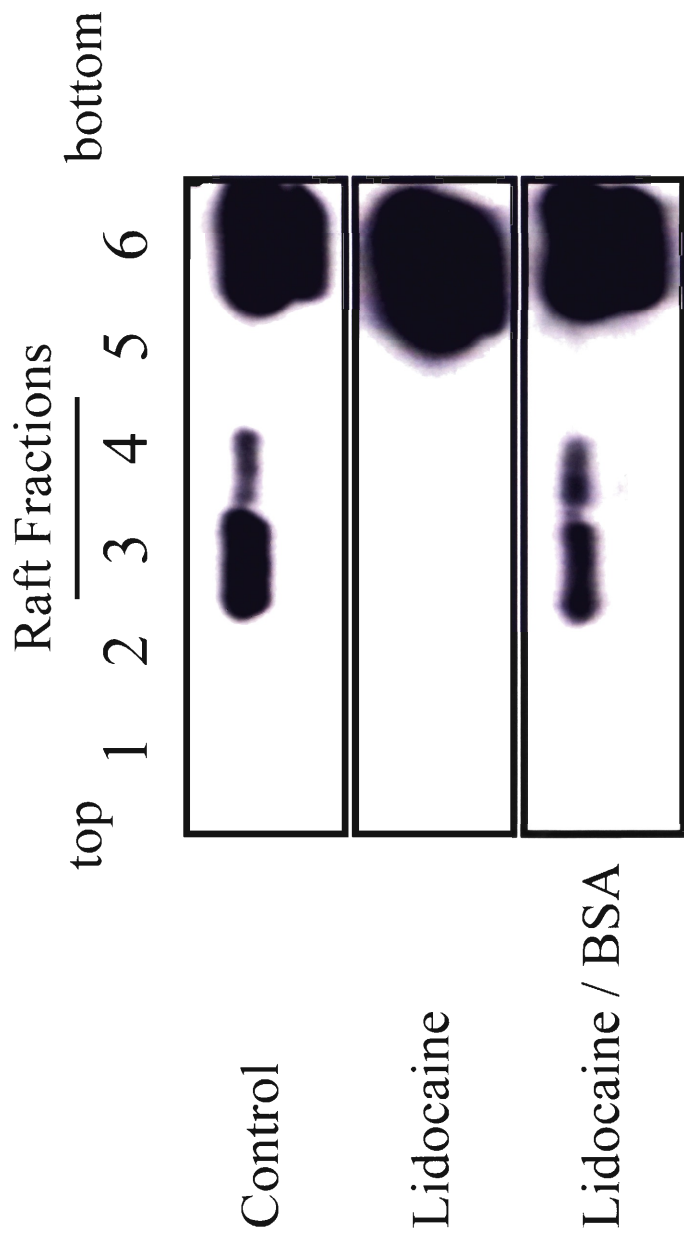


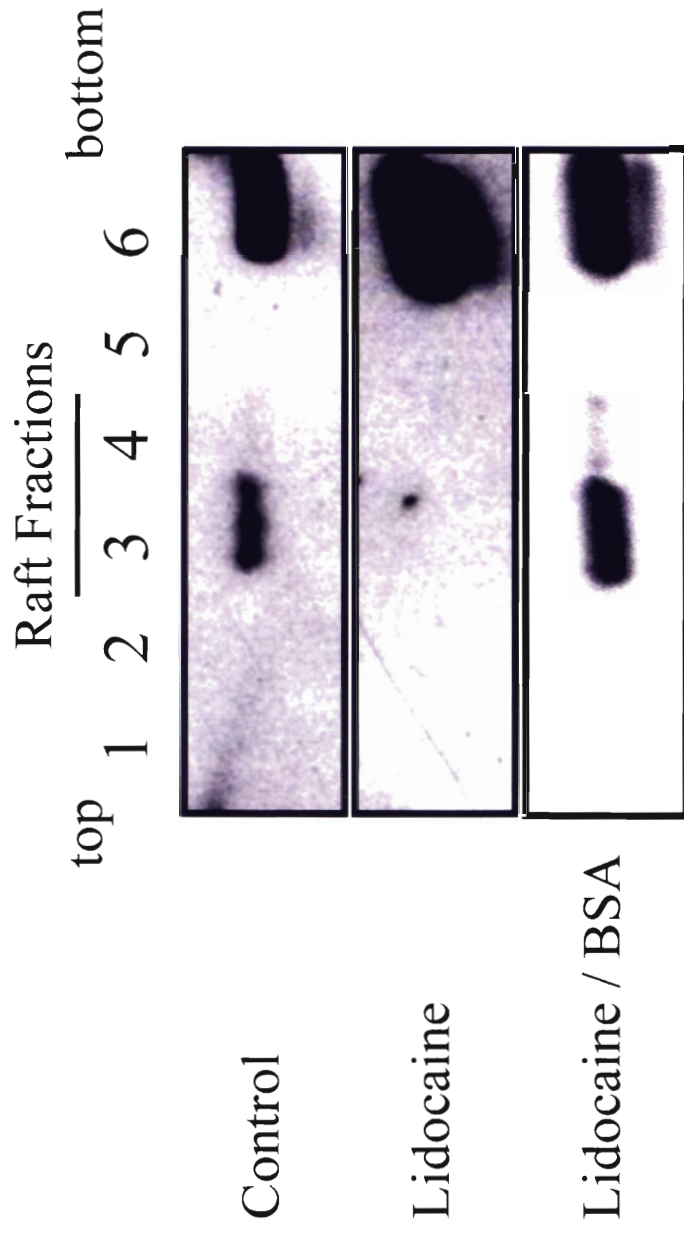
图 7

Anti-Flotillin Ab



8

Anti- G α Ab



Fraction Numbers 1-6

图 9

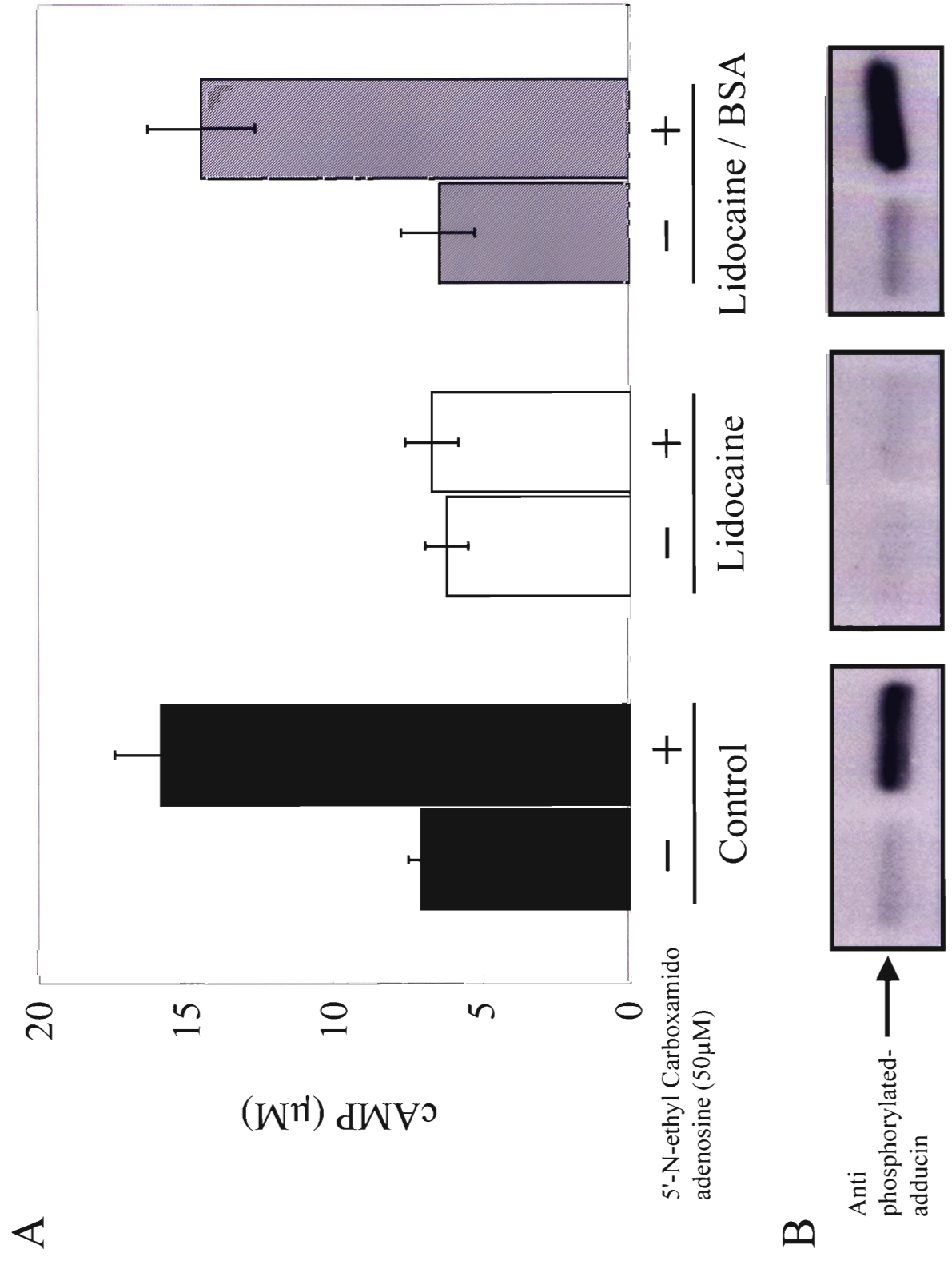


图 10

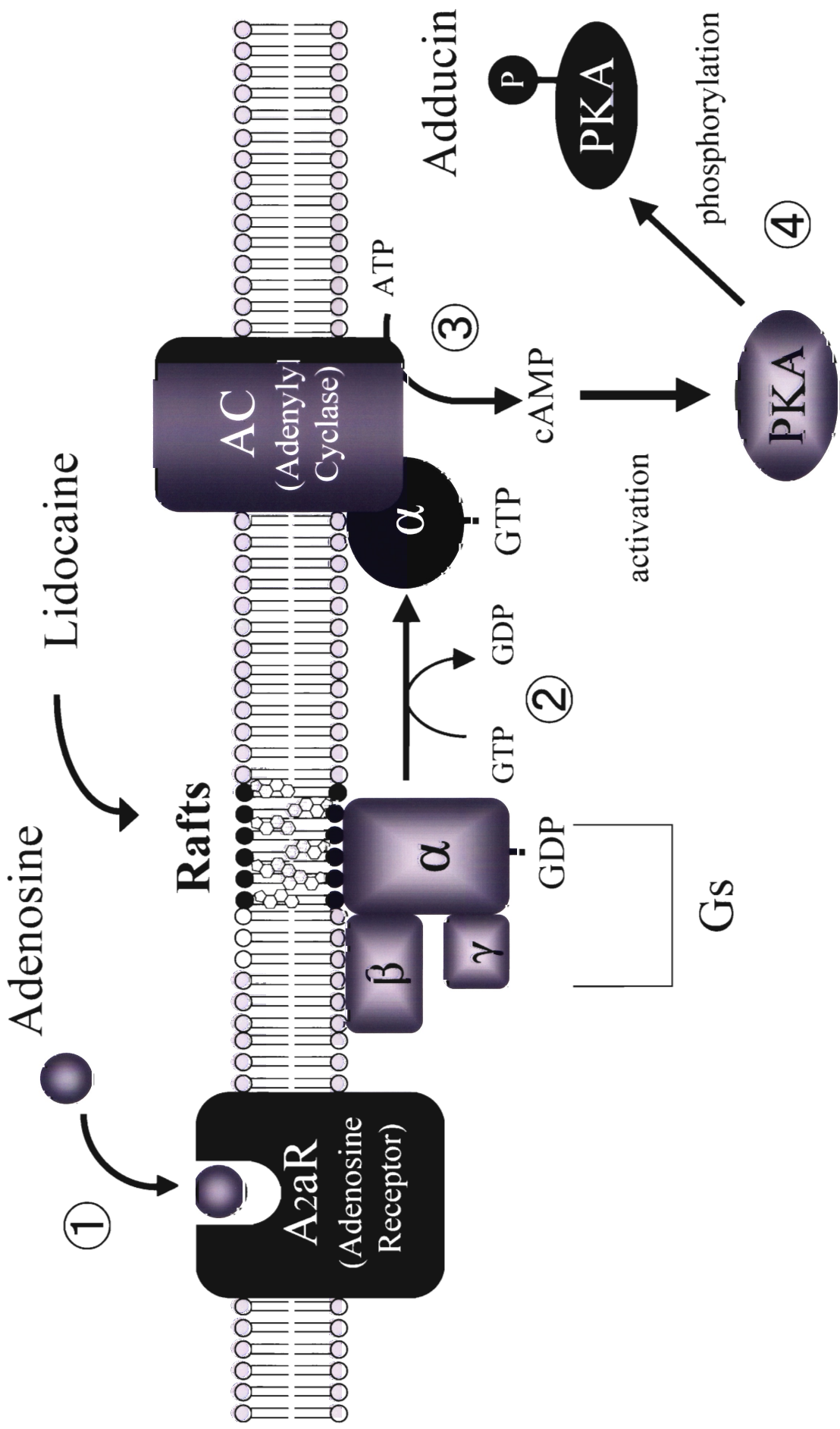


図 11

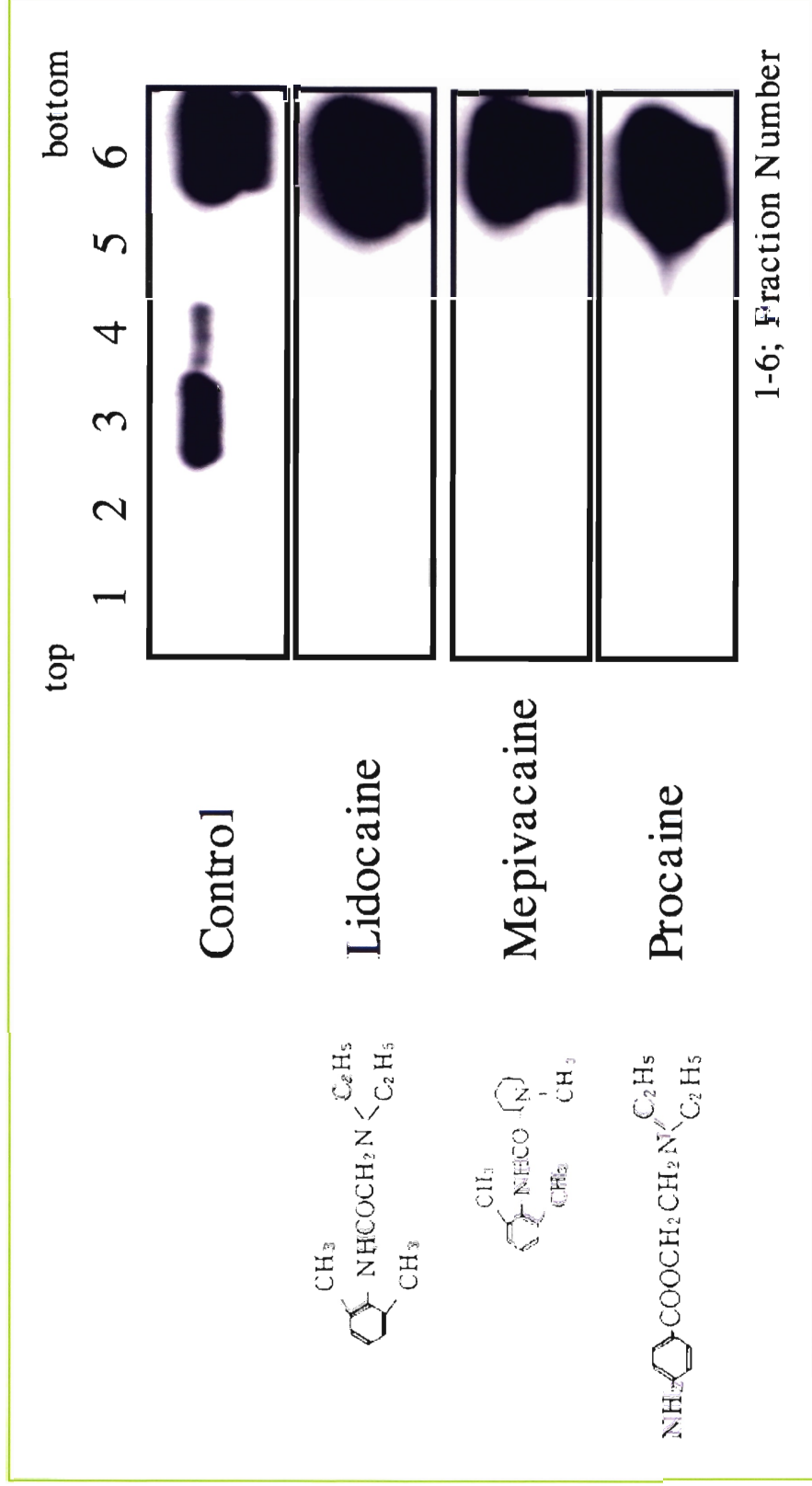


图 12

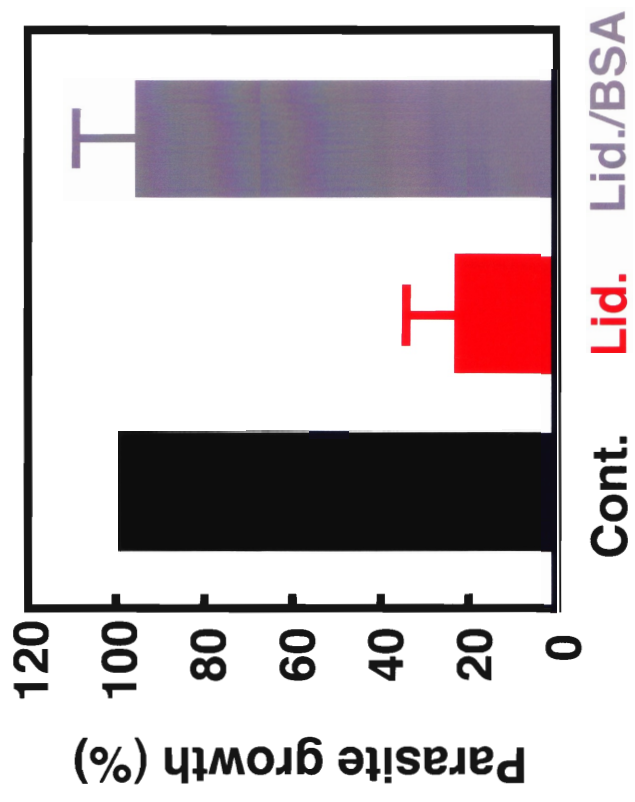
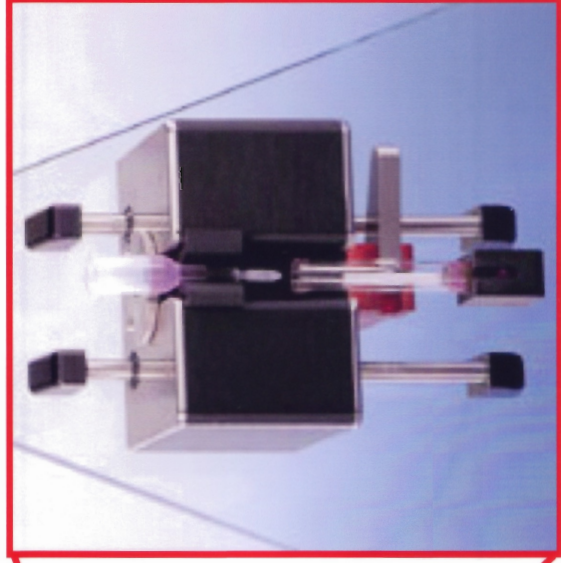
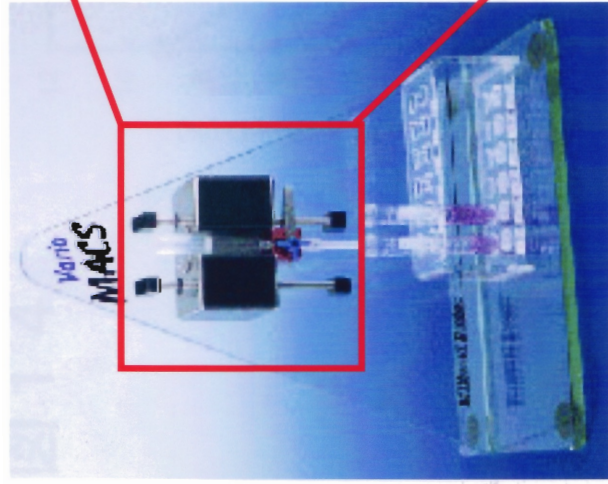


图 13



Schizont



hemozoin

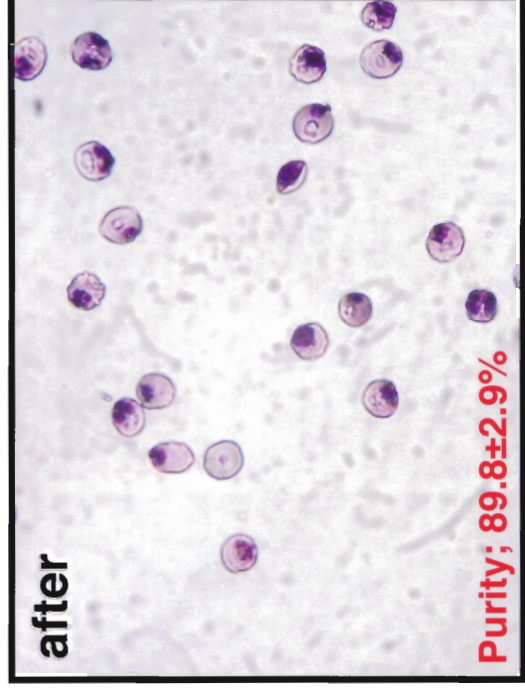
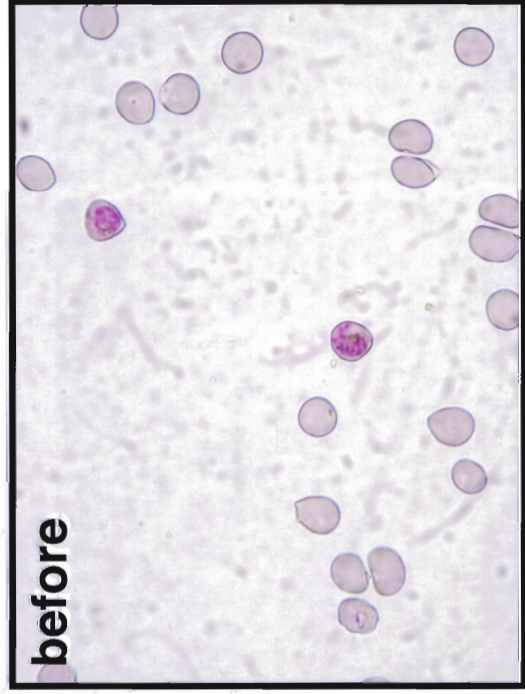
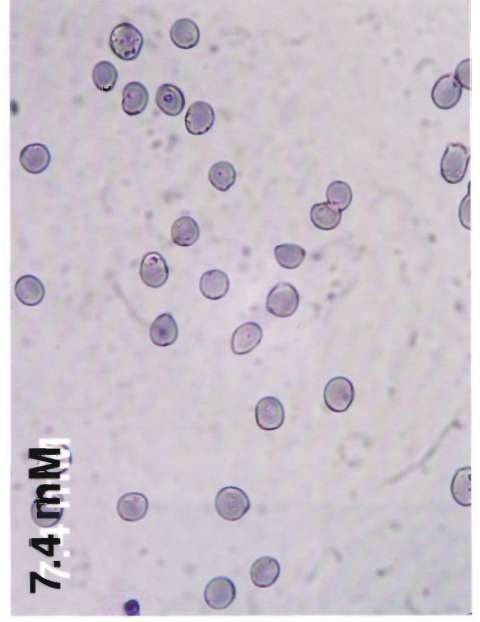
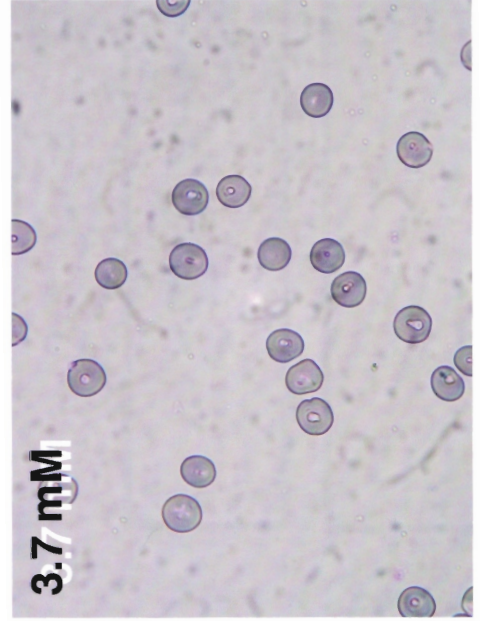
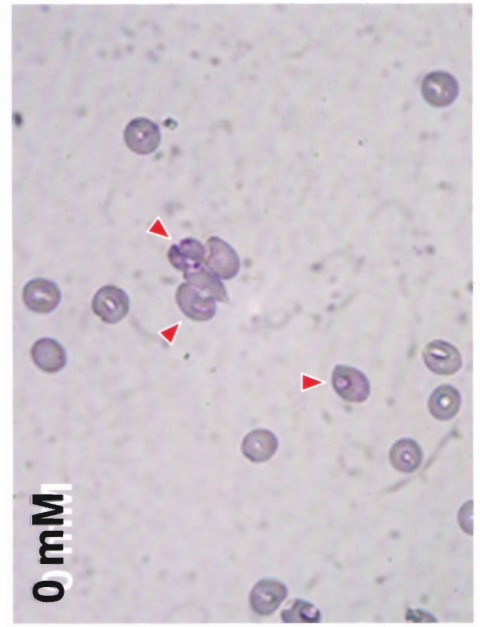
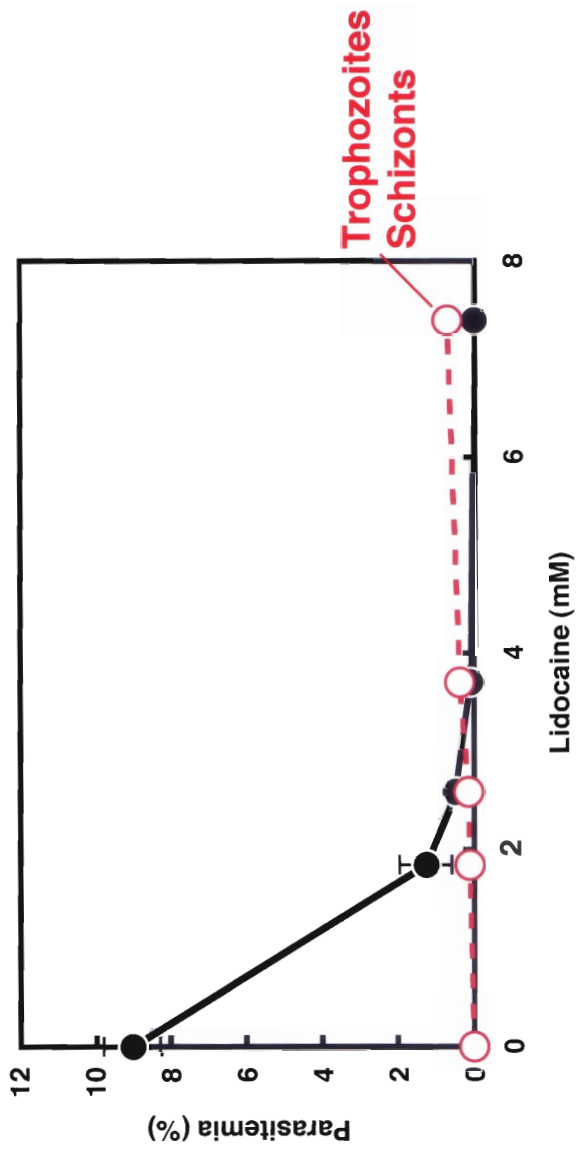
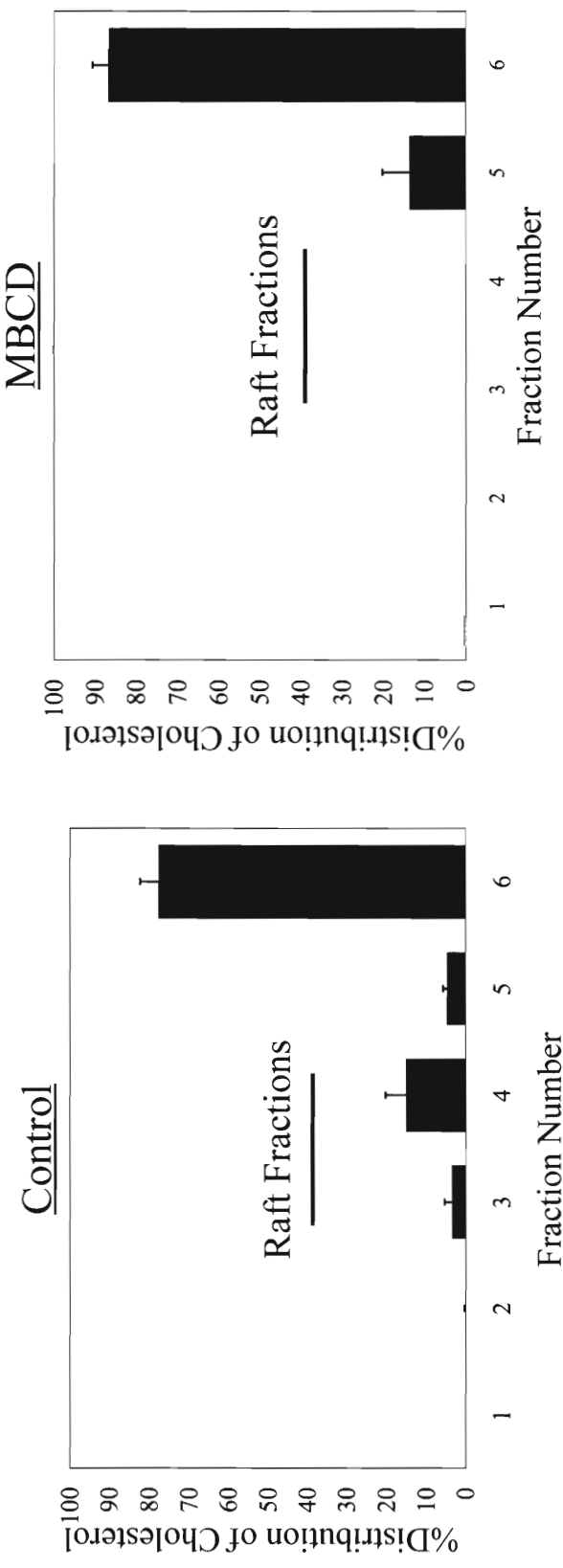


图 14



A



B

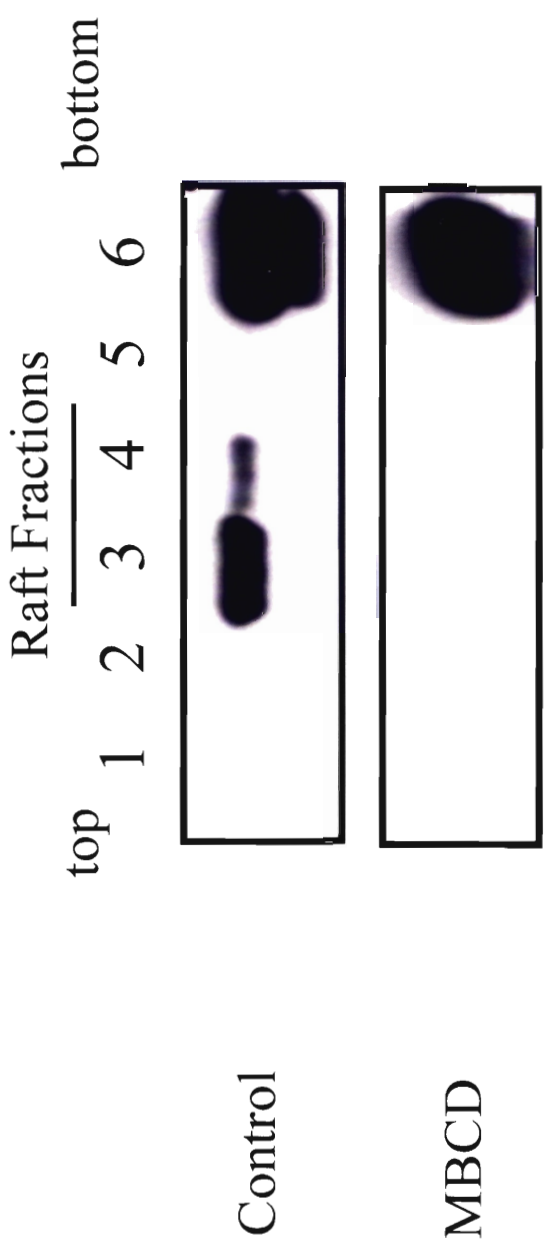
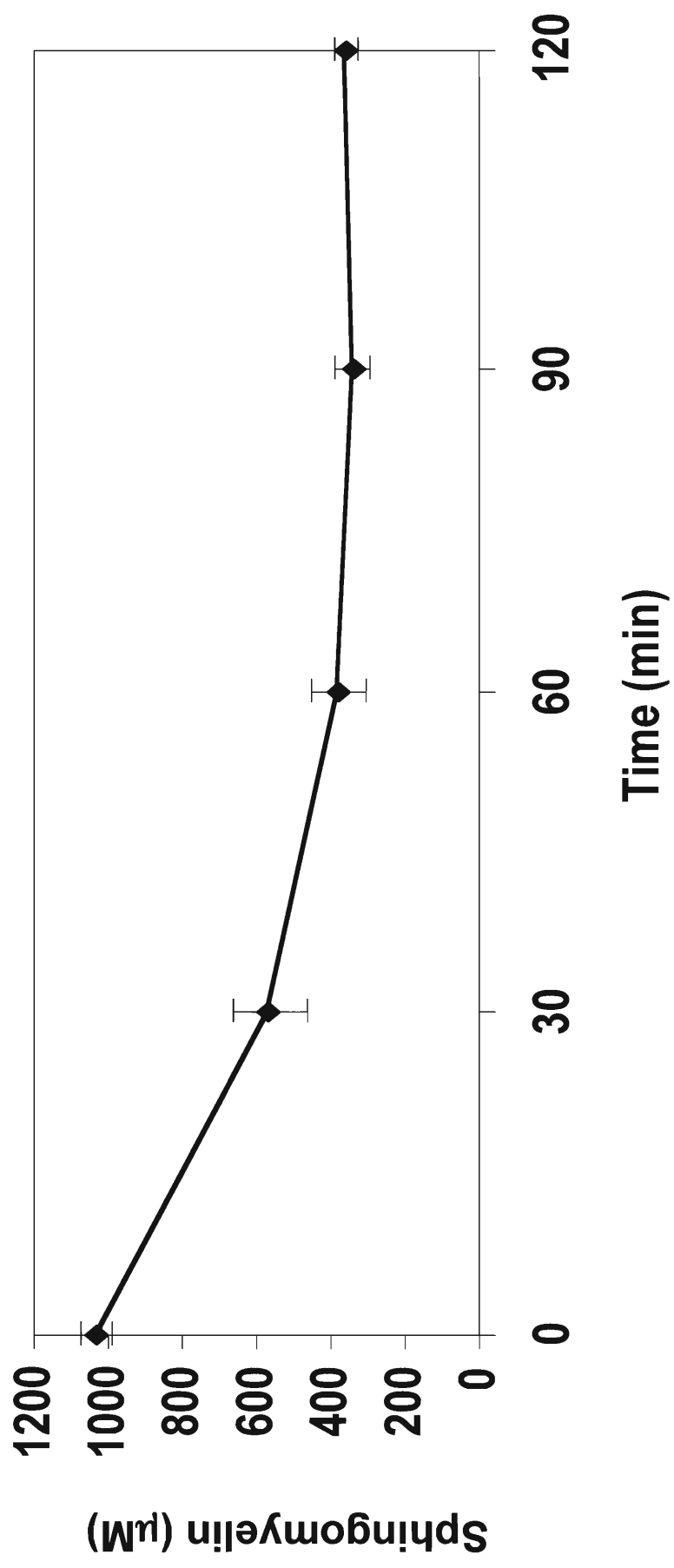


图 16



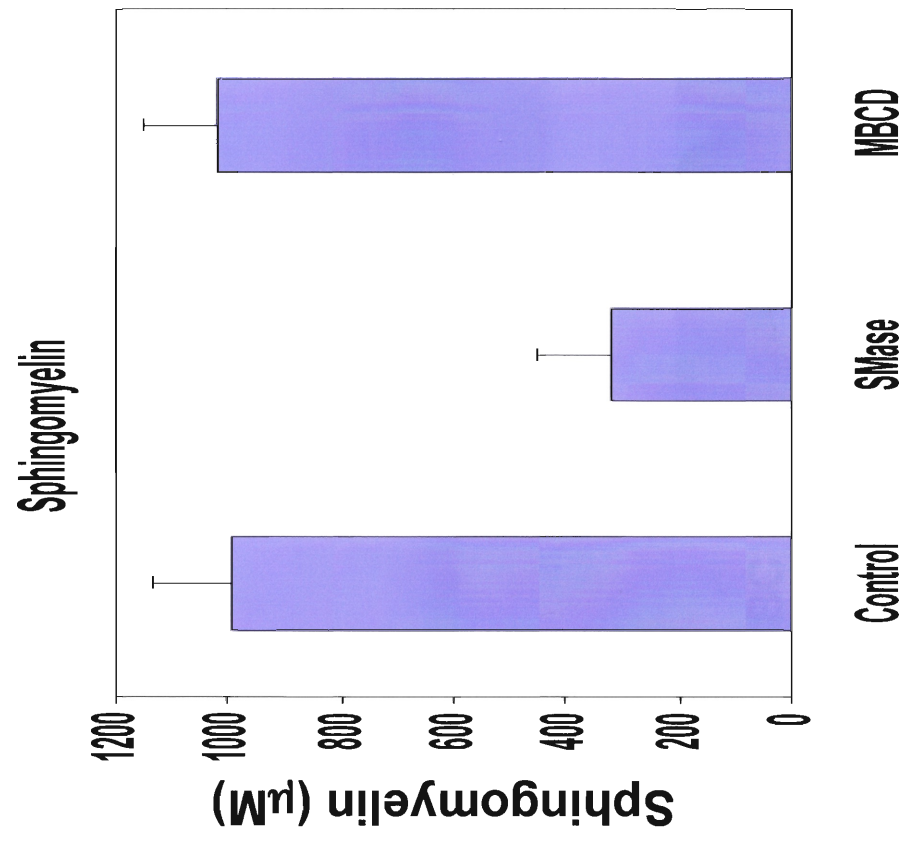
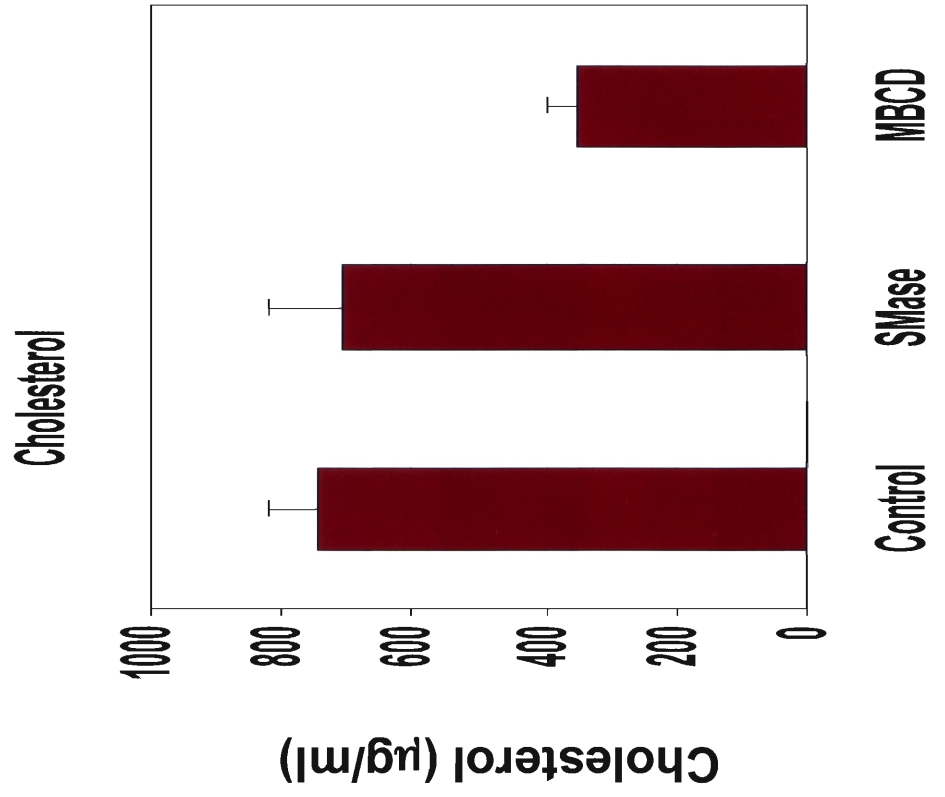


图 18

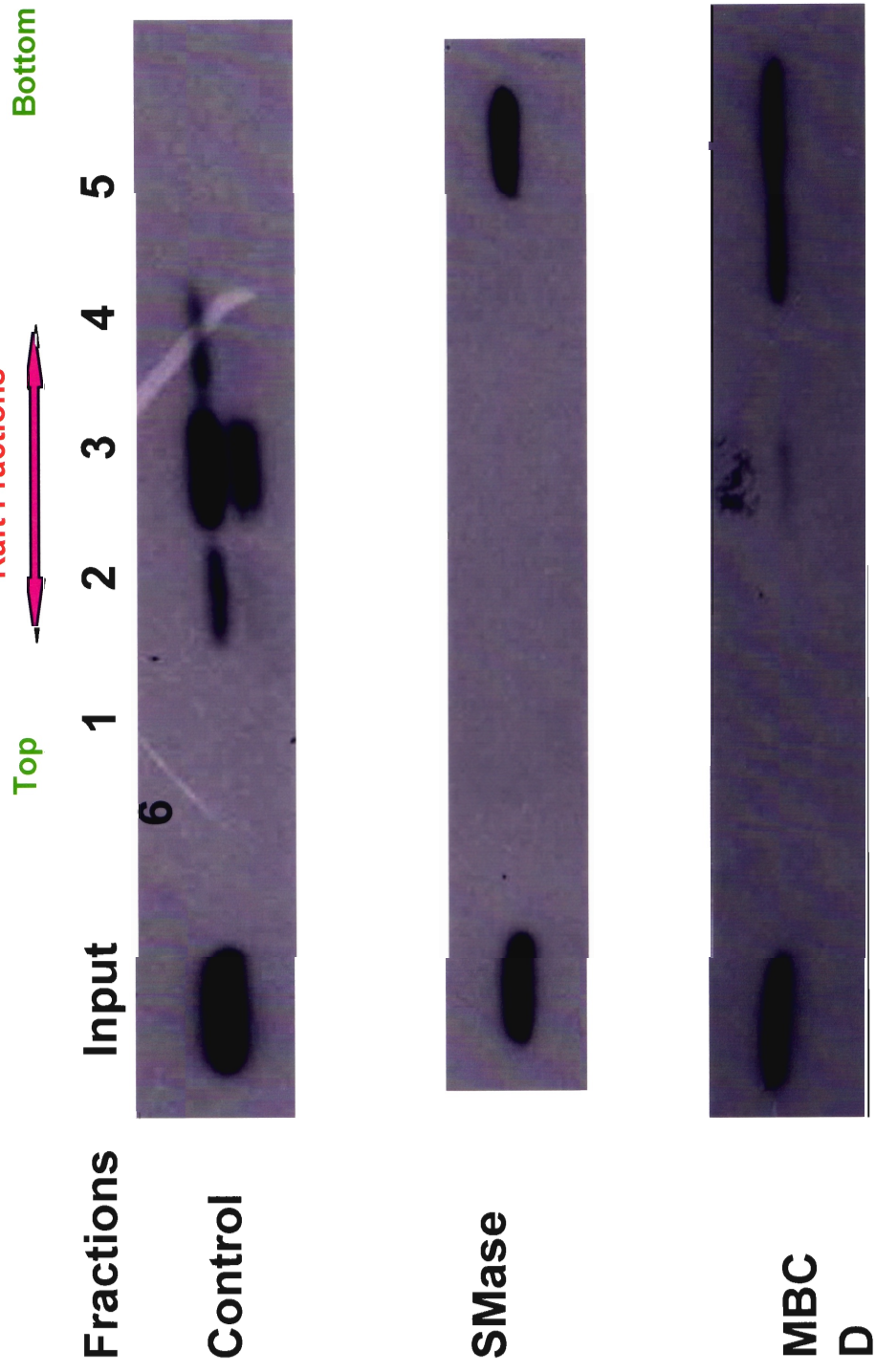
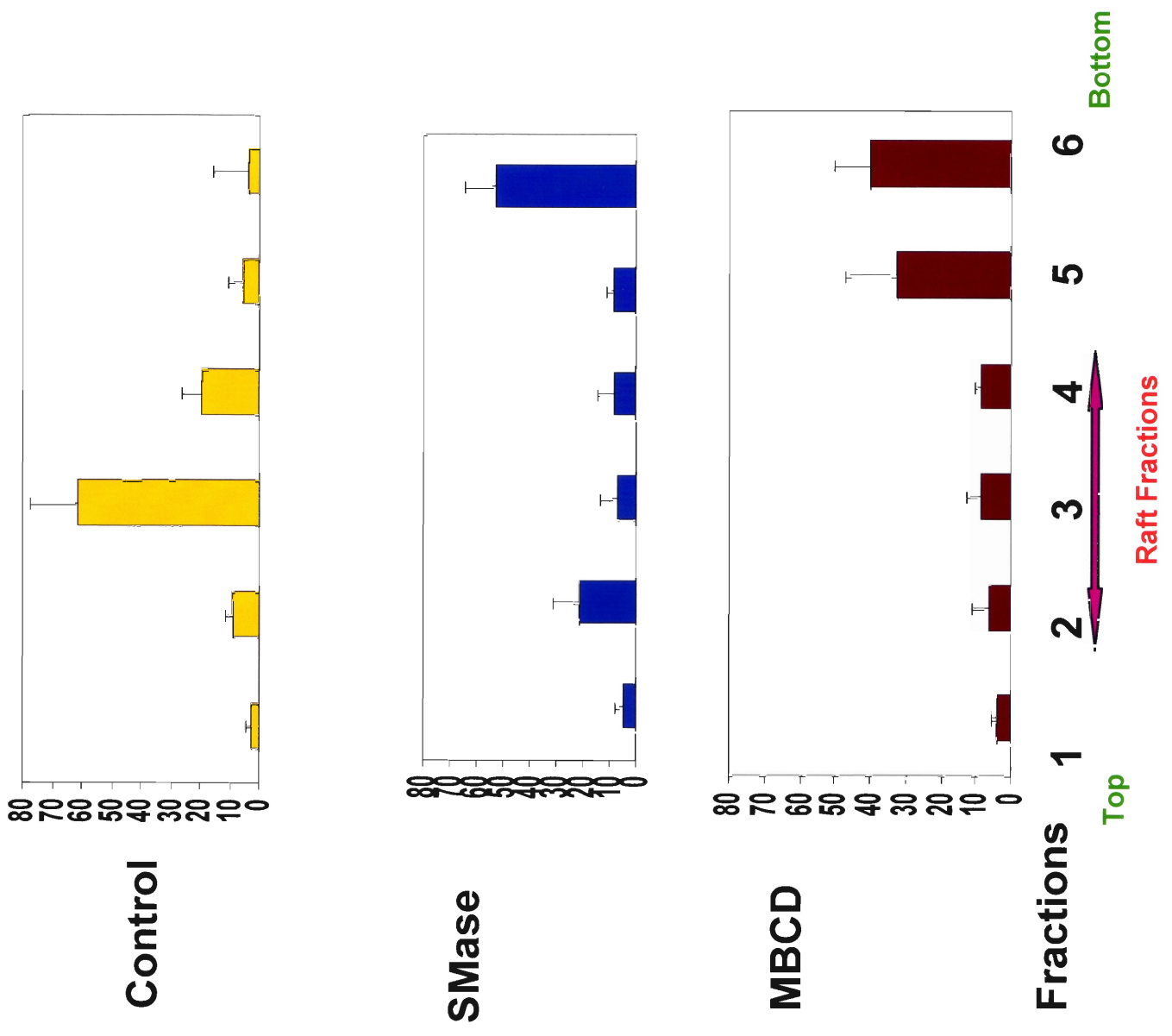


Figure 19

Sphingomyelin Distribution (%)



Cholesterol Distribution (%)

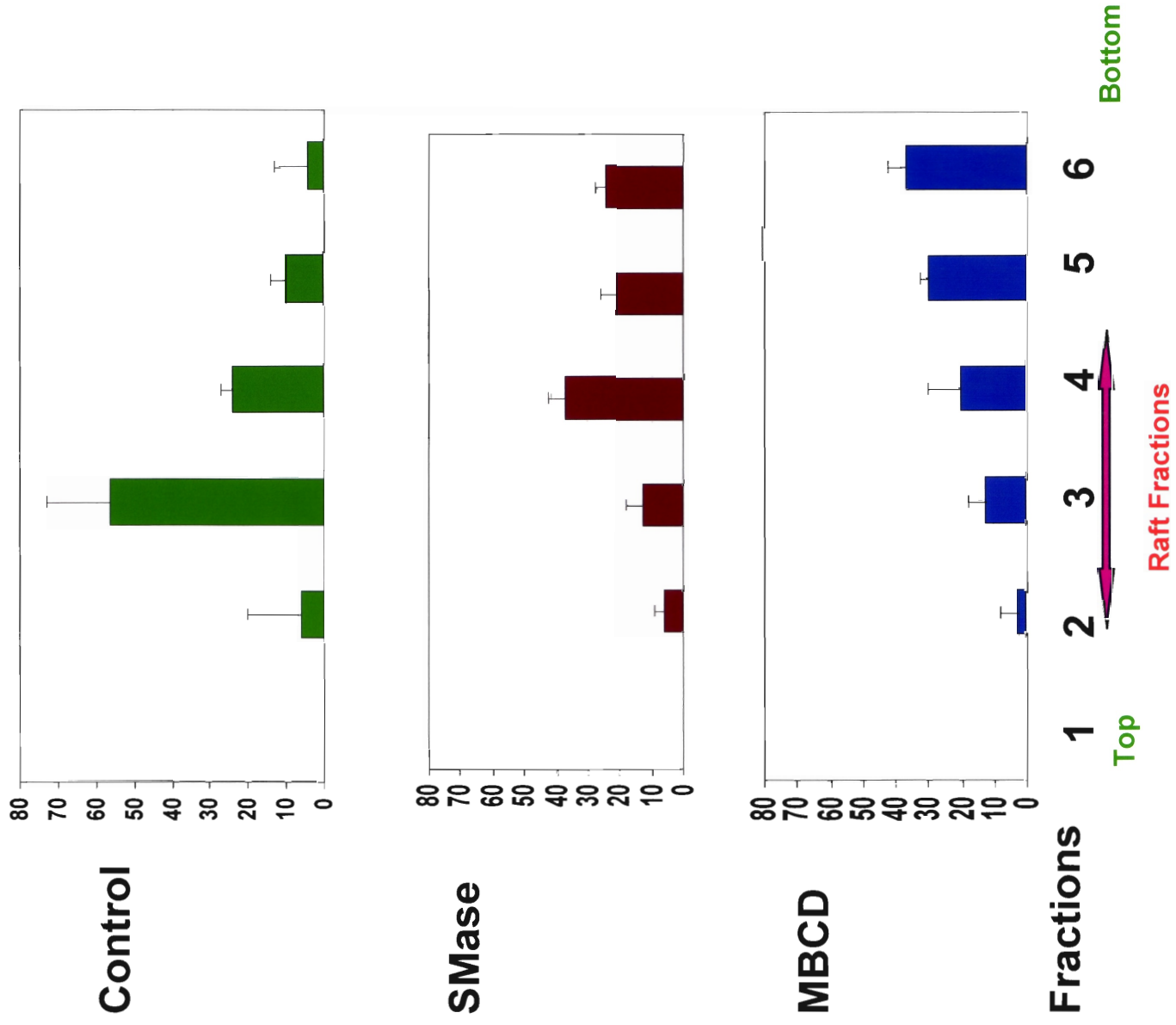


Figure 2 1

