

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02651

研究課題名(和文) PfEMP1ドメイン網羅的アプローチによるシークエストレーション分子機構の解明

研究課題名(英文) Functional analysis of PfEMP domains with the endothelial cell surface protein array

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) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：熱帯熱マラリア原虫ゲノムには271個のPfEMP1ドメインがコードされている。これが血管内皮細胞表面タンパク質と結合するとシークエストレーションが惹起され、重症マラリア発症につながる。最近申請者は当該ドメイン全てを発現し、免疫スクリーニングでマラリア発症阻止に重要なドメイン17個を絞り込んだ。本研究ではアルファスクリーンを用いて17個の重要PfEMP1ドメインと血管内皮細胞表面タンパク質との結合を網羅的に探索した。さらに哺乳類細胞で発現させた組換えタンパク質を用いてSPR、プルダウンアッセイを行うことでタンパク質相互作用を検証することで新規なPfEMP1結合ヒトタンパク質を同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

熱帯熱マラリアは毎年40万人以上が死亡する重篤な感染症である。重症マラリアは昏睡・重症貧血等を合併した熱帯熱マラリアであり、高い致死率が問題となっている。成熟した原虫の寄生する赤血球が末梢血管壁に接着するシークエストレーションは、重症マラリアの発症に直接関与していると考えられている。そのためこの分子メカニズムを明らかにすることが重要である。本研究では感染赤血球表面の原虫タンパク質が認識する、新たなヒトタンパク質の探索に成功した。これは重症マラリア治療法の開発や、新規マラリアワクチンの開発などに発展できる成果である。

研究成果の概要(英文)：Plasmodium falciparum parasites possess 62 var genes that encode about 271 PfEMP1 domains. The binding of these domains to endothelial cell surface proteins causes erythrocytes sequestration, which leads to complicated malaria. We recently expressed all of the domains with a wheat germ cell-free system and identified 17 domains whose antibodies levels negatively correlate with reduced risk to symptomatic disease in a malaria exposed population. Therefore, understanding the role of these 17 domains in host-parasite interactions is of great interest in elucidating the factors underlying complicated malaria. To this end, this study used 17 PfEMP1 domains to comprehensively screen a library of endothelial cell surface proteins for potential interacting partners. Top hits were evaluated for interaction using SPR and pull-down assays. As an outcome, we successfully identified and confirmed that a novel human protein interacts with one of the potentially sero-protective PfEMP1 domain.

研究分野：分子寄生虫学

キーワード：重症マラリア PfEMP1 タンパク質相互作用

1. 研究開始当初の背景

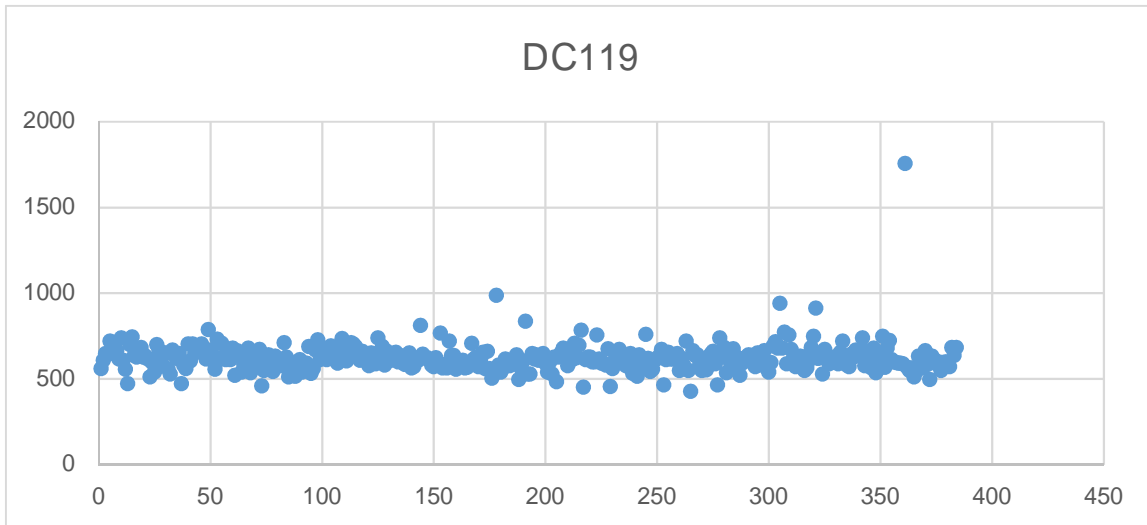
熱帯熱マラリアは毎年 40 万人以上が死亡する重篤な感染症である。重症マラリアは昏睡・重症貧血等を合併した熱帯熱マラリアであり、高い致死率が問題となっている。成熟した原虫の寄生する赤血球が末梢血管壁に接着するシークエストレーションは熱帯熱マラリア特異的であることから、重症マラリアの発症に関与していると考えられている。シークエストレーションは、感染赤血球の表面から突き出た熱帯熱マラリア原虫分子 PfEMP1 が血管内皮細胞表面タンパク質と結合することで起きる。熱帯熱マラリア原虫 3D7 株ゲノム中には 61 種類の PfEMP1 遺伝子がコードされており、その中から 1 種類の PfEMP1 分子を入れ替わり立ち替わり発現することで、宿主免疫から逃れながらシークエストレーションを可能にしている。3D7 株がコードする 61 種類の PfEMP1 はそれぞれ 100~350 kDa の大きさで、2~9 個の宿主タンパク質結合ドメイン (PfEMP1 ドメイン) がタンデムに連結した構造である。つまり 3D7 株は合計で 271 個の PfEMP1 ドメインをコードしている。PfEMP1 ドメインは大きく分けて Duffy Binding Like (DBL)、Cysteine rich Inter Domain Region (CIDR) の二種類があり、さらに中分類 (ギリシャ文字) 小分類 (数字) された結果 DBL 3、CIDR 1 など約 200 種類のサブタイプに分類されている。これまでは、複雑な PfEMP1 分子の中で、高頻度で隣同士になるドメインペアを 23 種類のドメインカセットとして定義し、これを機能単位とした研究が行われてきた (Duffy, 高島ら 2016 *Malar J*)。しかし近年の研究から DBL 3 は ICAM1、CIDR 1 は EPCR と結合するというように、個々のドメインが独立かつ同時に機能している事が示唆されており、DC 以外の個別ドメインを無視したこれまでの研究では、PfEMP1 の分子機能の総体は解析できていないと考えられた。そこで本研究は、PfEMP1 ドメインと血管内皮表面タンパク質の結合を全て解析することで、PfEMP1 分子の真の分子機能を明らかにし、シークエストレーションの分子論的理解を目指す。

2. 研究の目的

ドメイン網羅的な解析をするため、我々は世界に先駆けてコムギ無細胞系を用いて機能単位である 271 個の PfEMP1 ドメイン全てを個別に発現させた。続いて最近確立したハイスループットな抗体価測定系を用いて (Kanoi, 高島ら 2017 *Vaccine*; 森田, 高島ら 2017 *Sci Rep*)、6-20 歳のウガンダ人に熱帯熱マラリア防御免疫を誘導する 17 種の重要 PfEMP1 ドメイン を新規に同定した。流行地では重症マラリアに対する免疫を 5 歳未満で獲得することから、これら重要 PfEMP1 ドメインの抗体は重症マラリア防御にも関与すると考えられる。本研究では、これら 17 個の重要 PfEMP1 ドメインの分子機能の解明を目的に、血管内皮細胞表面、赤血球表面のタンパク質との相互作用を探索する。現在未解明の、脳、肺、腎臓、骨髄などで起きる臓器特異的なシークエストレーションの分子機構が本研究により解明されれば、将来の重症マラリアに対する有効な治療法や、高リスク患者の迅速診断法の確立への一步となる。

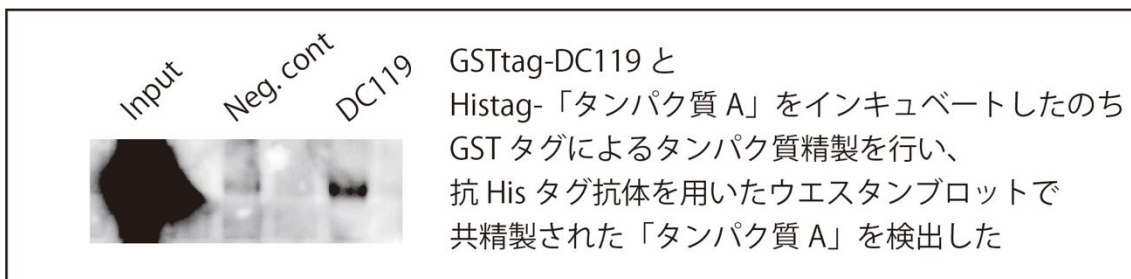
3. 研究の方法

血管内皮細胞表面タンパク質アレイ (Endothelial cell Surface Protein Array, ESPA) の作製 当研究センターの 2 万ヒトタンパク質アレイ (20K-HUPA) から、血管内皮細胞表面に発現するタンパク質 176 個を抜き出して ESPA を作成する。



結合特異性の検証

アルファスクリーンの結果から、DC119 とタンパク質 A との相互作用を解析することにした。コムギ無細胞系では糖鎖が付加されず、ヒトタンパク質の機能が十分に再現できない可能性があることから、ヒト培養細胞を用いて発現させた組換えタンパク質 A を用いて Biacore による SPR 解析を行った。その結果 DC119 は当該タンパク質 A と $KD = 3 \times 10^{-8} \text{ M}$ で相互作用することが明らかになった。さらにプルダウンアッセイを行い、この相互作用の検証を行った(下図)。以上により、本研究で新たなタンパク質相互作用を同定することに成功した。



タンパク質 A はヘテロダイマータンパク質であるが、アルファスクリーンではその片方サブユニットのみに反応が見られた。今後は本反応に関わるドメインの同定、またタンパク質 A をベイトとして用い、さらなる新規相互作用を同定していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 7件）

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) 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, 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) 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

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) 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 Kanoi Bernard N., Nagaoka Hikaru, Morita Masayuki, White Michael T., Palacpac Nirianne M. Q., Ntege Edward H., Balikagala Betty, Yeka Adoke, Egwang Thomas G., Horii Toshihiro, Tsuboi Takafumi, Takashima Eizo	4. 巻 36
2. 論文標題 Comprehensive analysis of antibody responses to Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 domains	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 6826 ~ 6833
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vaccine.2018.08.058	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 該当する

1. 著者名 Yuguchi Takaaki, Kanoi Bernard N., Nagaoka Hikaru, Miura Toyokazu, Ito Daisuke, Takeda Hiroyuki, Tsuboi Takafumi, Takashima Eizo, Otsuki Hitoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Plasmodium yoelii Erythrocyte Binding Like Protein Interacts With Basigin, an Erythrocyte Surface Protein	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2021.656620	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 Nagaoka Hikaru, Kanoi Bernard N., Morita Masayuki, Nakata Takahiro, Palacpac Nirianne M.Q., Egwang Thomas G., Horii Toshihiro, Tsuboi Takafumi, Takashima Eizo	4. 巻 80
2. 論文標題 Characterization of a Plasmodium falciparum PHISTc protein, PF3D7_0801000, in blood- stage malaria parasites	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102240 ~ 102240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2020.102240	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 Kanoi Bernard N., Nagaoka Hikaru, Morita Masayuki, Tsuboi Takafumi, Takashima Eizo	4. 巻 80
2. 論文標題 Leveraging the wheat germ cell-free protein synthesis system to accelerate malaria vaccine development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102224 ~ 102224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2020.102224	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 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 6573-6573
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 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 Ito Daisuke, Takashima Eizo, Yamasaki Tsutomu, Hatano Shinya, Hasegawa Tomoyuki, Miura Kazutoyo, Morita Masayuki, Thongkukiatkul Amporn, Diakite Mahamadou, Long Carole A., Sattabongkot Jetsumon, Udomsangpetch Rachanee, Iriko Hideyuki, Ishino Tomoko, Tsuboi Takafumi	4. 巻 68
2. 論文標題 Antibodies against a Plasmodium falciparum RON12 inhibit merozoite invasion into erythrocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 87~91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2018.10.006	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 Tohmoto Tatsuhiro, Takashima Eizo, Takeo Satoru, Morita Masayuki, Nagaoka Hikaru, Udomsangpetch Rachanee, Sattabongkot Jetsumon, Ishino Tomoko, Torii Motomi, Tsuboi Takafumi	4. 巻 69
2. 論文標題 Anti-MSP11 IgG inhibits Plasmodium falciparum merozoite invasion into erythrocytes in vitro	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 25~29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2018.10.012	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 Miura Kazutoyo, Tachibana Mayumi, Takashima Eizo, Morita Masayuki, Kanoi Bernard N., Nagaoka Hikaru, Baba Minami, Torii Motomi, Ishino Tomoko, Tsuboi Takafumi	4. 巻 18
2. 論文標題 Malaria transmission-blocking vaccines: wheat germ cell-free technology can accelerate vaccine development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Expert Review of Vaccines	6. 最初と最後の頁 1017~1027
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14760584.2019.1674145	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 該当する

1. 著者名 Ito Daisuke, Chen Jun-Hu, Takashima Eizo, Hasegawa Tomoyuki, Otsuki Hitoshi, Takeo Satoru, Thongkukiatkul Amporn, Han Eun-Taek, Tsuboi Takafumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Identification of a Novel RAMA/RON3 Rhoptry Protein Complex in Plasmodium falciparum Merozoites	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2020.605367	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12件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 12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 Liu Z, Takashima E, Harbers M, Tsuboi T, White M, Sattabongkot J, Longley R, Mueller I
2. 発表標題 Defining naturally acquired antibody kinetics against <i>Plasmodium vivax</i> antigens in a region of low malaria transmission in western Thailand.
3. 学会等名 7th International Conference on <i>Plasmodium vivax</i> Research, Paris, France, (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mazhari R, Kanoi BN, White M, Takashima E, Nagaoka H, Longley R, Tsuboi T, Mueller I
2. 発表標題 Association between antibody responses to <i>Plasmodium vivax</i> and protection against clinical malaria in a longitudinal cohort of Papua New Guinean children.
3. 学会等名 7th International Conference on <i>Plasmodium vivax</i> Research, Paris, France, (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 Plasmodium falciparum 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 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 Human antibody repertoires to RIFINs and STEVORs associate with reduced risk to febrile malaria.
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 Kanoi BN, Nagaoka H, Morita M, White MT, Palacpac NMQ, Ntege EH, Balikagala B
2 . 発表標題 Genome-scale analysis of naturally acquired antibody responses to PfEMP1 domains
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 Kanoi BN, Nagaoka H, Morita M, White MT, Palacpac NMQ, Ntege EH, Balikagala B, Yeka A, Egwang TG, Horii T, Tsuboi T, Takashima E
2 . 発表標題 Naturally acquired antibody responses to PfEMP1 domains reveal potential protective targets of immunity in malaria
3 . 学会等名 14th International Congress of Parasitology, Daegu City, Korea, August 19-24, 2018 (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

1. 発表者名 Takashima E, Kanoi BN, Nagaoka H, Morita M, White MT, Palacpac NMQ, Ntege EH, Balikagala B, Yeka A, Egwang TG, Horii T, Tsuboi T.
2. 発表標題 Comprehensive analysis of antibody responses to full-length PfEMP1 domains
3. 学会等名 ASTMH 67th annual meeting, New Orleans, USA, October 28-November 1, 2018. (国際学会)
4. 発表年 2018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 Naung M, Mazhari R, Wong W, Takashima E, Tsuboi T, Mueller I, Barry AE
2. 発表標題 Differential patterns of naturally acquired immune responses to 28 Plasmodium falciparum vaccine antigens with various levels of genetic diversity.
3. 学会等名 8th conference on Genomic Epidemiology of Malaria (GEM Virtual Conference), Wellcome Trust Scientific Conferences and Events, June 7-9, 2021. (国際学会)
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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