

論文の内容の要旨

論文題目 赤血球期熱帯熱マラリア原虫の血清中脂肪酸に対する細胞応答機構
氏名 見市 文香

[序]

赤血球期熱帯熱マラリア原虫は、その細胞増殖を宿主の血清中因子に依存しており、その中の1つとして血清アルブミンに結合した脂肪酸が重要であることは古くから認識されていた。私の所属する研究グループでは、これまでの研究から、脱脂ウシ血清アルブミンに脂肪酸を再構築したものをを用いたマラリア原虫培養と、生化学的な解析により、原虫の増殖には限られた組み合わせの飽和脂肪酸および不飽和脂肪酸が必要であり、C16:0/C18:1の組み合わせが最も良いことを明らかにした。ところが血清中にはC16:0/C18:1以外にもmajorな脂肪酸が2種類(C18:0、C18:2)含まれており、その他多くのminorな脂肪酸が存在する。これらの脂肪酸は原虫に取り込まれることは報告されているが、各脂肪酸の原虫の増殖への効果や代謝については不明である。また宿主血清中の脂肪酸の組成は個体差が大きく、また食餌によっても変動するため、原虫の応答は、環境変化への適応という観点、また新規化学療法の標的分子の探索という観点から非常に興味深い。本研究において私は、赤血球期熱帯熱マラリア原虫の増殖がどの脂肪酸種に依存しているのか、また取り込まれた脂肪酸は原虫内でどのように代謝されているのか、について解析を行った。

[方法と結果]

赤血球期マラリア原虫の細胞増殖に必須な血清中脂肪酸の組み合わせの同定

血清中に存在する遊離脂肪酸含量をガスクロマトグラフィーにより解析した結果、その含量が全脂肪酸含量の 1% 以上である脂肪酸は 8 種類あり、その平均濃度は、(C14:0 [0.34 μM], C16:0 [9.19 μM], C16:1 [0.55 μM], C18:0 [4.04 μM], C18:1 [7.72 μM], C18:2 [3.70 μM], C18:3(n-3) [0.52 μM], C20:4 [0.81 μM]) であった。

最初に major な脂肪酸 (C16:0、C18:0、C18:1、C18:2) について、4 種類、もしくはその中の 3 種類の全ての組み合わせに対する増殖実験を行ったところ、192 時間後まで全て細胞増殖を支持した。さらに minor な脂肪酸の増殖効果を定量的に比較するために、上記 8 種類の脂肪酸中の 3 種類の組み合わせ(それぞれ 30 μM)を網羅的に解析した。結果を、96 時間後(原虫

| 96HR | | | | | | | | | | 192HR | | | | | | | | | |
|------------|------------|--------------|--------------|-------------|-------|-------------|-------------|--------------|-------------|------------|------------|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------|--|
| | | C14:0 | C16:0 | C18:0 | C16:1 | C18:1 | C18:2 | C18:3(n-3) | C20:4 | | C14:0 | C16:0 | C18:0 | C16:1 | C18:1 | C18:2 | C18:3(n-3) | C20:4 | |
| C14:0 | C16:0 | | | | n.s. | 5.10 | n.s. | n.s. | n.s. | C14:0 | C16:0 | | n.s. | 5.39 | n.s. | n.s. | n.s. | | |
| C14:0 | C18:0 | | | | n.s. | 5.14 | 4.88 | 3.58 | 1.57 | C14:0 | C18:0 | | n.s. | 4.04 | 4.46 | 2.14 | 0.690 | | |
| C16:0 | C18:0 | | | | n.s. | 5.11 | 4.93 | 0.898 | n.s. | C16:0 | C18:0 | | n.s. | 3.73 | 5.11 | n.s. | n.s. | | |
| C16:1 | C18:1 | n.s. | 4.73 | 4.69 | | | | | | C16:1 | C18:1 | n.s. | 5.45 | 3.83 | | | | | |
| C16:1 | C18:2 | n.s. | 0.867 | 4.67 | | | | | | C16:1 | C18:2 | n.s. | n.s. | 3.18 | | | | | |
| C16:1 | C18:3(n-3) | n.s. | n.s. | 2.03 | | | | | | C16:1 | C18:3(n-3) | n.s. | n.s. | 1.32 | | | | | |
| C16:1 | C20:4 | n.s. | n.s. | 3.63 | | | | | | C16:1 | C20:4 | n.s. | n.s. | 2.29 | | | | | |
| C18:1 | C18:2 | 0.677 | 3.85 | 5.22 | | | | | | C18:1 | C18:2 | n.s. | 3.41 | 4.23 | | | | | |
| C18:1 | C18:3(n-3) | 0.810 | 3.86 | 5.22 | | | | | | C18:1 | C18:3(n-3) | n.s. | 4.30 | 5.05 | | | | | |
| C18:1 | C20:4 | n.s. | 0.424 | 5.00 | | | | | | C18:1 | C20:4 | n.s. | n.s. | 1.94 | | | | | |
| C18:2 | C18:3(n-3) | n.s. | n.s. | 4.93 | | | | | | C18:2 | C18:3(n-3) | n.s. | n.s. | 4.46 | | | | | |
| C18:2 | C20:4 | n.s. | n.s. | 3.22 | | | | | | C18:2 | C20:4 | n.s. | n.s. | 1.31 | | | | | |
| C18:3(n-3) | C20:4 | n.s. | n.s. | 0.70 | | | | | | C18:3(n-3) | C20:4 | n.s. | n.s. | n.s. | | | | | |

n.s. not significant

表1 血清中脂肪酸の組み合わせによる熱帯熱マラリア原虫の細胞増殖率への影響

の生活環は 48 時間であるため 2 周期目)と 192 時間後 (4 周期目) の感染率を測定、増殖率として表 1 にまとめた。原虫の増殖は炭素鎖数の差 (C14:0vs C16:0vsC18:0 など)、飽和度の差 (C18:0vs C18:1vs C18:2 など)で大きく影響を受けた。また 96 時間後に比べ 192 時間後の増殖率は全体的に低下し、192 時間後まで増殖効果を示した組み合わせは 15 種類であった (表中白または灰色)。これらの組み合わせは、その性質から 2 通りに分けることができ、C16:0/C18:1 の組み合わせを含む (5 種類。表中下線)、もしくは C18:0 を含む (10 種類。表中斜体) ことが、赤血球期熱帯熱マラリア原虫の細胞増殖を支持するために必要であることが明らかになった。

| Medium | Growth rate | |
|---------------------------------|-------------|---------------|
| Human Serum | 11.2 | ± 1.91 |
| Albumax | 7.73 | ± 0.88 |
| C16:0/ C18:1 | 6.39 | ± 0.39 |
| C16:0/ C18:1/ C14:0 | 5.96 | ± 0.57 |
| C16:0/ C18:1/ C16:1 | 6.04 | ± 0.88 |
| C16:0/ C18:1/ C18:2 | 4.27 | ± 0.57 |
| C16:0/ C18:1/ C18:3(n-3) | 5.03 | ± 1.06 |
| C16:0/ C18:0/ C18:2 | 5.10 | ± 0.38 |
| C14:0/ C18:0/ C18:2 | 4.50 | ± 0.15 |
| C14:0/ C18:0/ C18:1 | 3.49 | ± 1.01 |
| C18:0/ C18:1/ C18:2 | 3.45 | ± 0.74 |

表2 各培養条件下での増殖率

3種類の脂肪酸再構成培地での継代培養

上記 15 種類についてさらに 7 継代 (672 時間) 培養を続けた。結果 7 継代以上の培養が可能な脂肪酸の組み合わせは、[C16:0/C18:0/C18:2] [C14:0/C18:0/C18:2] [C14:0/C18:0/C18:1] [C18:0/C18:1/C18:2] [C16:0/C18:1/C14:0] [C16:0/C18:1/C16:1] [C16:0/C18:1/C18:2] [C16:0/C18:1/C18:3(n-3)]の 8 種類あった。これらの増殖率を表 2 に示す。C16:0/C18:1 は、2 種類の脂肪酸の組み合わせのうち唯一 7 継代目までの増殖を支持する組み合わせであることから、他の脂肪酸(C14:0、C16:1、C18:2、C18:3(n-3))の添加は C16:0/C18:1 による原虫の増殖効果に大きな影響を与えないと考えられる。

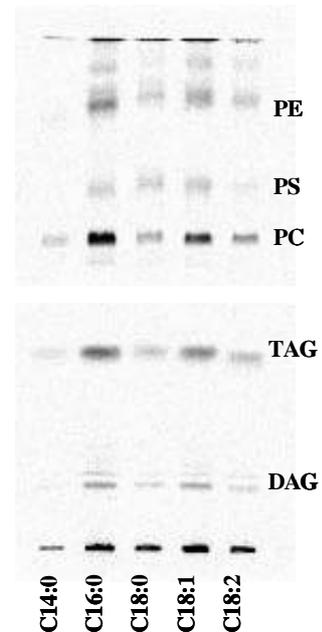
一方 C18:0 を含む組み合わせは 4 種類あるが、これらの組み合わせから 1 つの脂肪酸を除いた 2 種類の脂肪酸の組み合わせ(例えば C14:0/C18:0/C18:2 の場合、C14:0/C18:0、C18:0/C18:2、C14:0/C18:2) は増殖を支持しないことから、C18:0 を含むことと同時に脂肪酸の組み合わせが重要であると考えられる。

血清を用いた培養条件下での原虫内の各脂肪酸の代謝

脂肪酸は原虫内に取り込まれ、リン脂質や中性脂質を構成する。取り込まれた各脂肪酸の原虫内での代謝産物を明らかにするため、放射ラベルした脂肪酸(C14:0、C16:0、C18:0、C18:1、C18:2)を用い、放射比活性をそろえて *in vitro* 原虫培養系における代謝ラベル実験を行った。結果を図 1 に示す。5 種類の脂肪酸は、全て原虫内に取り込まれていた。また、代謝産物のパターンは脂肪酸種の違いによる大きな差は見られなかった。唯一例外として C18:0 が他の脂質種と比較して、ホスファチジルセリンもしくはホスファチジリノシトールに多く取り込まれていた。

3種類の脂肪酸再構成培地条件下での原虫内の各脂肪酸の代謝

3 種類の脂肪酸再構成培地における脂肪酸の代謝を知る目的で、同様の実験を行った。上記の継代培養が可能な組み合わせで培養した原虫に放射ラベルした 3 種類の脂肪酸を、放射比活性をそろえて加え代謝産物の解析を行った。結果、血清条件下と同様に代謝産物のパターンは脂肪酸種の違いによる大きな差は見られなかったが、ホスファチジルセリンもしくはホスファチジリノシトールへの C18:0 の蓄積が、他に比べて顕著であった。



PE: Phosphatidylethanolamine
PS: Phosphatidylserine
PC: Phosphatidylcholine
TAG: Triacylglycerol
FFA: Free fatty acid
DAG: Diacylglycerol

図 1 血清を用いた培養条件下での原虫内の各脂肪酸の代謝

ガスクロマトグラフィーを用いた赤血球期熱帯熱マラリア原虫の脂肪酸組成の解析

赤血球期熱帯熱マラリア原虫の全脂質中の脂肪酸組成を解析する目的で、血清培地および再構築培地 [C16:0/C18:0/C18:2] [C14:0/C18:0/C18:2] で培養した原虫感染赤血球(図中黒線)から抽出した全脂質中に存在する脂肪酸種を、ガスクロマトグラフィーにより解析、非感染赤血球(図中細線)の結果と比較した。図 2 に示すように、血清で培養した原虫は、血清中に含まれる遊離脂肪酸の組成と近い組成であった。また、再構築培地の [C16:0/C18:0/C18:2] [C14:0/C18:0/C18:2] を用いた場合も同様に、主に培地中に含まれる 3 種類の脂肪酸で構成(90%以上)されていた。それ以外には [C16:0/C18:0/C18:2] で培養した原虫には C18:1 が、[C14:0/C18:0/C18:2] で培養した原虫では C18:1 および C16:0 が検出された。

[考察]

本研究から、赤血球期熱帯熱マラリア原虫の血清中脂肪酸の取り込み、および取り込まれた脂肪酸の代謝、脂肪酸の種類に対する選択性は低いことを明らかにした(図 2)。そのため、原虫の脂肪酸組成は、培地の脂肪酸組成に大きく依存しほぼ等しくなることがみられた。

しかしながら、原虫細胞の増殖は脂肪酸の鎖長や飽和度に大きく依存した(C16:0/C18:1 の対または C18:0 が必要。表 1,2)。

さらに、ガスクロマトグラフィーを用いた解析により、原虫の脂肪酸代謝において重要と考えら

れる 2 つの酵素の存在が示唆された。すなわち C18:0 から C18:1 を生成する desaturase、および C14:0 から C16:0 を生成する脂肪酸伸長酵素(elongation system)である(図 2B,C)。desaturase および elongase がマラリア原虫においては機能していないという過去の報告とは異なるが、発現が示唆された条件が、脂肪酸の種類が制限された条件であることを考えると、これらの酵素が、原虫の環境適応にかかわる可能性がある。

今後は、赤血球期熱帯熱マラリア原虫の生存の鍵となる脂肪酸種について、原虫の細胞増殖に関わる分子機構を、原虫細胞の宿主環境変化への適応という点から迫りたい。

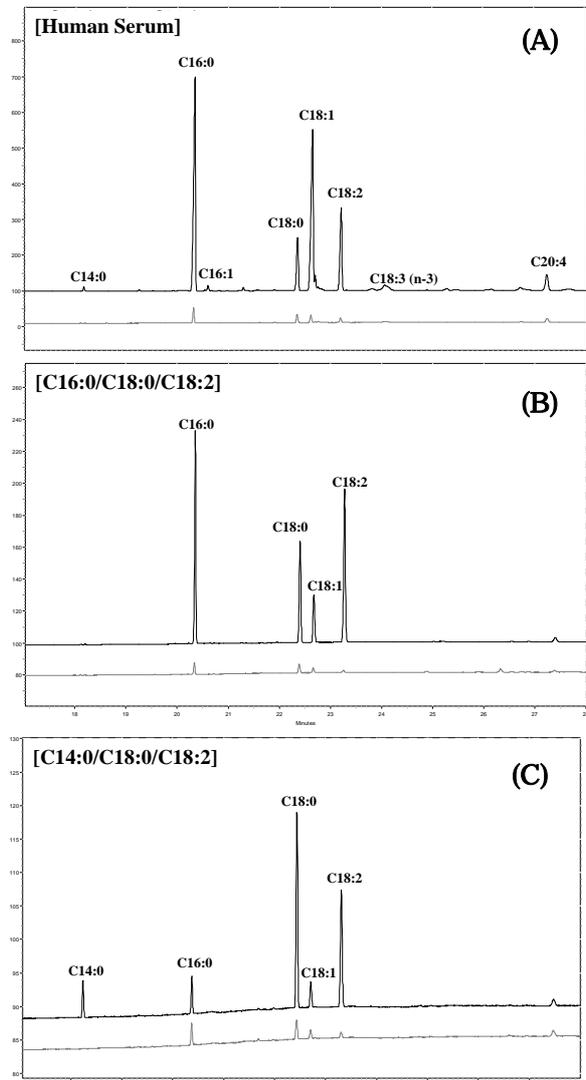


図2 培養条件と原虫の脂肪酸組成