

令和元年6月19日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15678

研究課題名(和文) GAMA-MSP10相互作用の熱帯熱マラリア原虫赤血球侵入における役割

研究課題名(英文) The interaction between GAMA and MSP10 plays an important role in *P.falciparum* erythrocyte invasion

研究代表者

長岡 ひかる (Nagaoka, Hikaru)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・研究員

研究者番号：10757222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：熱帯熱マラリア原虫赤血球侵入型メロゾイトに存在し、赤血球への侵入に関与していることが考えられるMSP10およびGAMA分子の機能解明を目的として研究を進めた。まず、MSP10およびGAMA分子を5つおよび8つの分断領域に分け、これら分断体を抗原としてウサギに免疫して抗体を作成し、原虫に対する増殖阻害試験を行った。その結果から、GAMAではC末端側に位置する領域、MSP10ではN末端側に位置する領域に侵入阻害活性が認められ、抗原の最小化に成功した。本研究により、ワクチン候補抗原分子の最適化に関する新たな手法を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規マラリアワクチン候補抗原分子の断片領域の抗体を用いて、マラリア原虫に対する増殖阻害活性を測定した結果と、タンパク質間相互作用の生化学的解析の結果を比較して考察したことにより、赤血球侵入における原虫タンパク質複合体の分子機能に対する新たな知見を得られた。また、限局した領域に原虫増殖阻害活性を認めたことで抗原分子の最小化に成功し、本研究からワクチン候補抗原分子の最適化に貢献することができる研究成果を得た。

研究成果の概要(英文)：Our research was to elucidate the functions of *P.falciparum* MSP10 and GAMA. These proteins, that expressed by the merozoites, the invasive form malaria parasite, may be involved in erythrocyte invasion.

First, MSP10 and GAMA were each synthesized as five and eight truncates, used to raise antibodies in rabbits, and subsequently the antibodies were used for growth inhibition tests against *P.falciparum*. As a result, C terminal region of GAMA were observed to have invasion inhibitory activity as well as the N terminal region of MSP10. In conclusion, This study consolidates our new approaches towards optimization of vaccine candidates antigen discovery.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア タンパク質相互作用 ワクチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マラリアは、ここ数年マラリアによる死亡者数は減少傾向に転じ、エリミネーションが視野に入ってきた。しかしマラリア罹患率の減少による集団免疫の低下が問題視されており、そのため赤血球期マラリアワクチンの必要性がより一層高まっている(Tsuboi T, Takashima E. 2015, *Lancet infect Dis*, WHO, 2016, *Eliminating Malaria*)。赤血球期ワクチンの候補抗原探索の一環として、また「なぜ、どのように赤血球に侵入するのか?」という寄生虫学の根幹的疑問に答えるため、熱帯熱マラリア原虫メロゾイトの赤血球侵入分子機構に関する研究は数多くの寄生虫学者の興味をそそってきた。この分野における最近の大きな発見は、Rh5 と呼ばれる原虫リガンド分子が、赤血球表面の Basigin (CD147) 分子と結合し、原虫の赤血球侵入に重要な役割を果たす事が発見された事である。そのため Rh5 は赤血球期ワクチン候補抗原として注目されている(Wright et al. 2014, *Nature*)。近年申請者らは、赤血球期ワクチンの候補抗原探索の一環として148種のウサギ抗体における原虫増殖阻害活性を比較した。その結果、抗GAMA抗体は、抗Rh5抗体と遜色ない原虫増殖阻害活性を持つことが明らかになった。またGAMAはメロゾイト表面に局在し、赤血球表面に結合する活性を持つ。このことからGAMAは赤血球期ワクチンの重要な候補抗原であると共に、原虫の赤血球侵入機構を理解する上で重要な分子であると考えられた。そこで我々はGAMAの分子機能を探るため、免疫沈降やBiacoreでGAMAと相互作用するタンパク質分子の同定を試みた。その結果、GAMAはMSP10と直接相互作用することがわかった。そこで申請者はGAMA-MSP10相互作用がメロゾイトの赤血球侵入にどのような意義を持つのかを解明すれば、新たな赤血球侵入機構の発見につながると考え、本研究を着想した。

2. 研究の目的

GAMA-MSP10相互作用がメロゾイトの赤血球侵入にどのような意義を持つのか検証する事を目的に、次に述べる三項目を実施した。1. GAMA トランケートタンパク質の調製とウサギ抗体の作製、2. 抗GAMA トランケート抗体によるGAMA-MSP10相互作用阻害活性の測定、3. 抗GAMA トランケート抗体の原虫増殖阻害活性の測定。

3. 研究の方法

GAMA-MSP10相互作用の赤血球侵入における生理的意義を明らかにするために、まずGAMAおよびMSP10分子のトランケートタンパク質をコムギ無細胞合成系で合成した。これらのタンパク質を用いて赤血球結合試験を行い赤血球侵入に関与している部分を探索した。さらにこれらの分断体を用いてウサギに免疫し、抗体を作成した後に、熱帯熱マラリア原虫に対する増殖阻害活性の測定しどの領域が赤血球侵入時に関与しているのか見出した。

4. 研究成果

(1) GAMA および MSP10 分断体抗体の作製

GAMAは全長738アミノ酸からなる、GPIアンカータンパク質で、中心にアスパラギンが連続するアスパラギンリッチドメイン、またC末側に赤血球表面と結合できるドメインがある。本研究計画では、アスパラギンリッチドメインを除いた領域から合計8つのGAMAトランケート分子を調製した。これら8つのトランケート分子を、GSTタグ融合タンパク質としてコムギ無細胞系によって合成し、タグを利用することによって精製した。これをウサギに免疫することで抗体を作製した。

MSP10は全長524アミノ酸からなる、GPIアンカータンパク質で、他のMSPタンパク質との相同性によりMSP10と名付けられている。C末側にEGF-likeドメインがあり、シグナル配列を除いた領域から合計5つのMSP10トランケート分子を調製し、MSP10分断体と同様にウサギに免疫して抗体を得た。

(2) 抗原反応性の確認および熱帯熱マラリア原虫に対する増殖阻害試験

原虫抗原に対する反応性の確認をウェスタンブロットによって行ったところ、全ての抗体が原虫ライセート内の抗原を特異的に認識した。そこで、各トランケート抗体を用いて、熱帯熱マラリア原虫に対する増殖阻害活性を測定した。その結果、GAMA分子ではC末端側に位置する領域、MSP10分子ではN末端側に位置する領域へ侵入阻害活性が認められ、両分子が赤血球侵入になんらかの形で関与してすることが確認された。またGAMA分子に関しては、全長抗体に対する抗体よりも最小化した分断抗体に全長抗体よりも強い増殖阻害活性が認められ、抗原の最小化に成功した。本研究からワクチン候補抗原分子の最適化に貢献することができる研究成果が得られた。

(3) 赤血球結合試験

赤血球侵入に何らかの形で関与していることが示唆されたGAMAおよびMSP10分子の赤血球侵入における作用機構を明らかにするため、作成した分断体を用いて赤血球結合試験を試みた。赤血球結合試験の手法は既報の文献を参考にし、コムギ無細胞タンパク質合成系で作成した組換えタンパク質を用い、酵素処理および酵素未処理の赤血球で行った。その結果、両分子ともに赤血球結合能が確認されたとともに、シアル酸非依存の様式で赤血球表面に結合することが

示唆された。さらに GAMA 分子では C 末端側に位置する領域、MSP10 分子では N 末端側に位置する領域が赤血球結合能を示した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

PfMSA180 is a novel *Plasmodium falciparum* vaccine antigen that interacts with human erythrocyte integrin associated protein (CD47)., Nagaoka H, Sasaoka C, Yuguchi T, Kanoi BN, Ito D, Morita M, Udomsangpetch R, Sattabongkot J, Ishino T, Tsuboi T, Takashima E., Scientific reports 9(1) 5923 2019年4月.

Identification of domains within Pfs230 that elicit transmission blocking antibody responses., Tachibana M, Miura K, Takashima E, Morita M, Nagaoka H, Zhou L, Long CA, Richter King C, Torii M, Tsuboi T, Ishino T., Vaccine 37(13) 1799-1806 2019年3月
Anti-MSP11 IgG inhibits *Plasmodium falciparum* merozoite invasion into erythrocytes in vitro. Tohmoto T, Takashima E, Takeo S, Morita M, Nagaoka H, Udomsangpetch R, Sattabongkot J, Ishino T, Torii M, Tsuboi T., Parasitology international 69 25-29 2018年10月.

Comprehensive analysis of antibody responses to Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 domains., Kanoi BN, Nagaoka H, Morita M, White MT, Palacpac NMQ, Ntege EH, Balikagala B, Yeka A, Egwang TG, Horii T, Tsuboi T, Takashima E., Vaccine 36(45) 6826-6833 2018年10月.

PV1, a novel Plasmodium falciparum merozoite dense granule protein, interacts with exported protein in infected erythrocytes., Morita M, Nagaoka H, Ntege EH, Kanoi BN, Ito D, Nakata T, Lee JW, Tokunaga K, Iimura T, Torii M, Tsuboi T, Takashima E., Scientific reports 8(1) 3696 2018年2月.

〔学会発表〕(計 7 件)

熱帯熱マラリアワクチン候補分子 Ripr における増殖阻害活性エピトープの同定, 長岡ひかる, カノイ・バーナード, シテゲ・エドワード, 福島晃久, 坪井敬文, 高島英造, 日本寄生虫学会, 2019年, 長崎.

PfRipr_5: a potent blood-stage malaria vaccine candidate antigen, Hikaru Nagaoka, Bernard N. Kanoi, Akihisa Fukushima, Edward Ntege, Takafumi Tsuboi, Eizo Takashima, American Society of Tropical Medicine and Hygiene 67th Annual Meeting (国際学会), 2018. New Orleans, USA.

Identification of PfRipr_5 as a potent blood-stage malaria vaccine candidate, Hikaru Nagaoka, Bernard N. Kanoi, Akihisa Fukushima, Edward Ntege, Takafumi Tsuboi, Eizo Takashima, ICOPA 2018 14th International congress of parasitology (国際学会), 2018. Daegu, Korea.

マラリアワクチン候補 R1PR の赤血球侵入における分子機能の解明, 長岡ひかる, 高島英造, カノイ・バーナード, シテゲ・エドワード, 坪井敬文日本寄生虫学会, 2018年, 東京.

Truncation of PfRipr reveals region that induces antibody with the most potent growth inhibitory activity against Plasmodium falciparum, Hikaru Nagaoka, Eizo Takashima, Akihisa Fukushima, Edward Ntege, Takafumi Tsuboi, American society of tropical medicine and hygiene (国際学会), 2017. Baltimore, USA.

Ripr を中心としたタンパク質相互作用解析, 長岡ひかる, 高島英造, Edward Ntege, 坪井敬文, 分子寄生虫ワークショップ&分子寄生虫・マラリア研究フォーラム, 2017年, 帯広.
熱帯熱マラリアワクチン候補分子 Ripr の CyRPA との相互作用領域の同定, 長岡ひかる, 高島英造, Edward Ntege, 坪井敬文, 日本寄生虫学会, 2017年, 札幌.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。