

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460517

研究課題名(和文) 無細胞膜タンパク質合成技術を基盤とした熱帯熱マラリア原虫の赤血球レセプター探索

研究課題名(英文) Screening of the RBC receptor molecules for malaria merozoite invasion based on wheat germ cell free system

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：マラリア原虫は赤血球表面のタンパク質と相互作用することによって、赤血球に侵入し感染を成立させると考えられている。そこで本研究室にある約200種類の原虫・宿主タンパク質に対する抗体(約200種)を用いて、大規模に免疫沈降を行った。その結果ワクチン候補分子として注目される、原虫のGAMA分子と相互作用するタンパク質、GAAPタンパク質を見出すことに成功した。両タンパク質は $K_d = 2.5 \text{ nM}$ という、抗原抗体反応に匹敵するほど強い相互作用を有することが明らかとなった。結合ドメインの同定を行った結果GAMA分子の100アミノ酸からなるドメインがGAAPとの結合に重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Merozoite invasion of malaria parasite is attributed with the parasite erythrocyte binding antigens (EBA). In this study, we attempted to screen for identification of the receptor molecules on the surface of the host RBC for the EBAs. By means of comprehensive immuno-precipitation with more than 200 polyclonal antibodies, we identified the molecule interacting with GPI-anchored micronemal antigen (GAMA), a blood stage vaccine candidate. We named the molecule GAMA association protein (GAAP). Biacore analysis revealed that K_d value of the interaction was 2.5 nM . We also identified the GAAP interacting domain in GAMA which has about 100 amino acid residues.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア 赤血球

1. 研究開始当初の背景

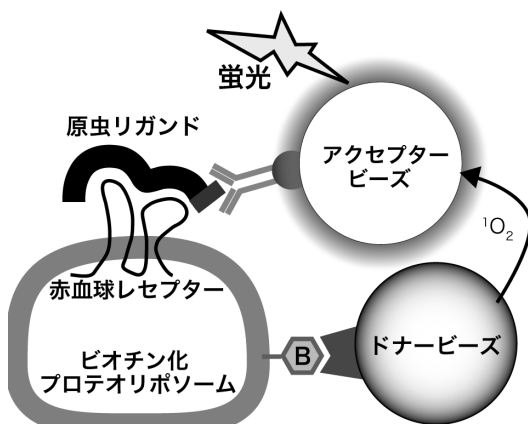
マラリア原虫は赤血球表面のタンパク質と相互作用することで、自身を赤血球に侵入させ感染を成立させると考えられている。原虫と相互作用する赤血球表面のタンパク質(赤血球レセプター)を同定することができれば、原虫の赤血球侵入機構の解明に大きく貢献できると考えられる。しかし、赤血球表面タンパク質は膜貫通領域を持つ膜タンパク質であることから、赤血球レセプターの網羅的な探索技術の開発は「膜タンパク質の合成」という既存のタンパク質発現系では実施困難な技術的障壁に阻まれていた。

2. 研究の目的

最近当研究センターでは、リポソームを添加したコムギ無細胞系を用いてタンパク質を合成し、プロテオリポソームを形成することで様々な膜タンパク質を高い確率で合成することができる系を確立した。そこで申請者は、赤血球膜タンパク質を網羅的にリポソーム上に合成することで、マラリア原虫赤血球レセプター分子の網羅的な探索系を確立し、それを用いて赤血球レセプターを同定することを目的に研究を着想した。

探索系を確立するために、近年我々が報告した新規マラリアワクチン候補分子である熱帯熱マラリア原虫メロゾイトの赤血球表面結合タンパク質 GPI-anchored micronemal antigen (GAMA) (Arumugam ら: Infect Immun. 2011) をモデルとして用いた。GAMA は、原虫の赤血球侵入において必須なタンパク質分子である。メロゾイトの放出にともなって先端部小器官マイクロネームから原虫表面に移行し、赤血球表面の未知レセプターと相互作用することでメロゾイトの赤血球侵入に重要な機能を担うと考えられている。抗 GAMA 全長抗体は培養熱帯熱マラリア原虫に対して増殖阻害活性(GIA)を持つため、新規マラリアワクチン候補分子として注目されている。また GAMA の C 末側 1/3 は赤血球結合ドメインである。

3. 研究の方法



1) アルファスクリーンを用いた赤血球表面タンパク質スクリーニング

表面をビオチンでラベルしたリポソームを添加したコムギ無細胞系を用いて、ヒト赤血球膜に局在するタンパク質を網羅的に合成する。これにより、赤血球表面タンパク質ライブラリーを構築する。次に、GST タグ融合原虫タンパク質をコムギ無細胞系で合成し、互いを混合してインキュベートすることで複合体を形成させる。複合体の形成を、アルファスクリーンを用いてハイスループットかつ網羅的に検出する(図)。

2) 免疫沈降

アルファスクリーンで得られた結果を検証するために、原虫・宿主タンパク質に対する抗体を用いて免疫沈降を行う。また、アルファスクリーンによる赤血球レセプターの同定が予定通り進まない場合には、当研究室がコムギ無細胞系を用いて合成し免疫して得た原虫・宿主タンパク質に対する抗体(約200種類)を用いて免疫沈降を網羅的に行うことで、相互作用分子を同定する。

3) Biacore によるタンパク質相互作用の生化学的解析

タンパク質間の直接的な相互作用の有無、ならびにその結合の特異性を見積もる上で重要な相互作用の解析は、Biacore による表面プラズモン共鳴解析を用いて行ない、両者の結合の反応速度(結合速度定数、解離速度定数、解離定数)と平衡状態を測定した。

4. 研究成果

1) GAMA 結合タンパク質の同定

本研究室にある約200種類の原虫・宿主タンパク質に対する抗体(約200種)を用いて、大規模に免疫沈降を行った。その結果、GAMA association protein (GAAP) が共沈していることが判明した。

2) Biacore による相互作用の検証

両タンパク質が免疫沈降によって共沈することを認めたが、それぞれが直接結合しているかどうかは、免疫沈降のみでは明らかにすることはできない。そこで、Biacore を用いてタンパク質・タンパク質相互作用の速度論的解析を行った。その結果、両タンパク質は $K_d = 2.5 \text{ nM}$ という、抗原抗体反応に匹敵するほど強い相互作用によって、直接結合することが明らかとなった。さらに GAMA 分子の分断体を合成し、同様の Biacore 解析を行った結果、GAMA 分子の N 末側にある 100 アミノ酸からなるドメインが GAAP との結合に重要であることが明らかとなった。

今後は GAMA・GAAP 分子の相互作用が、原虫の侵入にどのような影響を与えているのかを検証するために、当該タンパク質相互作用を阻害するモノクローナル抗体の作成を行なう予定である。メロゾイトの赤血球侵入がどのような影響を受けるのかを解析することで、マラリア原虫の赤血球侵入分子メカニズムの総体の理解に大きく貢献することが

できると考えられ、さらには新規抗マalaria薬、マalariaワクチン開発などへの応用が期待できる。

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9件)

Takashima E, Morita M, Tsuboi T. Vaccine candidates for malaria: what's new? *Expert Rev Vaccines*. 2016;15(1):1-3. doi: 10.1586/14760584.2016.1 査読有

Tsuboi T, Takashima E. Antibody titre as a surrogate of protection of the first malaria subunit vaccine, RTS,S/AS01. *Lancet Infect Dis*. 2015;15(12):1371-2. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00300-X. 査読無

Mitri C, Bischoff E, Takashima E, Williams M, Eiglmeier K, Pain A, Guelbeogo WM, Gneme A, Brito-Fravallo E, Holm I, Lavazec C, Sagnon N, Baxter RH, Riehle MM, Vernick KD. An Evolution-Based Screen for Genetic Differentiation between Anopheles Sister Taxa Enriches for Detection of Functional Immune Factors. *PLoS Pathog*. 2015 Dec 3;11(12):e1005306. doi: 10.1371/journal.ppat.1005306. 査読有

Wang B, Lu F, Cheng Y, Chen JH, Jeon HY, Ha KS, Cao J, Nyunt MH, Han JH, Lee SK, Kyaw MP, Sattabongkot J, Takashima E, Tsuboi T, Han ET. Immunoprofiling of the tryptophan-rich antigen family in *Plasmodium vivax*. *Infect Immun*. 2015;83(8):3083-95. doi: 10.1128/IAI.03067-14. 査読有

Arumugam TU, Ito D, Takashima E, Tachibana M, Ishino T, Torii M, Tsuboi T. Application of wheat germ cell-free protein expression system for novel malaria vaccine candidate discovery. *Expert Rev Vaccines*. 2014;13(1):75-85. doi: 10.1586/14760584.2014.861747. 査読有

Mathias DK, Pastrana-Mena R, Ranucci E, Tao D, Ferruti P, Ortega C, Staples GO, Zaia J, Takashima E, Tsuboi T, Borg NA, Verotta L, Dinglasan RR. A small molecule glycosaminoglycan mimetic blocks *Plasmodium* invasion of the mosquito midgut. *PLoS Pathog*. 2013;9(11):e1003757. doi: 10.1371/journal.ppat.1003757. 査読有

Miura K, Takashima E, Deng B, Tullo G,

Diouf A, Moretz SE, Nikolaeva D, Diakite M, Fairhurst RM, Fay MP, Long CA, Tsuboi T. Functional comparison of *Plasmodium falciparum* transmission-blocking vaccine candidates by the standard membrane-feeding assay. *Infect Immun*. 2013 81(12):4377-82. doi: 10.1128/IAI.01056-13. 査読有

Ito D, Hasegawa T, Miura K, Yamasaki T, Arumugam TU, Thongkukiatkul A, Takeo S, Takashima E, Sattabongkot J, Han ET, Long CA, Torii M, Tsuboi T. RALP1 is a rhoptry neck erythrocyte-binding protein of *Plasmodium falciparum* merozoites and a potential blood-stage vaccine candidate antigen. *Infect Immun*. 2013 81(11):4290-8. doi: 10.1128/IAI.00690-13. 査読有

Cheng Y, Wang Y, Ito D, Kong DH, Ha KS, Chen JH, Lu F, Li J, Wang B, Takashima E, Sattabongkot J, Tsuboi T, Han ET. The *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 paralog is a novel erythrocyte-binding ligand of *P. vivax*. *Infect Immun*. 2013 81(5):1585-95. doi: 10.1128/IAI.01117-12. 査読有

[学会発表](計46件)

高島英造、今川瑞季、長岡ひかる、坪井敬文、赤血球侵入メカニズムの解明に向けた熱帯熱マalaria原虫メロゾイト分子間相互作用解析、第85回日本寄生虫学会大会、宮崎県宮崎市、3/19-20、2016。

高島英造、森田将之、長岡ひかる、坪井敬文、マalaria原虫赤血球寄生メカニズムの総合的理解のための網羅的タンパク質相互作用解析戦略、第23回分子寄生虫学ワークショップ・第13回分子寄生虫・マalaria研究フォーラム合同大会、北海道帯広市、8/30-9/2、2015。

Takashima E, Sasaoka C, Sakamoto H, Ito D, Takeo S, Sattabongkot J, Tsuboi T. Identification of *Plasmodium falciparum* PfMAS170 as novel blood-stage malaria vaccine candidate. 25th Annual Molecular

Parasitology/Vector Biology Symposium,
University of Georgia, Athens, USA, 4/28-29,
2015.

高島英造、笹岡千紗、伊藤大輔、サタボン
コト ジェッツモン、鳥居本美、坪井敬文、熱
帯熱マラリア赤血球期ワクチン候補分子
MAS170 の性状解析、第 84 回日本寄生虫学
会大会、東京都三鷹市、3/21-22、2015.

(招待講演)高島英造、コムギ無細胞タンパ
ク質合成法が拓く次世代マラリア研究岡山
大学医歯薬学総合研究科、第9回異分野キャ
リアを持つ医療系生命科学研究者育成支援
事業セミナー、岡山県岡山市、3/13、2015.

(招待講演) Tsuboi T, Takashima E, Ito
D, Feng Lu, Cheng Y, Han ET. Wheat germ
cell-free protein synthesis system
(WGCFs): a breakthrough for the
post-genome vivax malaria research. 13th
International Congress of Parasitology,
Hotel Camino Real, Mexico City, Mexico,
8/10-15, 2014.

高島英造、新澤直明、野崎守、伊藤大輔、
石野智子、鳥居本美、坪井敬文、マラリア原
虫におけるタンパク質相互作用の生化学的解
析、第 21 回分子寄生虫学ワークショップ、兵
庫県神戸市、8/25-28、2013.

〔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

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