

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19455

研究課題名(和文) コムギ無細胞系によるマラリア原虫膜タンパク質のゲノム網羅的発現

研究課題名(英文) Genome-wide expression of *P. falciparum* membrane proteins

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) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：リポソーム共存下でコムギ無細胞系によるタンパク質合成を行った。その結果、数種の膜貫通タンパク質について、良好な合成を確認することができた。さらにリポソーム内にコムギ無細胞系を封入し、そこでタンパク質合成を行った。その結果、リポソーム膜に局在する膜貫通タンパク質を観察することができた。リポソーム共存下コムギ無細胞系の質的評価がなされたと判断して、さらに通常の条件では合成できなかったタンパク質について、リポソームを共存させ合成した結果、機能的タンパク質分子を得る事ができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マラリア原虫タンパク質は既存の発現系ではほとんど発現できず、研究が頓挫していた。しかし申請者らはコムギ無細胞系で組換え原虫タンパク質の発現に成功し研究を発展させてきた。本研究でリポソームを共存させたコムギ無細胞系によって今まで合成できなかった膜タンパク質も合成することができた。合成できるタンパク質が増えることによって研究対象が増え、その結果マラリアワクチンや新規化学療法剤の開発に繋がる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Membrane associated plasmodial proteins are usually difficult to predict using the present algorithms, and are not well expressed by under conventional wheat germ cell-free protein expression system (WGCFs) conditions. In this study, we aimed at expressing *P. falciparum* genes using WGCFs-liposome method for membrane protein production. As a result, we succeeded to express *P. falciparum* proteins which are not well expressed by usual conditions of WGCFs. Moreover, liposome encapsulated WGCFs successfully expressed some membrane proteins and the recombinant proteins were localized to the liposomal membrane. Based on these results, we conclude that WGCFs-liposome is a useful tool for the expression of membrane proteins and will facilitate production and functional analyses of *P. falciparum* membrane proteins.

研究分野：分子寄生虫学

キーワード：マラリア 膜タンパク質

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

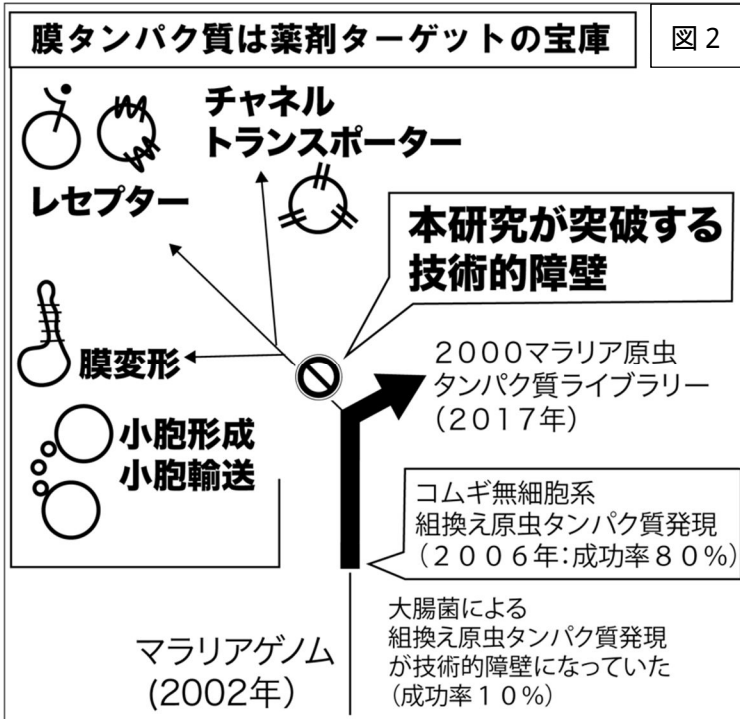
1. 研究開始当初の背景

マラリアによる死者は全世界で年間40万人にものぼる。現在最強の抗マラリア薬であるアルテスネートにより減少傾向にあるが、耐性原虫の出現により、新規マラリア薬の開発は急務である。赤血球に感染した熱帯熱マラリア原虫は多重の膜に包まれた特有の寄生環境を作り出す(図1)。そのため原虫は、チャンネル、トランスポーター、小胞輸送を巧みに利用し、独特な膜間輸送を発達させてきた(図1)。これら膜間輸送に関わる膜タンパク質は薬剤標的として極めて重要である。しかし技術的障壁のため原虫膜タンパク質の研究は進んでいない。またマラリア原虫遺伝子はユニークなものが多く、アミノ酸配列から機能を予測することはもちろん、膜タンパク質を予測することすら確実ではない。



2. 研究の目的

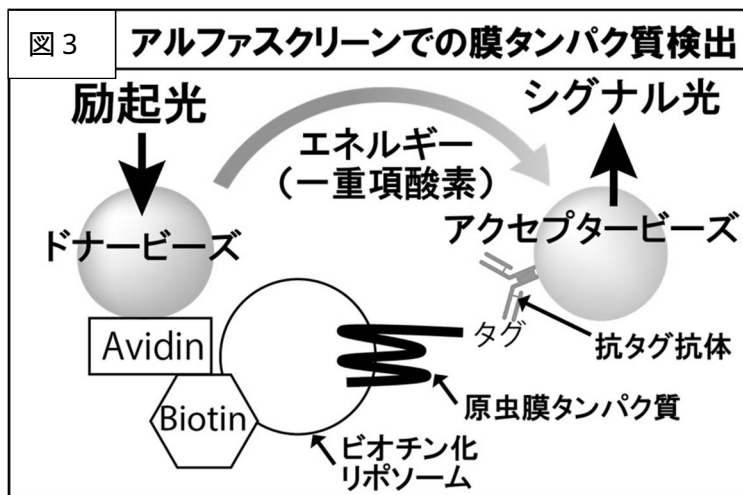
申請者が所属する研究センターは、2000年初頭にコムギ無細胞タンパク質発現系を実用化した後、世界に先駆けてアルファスクリーン技術を網羅的なタンパク質機能解析に導入し、無細胞技術と融合したハイスループットアッセイのための設備導入及び基盤技術の蓄積に10年以上にわたり注力してきた。2002年に熱帯熱マラリアゲノムが解読されて以来、欧米の研究者によりゲノムワイドな原虫組換えタンパク質の発現が試みられた。しかし、熱帯熱マラリア原虫遺伝子は大腸菌等の既存の発現系では原虫の組換えタンパク質をほとんど発現できず、ポストゲノム時代のマラリア研究は大きな技術的障壁に直面していた(図2)。しかし申請者らはコムギ無細胞タンパク質発現法を応用することで組換え



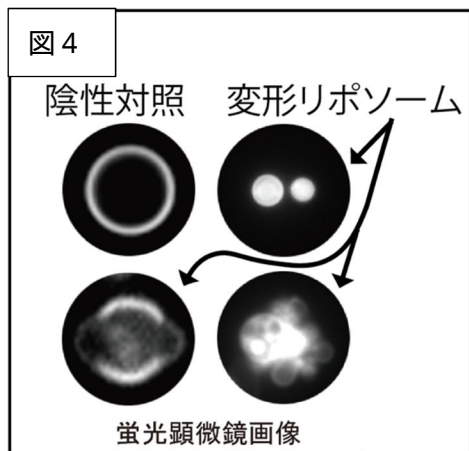
原虫タンパク質の発現に成功し、ポストゲノム時代のマラリアタンパク質研究を飛躍的に発展させてきた。そして近年コムギ無細胞系で発現した「活着している」タンパク質をゲノム網羅的にコレクションする事に成功した(2000マラリア原虫タンパク質ライブラリー、図2)これはまさにポストゲノムマラリア研究におけるブレイクスルーである。そこでハイスループットにリポソーム共存コムギ無細胞系を駆使することで、現在もなお

世界のどこにも確立されていない、高い成功率のマラリア原虫膜タンパク質発現系を確立することを着想した。そこで本研究は「コムギ無細胞系」を用いて、マラリア原虫ゲノム網羅的に膜タンパク質発現を行うことで、新規薬剤標的の同定を目的に膜変形・小胞形成タンパク質、物質輸送に関わるチャネル及びトランスポーターの同定を行う。これにより、コムギ無細胞系によるマラリアタンパク質合成技術のノウハウをより多く蓄積し、さらに基盤技術としてのタンパク質発現系の完成度を高めることもできる。

3. 研究の方法



また申請者らの研究センターはすでに、コムギ無細胞系にビオチン化リポソームを共存させることによって GPCR 等の複雑な膜タンパク質を機能的に発現させることに成功した (竹田ら 2015 *Sci Rep*)。そこで本研究は当該 2000 個の赤血球期原虫タンパク質につき上記発現系を用いてゲノム網羅的に新規膜タンパク質を同定



する。ビオチン化リポソーム上のタンパク質をアルファスクリーンによってハイスループットに検出する (図3、確立済) これによりアミノ酸配列から予測できていない原虫固有の膜タンパク質を取りこぼしなく同定することができる。シグナルが検出されたものを膜タンパク質として次のアッセイ対象とする。

エンドサイトーシス、膜輸送ではダイナミックな膜形態変化を伴う事が知られている (図1)。小胞を作る場合には、膜の「かたち」を整えカットするタンパク質が必須であるが、マラリア原虫では未だ同定されてい

ない。蛍光顕微鏡を用いた膜変形・小胞化タンパク質探索系を開発した (図4)。これを利用して新規な膜変形・小胞形成タンパク質を同定する。

4. 研究成果

リポソーム共存下でコムギ無細胞系によるタンパク質合成を行った。その結果、数種の複数膜貫通領域を持つタンパク質について、良好な合成を確認することができた。さらにリポソーム内にコムギ無細胞系を封入し、そこでタンパク質合成を行った。その結果、リポソーム膜に局在する膜貫通タンパク質を観察することができた。リポソーム共存下コムギ無細胞系の質的評価がなされたと判断して、さらに通常の条件では合成できなかったタンパク質について、リポソームを共存させ合成した結果、機能的タンパク質分子を得る事ができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Nagaoka Hikaru, Kanoi Bernard N., Ntege Edward H., Aoki Masamitsu, Fukushima Akihisa, Tsuboi Takafumi, Takashima Eizo | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Antibodies against a short region of PfRipr inhibit Plasmodium falciparum merozoite invasion and PfRipr interaction with Rh5 and SEMA7A | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 1-14 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1038/s41598-020-63611-6 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Kanoi Bernard N., Nagaoka Hikaru, White Michael T., Morita Masayuki, Palacpac Nirianne M. Q., Ntege Edward H., Balikagala Betty, Yeka Adoke, Egwang Thomas G., Horii Toshihiro, Tsuboi Takafumi, Takashima Eizo | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Global Repertoire of Human Antibodies Against Plasmodium falciparum RIFINs, SURFINs, and STEVORs in a Malaria Exposed Population | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Immunology | 6. 最初と最後の頁 1-12 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00893 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Nagaoka Hikaru, Kanoi Bernard N., Jinoka Kana, Morita Masayuki, Arumugam Thangavelu U., Palacpac Nirianne M. Q., Egwang Thomas G., Horii Toshihiro, Tsuboi Takafumi, Takashima Eizo | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 The N-Terminal Region of Plasmodium falciparum MSP10 Is a Target of Protective Antibodies in Malaria and Is Important for PfGAMA/PfMSP10 Interaction | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Immunology | 6. 最初と最後の頁 1-9 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02669 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Nagaoka Hikaru, Sasaoka Chisa, Yuguchi Takaaki, Kanoi Bernard N., Ito Daisuke, Morita Masayuki, Udonsangpetch Rachanee, Sattabongkot Jetsumon, Ishino Tomoko, Tsuboi Takafumi, Takashima Eizo | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 PfMSA180 is a novel Plasmodium falciparum vaccine antigen that interacts with human erythrocyte integrin associated protein (CD47) | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 1-11 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1038/s41598-019-42366-9 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件／うち国際学会 7件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Takashima E, Tsuboi T |
| 2. 発表標題 Screening for background immunity to <i>P. vivax</i> malaria in volunteers |
| 3. 学会等名 MIST (Malaria Infection Study in Thailand) Kick-off Meeting, Bangkok, Thailand, (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kanoi BN, Nagaoka H, Palacpac NMQ, White MT, Morita M, Ntege EH, Balikagala B, Yeka A, Egwang TG, Horii T, Tsuboi T, Takashima E |
| 2. 発表標題 Comprehensive serological profiles of <i>P. falciparum</i> VSA and risk of febrile malaria in Uganda. |
| 3. 学会等名 The 17th Protein Island Matsuyama (PIM) International Symposium, Matsuyama, Japan (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Nagaoka H, Kanoi BN, Jinoka K, Morita M, Arumugam TU, Palacpac NMQ, Egwang TG, Horii T, Tsuboi T, Takashima E |
| 2. 発表標題 The N-terminal region of <i>Plasmodium falciparum</i> MSP10 is important for PfGAMA/MSP10 interaction and is a target of protective antibodies |
| 3. 学会等名 ASTMH 68th annual meeting, Washington DC, USA (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Takashima E, Nagaoka H, Sasaoka C, Yuguchi T, Kanoi BN, Ito D, Morita M, Udomsangpetch R, Sattabongkot J, Ishino T, Tsuboi T |
| 2. 発表標題 PfMSA180 is a novel <i>Plasmodium falciparum</i> vaccine candidate that interacts with CD47 on erythrocytes. |
| 3. 学会等名 ASTMH 68th annual meeting, Washington DC, USA, (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Takashima E, Nagaoka H, Kanoi BN, Jinoka K, Morita M, Arumugam TU, Palacpac NMQ, Egwang TG, Horii T, Tsuboi T |
| 2. 発表標題 Identification of PfMSP10 as a PfGAMA associating protein that is important for merozoite invasion |
| 3. 学会等名 U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program (USJCMSP), The 50th Joint Conference on Parasitic Diseases, Matsuyama, Japan (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 高島英造 |
| 2. 発表標題 無細胞タンパク質ライブラリーによる次世代マラリア研究 |
| 3. 学会等名 シンポジウム：寄生の生化学、第91回日本生化学会大会、京都市、9/24-26、2018。(招待講演)(国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Takashima E |
| 2. 発表標題 Post-genomic strategies for the identification of novel blood-stage vaccine candidates with wheat germ cell-free system. |
| 3. 学会等名 14th International Congress of Parasitology, Daegu City, Korea, August 19-24, 2018。(招待講演)(国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

愛媛大学プロテオサイエンスセンター マラリア研究部門
<http://www.pros.ehime-u.ac.jp/malaria/>

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------------------|---|---|----|
| 研究 分 担 者 | 山田 浩司 (Yamada Hiroshi) (80325092) | 岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授 (15301) | |