

平成21年 4月16日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390120
 研究課題名（和文） マラリア原虫の赤血球結合ロプトリータンパク質の受容体の同定
 研究課題名（英文） Identification of erythrocyte proteins interacting with RhopH complex of malaria parasites
 研究代表者
 鳥居 本美 (TORII MOTOMI)
 愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：20164072

研究成果の概要：

マラリア原虫メロゾイトは、宿主赤血球侵入時に先端部小器官からタンパク質を分泌する。先端部小器官から分泌されるタンパク質の中で、ロプトリーから分泌される高分子ロプトリータンパク質複合体（RhopH 複合体）の赤血球侵入における役割は分かっていない。本研究では、RhopH の赤血球侵入時における機能の解明に向けて、RhopH 複合体と相互作用する赤血球タンパク質の検索を行った結果、RhopH 複合体と結合するタンパク質を見いだすことに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2008年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：原虫、マラリア、感染症

1. 研究開始当初の背景

マラリアは世界中で年間2～3億人の感染者、150万人の死者を出す重大な感染症である。マラリア原虫はヒト体内で赤血球に侵入増殖してこれを破壊することで病害を与えるが、マラリア感染成立には、赤血球への侵入型であるメロゾイトの先端部小器官に局在する原虫側リガンドが赤血球側レセプターを認識することが必須であるため、原虫リガンドは有望なワクチン候補抗原である。ところが、長年の研究にもかかわらず、マラ

リアのワクチン開発の成果はいまだに出していない。その理由として、マラリア原虫の赤血球侵入機構は単純ではなく、ある侵入経路を阻止しても、別の侵入経路により侵入をすることができ（赤血球侵入の多様性）、また重要なリガンドは多型性を示して、宿主免疫を回避する（宿主免疫回避機構）などと、考えられていたよりも複雑で洗練された機構であった点が上げられる。そこで、有効なワクチンを開発するためには、マラリア原虫の赤血球侵入機構を詳細に解析することが必要だと考えた。赤血球侵入に関与する分子の

うち、1980年代末に特異抗体が培養系および動物実験系において原虫の増殖阻害効果を示したにもかかわらず研究が遅れていた赤血球結合分子 RhopH 複合体に焦点をあてて研究を進めてきた。ヒトに感染する熱帯熱マalaria原虫の解析に加え、大量の原虫材料を容易に準備できる利点を持つネズミマalaria原虫 (*Plasmodium yoelii*) を用いて、現在までに、RhopH 複合体を構成するタンパク質 (RhopH1/2/3) をコードする遺伝子群を同定し、フローサイトメーターによる半定量的な原虫リガンドの赤血球表面への結合アッセイ系を新たに構築し、また RhopH 複合体の赤血球側レセプターがタンパク質成分を含み、GPI アンカーを介して赤血球表面に結合していることも示した。さらに、RhopH 複合体の赤血球への結合の強度が異なる2系統のマウスを用いた連鎖解析の手法により、レセプターをコードする領域を同定することを試み、第11染色体の特定領域が RhopH 複合体の赤血球結合に強く関連することを見出した。この領域にはバンド3という主要な赤血球表面タンパク質が存在したが、GPI アンカー結合型タンパク質が存在せず、この領域にコードされているのはレセプター自体ではなく、その質や量に影響する間接的な因子であると考えられた。以上の結果から、RhopH 複合体の赤血球への結合の強度には予想よりも多くの因子が関与しており、連鎖解析の手法ではレセプターの同定は困難であると考え、生化学的に直接レセプターを精製するという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、宿主に防御免疫を誘導するマalaria原虫リガンドである RhopH 複合体に結合する赤血球側の受容体を同定することで赤血球侵入機構の一端を明らかにすることを目的として実施した。

3. 研究の方法

本研究では、種々の組換えマウス赤血球タンパク質を調製することにより、PyRhopH 複合体との相互作用を *in vitro* で検出するために以下の方法を用いた。

(1) PyRhopH 複合体の精製

ネズミマalaria (*P. yoelii*) の RhopH 複合体に対する特異的モノクローナル抗体 (mAb#25) をホルミル・セルロファインに結

合させ、mAb#25 アフィニティ・カラムを作成した。*P. yoelii* 17XL 感染マウス血液からパーコールを用いて精製した分裂体粗抽出液を材料として、mAb アフィニティ・カラムを用いて RhopH 複合体を精製した。精製した RhopH 複合体をホルミル・セルロファインに結合させ、RhopH 複合体アフィニティ・カラムを作成した。

(2) RhopH 複合体に結合する赤血球側レセプターの分離

RhopH 複合体アフィニティ・カラムを用いて、赤血球膜タンパク質抽出液から RhopH 複合体に親和性を持つ分子を分離した。元のホルミル・セルロファインのみで作成したコントロール・カラムをもちいて、赤血球膜タンパク質抽出液から、ホルミル・セルロファインに親和性を持つ分子を分離した。RhopH 複合体アフィニティ・カラムで得られた分子と、コントロール・カラムで得られた分子を電気泳動し、染色の後、バンドの有無を比較検討した。バンドの確認にはルミノイメージ・アナライザーを用いた。

(3) マウス赤血球 cDNA の選択

ヒト赤血球のプロテオーム解析データ (Blood 2006;108:791-801) を利用して、ヒト赤血球タンパク質をコードする遺伝子のマウスオーソログを検索した。

(4) タグ付きの組換えマウス赤血球タンパク質の調製

PCR 増幅により RNA ポリメラーゼ結合部位・翻訳促進用配列・ビオチン標識用配列を5'側に、長鎖の非翻訳配列を3'側に付加し、*in vitro* で転写して mRNA を調製し、マウス赤血球タンパク質を合成するための鋳型とした。上記 mRNA を基に、コムギ胚芽抽出液を用いて組換えタンパク質を調製し、相互作用検出のためのビオチン標識を行った。

(5) PyRhopH 複合体と組換えマウス赤血球タンパク質との相互作用の *in vitro* 検出

PyRhopH 複合体は、*P. yoelii* 分裂体が感染したマウス赤血球を凍結溶解した後の上清に得られるものを用いた。これとビオチン標識マウス赤血球タンパク質との相互作用の検出は、標的2分子の結合によって蛍光を検出できる系 (AlphaScreen 法) を用いて行った。アクセプタービーズと結合させたモノクローナル抗体標識 PyRhopH 複合体とドナービーズと結合させたビオチン標識マウス赤血球タンパク質を反応させた。標的2分子が相

相互作用すれば双方のビーズが近接する。この状態で励起光を照射すると、アクセプタービーズが発光する。この蛍光を測定して結合の判定に用いた。

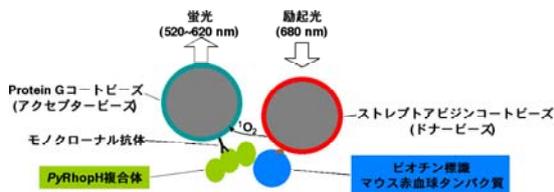


図 AlphaScreen法を用いたタンパク質間相互作用の検出

4. 研究成果

(1) PyRhopH 複合体に結合する赤血球レセプター分子のアフィニティ・精製

ネズミマラリア (*P. yoelii*) の RhopH 複合体に対する特異的モノクローナル抗体 (mAb#25) をホルミル・セルロファインに結合させ作成した mAb#25 アフィニティ・カラムに、*P. yoelii* 17XL 感染マウス血液からパーコールを用いて精製した分裂体粗抽出液を添加して、RhopH 複合体を精製した。次に、精製した RhopH 複合体をホルミル・セルロファインに結合させ、RhopH 複合体アフィニティ・カラムを作成した。この RhopH 複合体アフィニティ・カラムを用いて、マウス赤血球膜タンパク質抽出液から RhopH 複合体に親和性を持つ分子の分離を試みた。同様にホルミル・セルロファインのみのコントロールカラムを用いて結合する赤血球膜分子を分離し、陰性コントロールとした。これら2つのサンプルを SDS-PAGE にて展開し、両者を比較して RhopH 複合体アフィニティ・カラムに得意的なバンドの選択を試みたが、特異的なバンドを選択することは困難であった。

(2) マウス赤血球 cDNA

ヒト赤血球タンパク質をコードする遺伝子のマウスオースログを検索した結果、592種のヒト赤血球タンパク質から、488種のマウスオースログを選択することが出来た。

	Human erythrocyte protein		Total	Yield (%)
	Membrane protein	Soluble protein		
IPI number	336	256	592	100
Human gene ID	330	246	576	97.3
Mouse gene ID	304	222	526	88.9
MGI ID	303	222	525	88.7
Mouse cDNA clone ID	286	218	504 (488)	85.1

(), the number without overlapping IDs

(3) ビオチン化組換えタンパク質の作成

選択した 488 種のマウス遺伝子を PCR 増幅

により RNA ポリメラーゼ結合部位・翻訳促進用配列・ビオチン標識用配列を 5'側に、長鎖の非翻訳配列を 3'側に付加し、*in vitro* で転写して mRNA を調製したところ、455 種の mRNA を作成することが出来た。これらの mRNA を用いてコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系により、組換えタンパク質を調製したところ、430 種のビオチン標識組換えタンパク質の合成に成功した。

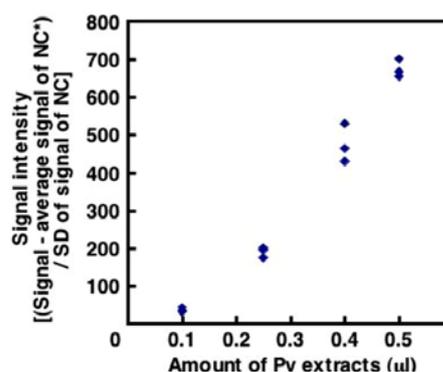
	Mouse ortholog of human erythrocyte gene encoding			Total	Yield (%)
	Membrane protein	Soluble protein	Membrane and soluble protein		
cDNA clone	270	214	4	488	100
2nd PCR product	268	212	4	484	99.2
mRNA	253	199	3	455	93.2
Biotinylated recombinant protein	232	195	3	430	88.1

(4) AlphaScreen 法を用いた PyRhopH 複合体と結合するビオチン化組換えタンパク質の選択

作成した 430 種のビオチン標識組換えタンパク質と RhopH3 に特異的に反応する単クローン抗体 mAb#32 を用いた Alpha Screen 法によって結合タンパク質の検索をおこなった。その結果、PyRhopH 複合体との結合を示唆する高い蛍光強度を発する 1 分子を同定することができた。RhopH 複合体を構成する別のタンパク質 RhopH2 に特異的に反応する単クローン抗体 mAb#25 を用いた Alpha Screen 法によっても同様に有意に高い蛍光強度が得られた。

n	Signal detected with mAb#25					
	mAb#25			mAb#16 (Negative control)		
	1x	5x	10x	1x	Average	SD
n = 1	604	1256	64.3	944	37.8	292
n = 2	468	1320	66.5	732	36.9	296
n = 3	452	1228	62.5	772	32.3	288

更に、この反応の量反応関係を確かめたところ、マラリア原虫タンパク質量と蛍光強度との間に正の相関が認められた。



我々は以前に *P. yoelii* の PyRhopH 複合体が、赤血球表面の GPI アンカー型タンパク質に結合することを見いだしている (Rungruang et al., 2005)。本研究によって選択されたマウスタンパク質は GPI アンカー型タンパク質と予想されることから、PyRhopH 複合体に特異的に結合する赤血球側のレセプターである可能性が高く、現在、さらに詳細な解析を継続している。

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 2 件)

- ① Otsuki H, Kaneko O, Thongkukiattkul A, Tachibana M, Iriko H, Takeo S, Tsuboi T, Torii M. Single amino acid substitution in *Plasmodium yoelii* erythrocyte ligand determines its localization and controls parasite virulence. Proc Natl Acad Sci USA, in press (電子版 April 3 2009). 査読有
- ② Ghoneim A, Kaneko O, Tsuboi T, Torii M. The *Plasmodium falciparum* RhopH2 promoter and first 24 amino acids are sufficient to target proteins to the rhoptries. *Parasitol Int* 56:31-43 2007. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① Cao J, Kaneko O, Thongkukiattkul A, Tachibana M, Otsuki H, Tsuboi T, Torii M. A complex formation of rhoptry neck protein 2 with a microneme protein, AMA1, in *Plasmodium falciparum*. 57th ASTMH Annual Meeting, New Orleans, USA (December 7-11, 2008)
- ② Otsuki H, Kaneko O, Thongkukiattkul A, Tachibana M, Iriko H, Takeo S, Tsuboi T, Torii M. Erythrocyte-Binding-Like molecule and Virulence of *Plasmodium yoelii*. 19th Annual Molecular Parasitology Meeting, Woods Hole, USA (September 21-25, 2008)
- ③ 大槻均、金子修、入子英幸、竹尾暁、坪井敬文、Thongkukiattkul Amporn、鳥居本美。ネズミマラリア原虫の赤血球結合分子相同体 EBL の局在と病原性 第 77 回日本寄生虫学会大会、長崎市 (2008, 04, 3-4)

- ④ 曹俊、金子修、Thongkukiattkul Amporn、橋真由美、大槻均、坪井敬文、鳥居本美。A complex formation of rhoptry neck protein 2 with a microneme protein, AMA1, in *Plasmodium falciparum*. 第 77 回日本寄生虫学会大会、長崎市 (2008, 04, 3-4)
- ⑤ Cao J, Kaneko O, Thongkukiattkul A, Tachibana M, Otsuki H, Tsuboi T, Torii M. A complex formation of rhoptry neck protein 2 with a microneme protein, AMA 1, in *Plasmodium falciparum*. 第 6 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、松山 (2007. 10. 27-28)
- ⑥ Cao J, Kaneko O, Thongkukiattkul A, Tachibana M, Otsuki H, Sattabongkot J, Tsuboi T, Torii M. *Plasmodium falciparum* rhoptry neck protein (*PfRON2*) expressed at both erythrocytic and pre-erythrocytic invasive parasites. The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, (September 4-7, 2007)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳥居 本美 (TORII MOTOMI)
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 20164072

(2) 研究分担者

大槻 均 (OTSUKI HITOSHI)
愛媛大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 80403806

(3) 連携研究者

なし