

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670202

研究課題名(和文)リバースケミカルジェネティクスによるマラリア赤血球侵入分子機構の解析

研究課題名(英文)Elucidation of malaria invasion mechanism into erythrocyte by reverse chemical genetics

研究代表者

坪井 敬文(Tsuboi, Takafumi)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授

研究者番号：00188616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、マラリア原虫のタンパク質相互作用を標的としたリバースケミカルジェネティクス研究法の確立を旨とした。まず、マラリアワクチン候補分子GAMAと直接結合するマラリア原虫タンパク質MSP10を同定した。次に、GAMAとMSP10の結合を阻害する化合物を探索するため、高速な分子間相互作用検出系であるAlphaScreenを用いてGAMA-MSP10相互作用に対する阻害剤のスクリーニング系を構築した。今後は当該相互作用を阻害する化合物を探索し、それを培養熱帯熱マラリア原虫に添加しメロゾイトの赤血球侵入に及ぼす影響を解析することにより、原虫の赤血球侵入分子メカニズムの解明に繋げたい。

研究成果の概要(英文)：To develop a novel approach, reverse chemical genetics, for elucidation of malaria invasion mechanism into erythrocyte, we first identified a molecular-molecular interaction between malaria parasite proteins, GAMA and MSP10. We then successfully established a high-throughput screening system for inhibitors which will inhibit GAMA-MSP10 interaction by applying AlphaScreen technology. This screening system would be useful to discover not only novel malaria drug candidates but also elucidation of molecular mechanism of erythrocyte invasion of the parasite.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア リバースケミカルジェネティクス 赤血球侵入

## 1. 研究開始当初の背景

マラリア原虫の生物学は、ゲノムの解読によって飛躍的に進んだ。さらに近年、申請者らが所属する愛媛大学プロテオサイエンスセンターで開発された新技术コムギ無細胞系によって、我々は組換えマラリアタンパク質の発現を世界に先駆けて自由自在に行う事が可能になった。しかし、それにも関わらず、赤血球期の原虫におけるタンパク質の機能解析は困難を極めている。この理由としては、赤血球期マラリア原虫の遺伝子を操作することが困難である上、たとえ遺伝子ノックアウト原虫を作出したとしても、多くの例で致死性であり、表現型を解析することができないことが挙げられる。

## 2. 研究の目的

近年リバースケミカルジェネティクスと呼ばれる研究アプローチが提唱されている。これは、特定のタンパク質機能の阻害剤を探索・合成し、それをツールにして細胞におけるタンパク質の機能や表現型を解析することである。これにより、医薬品の効果が分子レベルで解明されるだけでなく、変異を出発点とする従来の遺伝学では解明できなかった複雑な生命現象を解明できる。本法の利点としては、1) 遺伝子操作が不要、2) 遺伝子ノックアウト実験で致命的なものでも阻害剤の濃度を調節することで表現型を観察できる、3) 阻害剤を創薬のリード化合物に応用できる、等が挙げられる。

本研究は、良質なマラリア原虫タンパク質をゲノムワイドに保有している申請者らの強みを生かし、世界に先駆けてマラリア原虫のタンパク質相互作用を標的としたリバースケミカルジェネティクスを確立する事を目的とした。そのために、近年我々が報告した新規マラリアワクチン候補分子である熱帯熱マラリア原虫メロゾイトの赤血球表面結合タンパク質 GPI-anchored micronemal antigen (GAMA) (Arumugam ら: Infect Immun. 2011) をモデルとして用いた。GAMA は、原虫の赤血球侵入において必須なタンパク質分子である。メロゾイトの放出にともなって先端部小器官マイクロネームから原虫表面に移行し、赤血球表面の未知レセプターと相互作用することでメロゾイトの赤血球侵入に重要な機能を担うと考えられている。抗 GAMA 全長抗体は培養熱帯熱マラリア原虫に対して増殖阻害活性(GIA)を持つため、新規マラリアワクチン候補分子として注目されている。また GAMA の C 末側 1/3 は赤血球結合ドメインである。

## 3. 研究の方法

### (1)GAMA 結合タンパク質のスクリーニング

抗 GAMA 抗体で熱帯熱マラリア原虫タンパク質の免疫沈降を行い、その沈降物を申請者らが保有している熱帯熱マラリア原虫メロゾイトタンパク質に対する 200 種類もの特異

抗体ライブラリでウエスタンブロットを行い、GAMA と複合体を形成している可能性のある原虫タンパク質を同定した。

### (2)GAMA 結合タンパク質の検証

上記 1) で同定した原虫タンパク質が GAMA と直接結合しているか否かを検証するため、組換え GAMA タンパク質と、組換え GAMA 結合タンパク質を、高品質なマラリア原虫タンパク質を合成できるコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて作製する。組換え GAMA と組換え GAMA 結合タンパク質との直接的な相互作用の有無、ならびにその結合の特異性を見積もる上で重要な相互作用の解析は、Biacore による表面プラズモン共鳴解析を用いて行ない、両者の結合の反応速度(結合速度定数、解離速度定数、解離定数)と平衡状態を測定した。

### (3) タンパク質相互作用を阻害する化合物のハイスループットスクリーニング系の構築

「酵素/基質」や「受容体/リガンド」と比較して「タンパク質/タンパク質」の相互作用の強さ(Kd)は弱く、ハイスループットスクリーニング(HTS)系の構築には特殊な実験系が要求される。これには当センターに既設の AlphaScreen を利用した。タグ融合 GAMA とビオチン化 GAMA 結合タンパク質とをインキュベートしておき、そこにビオチン結合ドナービーズ、抗タグ抗体結合アクセプタービーズを加える。GAMA と GAMA 結合タンパク質が結合すると、励起光でドナービーズから生じたエネルギーがアクセプタービーズに届き、発光シグナルを検出できる。洗浄のステップが無いいため、弱い相互作用でも検出できるのがこの系の利点である。

## 4. 研究成果

### (1)GAMA 結合タンパク質の同定

抗 GAMA 抗体で熱帯熱マラリア原虫タンパク質の免疫沈降物を用いたウエスタンブロットにより、メロゾイト表面に局在する GPI アンカータンパク質 Merozoite surface protein 10 (MSP10) が共沈していることが判明した。

### (2)GAMA と MSP10 の結合の検証

次にコムギ無細胞系により GAMA と MSP10 を組換えタンパク質として合成し、表面プラズモン共鳴によって相互作用を計測した。その結果 Kd=  $2.5 \times 10^{-9}$  で直接相互作用していた。このことは、マイクロネームから移行してきた GAMA 分子が、表面にある MSP10 と相互作用することを示唆している。

### (3) タンパク質相互作用を阻害する化合物のハイスループットスクリーニング系の構築

続いて当該相互作用が原虫の赤血球侵入にどのような役目を果たすのか解析するため、ハイスループットな分子間相互作用検出系である AlphaScreen を用いて GAMA-MSP10 相互作用に対する阻害剤・モノクローナル抗体スクリーニング系を構築した。GAMA と MSP10 それぞれに用いるアフィニティータグ

の種類、ならびにタグを付加する場所によって、GAMA と MSP10 間の相互作用に強弱が認められたが、最終的に 10 倍以上のウインドウを有するスクリーニング系の確立に成功した。今後は当該相互作用を阻害する化合物を探索し、その化合物を培養熱帯熱マラリア原虫に添加する事によってメロゾイトの赤血球侵入がどのように影響を受けるのかを解析しマラリア原虫の赤血球侵入分子メカニズムの解明に繋げたい。

本研究により、遺伝子操作が困難な赤血球期マラリア原虫のタンパク質機能解析法が確立できれば、マラリア原虫の寄生現象の根幹にかかわるメロゾイトの赤血球侵入分子機構の総体の理解のみならず、新規抗マラリア薬の開発にも貢献できると考えられる。

## 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 18 件)

Tsuboi T, Takashima E. Antibody titre as a surrogate of protection of the first malaria subunit vaccine, RTS,S/AS01. **Lancet Infect Dis**. 2015;15(12):1371-2. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00300-X. 査読無

Aguiar JC, Bolton J, Wanga J, Sacchi JB, Iriko H, Mazeika JK, Han ET, Limbach K, Patterson NB, Sedegah M, Cruz AM, Tsuboi T, Hoffman SL, Carucci D, Hollingdale MR, Villasante ED, Richie TL. Discovery of Novel *Plasmodium falciparum* Pre-Erythrocytic Antigens for Vaccine Development. **PLoS One**. 2015;10(8):e0136109. doi: 10.1371/journal.pone.0136109. 査読有

Kapulu MC, Da DF, Miura K, Li Y, Blagborough AM, Churcher TS, Nikolaeva D, Williams AR, Goodman AL, Sangare I, Turner AV, Cottingham MG, Nicosia A, Straschil U, Tsuboi T, Gilbert SC, Long CA, Sinden RE, Draper SJ, Hill AV, Cohuet A, Biswas S. Comparative assessment of transmission-blocking vaccine candidates against *Plasmodium falciparum*. **Sci Rep**. 2015;5:11193. doi: 10.1038/srep11193. 査読有

Cheng Y, Lu F, Lee SK, Kong DH, Ha KS, Wang B, Sattabongkot J, Tsuboi T, Han ET. Characterization of *Plasmodium vivax* Early Transcribed Membrane Protein 11.2 and Exported Protein 1. **PLoS One**. 2015;10(5):e0127500. doi: 10.1371/journal.pone.0127500. 査読有

Wu Y, Sinden RE, Churcher TS, Tsuboi T, Yusibov V. Development of malaria transmission-blocking vaccines: from concept to product. **Adv Parasitol**.

2015;89:109-52. doi:

10.1016/bs.apar.2015.04.001. 査読有

Wang B, Lu F, Cheng Y, Chen JH, Jeon HY, Ha KS, Cao J, Nyunt MH, Han JH, Lee SK, Kyaw MP, Sattabongkot J, Takashima E, Tsuboi T, Han ET. Immunoprofiling of the tryptophan-rich antigen family in *Plasmodium vivax*. **Infect Immun**. 2015;83(8):3083-95. doi: 10.1128/IAI.03067-14. 査読有

Cheng Y, Li J, Ito D, Kong DH, Ha KS, Lu F, Wang B, Sattabongkot J, Lim CS, Tsuboi T, Han ET. Antigenicity and immunogenicity of PvRALP1, a novel *Plasmodium vivax* rhoptry neck protein. **Malar J**. 2015;14:186. doi: 10.1186/s12936-015-0698-z. 査読有

Changrob S, Leepiyasakulchai C, Tsuboi T, Cheng Y, Lim CS, Chootong P, Han ET. Naturally-acquired cellular immune response against *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 paralog antigen. **Malar J**. 2015;14:159. doi: 10.1186/s12936-015-0681-8. 査読有

Tachibana M, Suwanabun N, Kaneko O, Iriko H, Otsuki H, Sattabongkot J, Kaneko A, Herrera S, Torii M, Tsuboi T. *Plasmodium vivax* gametocyte proteins, Pvs48/45 and Pvs47, induce transmission-reducing antibodies by DNA immunization. **Vaccine**. 2015;33(16):1901-8. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.03.008. 査読有

Otsuki H, Yokouchi Y, Iyoku N, Tachibana M, Tsuboi T, Torii M. The rodent malaria lactate dehydrogenase assay provides a high throughput solution for in vivo vaccine studies. **Parasitol Int**. 2015;64(4):60-3. doi: 10.1016/j.parint.2015.02.001. 査読有

Cheng Y, Wang B, Sattabongkot J, Lim CS, Tsuboi T, Han ET. Immunogenicity and antigenicity of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 10. **Parasitol Res**. 2014;113(7):2559-68. doi: 10.1007/s00436-014-3907-8. 査読有

Lu F, Li J, Wang B, Cheng Y, Kong DH, Cui L, Ha KS, Sattabongkot J, Tsuboi T, Han ET. Profiling the humoral immune responses to *Plasmodium vivax* infection and identification of candidate immunogenic rhoptry-associated membrane antigen (RAMA). **J Proteomics**. 2014;102:66-82. doi: 10.1016/j.jprot.2014.02.029. 査読有

Sattabongkot J, Tsuboi T, Han ET, Bantuchai S, Buates S. Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid diagnosis of malaria infections in an area of endemicity in Thailand. **J Clin**

**Microbiol.** 2014;52(5):1471-7. doi: 10.1128/JCM.03313-13. 査読有  
Cheng Y, Shin EH, Lu F, Wang B, Choe J, Tsuboi T, Han ET. Antigenicity studies in humans and immunogenicity studies in mice: an MSP1P subdomain as a candidate for malaria vaccine development. **Microbes Infect.** 2014;16(5):419-28. doi: 10.1016/j.micinf.2014.02.002. 査読有  
Arakawa T, Tsuboi T, Sattabongkot J, Sakao K, Torii M, Miyata T. Tricomponent complex loaded with a mosquito-stage antigen of the malaria parasite induces potent transmission-blocking immunity. **Clin Vaccine Immunol.** 2014;21(4):561-9. doi: 10.1128/CVI.00053-14. 査読有  
Arumugam TU, Ito D, Takashima E, Tachibana M, Ishino T, Torii M, Tsuboi T. Application of wheat germ cell-free protein expression system for novel malaria vaccine candidate discovery. **Expert Rev Vaccines.** 2014;13(1):75-85. doi: 10.1586/14760584.2014.861747. 査読有  
Mathias DK, Pastrana-Mena R, Ranucci E, Tao D, Ferruti P, Ortega C, Staples GO, Zaia J, Takashima E, Tsuboi T, Borg NA, Verotta L, Dinglasan RR. A small molecule glycosaminoglycan mimetic blocks *Plasmodium* invasion of the mosquito midgut. **PLoS Pathog.** 2013;9(11):e1003757. doi: 10.1371/journal.ppat.1003757. 査読有  
Kaneko A, Chaves LF, Taleo G, Kalkoa M, Iozumi R, Wickremasinghe R, Perlmann H, Takeo S, Tsuboi T, Tachibana S, Kimura M, Björkman A, Troye-Blomberg M, Tanabe K, Drakeley C. Characteristic age distribution of *Plasmodium vivax* infections after malaria elimination on Aneityum Island, Vanuatu. **Infect Immun.** 2014;82(1):243-52. doi: 10.1128/IAI.00931-13. 査読有

[学会発表](計87件)

(招待講演)坪井敬文、ポストゲノムマalariaワクチン研究は宿主寄生体関係の総体的理解につながる、第88回日本生化学会大会・第38回日本分子生物学会年会 合同大会(2015.12.1-4,神戸ポートアイランド.兵庫県神戸市)

(招待講演) Tsuboi T, Pre-erythrocytic vaccines for malaria elimination. *Malaria R&D in a Time of Global Partnerships*, (2015.6.26, University of Tokyo, Tokyo)

(招待講演) Tsuboi T, Kanoi BN, Egwang TG, Horii T, An integrated approach to

tackling malaria in Uganda with special reference to novel malaria vaccine candidate discovery. E-JUST 2nd International Conference on Innovative Engineering (2015.5.19-21, Bibliotheca Alexandria, Alexandria, Egypt)

(招待講演) Tsuboi T, WGCFS: an innovative technology for post-genome malaria vaccine research. 25th Annual Molecular Parasitology/Vector Biology Symposium (2015.4.28-29, University of Georgia, Athens, USA)

(招待講演) Tsuboi T, Global Health Innovation through Partnership. 第55回日本熱帯医学会大会・第29回日本国際保健医療学会学術大会合同大会、(2014.11.1-3. 東京女子医科大学、東京都)

(招待講演) Tsuboi T, Wheat germ cell-free protein synthesis system: an innovative technology for post-genome malaria vaccine candidate discovery. 第157回日本獣医学会学術集会、日本獣医寄生虫学会国際シンポジウム、(2014.9.9-12. 北海道大学、札幌市)

(招待講演) Tsuboi T, Takashima E, Ito D, Feng Lu, Cheng Y, Han ET. Wheat germ cell-free protein synthesis system (WGCFS): a breakthrough for the post-genome vivax malaria research. 13th International Congress of Parasitology, (2014.8.10-15, Hotel Camino Real, Mexico City, Mexico)

[その他]

ホームページ等

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坪井 敬文 (TSUBOI, Takafumi)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授

研究者番号：00188616

### (2) 研究分担者

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