

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25年 6月 7日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22770151

研究課題名（和文） 熱帯熱マラリアワクチン抗原 SERA5 タンパク質の立体構造解析

研究課題名（英文） Structural analysis of *Plasmodium falciparum* malaria vaccine candidate antigen SERA5

研究代表者

八木 正典（YAGI MASANORI）

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員

研究者番号：60452463

研究成果の概要（和文）：マラリアワクチン候補抗原 SE36 は、マラリア流行地域であるウガンダにおける臨床試験でワクチンの安全性と発症防御効果が示されたが、抗原タンパク質の立体構造や物理化学的性質は明らかにされていない。本研究では、SE36 抗原の防御エピトープ領域が特定の立体構造を持たない天然変性領域であることを明らかにするとともに、立体構造解析に適した安定な立体構造を有する SE36 変異体の構築に成功した。

研究成果の概要（英文）：Phase Ib clinical trial of malaria vaccine candidate SE36 in Uganda showed the safety of SE36 and possible protective effect against symptomatic malaria. However, no information has been reported on tertiary structure and physicochemical properties of SE36. This study revealed that the protective epitopes of SE36 have the characteristics of intrinsically unstructured regions and succeeded in construction of SE36 mutants suitable for structural analysis of SE36 antigen.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2011年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2012年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：タンパク質の物性、マラリアワクチン

1. 研究開始当初の背景

マラリアは現在も全世界で年間約2億人の患者および約100万人の死者を出しており、三大感染症の1つに数えられる。このような現状において、一刻も早いマラリアワクチンの実用化が期待されているが、いまだに有効なマラリアワクチンは登場していない。マラリアワクチンの開発が困難である理由は、マラリア原虫のもつ免疫回避機構にあると考えられている。これは、多重遺伝子族や遺伝

子多型によって、防御免疫の標的となる抗原分子を変化させることによる。実際、マラリア流行地域においても、幼児期より幾度となくマラリア感染を繰り返すことで、ようやく防御免疫が獲得される。

このような背景をもとに、研究代表者が所属している研究室では、熱帯熱マラリア原虫の SERA (Serine Repeat Antigen) と呼ばれるタンパク質ファミリーに注目し、ワクチン開発を行っている。SERA ファミリーのうち、

SERA5 は赤血球期において発現している 120kDa のタンパク質 (P120) であり、赤血球からマラリア原虫が放出される際にプロセッシングを受けて、47kDa、50kDa、6kDa、18kDa の断片 (P47、P50、P6、P18) に切断される。N 末端ドメインの P47 と C 末端ドメインの P18 はジスルフィド結合によって複合体を形成しており、マラリア原虫の表面に存在している。このうち、P47 からセリンの繰り返し配列を除いた 333 残基の組換えタンパク質 SE36 が、これまでにワクチン候補として研究・開発されてきた。SE36 は、研究開始当初において、すでに日本国内での第 Ia 相臨床試験で安全性と抗体陽転が確認されており、その後、現在までに流行地域であるウガンダでの第 Ib 相臨床試験と追跡調査を完了し、安全性と発症防御効果が示されている。

2. 研究の目的

現在、世界中でマラリアワクチンの開発が行われており、SERA5 以外にも多くのタンパク質がワクチン抗原として研究されてきた。なかでも MSP-1 や AMA-1 は、ワクチンとして開発されている領域の立体構造が明らかにされ、立体構造上における多型性の高い領域なども議論されている。マラリアワクチンの開発においては、防御免疫の標的となる抗原分子を変化させるマラリア原虫の免疫回避機構を考慮する必要があり、抗原分子の多型性がワクチンの効果へ及ぼす影響を議論する際に、一次構造だけでなく、三次元における位置関係を考慮に入れることのできる意義は大きい。その一方で、SE36 についての物理化学的、構造学的研究はほとんどなされていない。この現状をふまえ、本研究では、SERA5 タンパク質の物理化学的性質および高次構造情報を明らかにし、分子内相互作用についての考察から、SERA5 の機能とプロセッシングによる調節についての知見を得るとともに、構造情報をふまえた、より効率的な SE36 ワクチンの生産と改良に繋がる基盤を築くことを目的とした。

3. 研究の方法

SERA5 タンパク質は、図 1 に示すように、多くのシステイン残基と低複雑度領域を含んでいる。また、P50 に存在するプロテアーゼ様ドメインを除いては、すでに立体構造が明らかになっているタンパク質との相同性が見いだせず、どのようなフォールドをもつタンパク質なのか推定もできない。しかし一方で、熱帯熱マラリア原虫の SERA ファミリータンパク質 (9 種類) のみならず、種を超えて SERA ファミリータンパク質においてよく保存されている領域も多く存在する (図 1)。これらの領域は、ほどよく疎水性アミノ酸が含まれており、システイン残基もよく保存さ

れている。図 1 に示した SERA5 に存在する 26 個のシステイン残基もすべて SERA ファミリーにおいて保存されているものである。SERA5 を含め、SERA ファミリーには数十残基からなる低複雑度領域が存在するが、それぞれの SERA タンパク質でその挿入位置は異なっており、同一種においても株によって長さや配列の異なるものが存在する。

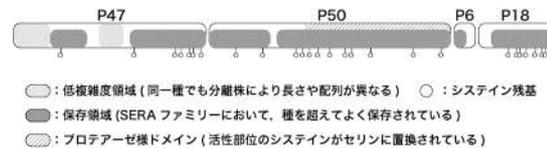


図 1 : SERA5 タンパク質の一次構造の特徴

これらのことから、SERA ファミリータンパク質には、よく保存された土台となる構造が存在し、そこにそれぞれの SERA タンパク質を特徴づける低複雑度領域が挿入されていると考えられる。PSIPRED などの構造予測プログラムを用いても、保存領域に多くの二次構造が存在することが予測される。この保存領域に注目して、まだ明らかにされていない SERA ファミリーの立体構造を明らかにしていこうと考えた。

具体的な戦略として、SERA ファミリーにおいてよく保存されている領域に着目し、それ以外の領域については、すでに知られている中でもっともシンプルな配列を選んでコンストラクトをデザインした。また、多数のシステイン残基が存在することからジスルフィド結合の重要性を考慮して、まず真核生物による発現系として *Pichia pastoris* を用い、全長およびそれぞれのドメインの発現・精製を試みた。それぞれのドメインについて、患者から単離された中でもっともシンプルな配列のものに加え、ファミリー間のアミノ酸配列比較により冗長な低複雑度領域を取り除いたものを用意した。その後、多くのドメイン、コンストラクトにおいて、*P. pastoris* の発現系での発現が確認されなかったため、大腸菌の発現系に移行し、さまざまな株での発現を確認した。そこから発現が確認されたものについて、円二色性や核磁気共鳴などの分光学的手法で、それらの物理化学的性質を測定し、立体構造解析に適応できそうなコンストラクトを絞り込んでいった。

また、低複雑度領域については合成ペプチドを用い、その物理化学的性質を調べた。

4. 研究成果

20~30kDa を超える大きなタンパク質については、ジスルフィド結合の形成などの難しさから、真核生物である *P. pastoris* の発現系を用いて、タンパク質発現を試みた。しか

し、マラリアワクチン SE36 に用いている N 末端ドメインの P47 に関連したコンストラクトの発現は確認できず、すでに立体構造の知られているプロテアーゼドメインを含む P50 に関連したコンストラクトのみが *P. pastoris* において発現が確認された。

そこで、大腸菌の発現系に移行し、BL21、Rosetta、Origami やその派生株を用いて、P47 を含むドメインの発現を試みた。その中で、P47 と P18 を連結したドメインは、封入体として発現したが、大腸菌株や発現条件の検討を行ったものの、発現したタンパク質が可溶性画分に得られることはなかった。一方で、P47 ドメイン由来のコンストラクトの C 末端側が短くなったものが、可溶性画分に得られはじめ、より安定に発現する C 末端の位置と発現条件の検討に的を絞った。

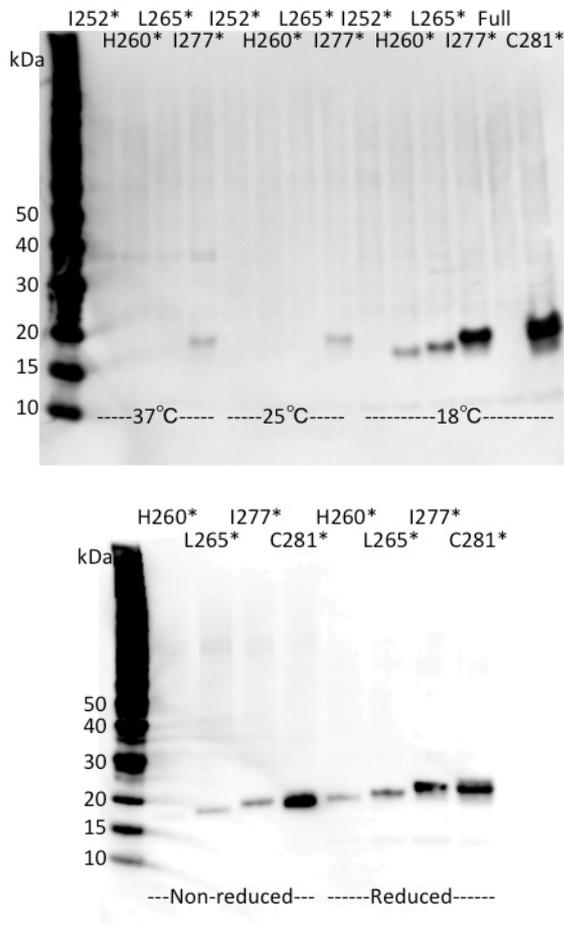


図 2 : SE47mod の C 末端切断変異体の発現。(上) 発現温度の条件検討。(下) 18°C 発現における C 末端位置の検討。どちらも His タグを認識する抗体を用いて、ウェスタンブロットを行った。

まず、大腸菌による発現から得られた C 末端側が短くなったタンパク質について質量分析を行い、C 末端の 50 残基程度が切断されていることを突き止めた。そこで、P47 の低複雑度領域を取り除いたコンストラクト SE47mod と、患者から単離された中でもっともシンプルな配列に基づいたコンストラクト SE47min を用いて、その切断箇所周辺に停止コドンを入れていったところ、281 番目のシステインに停止コドンを入れた変異体 (C281*) の発現がよく、また温度を低温にして発現させたほうが、タンパク質が多く得られることが明らかになった(図 2)。また、発現に用いる株は、Rosetta-gami B (DE3) pLysS が良いことも見出された。

次に、Rosetta-gami B (DE3) pLysS 株を用いて発現・精製した C281* 変異体の二次構造と物理化学的性質を、円二色性スペクトルを用いて調べた(図 3)。

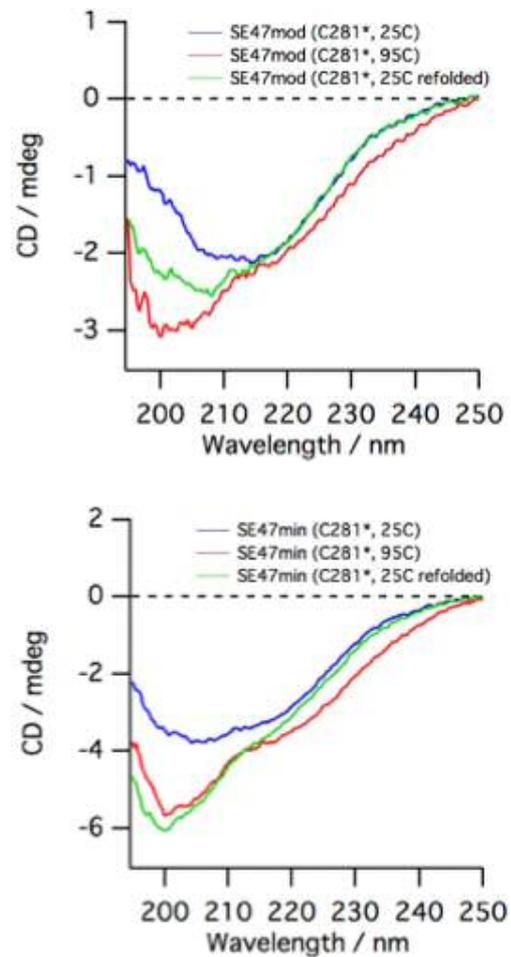


図 3 : SE47mod(上)と SE47min(下)の C281* 変異体の円二色性スペクトル。25°C および 95°C で測定したスペクトルと 95°C で熱変性したのちに 25°C まで温度を下げリフォールディングさせて測定したスペクトルを示している。

円二色性スペクトルから、Rosetta-gami B (DE3) pLysS 株で発現・精製した SE47mod および SE47min の C281*変異体は、25°Cにおいて α ヘリックスや β シートといった二次構造を保持していることが示された。また熱変性時に協同的に変性したことから、比較的安定な立体構造を保持していることが推定される。一方で、熱変性後にリフォールディングさせたもののスペクトルでは、変性前のものとスペクトルが一致せず、変性状態からのリフォールディングが容易ではないことが示された。このことから、封入体からのリフォールディングによるタンパク質の回収は行わないほうがよいという判断に至った。

現在は、この2種類のコンストラクトに的を絞り、核磁気共鳴測定用に安定同位体標識を行ったタンパク質を用いて、引き続き立体構造解析に取り組んでいる。

さらに、上記の大腸菌により発現させたコンストラクトに加え、P47に含まれている低複雑度領域をペプチド合成により作製し、その物理化学的性質を調べた(図4)。

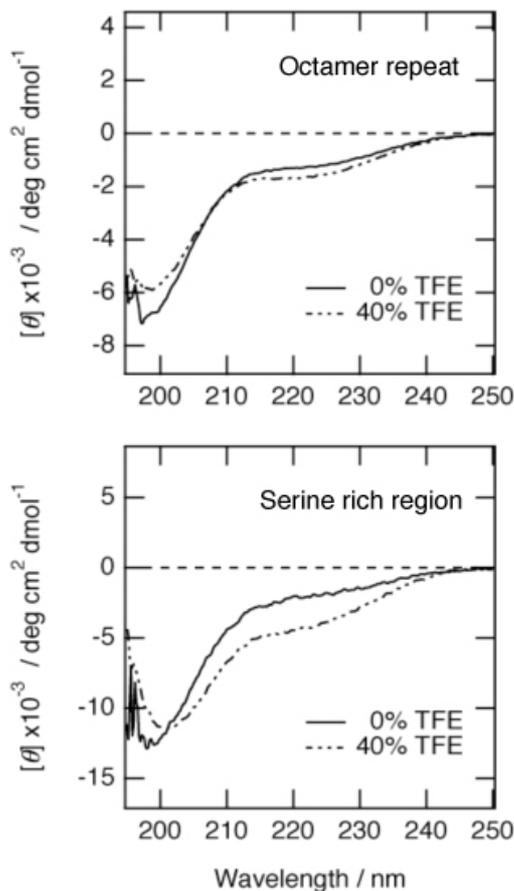


図4: Octamer repeat と Serine rich region に相当する合成ペプチドの円二色性スペクトル。

P47 の N 末端領域に存在する 8 残基の繰り返し配列 (octamer repeat) とセリンの多い領域 (serine rich region) を認識する抗体は、マラリア流行地域であるウガンダに住む成人の血清中に多く存在し、それらの領域を特異的に認識する抗体を精製して、マラリア原虫の増殖阻害試験を行うと、高い増殖阻害能を示している。このことから、この領域は防御抗体を誘導する防御エピトープであると言える。この領域に相当する合成ペプチドの円二色性スペクトルは、二次構造を誘導するトリフルオロエタノール (TFE) 存在下でも構造を形成せず、天然変性領域であることが示唆された。一方、P47 由来の他の領域に相当する合成ペプチドは、TFE 存在下で二次構造の形成を示した。このことから、マラリアワクチン SE36 の防御エピトープ領域は立体構造を有しない天然変性領域であり、防御抗体の誘導させる抗原に厳密な立体構造が要求されないことが示唆された。防御エピトープ領域が天然変性領域の特徴をもつことについての研究結果は、現在、論文に執筆中である。

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1件)

(1) Tanabe K, Arisue N, Palacpac NM, Yagi M, Tougan T, Honma H, Ferreira MU, Färnert A, Björkman A, Kaneko A, Nakamura M, Hirayama K, Mita T, Horii T. Geographic differentiation of polymorphism in the *Plasmodium falciparum* malaria vaccine candidate gene SERA5. *Vaccine* 30, (2012) 1583-1593 (査読有)
doi:10.1016/j.vaccine.2011.12.124.

[学会発表] (計1件)

(1) 八木 正典、Identification and characterization of protective epitopes in malaria vaccine candidate SE36、IUMS 2011 Sapporo、2011. 9. 9、札幌コンベンションセンター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八木 正典 (YAGI MASANORI)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員

研究者番号：60452463