

細胞内輸送を制御するマラリア原虫特異的 Rab5b 結合タンパク質の探索

平井 智浩 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 稲垣祐司 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

マラリアは2億人が罹患し、年間60万人の死亡者を出す重篤な感染症である。この疾患は寄生性の原虫であるマラリア原虫がハマダラカの刺咬を介して体内に侵入することが原因である。マラリア原虫はヒトの体内に侵入すると肝細胞を経て赤血球へと侵入し、寄生胞膜やマウレル裂という膜構造を多数作ることで自らの生育に快適な環境を構築する。さらに、寄生胞膜を介して感染赤血球表面へのタンパク提示や栄養源の取り込みを行なっている。

真核生物で保存された、膜を介する小胞輸送を分子スイッチとして制御するのが低分子量 GTPase の Rab である。まず、guanine-nucleotide exchange factor (GEF) が、不活性型 (GDP 結合型) の Rab を、活性化型 (GTP 結合型) へ変換する。次に、GTP 結合型の Rab はエフェクタータンパク質と結合し、活性調節を行なう。その後、GTP の加水分解がおり、Rab は GDP 型に戻る。このうち、初期エンドソームに局在し、初期エンドソームの膜融合を調節する Rab として Rab5 が報告されている。Rab5 は C 末端側のシステインがイソプレニル化の脂質修飾を受けることで膜に結合し、膜融合を調節する (以下、保存型 Rab5)。しかし、陸上植物とマラリア原虫は保存型 Rab5 の他に C 末端側の脂質修飾部位を持たず、N 末端側のグリシンとシステインがそれぞれミリストイル化とパルミトイル化の修飾を受ける特殊な Rab5 (Rab5b) を有する。また、マラリア原虫の Rab5b は原虫細胞質だけでなく感染赤血球細胞質にも局在が観察されているため、細胞外への輸送にも関与すると考えられているが、その機構は明らかになっていない。さらに、これまで Rab5b を有するトキソプラズマ原虫や高等植物でも Rab5b のエフェクタータンパク質は未だに同定されていない。

本研究では熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) を用いて、熱帯熱マラリア Rab5b (PfRab5b) の活性化因子である GEF やエフェクタータンパク質の探索を行なった。

材料・方法

(1) 酵母ソーハイブリッド (Y2H) 法による PfRab5 と GEF の結合の確認

他種生物において Vps9 は Rab5 GEF として報告されている。熱帯熱マラリア原虫ゲノム中にも Vps9 がアノテートされており、Rab5b と結合する可能性があった。そこで出芽酵母を用いた Y2H 法により熱帯熱マラリア原虫の Rab5b と Vps9 間の相互作用の確認を行なった。*Saccharomyces cerevisiae* Y187 株に、転写活性化因子である GAL4 タンパク質の DNA 結合ドメインと PfRab5 融合タンパク質を発現するプラスミドを導入した。同様に、AH109 株に、転写を促進するアクティベータードメインと PfVps9 融合プラスミドを導入した。それぞれの形質転換株を接合させ、Vps9 と Rab5b が結合した場合、レポーター遺伝子の発現が確認されることを指標とした。

(2) 共免疫沈降法による PfRab5b エフェクターの質量分析

PfRab5b と相互作用するタンパク質を広く探索するため、*P. falciparum* MS822 株を用いて、PfRab5b と GFP との融合タンパク (PfRab5b-GFP) あるいは PfRab5b-GFP に FLAG タグを融合させたタンパク質 (PfRab5b-GFP-FLAG) を発現させた株を作製した。それぞれの融合タンパク質を可溶化させる最適条件を検討した。また、blue native-poly acrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) により PfRab5b-エフェクター複合体の分子量を推定した。結合タンパク質を得るため、クロスリンカーによるタンパク質間架橋処理を行った後に、抗 FLAG 抗体を用いた共免疫沈降を行なった。共沈したタンパクの質量分析を行い、BN-PAGE の結果と照らし合わせて PfRab5b 結合タンパクの同定を試みた。

結果・考察

(1) 熱帯熱マラリア原虫ゲノムには1種類の Vps9 (PfVps9a) がアノテートされていた。また、そのホモログも1つ存在していた。そのホモログのアミノ酸配列は他種生物の Vps9 と同源性が非常に低く、アミノ酸配列から Rab5 GEF と判断するのは困難であった。しかし、そのホモログの二次構造予測を行なったところ、Vps9 の GEF 活性に必要な二次構造と活性残基が保存されていたため、これを PfVps9b とした。Y2H 法によって PfRab5 と PfVps9a および PfVps9b との結合を検証したが、酵母の中での相互作用は確認できなかった。

(2) 可溶化条件検討の結果、凍結融解でなく、1.0% Triton X-100 により融合タンパクが可溶化されることが分かった。BN-PAGE の結果から見積もる PfRab5b へ結合するタンパク質の分子量は、35・90 kDa であった。抗 FLAG 抗体によって共沈したタンパク質を質量分析によって解析した。得られたペプチドデータを BN-PAGE の結果と照らし合わせて、結合候補タンパクを22種類得た。その中にはゴルジ体周辺で機能するタンパク質と、寄生胞膜に輸送されるタンパク質が含まれていた。

今後、質量解析から得た結合候補タンパク質が、実際に Rab5b と相互作用があるのかの確認を行う必要がある。まず、熱帯熱マラリアで Rab5b の GDP 型および GTP 型変異株を作製し、共免疫沈降によって回収されるエフェクタータンパク質が GTP 型特異的に同定されるかを確認する。また、遺伝子操作が簡便なネズミマラリア原虫 (*P. berghei*) を用いて、候補タンパク質の細胞内局在を確認し、Rab5b 結合タンパク質および Rab5b カスケードを明らかにして行く予定である。

今回得られた候補タンパク質は、高等植物には存在しない遺伝子も含まれているため、マラリア特異的な輸送経路が同定できると期待している。また、PfRab5b 結合タンパク質の同定は、アピコンプレクサ独特の輸送システムの解明につながり、将来的には抗マラリア薬の創薬の基盤を提供できると期待している。