

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21249028

研究課題名（和文）マラリア原虫メロゾイト先端部小器官分子に対するヒト赤血球レセプターの網羅的同定

研究課題名（英文）Identification of RBC receptors against malaria parasite molecules in the merozoite apical organelle

研究代表者

坪井 敬文（TSUBOI TAKAFUMI）

愛媛大学・無細胞生命科学工学研究センター・教授

研究者番号：00188616

研究成果の概要（和文）：マラリア原虫メロゾイトの先端部小器官に局在する新規分子を同定するため、メロゾイト期に発現が予想される分子 193 種類をコムギ無細胞系にて合成し、すべてに対する抗体を作製した。その抗体の内、メロゾイト先端部小器官と反応するものを間接蛍光抗体法にて探索し、29 種類の新規メロゾイト先端部小器官分子を同定した。それらの内、マイクロネームに局在する GAMA の赤血球レセプターの性状を明らかにした。さらに、約 500 種類の赤血球分子を網羅するタンパク質アレイを作製し、赤血球に結合するロプトリータンパク質のレセプター分子を同定した。

研究成果の概要（英文）：In order to identify novel molecules localized in the apical organelles of *Plasmodium* merozoite, we have expressed 193 putative merozoite specific molecules and produced antibodies against each recombinant protein. Among them, 29 were localized at the apical end of the merozoite suggesting novel apical organellar proteins. We then characterized the RBC binding activity and the RBC receptor phenotype against one of the novel micronemal molecules, GAMA. Furthermore, we have constructed erythrocyte protein array including 500 of molecules, and identified an erythrocyte membrane protein which serves as a receptor against erythrocyte-binding rhoptry protein.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	15,700,000	4,710,000	20,410,000
2010年度	10,700,000	3,210,000	13,910,000
2011年度	10,700,000	3,210,000	13,910,000
年度			
年度			
総計	37,100,000	11,130,000	48,230,000

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：マラリア、レセプター、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系、ゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

マラリア原虫メロゾイトの赤血球への侵入過程において、メロゾイトの先端部に存在するロプトリー、マイクロネーム、デンスグラニュールと呼ばれる細胞内小器官（以後、先端部小器官）は赤血球へ侵入後消失するた

め、侵入に必須の分子を含むと考えられている。さらに、侵入には先端部小器官の原虫側リガンド分子が、赤血球表面、又は侵入開始後に形成される寄生胞膜の赤血球側のレセプターと結合することが必須と考えられている。そこで、分子機構の理解に基づく次世

代のマラリアワクチン開発のためにも、メロゾイトの赤血球侵入分子機構、特に原虫リガンドと赤血球レセプターの同定、およびそれらの相互作用の解析が必須である。なお、研究開始当初までにメロゾイト先端部小器官リガンド分子と赤血球レセプターの相互作用が報告されているものは、熱帯熱マラリア原虫分子の EBA175 と赤血球分子グリコフォリン A 等、わずか数種類に過ぎず、これらはすべて原虫タンパク質の赤血球結合アッセイで同定されていた。つまり、これまでの方法では、赤血球表面に豊富に存在するレセプター分子しか検出できていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまでわずかしら解明されていなかったメロゾイトの赤血球結合リガンド分子をゲノムワイドに探索し、それらの中から赤血球に結合する分子を網羅的に同定すること。さらに、同定された原虫リガンド分子に対する赤血球側のレセプター分子を、赤血球タンパク質アレイから網羅的に探索して同定することにより、マラリア原虫の赤血球侵入分子メカニズムを解明することを目的に実施した。

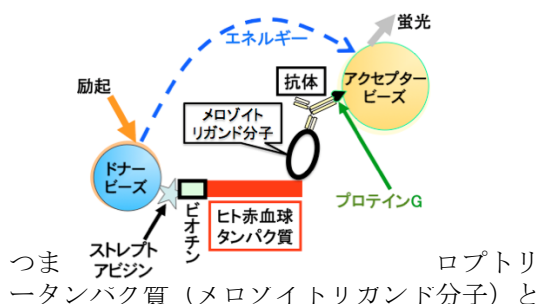
## 3. 研究の方法

### (1) マラリア原虫メロゾイトの先端部小器官に局在する新規分子の同定

マラリアゲノムデータベースよりマラリア原虫メロゾイト期に特異的な発現が予想される分子 193 種類を選択した。それらの組換えタンパク質を、マラリア原虫のタンパク質発現に優れたコムギ無細胞タンパク質合成系にて大量合成し、すべてに対する抗体を動物を用いて作製した。その抗体の認識抗原の局在は、間接蛍光抗体法にて観察した。

### (2) アルファスクリーン法による赤血球レセプター分子の探索

約 500 種類の分子を含むビオチン化赤血球タンパク質アレイを、完全長 cDNA ライブラリと、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて作製した。得られたタンパク質アレイをマラリア原虫ロプトリータンパク質及びそれに結合する単クローン抗体を用いてアルファスクリーン法にて探索した (下図)。



個別の赤血球タンパク質を反応させ、その後ドナービーズとアクセプタービーズを加えて反応させる。原虫ロプトリータンパク質と結合するヒト赤血球タンパク質が存在すれば、抗ロプトリータンパク質抗体を介して双方のビーズが近接する。このような状態でドナービーズを励起すると、このエネルギーが近接したアクセプタービーズと反応し蛍光を発することにより、高感度に分子間相互作用が検出できる。

## 4. 研究成果

### (1) マラリア原虫メロゾイトの先端部小器官に局在する新規分子の同定

マラリアゲノムデータベースより全予想遺伝子 5400 種類から、マラリア原虫メロゾイト期に特異的な発現が予想される分子 193 種類を選択した。それらの組換えタンパク質を、コムギ無細胞タンパク質合成系にて大量合成し、アフィニティー精製した。その結果、全ての組換えタンパク質が、1 mg の抗原スケールで可溶性画分に得られた。この結果は、既報の大腸菌を用いたマラリア原虫組換えタンパク質合成の結果と比較して、格段に優れていた。それらすべての組換えタンパク質に対する抗体を動物を用いて作製した。その認識抗原の局在を、熱帯熱マラリア原虫を抗原として用いた間接蛍光抗体法にて検討したところ、これまで全く解析がなされていない 29 種類の新規メロゾイト先端部小器官分子を同定することが出来た。

### (2) 新規マイクロネーム分子 GAMA の赤血球結合能

上記で同定された新規メロゾイト先端部小器官分子の中で、新規マイクロネーム分子 GAMA の特異抗体が熱帯熱マラリア原虫の増殖阻害活性を有していた。そこで、GAMA の性状を詳細に解析した。その結果、GAMA はヒト赤血球表面に結合し、この結合は既知の赤血球結合能を有するワクチン候補抗原 EBA175 とは異なり、赤血球表面のシアル酸には依存していないことが明らかとなった。したがって、GAMA (シアル酸非依存的赤血球結合分子) に対する抗体と、EBA175 (シアル酸依存的赤血球結合分子) に対する抗体を同時に作用させれば、それぞれの原虫増殖阻害活性を増強できるカクテルワクチン候補となる可能性が考えられた。そこで GAMA 抗体と EBA175 抗体を混合したところ、両者の混合により熱帯熱マラリア原虫の赤血球への増殖阻害活性が飛躍的に増強することが明らかとなった。以上の結果から、GAMA は赤血球に結合することにより、熱帯熱マラリア原虫メロゾイトの侵入に重要な役割を果たすこと、さらに新規赤血球期ワクチン候補となる可能性が示唆された。

(3) アルファスクリーン法によるマラリア原虫ロプトリータンパク質に対する赤血球レセプター分子の探索

ヒト完全長 cDNA ライブラリから、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて約 500 種類の分子を含むビオチン化赤血球プロテインアレイを作製した。得られたプロテインアレイをマラリア原虫ロプトリータンパク質及びそれに結合する単クローン抗体を用いてアルファスクリーン法にて探索した。その結果、マラリア原虫ロプトリータンパク質と特異的に結合する赤血球レセプター分子 1 種を同定した。この分子の性状を詳細に解析したところ、ロプトリータンパク質との結合が、カルシウム依存的に生起していることが明らかとなった。

#### 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 26 件)

- ① Arumugam TU, Takeo S, Tsuboi T. (他 14 名, ⑰番目) Discovery of GAMA, a *Plasmodium falciparum* merozoite micronemal protein, as a novel blood-stage vaccine candidate antigen. *Infect Immun*. 2011, 79:4523-4532. 査読有
- ② Sakamoto H, Takeo S, Maier AG, Sattabongkot J, Cowman AF, Tsuboi T. Antibodies against a *Plasmodium falciparum* antigen PfMSPDBL1 inhibit merozoite invasion into human erythrocytes. *Vaccine*. 2012, 30:1972-1980. 査読有
- ③ Tachibana M, Sato C, Otsuki H, Sattabongkot J, Kaneko O, Torii M, Tsuboi T. *Plasmodium vivax* gametocyte protein Pvs230 is a transmission-blocking vaccine candidate. *Vaccine*. 2012, 30:1807-1812. 査読有
- ④ Chen JH, Takeo S, Tsuboi T, Han ET. (他 6 名, ⑨番目) Measurement of naturally acquired humoral immune responses against the C-terminal region of the *Plasmodium vivax* MSP1 protein using protein arrays. *Parasitol Res*. 2011, 109:1259-1266. 査読有
- ⑤ Rui E, Takeo S, Tsuboi T. (他 4 名, ⑥番目) *Plasmodium vivax*: comparison of immunogenicity among proteins expressed in the cell-free systems of *Escherichia coli* and wheat germ by suspension array assays. *Malar J*. 2011, 10:192. 査読有
- ⑥ Miyata T, Harakuni T, Tsuboi T. (他 6 名, ③番目) Tricomponent immunopotentiating system (TIPS) as a novel molecular design strategy for malaria vaccine development. *Infect Immun*. 2011, 79:4260-4275. 査読有
- ⑦ Tachibana M, Wu Y, Iriko H, Muratova O, Macdonald NJ, Sattabongkot J, Takeo S, Otsuki H, Torii M, Tsuboi T. N-terminal pro-domain of Pfs230 synthesized using cell-free system is sufficient to induce the complement dependent malaria transmission-blocking activity. *Clin Vaccine Immunol*. 2011, 18:1343-1350. 査読有
- ⑧ Farrance CE, Rhee A, Tsuboi T. (他 13 名, ⑬番目) A Plant-Produced Pfs230 vaccine candidate blocks transmission of *Plasmodium falciparum*. *Clin Vaccine Immunol*. 2011, 18:1351-1357. 査読有
- ⑨ Doi M, Tanabe K, Tsuboi T. (他 14 名, ⑰番目) Worldwide sequence conservation of transmission-blocking vaccine candidate Pvs230 in *Plasmodium vivax*. *Vaccine*. 2011, 29:4308-4315. 査読有
- ⑩ Ito D, Han ET, Takeo S, Thongkukiatkul A, Otsuki H, Torii M, Tsuboi T. Plasmodial ortholog of *Toxoplasma gondii* rhoptry neck protein 3 is localized to the rhoptry body. *Parasitol Int*. 2011, 60: 132-138. 査読有
- ⑪ Miyata T, Harakuni T, Tsuboi T. (他 6 名, ⑧番目) Adenovirus-vectored *Plasmodium vivax* ookinete surface protein, Pvs25, as a potential transmission-blocking vaccine. *Vaccine*. 2011, 29:2720-2726. 査読有
- ⑫ Chen JH, Takeo S, Tsuboi T, Han ET. (他 5 名, ⑧番目) Immunoproteomics profiling of blood stage *Plasmodium vivax* infection by high-throughput screening assays. *J Proteome Res*. 2010, 9: 6479-6489. 査読有
- ⑬ Miyata T, Harakuni T, Tsuboi T. (他 6 名, ③番目) *Plasmodium vivax* ookinete surface protein, Pvs25, linked to cholera toxin B subunit induces potent transmission-blocking immunity by intranasal as well as subcutaneous immunization. *Infect Immun*. 2010, 78: 3773-3782. 査読有
- ⑭ Tsuboi T, Takeo S, Arumugam TU, Otsuki H, Torii M. The wheat germ cell-free protein synthesis system: a key tool for novel malaria vaccine candidate

- discovery. *Acta Trop.* 2010, 114: 171-176. 査読有
- ⑮ Tsuboi T, Takeo S, Sawasaki T, Torii M, Endo Y. An efficient approach to the production of vaccines against the malaria parasite. *Methods Mol Biol.* 2010, 607:73-83. 査読無
- ⑯ Blagborough AM, Yoshida S, Sattabongkot J, Tsuboi T, Sinden RE. Intranasal and intramuscular immunization with baculovirus dual expression system-based Pvs25 vaccine substantially blocks *Plasmodium vivax* transmission. *Vaccine.* 2010, 28: 6014-6020. 査読有
- ⑰ Culleton R, Takeo S, Tsuboi T, Tanabe K. (他 6 名, ⑦ 番目) Evidence for the transmission of *Plasmodium vivax* in the Republic of the Congo, west central Africa. *J Infect Dis.* 2009, 200:1465-9. 査読有
- ⑱ Arakawa T, Tachibana M, Torii M, Tsuboi T. (他 7 名, ⑩ 番目) Malaria ookinete surface protein-based vaccination via the intranasal route completely blocks parasite transmission in both passive and active vaccination regimens in a rodent model of malaria infection. *Infect Immun.* 2009, 77: 5496-5500. 査読有
- ⑲ Jiang G, Tsuboi T, Takeo S, Endo Y, Weiss WR. (他 16 名, ⑯ 番目) Sterile protection against *Plasmodium knowlesi* in rhesus monkeys from a malaria vaccine: comparison of heterologous prime boost strategies. *PLoS ONE.* 2009, 4(8):e6559. 査読有
- ⑳ VanBuskirk KM, Kangwanrangsan N, Tsuboi T, Cowman AF, Kappe SHI. (他 12 名, ⑩ 番目) Preerythrocytic, live-attenuated *Plasmodium falciparum* vaccine candidates by design. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009, 106:13004-9. 査読有
- ㉑ Takeo S, Hisamori D, Matsuda S, Vinetz J, Sattabongkot J, Tsuboi T. Enzymatic characterization of the *Plasmodium vivax* chitinase, a potential malaria transmission-blocking target. *Parasitol Int.* 2009, 58:243-8. 査読有
- ㉒ 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 U S A.* 2009, 106:7167-72. 査読有
- ㉓ Cao J, Kaneko O, Thongkukiattkul A, Tachibana M, Otsuki H, Gao Q, Tsuboi T, Torii M. Rhoptry neck protein RON2 forms a complex with microneme protein AMA1 in *Plasmodium falciparum* merozoites. *Parasitol Int.* 2009, 58:29-35. 査読有
- ㉔ Takeo S, Arumugam TU, Torii M, Tsuboi T. Wheat germ cell-free technology for accelerating the malaria vaccine research. *Expert Opin Drug Discov.* 2009, 4:1191-9. 査読有
- ㉕ Iriko H, Jin L, Kaneko O, Takeo S, Han ET, Tachibana M, Otsuki H, Torii M, Tsuboi T. A small-scale systematic analysis of alternative splicing in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Int.* 2009, 58:196-9. 査読有
- ㉖ Maeda T, Saito T, Harb OS, Roos DS, Takeo S, Suzuki H, Tsuboi T, Takeuchi T, Asai T. Pyruvate kinase type-II isozyme in *Plasmodium falciparum* localizes to the apicoplast. *Parasitol Int.* 2009, 58:101-5. 査読有
- [学会発表] (計 129 件)
- ① Tsuboi T. Two post-genome approaches for the discovery of novel malaria blood-stage vaccine candidates using wheat germ cell-free system. *Molecular Approaches to Malaria 2012* (2012. 2. 19, Lorne, Australia)
- ② Tsuboi T. Post-genome discovery of novel malaria vaccine candidates using wheat germ cell-free system. *International Union of Microbiological Societies 2011 Congress* (2011. 9. 6, Sapporo, Japan)
- ③ Sakamoto H. Antibody against a novel *Plasmodium falciparum* antigen MSPDBL1 inhibits erythrocyte invasion of merozoites. *International Union of Microbiological Societies 2011 Congress* (2011. 9. 6, Sapporo, Japan)
- ④ Arumugam TU. Identification of a novel *Plasmodium falciparum* merozoite micronemal protein as a blood-stage vaccine candidate. *60th Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene* (2011. 12. 4, Philadelphia, USA)
- ⑤ Tsuboi T. Wheat germ cell-free system-expressed Pfs230 is an effective transmission-blocking vaccine candidate antigen. *12th International Congress of Parasitology* (2010. 8. 16, Melbourne, Australia)
- ⑥ Tsuboi T. Sexual stage parasites and transmission-blocking antibodies.

Keystone Symposium, Malaria: New Approaches to Understanding Host-Parasite Interactions (2010.4.11, Copper Mountain, USA)

- ⑦Tsuboi T. Wheat germ cell-free protein synthesis system: a breakthrough for the post-genome malaria vaccine candidate discovery. Vivax malaria research III: 2009 and beyond (2009.5.24, Gamboa, Panama)

[その他]

ホームページ等

[http://www.ehime-u.ac.jp/~cellfree/prot\\_eomedical/malaria.html](http://www.ehime-u.ac.jp/~cellfree/prot_eomedical/malaria.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坪井 敬文 (TSUBOI TAKAFUMI)

愛媛大学・無細胞生命科学工学研究センター・教授

研究者番号：00188616

### (2) 研究分担者

竹尾 暁 (TAKEO SATORU)

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号：40302666

澤崎 達也 (SAWASAKI TATSUYA)

愛媛大学・無細胞生命科学工学研究センター・准教授

研究者番号：50314969

大槻 均 (OTSUKI HITOSHI)

鳥取大学・医学部・講師

研究者番号：80403806

(H21：研究分担者)