

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06991

研究課題名（和文）マラリア原虫の受精に関与する雄分子PyMiGSと相互作用する雌性生殖体分子の同定

研究課題名（英文）Identification of the molecule that interacts with the male specific molecule, PyMiGS involved in malaria fertilization

研究代表者

橘 真由美 (Tachibana, Mayumi)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・助教

研究者番号：00301325

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：マラリア原虫は、哺乳動物宿主から媒介蚊に伝搬する際に蚊の中で有性生殖を行う。有性生殖期に発現する分子は、これまでに幾つか報告されているものの、受精に関わる分子メカニズムはほとんど明らかになっていない。本研究では、改良型近位依存性ビオチン標識(AirID)の手法を用いて、有性生殖期に特異的に発現する分子PyMiGSと相互作用する分子を探索することを行った。PyMiGSにAirIDを融合した原虫、およびコントロール原虫を作製し、ビオチン化した原虫をそれぞれ質量分析により解析した結果、既知の分子を含め、シグナルペプチドを有し、有性生殖期に発現されていると予測される約20種の分子の分離に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マラリア原虫は、哺乳動物宿主から媒介蚊に伝搬する際に蚊の中で有性生殖を行う。これらのステージで発現する分子は、蚊から宿主への伝搬を遮断する“伝搬阻止”の標的として注目されている。本研究では、近位依存性ビオチン標識の手法を用いて、有性生殖期に特異的に発現する分子PyMiGSと相互作用する分子を探索した。その結果、有性生殖期に発現されていると予測される約20種の分子の分離に成功した。MiGSを手掛りにした本研究は、解析が進んでいないマラリア原虫の受精のメカニズムを解く糸口となる可能性があり、分離された分子は、新たな伝搬阻止戦略の標的となることも期待される。

研究成果の概要（英文）：Plasmodium parasites undergo sexual reproduction in mosquitoes during transmission from the mammalian host to the Anopheles vector. Although several molecules expressed during sexual development have been reported, the molecular mechanisms of fertilization remain largely unknown. In this study, we used an improved proximity-dependent biotin identification (AirID) technique to search for molecules that interact with PyMiGS, specifically expressed in the sexual stage. We produced transgenic parasites fused with AirID to PyMiGS and control parasites, which were then biotinylated and analyzed by mass spectrometry. As a result, we succeeded in isolating about 20 molecules with a signal peptide which predicted to be expressed during the sexual stage.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア 雄性生殖母体 オスミオフィリックボディ 改良型近位依存性ビオチン標識 有性生殖

### 1. 研究開始当初の背景

マラリア原虫は、哺乳動物宿主から媒介蚊に伝搬する際に蚊の中で有性生殖を行う。吸血により蚊の消化管に取り込まれた雌雄の生殖母体は、中腸内で赤血球から脱出し、生殖体となる。精子に相当するミクロガメートが外に放出されると活発に運動し、雌性生殖体を見つけて、受精する(図1)。その後、オーキネートへと発育し、中腸上皮を穿通して基底膜でオーシストが形成される。有性生殖期に発現する分子は、これまで

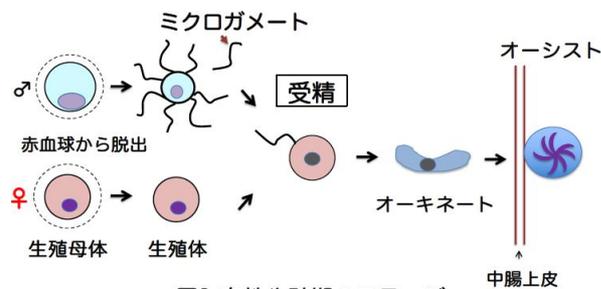


図1 有性生殖期のステージ

に幾つか報告されているものの、受精に関わる分子メカニズムはほとんど明らかになっていない。また、これらのステージの原虫表面に発現する分子は、蚊から宿主への伝搬を遮断する“伝搬阻止ワクチン”の標的抗原として注目されている。

研究代表者は、これまでにネズミマラリア原虫 (*Plasmodium yoelii*: Py) を用いて、雄の有性生殖期に特異的に発現する PyMiGS を同定した。この分子は、雄の生殖母体においてオスミオフィリックボディと呼ばれる細胞小器官、更には雄の生殖期ステージであるミクロガメートの虫体表面に発現する (Tachibana *et al. Cell Microbiol.* 2018)。抗 MiGS 抗体は、ミクロガメート表面に結合すると、次の発育ステージであるオーシストの形成を 99% 阻害し、MiGS が有力な伝搬阻止ワクチン候補抗原となり得る分子であることを明らかにした (Tachibana *et al. Vaccine* 2018, Tachibana *et al. Vaccine* 2020)。

PyMiGS の GPI アンカーを欠損した原虫では、ミクロガメート表面での発現が消失し、オーシスト数が激減することから、ミクロガメートの膜上にある MiGS が受精のステップに重要であることが示唆された (未発表)。

研究代表者は、雄性原虫であるミクロガメートの表面に発現し、且つ受精ステップにおいて重要な機能を有することが予測される PyMiGS を用いることで、この分子と相互作用する雌特異的な分子を見つけることができると考え、本研究を計画した。

### 2. 研究の目的

本研究は、マラリア原虫の受精時における分子間相互作用について解明するために、ミクロガメートの表面に発現する MiGS に着目し、この分子と相互作用する雌性生殖体側の分子を明らかにすることを目的とする。更に新たに分離された雌原虫(あるいは雄原虫)由来の分子が受精に関与しているのかについて解析を行い、マラリア伝搬阻止戦略への応用に繋げる。

### 3. 研究の方法

改良型ピオチンリガーゼ AirID を用いた BioID (近位依存性ピオチン標識) 法により、PyMiGS と相互作用する雌性生殖体分子を分離、同定する。

#### 1) PyMiGS::Agia tag/AirID 原虫、および Pys47::Agia tag/AirID 原虫の作製

PyMiGS 5'UTR 配列および 3'UTR 配列を含む PyMiGS の配列をもとに、PyMiGS のシグナル配列直後に Agia/AirID の配列を挿入した PyMiGS-AirID-N と C 末にある GPI アンカーの直後に Agia/AirID を挿入した PyMiGS-AirID-C を作製する。薬剤選択マーカーである hDHFR およびネガティブセレクションマーカーである cytosine deaminase/uridyl phosphoribosyl transferase (yFCU) で PyMiGS を置換した PyMiGS 欠損原虫を用い、トランスフェクションを行い、5-Fluorocytosine (5-Fc) を投与することで、hDHFR/yFCU カセットを PyMiGS-AirID-C あるいは PyMiGS-AirID-N に置換された原虫を作成する(図2)。また、薬剤耐性遺伝子(hDHFR)を含むプラスミドに Pys47 の C 末に Agia/AirID の配列を挿入した (Pys47 の 5'UTR および 3'UTR を含む) コンストラクトを作製し、Py 野生型原虫を用いてトランスフェクションを行い、ピリメサミン投与によりエピゾームに発現する Pys47::Agia tag/AirID 原虫 (コントロール原虫) を作成する。

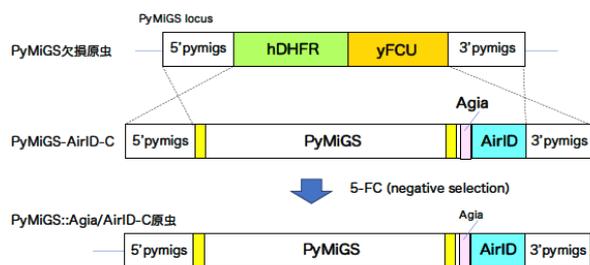


図2 PyMiGS::Agia/AirID-C原虫の作出方法

抗 Agia 抗体を用いたウェスタンブロットング法および間接蛍光抗体法 (IFA 法) により、組換え原虫の作出の評価を行う。

## 2) 組換え原虫のビオチン化の条件検討

ビオチンの投与方法として、静脈投与および飲料水から摂取させる方法を取り、生殖母体およびキサンツレン酸含む培養液により活性化された生殖体を集め、血液塗抹標本を作製する。ストレプトアビジンあるいは抗ビオチン抗体を用いたウェスタンブロッティング法および IFA 法により、ビオチン化が行われているかどうかを評価する。

## 3) 質量分析法による PyMiGS と相互作用する分子の同定

ビオチン化した PyMiGS::Agia/AirID 原虫および、ネガティブコントロールとして Pys47::Agia/AirID 原虫の生殖母体あるいは、活性化した生殖体を集め、グアニジン-TCEP-buffer でタンパク質を懸濁する。トリプシンで消化したペプチドはタマビジンビーズに吸着させ、1mM ビオチン/TBS で溶出する。PyMiGS::Agia/AirID 原虫におけるビオチン化ペプチド、またネガティブコントロールとして Pys47::Agia/AirID 原虫のビオチン化ペプチドを質量分析法により検出し、PyMiGS で有意にビオチン化されている分子を絞り込む。

## 4) 同定された分子のタグ(myc)原虫を作製し、性状解析

3) で上位にリストアップされた分子を選択し、C 末に myc タグを付加した原虫を作製する。発現プロファイル、局在などをウェスタンブロッティング法、IFA 法、免疫電顕法により解析する。

## 4. 研究成果

### 1) PyMiGS::Agia tag/AirID 原虫、および Pys47::Agia tag/AirID 原虫の作製

PyMiGS の N 末側に Agia/AirID の配列を挿入した PyMiGS::Agia/AirID-N 原虫、C 末に挿入した PyMiGS::Agia/AirID-C 原虫、また Pys47::Agia/AirID 原虫の作出に成功した。これらの生殖母体をサンプルとし、Agia タグに対する抗体を用いて、ウェスタンブロット法を行ったところ(図3) PyMiGS::Agia/AirID-C 原虫では、メジャーな3本のバンド(矢印)がそれぞれ37kDa ずつ高分子側へシフトしており、これらが Agia タグが融合した MiGS であるということが示された。しかしながら、N 末側に Agia/AirID を挿入した原虫においては、40kDa 程のバンドしか確認されず、Agia/AirID と MiGS の融合タンパク質と見られるものは確認できなかった。Pys47::Agia/AirID 原虫では、37kDa シフトした目的のバンド(矢印)が検出されたため、これをコントロール原虫として、PyMiGS::Agia/AirID-C 原虫のみを用いて以降の実験を行うこととした。更に、IFA 法により局在について確認したところ、PyMiGS::Agia/AirID-C 原虫の生殖母体では、野生型と同様に MiGS は雄のオスミオフィリックボディに局在することが確認できた一方で、ミクロガメート表面に局在していることを明確に示すことができなかった。そのため、この原虫を用いて、当初の目的であるミクロガメート上の MiGS と相互作用する雌側の分子を探索するということは困難であると判断し、まずは、雄の生殖母体内のオスミオフィリックボディにおいて相互作用する分子を探索するよう方向転換することにした。

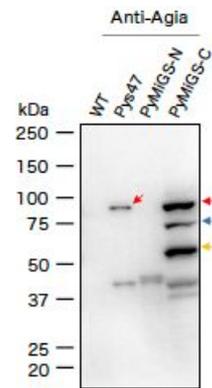


図3 Agia/AirIDを挿入した組換え原虫

## 2) 組換え原虫のビオチン化の条件検討

作出に成功した PyMiGS::Agia/AirID-C 原虫を用いて、ビオチン化の効率の良い投与方法を検討した。

感染マウスへ 静注によるビオチン投与(投与量の検討(25 $\mu$ M-500 $\mu$ M)、また投与後の経過時間の検討(1h-24h))あるいは ビオチンを含む飲料水による投与を行った後、回収した生殖母体をサンプルとしてウェスタンブロッティングによりビオチン化タンパク質を比較したところ、飲料水から投与する方がよりビオチン化されていることが示された。この条件下でビオチン化を行った PyMiGS::Agia/AirID-C 原虫においては、IFA 法により、PyMiGS の局在と同じ位置でビオチン化されていることが示され(図4) 電顕法においてもオスミオフィリックボディにビオチン化されているタンパク質があることが確認された(図5)。よって、目的の分子が効率よくビオチン化されていることが示唆された。

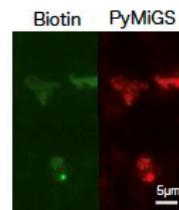


図4 ビオチン化した PyMiGS::Agia/AirID-C 原虫(雌性生殖母体)

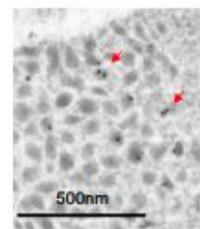


図5 袋状のオスミオフィリックボディ内にビオチン化されたタンパク質があることを電子顕微鏡で確認(粒子はビオチン抗体が反応している様子を示す)

## 3) 質量分析法により PyMiGS と相互作用する分子の同定

ビオチン含有の飲料水によりビオチン化した原虫(生殖母体)を回収したサンプル(PyMiGS::Agia/AirID-C および Pys47::Agia/AirID)を各3回分調製し、質量分析を行ったところ、4098種類のビオチン化ペプチドが同定され、1115種類のビオチン化タンパク質が定量された(図6)。それらのうち分泌タンパク質であることが予想されるシグナルペプチドを持つもの

が 99 分子あり、雄の分子である可能性が高いものが MiGS を除いて 3 分子、雌の分子である可能性が高いものが 19 分子であった。この 19 分子の中には、雌特異的なオスミオフィリックボディ分子である G377 やオーキネート分子である P25 や LAP family などが含まれており、ネガティブコントロールとして用いた雌分子である Pys47 との分子間相互作用がより優位であるため、PyMiGS との相互作用をする分子という観点からはランクが低くなっている。雄分子に予測される 3 分子のうち 2 分子は上位 30 位以内にランクされているため、この 2 つの分子が雄性生殖母体のオスミオフィリックボディに局在していることが示唆された。

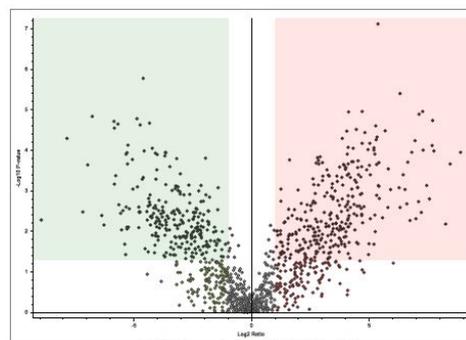


図6 Volcano plot (PyMiGS-C/Pys47)

#### 4) 同定された分子のタグ(myc)原虫の作製

3) で分離された分子の中で、雄分子であることが予測される 2 分子、さらには雌分子と予測される分子のうち、これまでに解析が行われていない分子を優先的に選び、C 末に myc タグを挿入した原虫を作製する。そのために、薬剤耐性カセット(TgDHFR/ts)を含んだトランスフェクション用のコンストラクトを作製した。現在までに 6 種のコンストラクト作製に成功している。

#### 5) まとめ

本研究では、雄性生殖母体、生殖体に特異的に発現する分子 PyMiGS を基盤とし、近位依存性ピオチン標識法を用いて、この分子と相互作用する、つまり、有性生殖期(受精)に発現する新規の分子の探索を試みた。当初の予定では、雄特異的な分子である PyMiGS と相互作用する雌分子を見つけることで、受精そのものの分子メカニズムの解明に迫ることを期待していたが、AirID/Agia を挿入することで、雄性生殖体(ミクロガメート)における MiGS の局在が変化してしまったため、実験計画を変更せざるを得なくなってしまった。しかしながら、雄性生殖母体においては、野生型原虫同様にオスミオフィリックボディと呼ばれる細胞小器官への局在が確認されたため、雄のオスミオフィリックボディに特異的に発現する分子をターゲットにして解析を進めることにした。生殖母体で効率よくピオチン化されたタンパク質を質量分析した結果、約 1000 種のタンパク質が分離された。その中で分泌タンパク質、または膜タンパク質などと予測され得る、シグナルペプチドを有する分子が約 100 種、更にその中で有性生殖期に発現されると予測される分子は雄が 3 種、雌が 19 種であった。これらの中には既知の分子が勿論含まれるが、十分な解析が行われていない分子や未知の分子も含まれることから、これらの分子を解析することで、有性生殖(受精)のメカニズムの解明に近づけると期待される。

## 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 3件）

1. 著者名 Miura K, Takashima E, Pham TP, Deng B, Zhou L, Huang W-C, Diouf A, Gebremicale YT, Tachibana M, Ishino T, Richter King C, Lovell JF, Long CA, Tsuboi T	4. 巻 13
2. 論文標題 Elucidating functional epitopes within the N-terminal region of malaria transmission blocking vaccine antigen Pfs230	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 NPJ Vaccines	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41541-021-00423-3	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 Miyata T, Minamihata K, Kurihara K, Kamizuru Y, Gotanda M, Obayashi M, Kitagawa T, Sato K, Kimura M, Oyama K, Ikeda Y, Tamaki Y, Lee JM, Sakao K, Hamanaka D, Kusakabe T, Tachibana M, Ibrahim HR.	4. 巻 195-196
2. 論文標題 Highly efficient protein expression of Plasmodium vivax surface antigen, Pvs25, by silkworm and its biochemical analysis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Protein Expr Purif.	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） 10.1016/j.pep.2022.106096.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nawapol Kunkeaw, Wang Nguitragoon, Eizo Takashima, Niwat Kangwanrangsarn, Hiromi Muramatsu, Mayumi Tachibana, Tomoko Ishino, Paulo J. C. Lin, Ying K. Tam, Sathit Pichyangkul, Takafumi Tsuboi, Norbert Pardi & Jetsumon Sattabongkot	4. 巻 8
2. 論文標題 A Pvs25 mRNA vaccine induces complete and durable transmission-blocking immunity to Plasmodium vivax	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 npj Vaccines	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41541-023-00786-9	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
1. 著者名 Huang WC, Mabrouk MT, Zhou L, Baba M, Tachibana M, Torii M, Takashima E, Locke E, Plieskatt J, King CR, Coelho CH, Duffy PE, Long C, Tsuboi T, Miura K, Wu Y, Ishino T, Lovell JF	4. 巻 1
2. 論文標題 Vaccine co-display of CSP and Pfs230 on liposomes targeting two Plasmodium falciparum differentiation stages	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Commun Biol.	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-03688-z	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Mayumi Tachibana, Minami Baba, Motomi Torii, Tomoko Ishino
2. 発表標題 PyMiGS on the microgamete surface is involved in fertilization
3. 学会等名 The 21st Protein Island Matsuyama international Symposium (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nawapol Kunkeaw, Wang Nguitrageol, Eizo Takashima, Niwat Kangwanrangsang, Hiromi Muramatsu, Mayumi Tachibana, Tomoko Ishino, Paulo J. C. Lin, Ying K. Tam, Sathit Pichyangkul, Takafumi Tsuboi, Norbert Pardi, Jetsumon Sattabongkot
2. 発表標題 Development of a potent Pvs25 mRNA vaccine to block transmission of Plasmodium vivax
3. 学会等名 The 21st Protein Island Matsuyama international Symposium (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------