

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15266

研究課題名(和文) プロテインマトリクス解析による三日熱マラリア原虫赤血球侵入メカニズムの解明

研究課題名(英文) Discovery of receptor ligand interactions of Plasmodium vivax

研究代表者

坪井 敬文 (Tsuboi, Takafumi)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授

研究者番号：00188616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：三日熱マラリア Reticulocyte binding protein (RBP) family を9種類全てコムギ無細胞法を用いて合成し、ヒト赤血球タンパク質353種からなる組換えタンパク質ライブラリを用いて、タンパク質-タンパク質相互作用をアルファスクリーン法で解析した。その結果、RBP1aに対する相互作用タンパク質が3種類、RBP1bに対する相互作用タンパク質が1種類同定できた。これらの成果は、コムギ無細胞法で作製した組換えタンパク質ライブラリが、赤血球レセプター分子のハイスループットな同定に有用であることを示したものである。

研究成果の概要(英文)：Plasmodium vivax can invade only young erythrocytes (reticulocytes). Although many P. vivax proteins have been discovered, their functions are largely unknown because of the lack of in vitro continuous culture. Among them, P. vivax reticulocyte binding proteins (RBPs) recognize and bind to reticulocytes. However, reticulocyte receptor(s) have yet to be determined. In this project, we expressed all of the 9 RBP molecules by using wheat germ cell-free system as baits. We then established human erythrocyte protein libraries consisted with 353 proteins also using the wheat germ cell-free system. We screened protein-protein interactions between both protein sets with AlpaScreen technology. Finally we identified 3 putative receptor molecules against RBP1a, and one against RBP1b.

研究分野：寄生虫学

キーワード：原虫 三日熱マラリア プロテインマトリクス 侵入

1. 研究開始当初の背景

マラリアは、毎年2億人余りが罹患し約50万人が死に至る感染症であるが、ここ数年来マラリアによる死亡者数は減少傾向に転じ、マラリアエリミネーションが視野に入ってきた (WHO:World Malaria Report 2014)。そのためには、熱帯熱マラリアのみならず、患者数がそれと同等の三日熱マラリア対策も必須となっている。しかし、三日熱マラリアは肝内休眠型による再発をおこすことが知られており、その対策は困難を極めている。さらに、三日熱マラリア原虫は培養法が確立されていないため研究が非常に遅れている。これまでに、赤血球の Duffy 抗原に結合する原虫タンパク質 (Duffy-binding protein、以下 DBP) が同定され (Adams ら: Cell 1990)、赤血球侵入分子機構の一端が解明された。その研究から、DBPは唯一の三日熱マラリア赤血球期ワクチン候補として開発が現在進められている。しかし最近になって、マダガスカルにおいて Duffy 陰性の住民からも三日熱マラリア患者が報告され (Menard ら:PNAS 2010)、Duffy 抗原-DBP 以外の侵入メカニズムが存在することが示唆された。一方、三日熱マラリア原虫は網状赤血球のみに侵入することから、2種の網状赤血球結合タンパク質 (Reticulocyte-binding protein、以下 RBP) が同定され (Galinski ら:Cell 1992)、さらに2008年の三日熱マラリアゲノム解読から、RBPは9種類の遺伝子からなるファミリーであることが判明した。しかし赤血球側レセプターの同定等の研究は全く進んでいない。

2. 研究の目的

三日熱マラリア原虫の感染分子機構の理解を深めるため、赤血球侵入に必須の網状赤血球結合タンパク質 (RBP) をモデルとして、その赤血球側 RBP レセプタータンパク質を同定することを目的に本研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) RBP 組換えタンパク質の合成

9種類全ての RBP を、コムギ無細胞法により組換えタンパク質として合成した。

(2) ヒト赤血球タンパク質を網羅するプロテインアレイの合成

既に合成完了しているヒト2万種類のプロテインアレイの中から、赤血球タンパク質353種を選択し組換えタンパク質を調整した。

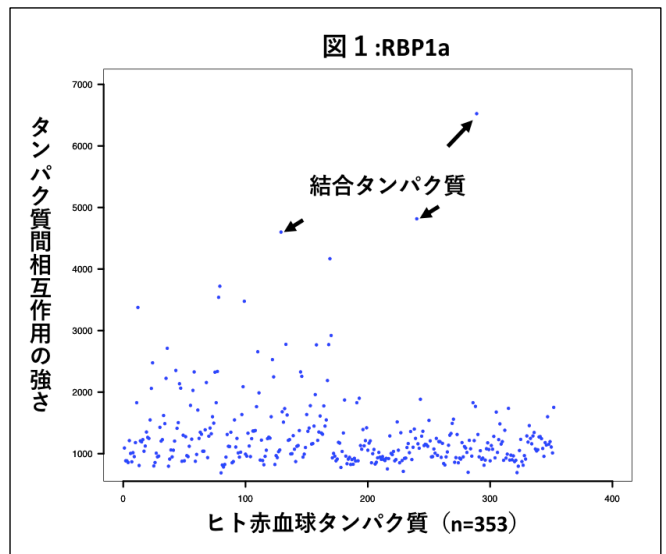
(3) タンパク質相互作用スクリーニング系の構築

アルファスクリーン法はタンパク質の相互作用をハイスループットに検出することができる技術である。ビオチン化 RBP とタグ付ヒト赤血球タンパク質が相互作用すると、ビオチンに結合するドナービーズと、抗タグ抗体に結合するアクセプタービーズが近接する。その状況で励起するとドナービーズからエネ

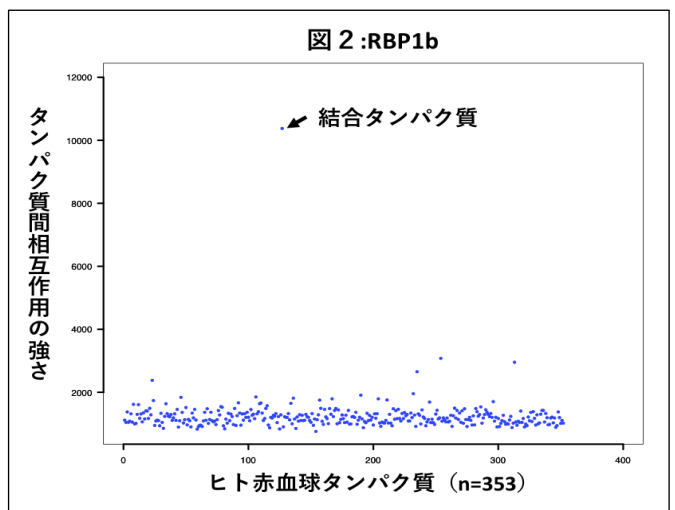
ルギーが生じ、これがアクセプタービーズと反応し発光し、これをアルファスクリーン測定装置で測定する。これに本センターが保有する全自動分注装置を組み合わせることにより、384 well プレートを使用した大規模ハイスループットスクリーニングが可能であり、1日あたり約5,000アッセイを行うことができる。9種類の RBP と 353種類の赤血球タンパク質とのタンパク質-タンパク質相互作用を AlphaScreen 法で測定した。

4. 研究成果

(1) RBP1a の赤血球レセプターの分子の同定
RBP1a に対する新規赤血球レセプター分子を3種類同定に成功した (図1)。



(2) RBP1b の赤血球レセプターの分子の同定
RBP1b に対する新規赤血球レセプター分子を1種類同定に成功した (図2)。



これらの成果は、コムギ無細胞法で作製した組換えタンパク質ライブラリが、赤血球レセプター分子のハイスループットな同定に有用であることを示したものである。今後、同定された赤血球レセプターと RBP の相互作用を詳細に解析する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 32 件)

- (1) Miura T, Takeo S, Ntege EH, Otsuki H, Sawasaki T, Ishino T, Takashima E, Tsuboi T. The malaria parasite RhopH protein complex interacts with erythrocyte calmyrin identified from a comprehensive erythrocyte protein library. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018, 500(2):261-267. 査読有
- (2) Tachibana M, Ishino T, Takashima E, Tsuboi T, Torii M. A male gametocyte osmiophilic body and microgamete surface protein of the rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii* (PyMiGS) plays a critical role in male osmiophilic body formation and exflagellation. *Cell Microbiol*. 2018, e12821. 査読有
- (3) Morita M, Nagaoka H, Ntege EH, Kanoi BN, Ito D, Nakata T, Lee J-W, Tokunaga K, Iimura T, Torii M, Tsuboi T, Takashima E. PV1, a novel *Plasmodium falciparum* merozoite dense granule protein, interacts with exported protein in infected erythrocytes. *Sci Rep*. 2018, 8(1):3696. 査読有
- (4) Sakamoto H, Takeo S, Takashima E, Miura K, Kanoi BN, Ishino T, Tsuboi T (他 6 名, 13 番目). Identification of target proteins of clinical immunity to *Plasmodium falciparum* in a region of low malaria transmission. *Parasitol Int*. 2018, 67(2):203-208. 査読有
- (5) Saito F, Hirayasu K, Takashima E, Tsuboi T (他 14 名, 12 番目), Arase H. Immune evasion of *Plasmodium falciparum* by RIFIN via inhibitory receptors. *Nature*. 2017, 552(7683):101-105. 査読有
- (6) França CT, Takashima E, Tsuboi T (他 21 名, 19 番目), Mueller I. Identification of highly-protective combinations of *Plasmodium vivax* recombinant proteins for vaccine development. *eLife*. 2017, 6: e28673. 査読有
- (7) Longley RJ, Takashima E, Morita M, Kanoi BN, Sattabongkot J, Tsuboi T (他 9 名 15 番目), Mueller I. Naturally acquired antibody responses to more than 300 *Plasmodium vivax* proteins in three geographic regions. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017, 11: e0005888. 査読有
- (8) Ntege EH, Takashima E, Morita M, Nagaoka H, Ishino T, Tsuboi T. Blood-stage malaria vaccines: Post-genome strategies to the identification of novel vaccine candidates. *Expert Rev Vaccines*. 2017, 16:769-779. 査読有
- (9) Morita M, Takashima E, Ito D, Miura K, Thongkukiatkul A, Diouf A, Fairhurst RM, Diakite M, Long CA, Torii M, Tsuboi T. Immunoscreening of *Plasmodium falciparum* proteins expressed in a wheat germ cell-free system reveals a novel malaria vaccine candidate. *Sci Rep*. 2017, 7:46086. 査読有
- (10) Ataide R, Takashima E, Tsuboi T (他 17 名, 9 番目), Beeson JG, Nosten F, Simpson JA, White NJ, Fowkes FJI. Host immunity and the assessment of emerging artemisinin resistance in malaria: a multinational cohort study. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017, 114:3515-3520. 査読有
- (11) Kanoi BN, Takashima E, Morita M, Horii T, Tsuboi T (他 6 名, 11 番目). Antibody profiles to wheat germ cell-free system synthesized *Plasmodium falciparum* proteins correlate with protection from symptomatic malaria in Uganda. *Vaccine*. 2017, 35:873-881. 査読有
- (12) Bargieri DY, Tsuboi T (他 18 名, 12 番目). *Plasmodium* MTRAP is essential for vacuole membrane disruption and host cell egress by malaria gametes. *Cell Host Microbe*. 2016, 20:618-630. 査読有
- (13) Ntege EH, Arisue N, Ito D, Hasegawa T, Palacpac NMQ, Egwang TG, Horii T, Takashima E, Tsuboi T. Identification of *Plasmodium falciparum* reticulocyte binding protein homologue 5-interacting protein, PfRipr, as a highly conserved blood-stage malaria vaccine candidate. *Vaccine*. 2016, 34:5612-5622. 査読有
- (14) Cheng Y, Ito D, Takashima E, Sattabongkot J, Miller LH, Tsuboi T (他 12 名, 18 番目), Han ET. *Plasmodium vivax* GPI-anchored micronemal antigen (PvGAMA) binds human erythrocytes independent of Duffy antigen status. *Sci Rep*. 2016, 6:35581. 査読有
- (15) Weaver R, Reiling L, Mueller I, Tsuboi T (他 4 名, 7 番目), Fowkes FJI, Beeson JG. The association between naturally acquired IgG subclass specific antibodies to the PFRH5 invasion complex and protection from *Plasmodium falciparum* malaria. *Sci Rep*. 2016, 6:33094. 査読有
- (16) McLean ARD, Tsuboi T (他 7 名, 6 番目), Fowkes FJI. Antibody responses to

Plasmodium falciparum and *Plasmodium vivax* blood-stage and sporozoite antigens in the postpartum period. *Sci Rep.* 2016, 6:32159. 査読有

- (17) Charnaud, SC, Tsuboi T (他 14 名, 10 番目). Maternal-foetal transfer of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* antibodies in a low transmission setting. *Sci Rep.* 2016, 6:20859. 査読有
- (18) Takashima E, Morita M, Tsuboi T. Vaccine candidates for malaria: what's new? *Expert Rev Vaccines.* 2016, 15(1):1-3. 査読有

[学会発表] (計 62 件)

- (1) (招待講演) 坪井敬文、ポストゲノムのマalariaワクチン研究。第 30 回日本動物細胞工学会 2017 年度大会、(2017. 7. 20-21, 松山市)
- (2) (招待講演) Tsuboi T. Post-genome malaria vaccine research. Japan-Brazil Malaria Research Workshop: fostering new partnerships (2017. 3. 15-17, São Paulo, Brazil)
- (3) (招待講演) Tsuboi T, Takashima E, Morita M, Ntege EH, Nagaoka H. Post-genome malaria vaccine candidate discovery by wheat germ cell-free system. Joint International Tropical Medicine Meeting 2016 (2016. 12. 7-9, Bangkok, Thailand)
- (4) (招待講演) 坪井敬文、高島英造、森田将之 ポストゲノム生化学研究：マalariaワクチン研究の突破口。第 89 回日本生化学会大会 (2016. 9. 25-27, 仙台市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.pros.ehime-u.ac.jp/malaria/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坪井 敬文 (TSUBOI, Takafumi)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授

研究者番号：00188616

(2) 研究分担者

高島 英造 (TAKASHIMA, Eizo)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・

准教授

研究者番号：50366762

(3) 連携研究者

該当無し

(4) 研究協力者

該当無し