

電子顕微鏡を用いた休眠期マラリア原虫のオルガネラ 3D 構造解析

所属：国立感染症研究所 寄生動物部 任期付研究員（助成時）

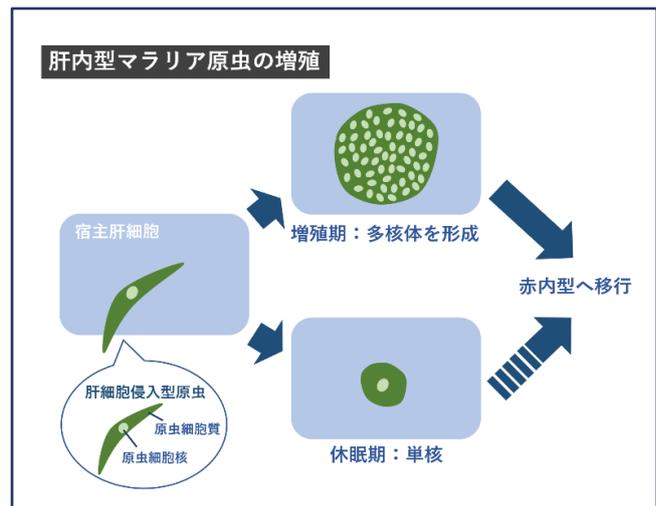
同上（現 在）

氏名：荒木 球沙

【研究背景・目的】

マラリア原虫は、世界三大感染症のひとつマラリアの病原体であり、非常に複雑な生活環・増殖制御機構を持つユニークな単細胞の真核生物である。この原虫のもつ複雑な生活環の中でも特にユニークな発育期として、宿主細胞内に最大複数年間も居座ることが出来る休眠期の存在があり、このステージにより原虫は時空間的に拡散・伝搬することが可能となるためマラリアの撲滅を困難にしている。本研究では、この休眠期原虫のメカニズムを明らかにするため、原虫の核を中心とした内部オルガネラの制御機構に着目し研究を展開する。

マラリア原虫のライフステージは、終宿主のハマダラカ体内で増殖するステージ（昆虫体内型）、ハマダラカの吸血時にヒトの肝臓細胞内に侵入し増殖するステージ（肝内型）、赤血球内へと移行し再度増殖を行うステージ（赤内型）の3ステージに分けられる。休眠期原虫は肝内型ステージにおいて出現し、核の分裂を行わず単核を維持したまま宿主細胞に最大数年間も居座り続ける事が出来ることが知られている。また一方で肝内型の増殖期は、核膜消失を伴わず核の分裂増殖を繰り返し、1細胞内に最大30000核を有する多核体を形成することが知られている（画像）。以上のように、肝内型マラリア原虫は非常にユニークな増殖制御メカニズムを持つと考えられるが、休眠期と増殖期における明確な違いは単核か複数核かの違いのみしか分かっておらず、それ以外のオルガネラに関しては全く明らかとなっていない。一般的に、細胞などが休眠状態になると核や細胞小器官は機能を停止し、代謝回転が低下することが知られている。マラリア原虫の増殖時において、ミトコンドリアやアピコプラスト（色素体）などのオルガネラは、一続きの伸長したネットワークを形成し、原虫分裂の最終段階で区分・分配（個々の原虫へとパッキング）されることが報告されており、劇的かつ巧妙なオルガネラ制御が必要となる。このような観点から肝内型を俯瞰すると、休眠と急増殖、その両極端な生命現象におけるオルガネラ制御は生物学的に大変興味深い。そこで本研究では、マラリア原虫の休眠期を増殖期との比較も含め解析し、そのオルガネラ制御機構を明らかにしたい。



以上のように、肝内型マラリア原虫は非常にユニークな増殖制御メカニズムを持つと考えられるが、休眠期と増殖期における明確な違いは単核か複数核かの違いのみしか分かっておらず、それ以外のオルガネラに関しては全く明らかとなっていない。一般的に、細胞などが休眠状態になると核や細胞小器官は機能を停止し、代謝回転が低下することが知られている。マラリア原虫の増殖時において、ミトコンドリアやアピコプラスト（色素体）などのオルガネラは、一続きの伸長したネットワークを形成し、原虫分裂の最終段階で区分・分配（個々の原虫へとパッキング）されることが報告されており、劇的かつ巧妙なオルガネラ制御が必要となる。このような観点から肝内型を俯瞰すると、休眠と急増殖、その両極端な生命現象におけるオルガネラ制御は生物学的に大変興味深い。そこで本研究では、マラリア原虫の休眠期を増殖期との比較も含め解析し、そのオルガネラ制御機構を明らかにしたい。

【実験方法】

肝内型（休眠期・増殖期）：作製方法

休眠期を有する原虫種が霊長類など限られた宿主にのみ感染し（研究で多く用いられているげっ歯類マラリア原虫は休眠期を持たない）、これら原虫はヒトへの感染性が非常に高いことから、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）。そこで申請者は、新たに立ち上げた霊長類マラリア原虫の感染実験系により、申請者らが既に作製に成功した緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現させた霊長類マラリア原虫：*Plasmodium cynomolgi* (Pcy-GFP) の肝細胞侵入型原虫を調整し、培養肝細胞への感染・培養を行い休眠期・増殖期原虫を作製する。また、各原虫は、蛍光顕微鏡を用いて観察を行う。蛍光顕微鏡により観察する原虫は、培養肝細胞をグリッド付きのディスクに播種しておくことで、電子顕微鏡解析に移行した際に、同一の休眠型原虫を解析することが可能となる（CLEM法：Correlative Light and Electron Microscopy）。

肝内型（休眠期・増殖期）：内部オルガネラ 3D 構造解析方法

マラリア原虫は、非常にサイズが小さいため、一般的な光学顕微鏡の観察では、内部オルガネラの構造を完全に把握することは非常に難しい。そこで申請者は、より分解能の高い電子顕微鏡を用いて3次元的なオルガネラの構造把握を試みた。使用する電子顕微鏡は、集束イオンビーム装置を内蔵した走査型顕微鏡：FIB-SEM (Focused Ion Beam-Scanning Electron Microscope) を用いた。FIB-SEM は、レーザーにより試料の表面を削り露出した断面を SEM により観察し、得られた多数の SEM 像から内部構造を再構築する分析手法である。具体的には、FIB-SEM を用いて、肝内型マラリア原虫の休眠期・増殖期の解析を行い、核の形状や増殖時に伸長が認められるミトコンドリアやアピコプラストを中心に多数オルガネラの3D構造解析を行った。今後、これらの実験結果をもとに肝内型の増殖期・休眠期の比較解析により、休眠・急増殖というその両極端な劇的かつ巧妙な生命現象におけるオルガネラ制御の解明を目指していきたい。

