

令和元年6月20日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05837

研究課題名(和文) マラリア原虫エノラーゼにおいてヒトプラスミノゲンを活性化する部分配列の合成的研究

研究課題名(英文) Plasminogen-binding and -activation sequences in Plasmodium falciparum enolase.

研究代表者

奥 浩之 (Oku, Hiroyuki)

群馬大学・大学院理工学府・准教授

研究者番号：20301749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年進展した肺炎球菌の感染機構の研究に関連して、マラリア原虫がヒトの赤血球内へ侵入する際に、原虫表面に発現した酵素“エノラーゼ”がヒト血中の線溶系タンパク質“プラスミノゲン”へ結合・活性化して、“プラスミン活性(加水分解反応性)”を発現させることで、赤血球へ原虫の侵入が促進されると考えられるようになってきた。しかし具体的な分子メカニズムは不明であり、本研究では原虫エノラーゼのループ構造から設計・合成したペプチドを用いて、「ヒトプラスミノゲンへの結合性」と「プラスミン活性の発現」について評価を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究は表面的にはマラリア対策やマラリアワクチンの開発に関する学術的な研究であるが、化学産業の将来を考えた社会的にも意義のある研究である。例えば我が国のものづくり製造業が付加価値の高い次世代産業へ発展するにはどうしたらいいかと考えて、研究を進めている。すなわち、“医療・保健分野を通じた高付加価値なものづくりイノベーション”として、臨床や製造業の現場におけるニーズと化学的なシーズを結びつける点で社会的なインパクトのある研究である。

研究成果の概要(英文)：Recently, the interaction of Plasmodium falciparum with human plasminogen (hPlg) represents a mechanism to invade host-cells, such as human erythrocytes and mosquito midgut, by capturing surface-associated proteolytic activity in the infected host. hPlg binds to surface displayed P.f. enolase (PfEno) and is subsequently activated to the serine protease plasmin (hPln) by host-derived tissue hPlg activator or urokinase. In this study, we analyzed a Plg-activation mechanism of PfEno by using synthetic peptide libraries.

研究分野：生態関連化学

キーワード：マラリア原虫 ペプチド 高分子材料 マラリアワクチン エノラーゼ プラスミノゲン

1. 研究開始当初の背景

マラリアワクチンの必要性和ワクチン開発の問題

(1-1) 研究開始当初のニーズと問題点

マラリアは地球規模の対策が進んだ現在でも世界最大の感染症であり、年間 1.98 億人の罹患者と 58.4 万人の死亡者数が推定されている。アーテミスニン治療薬 (2015 年ノーベル賞) にも薬剤耐性が問題となっており、流行を制御する方法としてワクチン開発が強く求められている。

ワクチン開発は 1980 年代から始まったが、未だに市販された例はない。開発が難しい理由は、マラリア原虫はヒトの防御免疫を回避する寄生適応メカニズムが発達しているためである。現在、約 20 種類のワクチン候補について世界中で臨床開発が進められている。我が国では大阪大学の堀井らによる SE36/AHG ワクチンがよく知られている。

多くのワクチン候補のうち、唯一、第 3 相臨床試験まで進んだのは、GlaxoSmithKline 社の RTS,S/AS01 (Mosquirix™) ワクチンである。しかし、乳幼児に対して 30% 程度の有効率しか得られないことや抗体価の持続が 1 年と短いことから、新しいワクチン開発が必要となっている。

(1-2) 本研究者らの成果 (本研究の必要性)

我々が開発を進めている AD22 ペプチドワクチンは、マラリアに対して一定の免疫力を持っている患者血清と強く反応する抗原蛋白 (エノラーゼ) を疫学調査で見いだしたこと (鈴木・狩野, 1990 年) にはじまる、申請者らの独創的な研究である。これまでに、サルやマウスによるワクチン試験などにより、ワクチンとしての有用性を示してきた。例えば非臨床試験を行った。



本研究では AD22 ワクチンのユニークな作用機序を明らかにすること (-->他のワクチン候補との差別化) を目的として、原虫エノラーゼによるヒト線溶系活性化と宿主細胞への侵入促進機構 (下図) について合成的な視点から研究を実施した。



2. 研究の目的

マラリアは世界最大の感染症でありワクチン開発が強く求められている。我々は熱帯熱マラリア原虫エノラーゼの部分配列から設計・合成した AD22 ペプチドワクチンの開発を進めてきた。本研究では、本ワクチンのユニークな作用機序の解明を目的として、近年注目が集まっている病原体由来エノラーゼによるヒト線溶系活性化と宿主細胞への侵入促進機構を、赤血球期のマラリア原虫において検証すべく、合成的な視点から研究を実施する。

(i) エノラーゼは解糖系における 9 番目の酵素であり、細胞内でのエネルギー産生を担っている。一方、肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) などの病原微生物では、細胞表面においてヒト線溶系を活性化することで宿主細胞への感染を促進していることが注目されている。

(ii) マラリア感染においては、媒介蚊の体内でのオーキネートという原虫形態において、細胞表面エノラーゼによる、蚊の中腸細胞へ侵入促進が報告されている (Jacobs-Lorena ら, 2011 年)。

(iii) 我々の研究においても、ヒト血中でのメロゾイトという原虫形態において細胞表面のエノラーゼが観察されることを、早くから見出していた鈴木・狩野ら, 1995 年)。しかし当時は赤血球への感染メカニズムについて理解できなかった。

--> 本研究では、赤血球期のマラリア原虫におけるエノラーゼの役割を、合成ペプチドと高分子微粒子上に

よってモデル化することで、従来と全く異なった方法により明らかにしてゆく。

### 3. 研究の方法

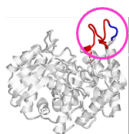
- (a, プラスミノゲン結合ペプチド)  
原虫エノラーゼ配列から様々な部分ペプチド配列を設計・合成。  
それぞれの部分ペプチドについて、プラスミノゲン結合を確認。
- (b, プラスミン活性)  
部分ペプチド + プラスミノゲン + 活性化因子(tPA)による複合体形成。  
それぞれの複合体について、プラスミン活性の強弱を、S-2251 基質の加水分解で確認。
- (c, 原虫モデル微粒子)  
部分ペプチドを表面修飾した高分子微粒子を作成。  
これを原虫モデル微粒子として、ヒト赤血球への接着を観察。

### 4. 研究成果

最近の研究により、肺炎連鎖球菌エノラーゼの内部モチーフと類似した配列を持つ熱帯熱マラリア原虫においても、ヒト血中の plg から得られるプラスミン活性を用いて細胞への侵入を促進していると考えられている。

本研究代表者らの研究グループは、熱帯熱マラリア原虫のエノラーゼが、熱帯熱マラリアに対して一定の免疫力を持っている患者血清と強く反応することを疫学調査で見出されたことに基づいて、ワクチン抗原としての可能性を検証してきた。様々な抗原部位のうち熱帯熱マラリア患者の血清と高い反応性を示す配列 AD22 をワクチン候補抗原として非臨床研究を行ってきた。

本研究では、ワクチン候補抗原配列 AD22 を含む 35 残基配列である Pf-Enolase のループ配列を基にした合成ペプチドを用いて、ループ配列中でヒト血中 plg との結合に重要な配列の探索、及び、合成ペプチドによるプラスミン活性促進効果を調べた。



VV35 = VAASE-FYNSE-NKTYD-LDFKT-PNNDK-SLVKT-GAQLV

- ライブラリー1: VV35を5残基ずつ重ね合わせた配列+プレート結合のためのC末端Lys残基
- ライブラリー2: Seq3をN末端側から1残基ずつ短縮+プレート結合のためのC末端Lys残基
- ライブラリー3: Seq8のLys残基を一部または全部Ala残基に置換

#### ライブラリー1

Seq1-10aK VAASE-FYNSE-K  
Seq2-10aK FYNSE-NKTYD-K  
Seq3-10aK NKTYD-LDFKT-K  
Seq4-10aK LDFKT-PNNDK-K  
Seq5-10aK PNNDK-SLVKT-K  
Seq6-10aK SLVKT-GAQLV-K  
Seq7-VK25 VAASE-FYNSE-NKTYD-LDFKT-PNNDK  
Seq8-VK36 VAASE-FYNSE-NKTYD-LDFKT-PNNDK-SLVKT-GAQLV-K

#### ライブラリー2

Seq3-10aK NKTYD-LDFKT-K  
Seq3-c9K KTYD-LDFKT-K  
Seq3-c8K TYD-LDFKT-K  
Seq3-c7K YD-LDFKT-K  
Seq3-c6K D-LDFKT-K  
Seq7-VK25 VAASE-FYNSE-NKTYD-LDFKT-PNNDK  
Seq8-VK36 VAASE-FYNSE-NKTYD-LDFKT-PNNDK-SLVKT-GAQLV-K

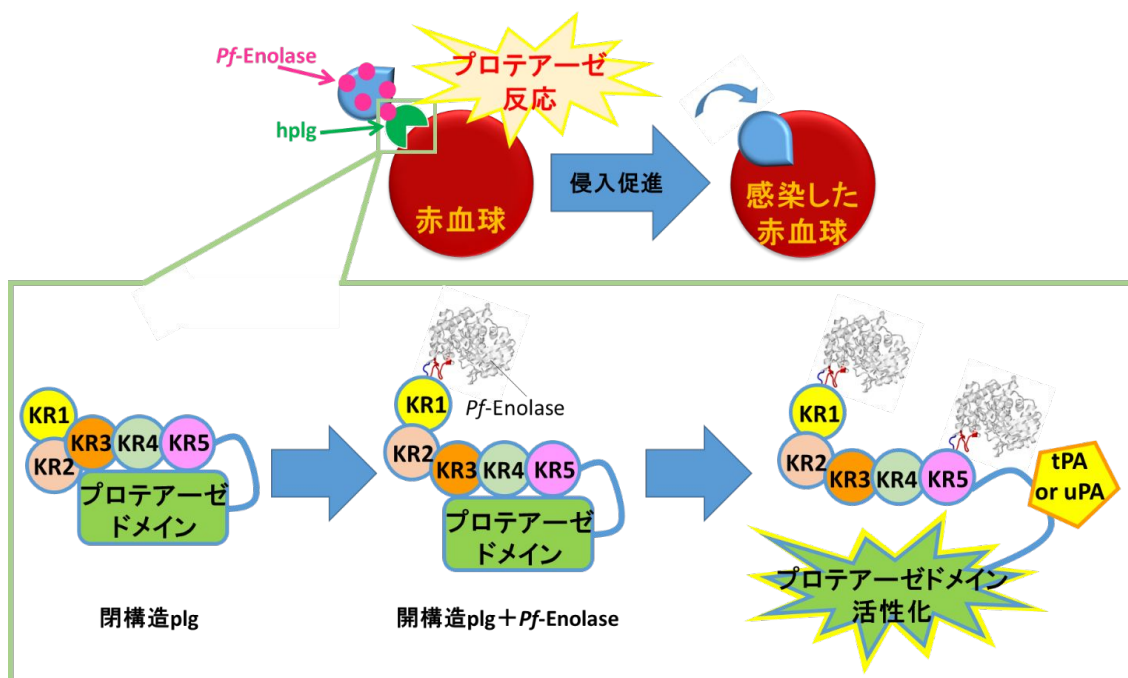
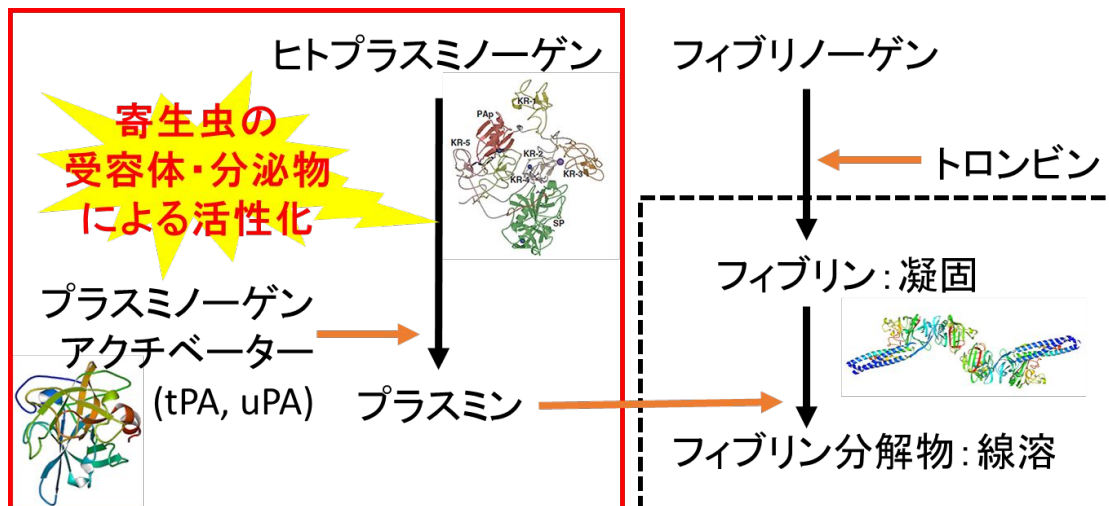
Seq8-VK36 VAASE-FYNSE-NKTYD-LDFKT-PNNDK-SLVKT-GAQLV-K  
**ライブラリー3** Seq8-VV35-K(265,272)A-K VAASE-FYNSE-N~~A~~TYD-LDF~~A~~T-PNNDK-SLVKT-GAQLV-K  
Seq8-VV35-K(278,282)A-K VAASE-FYNSE-NKTYD-LDFKT-PNND~~A~~-SLV~~A~~T-GAQLV-K  
Seq8-VV35(K→A)-K VAASE-FYNSE-N~~A~~TYD-LDF~~A~~T-PNND~~A~~-SLV~~A~~T-GAQLV-K

plg との結合に重要な配列探索は ELISA 法を用いて行い、測定には Pf-Enolase のループ配列を 5 残基ずつ重ね合わせた 10 残基+プレート結合用の C 末端リジン残基の合成ペプチドを用いた。また、その中で最も plg との結合が強かった配列(Seq3)の 10 残基ループ部分配列を N 末端側から 1~4 残基短縮し、plg との結合に特に重要なアミノ酸残基を調べた。さらに、Pf-Enolase のループ配列と plg の解離定数はバイオレイヤー干渉法を用いて測定した。合成ペプチドによるプラスミン活性促進効果は、プラスミンの基質を用いてプラスミン活性を検出し、その経時変化をモニターした。

測定の結果 plg と Pf-Enolase のループ配列は強固に結合する事が明らかとなった。また、Pf-Enolase のループ配列によるプラスミン活性発現促進を観測した。以上の結果より、



PfEnolaseによりplgが不活性な閉構造から開構造へ変化し、活性化因子であるtPAまたはuPAによりプラスミン活性を発現するような機構が推測出来る。hplgはレセプター蛋白と結合することで閉構造から開構造へ立体構造変化することが知られている。これに基づき、plgのKR1がPfEnolaseに結合後KR5が結合し、tPA又はuPAによりKR5・プロテアーゼドメイン間の活性化部位が切断されプラスミン活性が発現する機構が考えられる。



## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4件)

① 奥浩之、奥裕子「検査者の疲労感が軽減することを目標とした抗体価の測定キット」北関東産官学研究会 技術情報誌 HiKaLo、67号、(2019年3月発行) (査読 無).

奥浩之、「タンパク質や核酸をターゲットとしたものづくりイノベーション」北関東産官学研究会 技術情報誌 HiKaLo、66号、(2018年12月発行) (査読 無).

Hiroyuki Oku, Nana Isomoto, Yudai Kimoto, Shinya Kitamura, Keiichi Yamada, Kazuo Shinozuka. 「Identification of Plasminogen-Binding and Plasminogen-Activation Sequences from *Plasmodium falciparum* Enolase: Implication for the Parasite Invasion Mechanism into the Host Cell.」 Peptide Science 2017; I. Fujii Ed.; The Japanese Peptide Society: Osaka, pp.160-161 (2018) (査読 有).

奥浩之「微粒子を用いたマラリアワクチンと抗体価検査キット」月刊『化学工業』、第67巻第7号、pp53-59 (2016) (査読 無).

[学会発表](計 24件)

橋本 悠・松川 卓史・篠塚和夫・奥浩之・奥裕子「熱帯熱マラリア原虫エノラーゼをも

とにした AD22 抗原ペプチドの合成的研究」日本化学会関東支部群馬地区研究交流発表会、群馬工業高等専門学校（2018）。

橋本 悠・松川 卓史・篠塚和夫・奥 浩之・奥 裕子「熱帯熱マラリア原虫エノラーゼを用いた AD22 抗原ペプチドの研究」第 12 回バイオ関連化学シンポジウム、大阪大学吹田キャンパス（2018）。

奥 浩之「化学と機械の融合による太田イノベーション」第 1 4 回群馬産学官金連携推進会議、前橋商工会議所（2018）。

Takashi Matsukawa, Yu Hashimoto, Hotaka Shibao, Daichi Nakayama, Hajime Yamanaka, Yuko Oku, Hiroyuki Oku. 「Development of AD22 Malaria Vaccine Antigens and Related Model Studies.」 3rd International Symposium of Gunma University Medical Innovation (GUMI 2018), 桐生市民会館（2018）。

奥 浩之、磯本奈々、木本侑大「マラリア原虫エノラーゼにおけるヒトプラスミノーゲンとの複合体形成配列に関する研究」第 8 7 回日本寄生虫学会大会、国立国際医療研究センター（2018）。

磯本奈々、篠塚和夫、奥浩之「熱帯熱マラリア原虫のエノラーゼによる新しい感染促進メカニズムの研究」日本化学会関東支部群馬地区地域懇談会、群馬大学理工学部（2017）。

Hiroyuki Oku, Nana Isomoto, Yudai Kimoto, Kazuo Shinozuka. 「Identification of Plasminogen-Binding and Plasminogen-Activation Sequences from *Plasmodium falciparum* Enolase: Implication for the Parasite Invasion Mechanism into the Host Cell.」グローバルヘルス合同大会 2017（第 58 回日本熱帯医学会大会・第 32 回日本国際保健医療学会学術大会・第 21 回日本渡航医学会学術集会 合同大会） 東京大学本郷キャンパス（2017）。

奥浩之「化学的な視点によるマラリア原虫エノラーゼの研究」第 64 回北関東医学会 ワークショップ（依頼講演） 群馬大学医学部刀城会館、（2017）。

奥浩之、磯本奈々、木本侑大、北村慎也、山田圭一、篠塚和夫「熱帯熱マラリア原虫の宿主細胞への侵入メカニズムとしての、原虫エノラーゼの部分ペプチドによる、ヒトプラスミノーゲン結合配列とプラスミン活性化の研究」第 54 回ペプチド討論会、大阪府立大学中百舌鳥キャンパス（2017）。

Hiroyuki Oku, Nana Isomoto, Suguru Niwa, Takashi Matsukawa, Yu Hashimoto, Kazuo Shinozuka, Yuko Oku, Miho Oue, Tetsuya Nakamura 「Plasminogen Activation by Synthetic Peptides from Plasmodium falciparum Enolase: a Proof of Concept Study of AD22 Malaria Vaccine Project」4th International Symposium of Gunma University Medical Innovation (GUMI 2017), Maebashi City Chamber of Commerce（2017）。

磯本奈々、篠塚和夫、奥浩之「熱帯熱マラリア原虫エノラーゼの部分ペプチドを用いた、ヒトプラスミノーゲン結合配列とプラスミン活性化の研究」日本化学会第 97 春季年会、慶応大学日吉キャンパス（2017）。

磯本奈々、篠塚和夫、奥浩之「マラリア原虫エノラーゼとヒトプラスミノーゲンの相互作用による感染促進メカニズムの研究」日本化学会関東支部群馬地区地域懇談会、量子科学技術研究開発機構高崎量子応用研究所、P-05（2016）。

木本侑大、篠塚和夫、奥浩之「マラリア原虫エノラーゼにおけるプラスミノーゲン結合部位の探索」日本化学会関東支部群馬地区地域懇談会、量子科学技術研究開発機構高崎量子応用研究所（2016）。

Hiroyuki Oku, Yudai Kimoto, Nana Isomoto, Suguru Niwa, Kazuo Shinozuka, Miho Oue, Tetsuya Nakamura 「Plasminogen Binding Mechanism of Synthetic Peptide Antigen from Plasmodium falciparum: a Proof of Concept Study of Synthetic Peptide Vaccine Project」 3rd International Symposium of Gunma University Medical Innovation (GUMI 2016), 桐生市民会館（2016）。

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。