

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：30108

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06528

研究課題名(和文) マラリア原虫が持つ四重包膜オルガネラ内へのタンパク質輸送メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanisms of protein transport into the quadruplex membrane organelle of Plasmodium falciparum

研究代表者

齊藤 貴士 (Saitoh, Takashi)

北海道科学大学・薬学部・准教授

研究者番号：00432914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マラリア原虫は四重包膜に囲まれた色素体:アピコプラストを持つ。ここで使用される蛋白質の大部分は細胞質で合成された後、様々な膜透過関連蛋白質によりアピコプラスト内へと運ばれる。本研究ではアピコプラスト蛋白質と膜透過関連蛋白質：Tic22の相互作用機構の解明を目指した。その結果Tic22がシグナル配列やトランジット配列ではなく、蛋白質本体を認識していることを明らかにしてきた。また詳細な情報を得るため、蛋白質本体をペプチド鎖に分解しインシリコスクリーニングでTic22に結合する領域の探索を行った。ここから得られた情報を基にペプチドを合成しバイオレイヤー干渉法でTic22との相互作用を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マラリア感染症は早急に人類が克服すべき疾病であり、発展途上国を中心に毎年およそ3億人が感染し年間約50万人の命を奪っている。研究対象であるアピコプラストはマラリア原虫の生存に必須の細胞小器官であり、新たな創薬ターゲットとして注目されている。本研究から得られたアピコプラスト蛋白質とTic22蛋白質の相互作用についての知見は、今後の新機構マラリア薬の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Plasmodium falciparum has a plastid called apicoplast, which is surrounded by a quadruple envelope. Most of the proteins used in the apicoplast are synthesised in the cytoplasm and then transported into the apicoplast by various translocators. In this study, we aimed to investigate the interaction mechanism between apicoplast proteins and Tic22, one of the proteins constituting the translocators. As a result, it has been revealed that Tic22 recognised the protein main body, not the signal or transit sequences. In order to obtain more detailed information, the protein was divided into peptide chains and in silico screening was carried out to identify the region that binds to Tic22. Based on the information obtained, peptides were synthesised and their interaction with Tic22 was confirmed by the biolayer interferometry method.

研究分野：生物物理

キーワード：蛋白質間相互作用 マラリア

1. 研究開始当初の背景

マラリア感染症はエイズ、結核と並んで世界の3大感染症に挙げられ、早急に人類が克服すべき疾病である。発展途上国を中心に、毎年およそ3億人が感染し、年間約50万人の命を奪っている。近年、クロロキンなどの市販されている抗マラリア薬に耐性を持つマラリア原虫が蔓延して問題となっていることから、新たな作用機序での薬の開発が急務となっており、日本の貢献が期待されている。マラリア感染症を引き起こすマラリア原虫はアピコンプレックス門に属し、細胞内に取り込んだ紅色植物の葉緑体が退化したと考えられている四重包膜に囲まれた二次共生色素体：

アピコプラストを持つ(図1)。四重包膜のうち、外側は小胞体膜と共生体の細胞膜由来、内側の二膜は紅色植物由来と考えられている。アピコプラストは脂肪酸などの生合成反応の場として機能しておりマラリア原虫の生存に必須であり、新たな創薬ターゲットとして注目されている。アピコプラストは光合成能力は失われており、独自のゲノムDNAを持っているにもかかわらず一部の遺伝子しか残していない。すなわちアピコプラストで使用されるタンパク質(アピコプラスト蛋白質)の大部分は核ゲノムDNAにコードされている。よって、アピコプラスト蛋白質は小胞体で合成された後、本申請で研究対象とするTic22タンパク質など様々な膜透過関連タンパク質の助けをかりて四つの膜を通過しアピコプラスト内へと運ばれていく。これらマラリア原虫アピコプラストのタンパク質の構造生物学的研究は代表者らの報告をはじめ近年増加傾向にあるものの、アピコプラスト蛋白質間の相互作用ネットワークについては未解明の部分はまだ多く残っている。

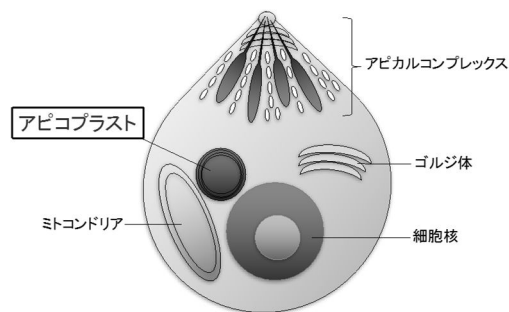


図1. マラリア原虫の模式図

2. 研究の目的

本研究では、アピコプラスト蛋白質と膜透過関連タンパク質との相互作用について、分光学的手法と物理化学的手法を組み合わせた多面的解析手法により原子レベルで解析し、そのタンパク質輸送メカニズムについて解明することをめざしている(図2)。特に、膜透過関連タンパク質として葉緑体由来の二重膜の間でアピコプラスト蛋白質輸送の一翼を担うTic22タンパク質に着目した。アピコプラスト蛋白質は細胞質で合成される際、N末端にアピコプラストへ輸送されるための情報が書かれたシグナル配列とトランジット配列が付加された状態で合成される。これまでの研究から表面プラズモン共鳴(SPR)法を用いた研究により、Tic22はシグナル配列やトランジット配列を認識するのではなく、アンフォールド状態の前駆体タンパク質本体を認識している予備的な実験結果を得ていた。そこで本研究ではより詳細な相互作用メカニズムを追求するため、アピコプラスト蛋白質本体をペプチドに分断することで、Tic22が認識するより詳細な領域の同定を行い、メカニズムの解明に向けた知見を得ることを目的とした。

アピコプラストは、マラリア原虫をはじめとするアピコンプレックス門のみがもつ葉緑体由来のオルガネラであり、本研究で解明を目指すタンパク質輸送では、他の生物種では見ることのできない分子認識メカニズムが使われている可能性がある。これまでのところ、この分野における物理化学的手法による研究は未発展であり、今後急速に発展していくと予想している。マラリア原虫がこのような細胞内小器官を持ちヒトとは異なる原核生物型の生合成反応系を持つことから、アピコプラストへ輸送されるタンパク質の四重包膜透過メカニズムを解明することは、ヒトへの副作用の少ない抗マラリア薬の開発に対し重要な情報を提供できる。

3. 研究の方法

アピコプラストへのタンパク質輸送では、葉緑体由来の第一、第二膜の透過と内部共生体細胞膜由来の第三、最外膜の透過に大きく分けられる(図2)。本研究では、葉緑体膜由来の膜透過の過程でアピコプラスト蛋白質を認識するTic22タンパク質の可溶性ドメインを研究の主なターゲットとし、アピコプラスト蛋白質との相互作用メカニズム解明を目指した。本研究で使用するTic22蛋白質の可溶性ドメインについて、研究代表者が確立したTic22タンパク質の大腸菌による大量発現系と、精製法を用いた。このTic22可溶性ドメインについて¹⁵Nラベルサンプルを用いNMRスペクトル測定を行った結果、良好なスペクトルが得られたことから三次元構造が維持されていることは確認済みである。

Tic22が認識するアピコプラスト蛋白質は膜透過の過程でアンフォールド状態を維持している必要がある。そこで本研究では、アピコプラスト内での電子伝達を担う電子伝達タンパク質；

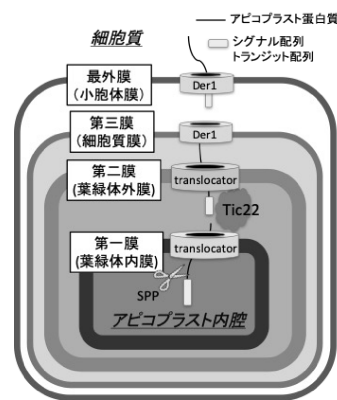


図2. アピコプラスト蛋白質の膜透過の模式図
小胞体で合成されたタンパク質は内部共生体細胞膜由来の第三、最外膜と葉緑体由来の第一、第二膜と透過しアピコプラスト内腔へと輸送される。

マラリア原虫フェレドキシン (PfFd) を採用した。本研究で用いる PfFd は研究分担者である木股より大腸菌による発現、精製が行われ提供された。PfFd は補因子として [2Fe-2S] クラスタを持つ。よって [2Fe-2S] クラスタをキレート剤で取り除く (Apo-PfFd) ことでアンフォールド状態を維持できる。実際、Apo-PfFd の CD スペクトルを測定した結果、アンフォールド状態を維持していくことが確認できた (図3)。

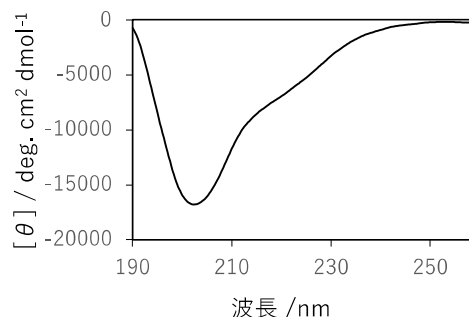


図3. Apo-PfFdのCDスペクトル

これまでの実験結果に加え、本研究ではバイオレイヤー干渉 (BLI) 法によって Tic22 と Apo-PfFd の相互作用について解析したが、相互作用を確認することができなかった。そこで PfFd を 5 および 10 残基のペプチド断片に分解し、それぞれのペプチドに対しインシリコスクリーニングを実施した。このインシリコスクリーニングから相互作用している可能性の高い領域を 4 箇所同定し、これらのペプチドを合成依頼した。これらのペプチドにおいて再度 BLI 法による相互作用解析を実施した。

4. 研究成果

本研究ではアピコプラスト蛋白質の一つである PfFd を用いて、Tic22 によるアピコプラストタンパク質の認識領域の同定を行った。PfFd 全長における BLI 法では明確な相互作用を確認することができなかったが、インシリコスクリーニングにより、アミノ酸配列状で 4 箇所の候補を同定することに成功した。これらのペプチドを合成し BLI 法において Tic22 との相互作用を再度 BLI 法を用いて確認したところ、全てのペプチドにおいて Tic22 との相互作用を確認することができた (図4)。すなわち、本研究で実施したインシリコスクリーニングと BLI 法を組み合わせた解析手法により相互作用領域の同定が効率よく行えることが確認できた。今後はこの手法をさらに発展させ相互作用メカニズムの詳細に明らかにしていく。

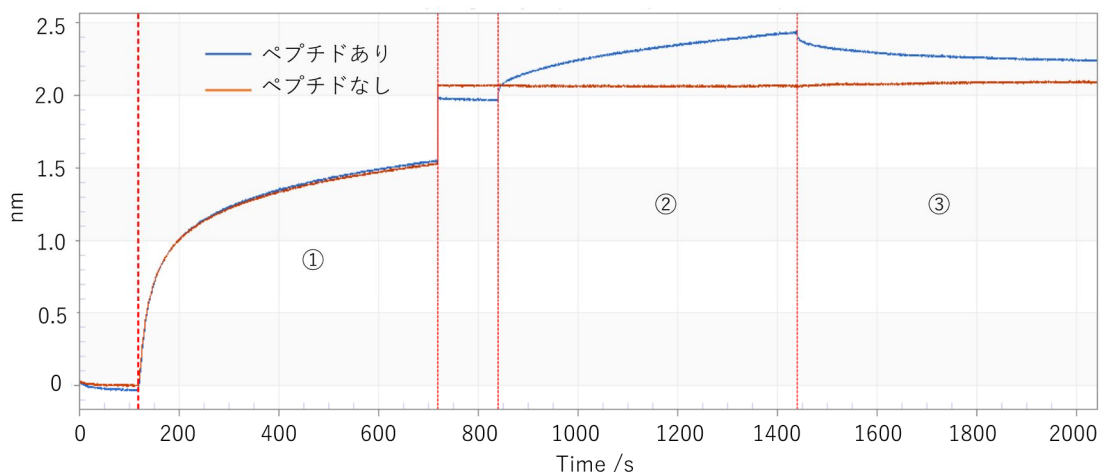


図4. BLI法によるペプチドとTic22の相互作用解析

Tic22をセンサーチップ上に固定化した。①はTic22のセンサーチップへの固定化。②はTic22とペプチドとの会合。③はTic22とペプチドの解離

マラリア感染症は早急に人類が克服すべき疾病であり、発展途上国を中心に毎年およそ 3 億人が感染し年間約 50 万人の命を奪っている。研究対象であるアピコプラストはマラリア原虫の生存に必須の細胞小器官であり、新たな創薬ターゲットとして注目されている。本研究、そして今後の研究から得られるアピコプラスト蛋白質と Tic22 蛋白質の相互作用についての知見は、今後の新機構マラリア薬の開発につながる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齊藤貴士、気仙雅史
2. 発表標題 マラリア原虫アピコプラストTic22蛋白質の阻害剤の探索
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019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
研究分担者	木股 洋子 (Kimata Yoko) (60255429)	山口大学・大学院創成科学研究科 准教授 (15501)	

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