

# Alexandre Jean Seme Fils

## 論文(テーシス)内容の要旨

主論文(テーシス)

*Plasmodium falciparum*: evaluating the polymorphism of vaccine candidates  
and the trafficking of a potential ligand

(熱帯熱マラリア原虫: ワクチン候補分子の多型と接着分子候補の輸送)

Alexandre Jean Seme Fils

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 新興感染症病態制御学系専攻

(主任指導教員 : 金子修 教授)

**緒言** : 熱帯熱マラリア原虫の宿主免疫にさらされる分子には正の選択圧がかかるため、ワクチン候補抗原を見出すために選択圧を検討することは重要な研究課題である。本研究ではcytoadherence linked asexual gene (*clag*)と呼ばれる原虫抗原遺伝子に対する選択圧を明らかにすることとした。また、熱帯熱マラリア原虫は病原性に関わる接着分子等を、寄生赤血球内に形成するマウレル裂と呼ばれる膜構造物を経て赤血球表面に輸送する。原虫分子の輸送を阻害することで病原性を軽減できるため、この分子輸送機構の解明は重要な研究課題である。現在のところ、輸送される分子のアミノ末端側疎水性領域と5つのアミノ酸からなる *Plasmodium* export element (PEXEL)と呼ばれるモチーフを用いるPEXEL依存性輸送と、膜貫通領域を用いるPEXEL非依存性輸送が知られている。本研究ではマウレル裂と感染赤血球表面に局在する接着分子候補である、一回膜貫通型タンパク質 surface-associated interspersed gene 4.2 (SURFIN<sub>4.2</sub>)の輸送経路、および、輸送に必要な領域を明らかにすることとした。

**対象と方法** : 【*clag* に対する選択圧の解析】1980年代にタイで採取し、培養株化した熱帯熱マラリア原虫 39株を用いて、*clag2* および *clag8*、*clag9* の多型領域について同義置換率と非同義置換率の比較、また地域集団を対象とする解析により選択圧を検討した。【SURFIN<sub>4.2</sub> の輸送経路の解析】SURFIN<sub>4.2</sub> の一部を緑色蛍光タンパク質(GFP)と融合したミニ SURFIN<sub>4.2</sub> を発現する組換え熱帯熱マラリア原虫、ミニ SURFIN<sub>4.2</sub> から種々の領域を除去した組換え SURFIN<sub>4.2</sub> を発現する原虫、さらに、PEXEL モチーフ様配列を破壊した組換え SURFIN<sub>4.2</sub> を発現する原虫を作製した。GFP シグナルの顕微鏡観察と間接蛍光抗体法により各組換えタンパク質の局在を検討した。精製した原虫虫体から凍結融解により水溶性分子を抽出後、トリトン X-100、sodium dodecyl sulfate (SDS)を順に用いて膜タンパク質を抽出し、各組換えタンパク質の性質を検討した。

**結果** :【*clag* に対する選択圧の解析】①*clag2* を挿入欠失の長さでアミノ酸配列を元に5つの型に分類した。②1型と2型の *clag2* と *clag8* に対する正の選択圧を同義置換率と非同義置換率を比較する方法により検出した。③地域集団を対象とする解析により1型 *clag2* と *clag8* に対する正の選択圧を検出した。【SURFIN<sub>4.2</sub> の輸送経路の解析】①ミニ SURFIN<sub>4.2</sub> は感染赤血球内およびマウレル裂に局在した。②ミニ SURFIN<sub>4.2</sub> から細胞内領域を除くと、マウレル裂に局在するが、赤血球内への局在はミニ SURFIN<sub>4.2</sub> と比べて減少した。細胞外領域のみを持つものは、原虫細胞質に留まった。ゆえに、SURFIN<sub>4.2</sub> の赤血球内およびマウレル裂への輸送には膜貫通領域を必要とするが細胞内領域を必要としないことがわかった。ウェスタンブロット法により、細胞外領域と膜貫通領域を持つものと、ミニ SURFIN<sub>4.2</sub> は膜タンパク質として抽出されたが、細胞外領域と膜貫通領域のみのもものと比べて、ミニ SURFIN<sub>4.2</sub> はトリトン X-100 不溶性画分に多く見られた。③SURFIN<sub>4.2</sub> の PEXEL モチーフ様配列を破壊しても、細胞外領域の種々の部位を除いても、細胞外領域の全てを除き、膜貫通領域直前の 50 アミノ酸に置換しても組換えタンパク質はマウレル裂へ局在した。

**考察** :【*clag* に対する選択圧の解析】*clag2* に対する正の選択圧が初めて明らかになった。また、以前に同義置換率と非同義置換率の比較法により検出された *clag8* に対する正の選択圧を地域集団を対象とする解析によっても検出できた。以上より、*clag2* と *clag8* がコードするタンパク質は宿主免疫により認識され、原虫の増殖を抑制する標的分子である可能性が示唆された。【SURFIN<sub>4.2</sub> の輸送経路の解析】赤血球内へ輸送される原虫タンパク質は、原虫内では粗面小胞体を経由する古典的分泌経路を用い、また、膜貫通領域は粗面小胞体移行シグナルとして機能することが知られているため、SURFIN<sub>4.2</sub> も同様に古典的分泌経路を経ることが示唆された。また、SURFIN<sub>4.2</sub> は PEXEL 非依存的に輸送されることが分かった。さらに、細胞外領域と細胞内領域のアミノ酸配列そのものには、SURFIN<sub>4.2</sub> の赤血球内輸送情報が含まれないことが明らかとなった。最後に、SURFIN<sub>4.2</sub> 細胞内領域が赤血球内局在および組換えタンパク質の可溶性に影響を与えていることが示唆された。

#### [基礎となった学術論文]

1. **Alexandre JSF**, Kaewthamasorn M, Yahata K, Nakazawa S, Kaneko O. Positive selection on the *Plasmodium falciparum clag2* gene encoding a component of the erythrocyte-binding rhoptry protein complex. *Tropical Medicine and Health* (in press)
2. **Alexandre JSF**, Yahata K, Kawai S, Torii M, Kaneko O. PEXEL-independent trafficking of *Plasmodium falciparum* SURFIN<sub>4.2</sub> to the parasite-infected red blood cell and Maurer's clefts. *Parasitology International*, 60, 313-320 (2011)