

マラリア原虫の赤血球侵入に関わる多重遺伝子族

金子 修, 大槻 均, 入子 英幸, 坪井 敬文, 鳥居 本美

愛媛大学医学部寄生虫学

Multigene families related to the erythrocyte invasion by malaria parasites

Osamu Kaneko, Hitoshi Otsuki, Hideyuki Iriko, Takafumi Tsuboi, Motomi Torii

Department of Molecular Parasitology, Ehime University School of Medicine

Key Words : malaria, erythrocyte invasion, multigene family

I. はじめに

マラリアは世界的には年間約3-5億人の感染者, 100万人以上の死者を出す重篤な原虫感染症である。マラリア原虫はヒト体内において, メロゾイトとよばれる型の原虫が赤血球に侵入し, 形態を変えて10~30個の新たなメロゾイトを形成し, これらのメロゾイトが感染赤血球を破壊して血中に出現し, 新たな赤血球に再侵入することで発育増殖する。メロゾイトは赤血球に侵入する際に, マイクロネームやロプトリー, デンス・グラニュールといった細胞内前部小器官から内容物を分泌している(図2)。ゆえに, これらの小器官に局在する分子は, 赤血球侵入にとり重要な役割を果たす。最近決定された熱帯熱マラリア原虫のゲノム情報により, 細胞内小器官に発現している赤血球結合分子が, 多重遺伝子族を形成していることが明らかになってきた¹⁾。本稿ではマラリア原虫の赤血球結合分子をコードしている*rbl*と*ebi*の二つの多重遺伝子族を中心に赤血球侵入と病原性について概説し, 後半部では我々が新たに見出したロプトリーの蛋白複合体を構成する多重遺伝子族について紹介する。

II. 赤血球侵入に関与するマラリア原虫の多重遺伝子族

a. 赤血球侵入能力と病原性

マラリア原虫の赤血球侵入能力と宿主に対する病原性は密接に関係する。例えばネズミマラリア原虫 *Plasmodium yoelii* には弱毒株の継代中に強毒化した株

がある。弱毒株は幼若赤血球にしか感染せず, ネズミは治癒する。一方, 強毒株は全てのステージの赤血球に感染し, ネズミは死亡する。このことは, 侵入できる赤血球のステージが拡大することで, マラリア原虫の病原性が増強することを示している。また, ヒトに感染する4種のマラリアのうち, 熱帯熱マラリア原虫 *P. falciparum* は急激に症状が悪化して死に至ることがあるが, その理由の一つとして, 他の3種の良性マラリア原虫が幼若赤血球(三日熱および卵形マラリア), または, 老熟赤血球(四日熱マラリア)の限られたステージの赤血球にしか感染しないのに対し, 熱帯熱マラリア原虫は全てのステージの赤血球に感染することができる点が挙げられる。

赤血球侵入能力とマラリアの病原性との関連は, 異なるステージの赤血球への侵入能力以外に, マラリア流行地でみられる変異型赤血球への侵入能力においても見ることができる。三日熱マラリア原虫はダフィー血液型抗原を欠損した赤血球には感染できないことが示されており²⁾, 原住民の多くがダフィー血液型抗原を持たない西アフリカには三日熱マラリアはほとんど見つからない³⁾。ダフィー血液型抗原を介した三日熱マラリア原虫の赤血球侵入能力と三日熱マラリアへの抵抗性に完全な相関が見られるのである。一方, 熱帯熱マラリア原虫はダフィー血液型抗原を欠損した赤血球を含む多くの変異型赤血球に感染することができ, 西アフリカでも猛威を振るっている。マラリア原虫ゲノム計画の進行につれて, この現象の分子的背景とし

表1 熱帯熱マラリア原虫の赤血球侵入に関する多重遺伝子族

名称 (局在)	遺伝子名	染色体	遺伝子産物 (別称, コメント)	アミノ酸数 ^b
<i>rbl</i> (ロプトリー頸部)	<i>pfrh 1</i>	4	PfRH1 (PfNBP1)	2,972
	<i>pfrh 2a</i>	13	PfRH2a (PfR2Ha, PfNBP2a, PfRBP2-Ha)	3,079
	<i>pfrh 2b</i>	13	PfRH2b (PfR2Hb, PfNBP2b, PfRBP2-Hb)	3,254
	<i>pfrh 3</i>	12	(読取枠にズレ, 偽遺伝子)	(2,889)
	<i>pfrh 4</i>	4	PfRH4	1,716
<i>ebl</i> (マイクロネーム)	<i>jesebl</i>	1	JESEBL (EBA-181)	1,567
	<i>pebl</i>	4	(読取枠にズレ, 偽遺伝子)	(1,431)
	<i>eab-175</i>	7	EBA-175 (SABP)	1,475
	<i>baebl</i>	13	BAEBL (EBA-140, EBP-2)	1,210
	<i>ebl-1</i>	13	[EBL-1] ^a	2,709
<i>rhop1</i> (ロプトリー体部)	<i>pfrhop1_2</i>	2	PfRhopH1_2 (Clag2)	1,440
	<i>pfrhop1_3.1</i>	3	PfRhopH1_3.1 (Clag3.1)	1,417
	<i>pfrhop1_3.2</i>	3	[PfRhopH1_3.2 (Clag3.2)] ^a	1,416
	<i>pfrhop1_b1</i>	不明	[PfRhopH1_B1 (ClagB1)] ^a	1,398
	<i>pfrhop1_9</i>	9	PfRhopH1_9 (Clag9)	1,341

^a *ebl-1* と *rhop1_3.2*, *rhop1_b1* は蛋白としての発現は確認されていない。

^b 読取枠のアミノ酸数を示す。*pebl* と *pfrh 3* については読取枠のズレを訂正して計算している。

て、マラリア原虫の赤血球結合蛋白をコードする多重遺伝子族が注目を浴び始めた。

b. *rbl* (reticulocyte-binding-like) 多重遺伝子族

rbl 多重遺伝子族のメンバーはC末端に短い細胞内領域を持つ一回膜貫通型の蛋白であるが、最初にネズミマラリア原虫 *P. yoelii* において、ロプトリー頸部に局在する235 kDaの蛋白 (p235, Py235) として見出された^{4),5)}。全てのステージの赤血球に感染し、致死性である *P. yoelii* YM株の感染に対して、Py235に対するモノクローナル抗体を血中に投与したマウスあるいは精製したPy235で免疫したマウスは、原虫感染が網状赤血球に限定され、致死性経過を経なかった^{6),7)}。Py235は、コードする遺伝子の一つが1994年に同定され⁸⁾、赤血球表面に結合することも示されている⁹⁾。この蛋白は *P. yoelii* のゲノム上に最高50の相同体を持ち、ひとつの分裂体中の異なるメロゾイトが個別のPy235を転写していることが示されている^{10)~12)}。

一方、1992年、米国のBarnwellらのグループはヒト網状赤血球に特異的に結合する三日熱マラリア原虫蛋白PvRBP1とPvRBP2の二つの *rbl* ファミリー蛋白を同定した^{13),14)}。間接蛍光抗体法にてPvRBPはメロゾイト先端部に発現していることが示されている。また、特異抗体を用いて免疫沈降したPvRBP1を電気泳動する

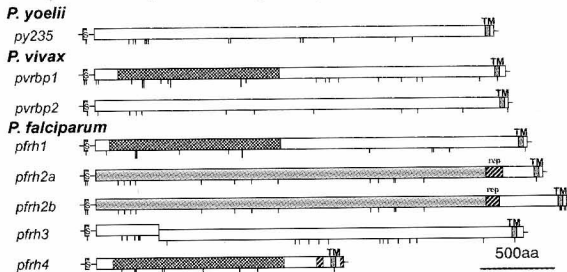
と、還元条件下で約280 kDa、非還元条件下で約600 kDaのサイズを示すことより、S-S結合によりホモダイマーを形成していると考えられている。PvRBP2はS-S結合によるダイマーを形成しない。

熱帯熱マラリア原虫に関しては、ゲノム上に最低5つの *rbl* メンバーがある事がわかってきた^{15)~19)}。系統樹解析から、熱帯熱マラリア原虫の *rbl* メンバーは、*pvrpb1* のオルソログである *pfrh 1*, *pfrh 4* と *pvrpb2* のオルソログである *pfrh 2a*, *pfrh 2b*, *pfrh 3* の2グループに分類される (表1, 図1A)。PfRH1はシアル酸依存的に赤血球に結合し、赤血球をトリプシンで処理しても結合には影響がなかった。また、グリコホリンB欠損赤血球にも結合した。グリコホリンAもグリコホリンCもトリプシンにより切断されることが知られているため、PfRH1の赤血球受容体はグリコホリンAやB, Cではないと考えられる¹⁷⁾。PfRH2aとPfRH2b, PfRH4については蛋白として発現していることは確認されている。*pfrh 3* の読取枠は途中でズレており、おそらく偽遺伝子であると考えられる¹⁸⁾。

rbl ファミリー蛋白の役割は、BarnwellらがPvRBPについて提唱している『赤血球初期選択説』がある。すなわち、三日熱マラリア原虫は血液中には比較的頻度が少ない幼若赤血球に好んで感染するが、それには量的にはるかに多い成熟赤血球に侵入しないための何ら

かのチェック機構がある可能性が考えられる。原虫が赤血球との間に不可逆的な密着接合（後述）を形成する前に、三日熱マラリア原虫は網状赤血球を特異的に認識するPvRBPを用いて、このチェックを行っているのではないかというものである²⁰。

A. *rbl* (reticulocyte binding-like) family



B. *eb1* (erythrocyte binding-like) family

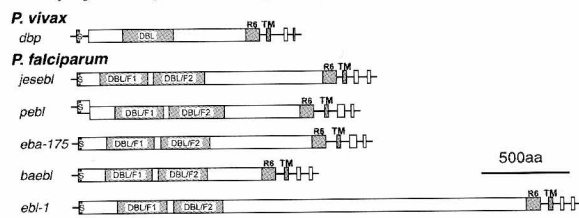


図1. (A) マラリア原虫 *rbl* 多重遺伝子族。シグナル配列 (S)、予想膜貫通領域 (TM) を示す。模式図下の垂直実線はシステイン残基の位置を表す。 *pvrbp1* と *prfh1*、 *prfh4* の間で保存されているものは長い線で表す。 *pvrbp1* と *prfh1*、 *prfh4* の間で相溶性の高い領域を格子模様で、 *prfh2a* と *prfh2b* で保存している領域を円筒模様、繰り返し配列を斜線模様で示す。読取枠がズレている箇所は模式図のズレとして表す。(B) マラリア原虫 *eb1* 多重遺伝子族。DBLドメインと第6領域 (R6) を示す。熱帯熱マラリア原虫は2つDBLドメインを持ち、最初のをDBL/F1、二番目をDBL/F2と呼ぶ。

C. *eb1* (erythrocyte-binding-like) 多重遺伝子族

1975年、アメリカのMillerらはサルマラリア原虫 *P. knowlesi* や三日熱マラリア原虫が赤血球表面のダフィー血液型抗原を認識して赤血球に侵入することを見出した^{21,3)}。1980年代後半には、ダフィー血液型抗原に結合する135~140 kDaの原虫蛋白が両マラリア原虫種で見つかり、ダフィー結合蛋白 (Duffy binding protein; DBP) と名づけられ^{22,23)}、1990年には遺伝子が同定された^{24,25)}。興味深いことに *P. knowlesi* には、ダフィー血液型抗原を認識するDBP (PkDBP- α) 以外に二つの相同体 (PkDBP- β と γ) が同定され、それらはダフィー血液型抗原以外の赤血球表面分子を認識した^{24,26)}。一方、熱帯熱マラリア原虫は赤血球表面のシアル酸を

認識していることが1977年に報告された²⁷⁾。1985年に Camus と Hadley により赤血球表面グリコホリンAのシアル酸に結合する175 kDaの原虫蛋白 (EBA-175) が見出され²⁸⁾、1990年に遺伝子が同定された²⁹⁾。

三日熱マラリア原虫と *P. knowlesi* のDBPと熱帯熱マラリア原虫のEBA-175は *eb1* 多重遺伝子族にコードされる一回膜貫通型蛋白である。この遺伝子族のメンバーのN末側のシグナル配列に続く第二領域と呼ばれる領域は、システインに富み、DBL (Duffy binding like) と呼ばれる赤血球結合ドメインで形成される^{26,30)}。三日熱マラリア原虫と *P. knowlesi* のDBPにはDBLドメインが一つしか存在しないが、熱帯熱マラリア原虫のEBA-175には2つ存在する (図1 B)。

ロプトリー頸部に局在する *rbl* ファミリー蛋白とは異なり、DBPとEBA-175はマイクロネームに局在する^{24,31)}。 *P. knowlesi* のメロゾイトが赤血球へ侵入する過程をCytochalasin Bにより阻害し、電子顕微鏡で観察すると、メロゾイト先端部と正常赤血球とは密に接着 (密着接合) していたが、ダフィー血液型抗原を欠損する赤血球の場合は、メロゾイト先端部と赤血球の間には接合が形成されていなかった³²⁾。このことより、 *eb1* 遺伝子族にコードされる蛋白はマラリア原虫の密着接合形成に関与する分子であると考えられている。

先にも述べたが、三日熱マラリア原虫ではダフィー血液型抗原とDBPの結合が赤血球侵入の決定因子となっている。ところが、熱帯熱マラリア原虫はEBA-175のレセプターであるグリコホリンAを欠損した赤血球にも侵入することができ、また、EBA-175の遺伝子座を破壊しても、原虫は培養系において新たな赤血球に正常に侵入し、発育増殖することができる^{33,34)}。このことより、熱帯熱マラリア原虫にはEBA-175と相補的に働く分子が存在することが予想されていたが、ゲノム情報により、EBA-175のパラログが、他に最低4つ (*baubl*, *jesebl*, *pebl*, *eb1-1*) 存在することが明らかになった (表1, 図1 B)^{35,36)}。このうち、 *pebl* は転写はしているが、世界各地から集められた様々な原虫株全てにおいて、開始コドンより約220塩基下流で読取枠にズレをおこし、蛋白としては発現していないと考えられる³⁷⁾。一方、BAEBLとJESEBLの赤血球結合能力に関して興味深い知見が発表され始めた。

BAEBLは、³⁵Sで標識した原虫蛋白を用いた赤血球結合アッセイでは、グリコホリンCに変異があるGerbigch型赤血球には結合しなかった³⁸⁾。さらに、ニト

ロセルロース膜に転写された赤血球グリコホリンCにBAEBLが特異的に結合したことより、BAEBLは赤血球のグリコホリンCを認識していることが示された³⁹⁾。マラリア高度流行地であるパプア・ニューギニアの海岸地域では、赤血球表面に存在するグリコホリンCの変異が現地住民の40%以上に見られる^{40),41)}。正常赤血球に比べて、変異型グリコホリンCを持つ赤血球には、熱帯熱マラリア原虫が侵入しにくい⁴²⁾、あるいは、変異型グリコホリンCを持つマラリア患者には重症マラリアが少ない⁴³⁾という報告もあるため、パプア・ニューギニアでは、変異型グリコホリンCが熱帯熱マラリア感染の淘汰圧により選択されてきたのかもしれない。ただし、様々な原虫株由来の配列を持つBAEBLのDBLドメインを組換え蛋白として発現し、赤血球結合能を検討したところ、585アミノ酸配列中に見られた4箇所のアミノ酸置換の組合せにより、赤血球への結合特異性が変化するという報告があり⁴⁴⁾、全ての熱帯熱マラリア原虫のBAEBLがグリコホリンCを認識するのかどうかは今後の検討が待たれる。

JESEBLについてもEBA-175やBAEBLと同様の局在を示し、赤血球に結合することが示された。赤血球への結合にはEBA-175とBAEBLと同様にシアル酸を必要とし、赤血球のキモトリプシン処理により結合しなくなったが、トリプシン処理は影響がなかった。また、グリコホリンB欠損赤血球に対しても結合した。ゆえに、JESEBLの血球受容体はグリコホリンAやB、Cではなく、EBA-175やBAEBLとは異なる赤血球表面分子を認識すると考えられる⁴⁵⁾。

Ⅲ. RhopH複合体

マラリア原虫は、侵入すべき赤血球を選択し、密着接合を形成する過程に続いて、ロプトリーの内容物を放出しながら寄生胞膜を形成してゆくが、ロプトリーに含まれる赤血球結合蛋白複合体を解析する過程で、我々は構成蛋白の一つが多重遺伝子族にコードされていることを見出した。この複合体は、ロプトリー高分子蛋白複合体 (RhopH複合体) と呼ばれ、RhopH1とRhopH2, RhopH3の3つの異なる分子により構成される^{46)~49)}。RhopH複合体は赤血球に結合し、赤血球内部の寄生胞膜に分布すること^{50),51)}、RhopH3をコードする遺伝子座が破壊が出来なかったこと⁵²⁾より、赤血球侵入に必須の分子だと考えられている。ところが、構成分子のうちRhopH1とRhopH2をコードする遺伝子が

未同定で、RhopH複合体の分子レベルでの機能解析が進んでいないため、我々はこれらの分子の同定を行った。

a. ネズミマラリア原虫RhopH複合体をコードする遺伝子の同定

まず、*P. yoelii*のロプトリーを精製し、ロプトリー分子に対する単クローン抗体を作成し、ネズミマラリア原虫PyRhopH複合体を構成する140, 135, 100 kDaの蛋白のうち、140 kDa蛋白に反応する単クローン抗体MAb#25, 100 kDa蛋白に反応するMAb#32を得た。MAb#25は免疫電子顕微鏡にてロプトリーに反応することを確認した(図2)。MAb#25を用いたアフィニティー・クロマトグラフィーで精製したRhopH複合体を電気泳動し、ゲルより切り出した各蛋白より、部分アミノ酸配列を決定した。その結果、各蛋白について4つから6つのペプチド配列が得られた。135 kDaと100 kDaの蛋白に関しては、得られたペプチド配列を参考にして縮重プライマーを作成し、PCR増幅された産物から遺伝子情報を得た。140 kDaの蛋白に関しては、*P. yoelii* 17 XNL (non-lethal) 株のショットガン・ゲノム情報が公開されたため⁵³⁾、ペプチド配列をクエリーに用いたBLAST解析により遺伝子を同定した。

100 kDaの蛋白は7つのエキソンから成る882アミノ酸の読取枠にコードされており、熱帯熱マラリア原虫のPfRhopH3と高い相同性を示した^{54),55)}。135 kDaの蛋白は8つのエキソンからなる1292アミノ酸の読取枠、140 kDaの蛋白は10のエキソンから成る1362アミノ酸の読取枠にコードされていた(図3)^{56),57)}。各蛋白がPyRhopH複合体を構成していることは、それぞれ

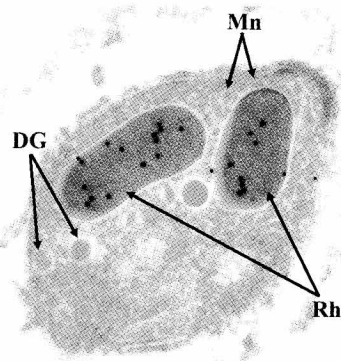


図2. ネズミマラリア原虫*Plasmodium yoelii*メロゾイトの免疫電子顕微鏡像。MAb#25はロプトリー体部に特異的に反応する。(Mn=マイクロナーム, Rh=ロプトリー, DG=デンス・グラニューール)

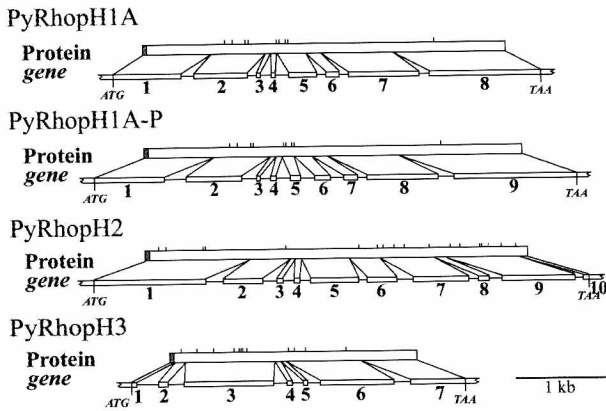


図3. PyRhopH複合体の構成分子, PyRhopH1Aおよび1A-P, 2, 3の遺伝子構造。熱帯熱マラリア原虫の相同体との間で保存しているシステイン残基を垂直線で示す。

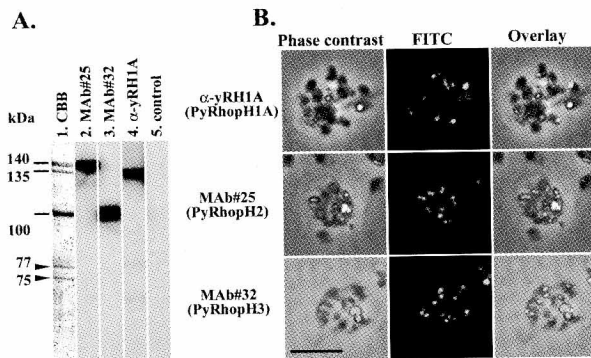


図4. (A) MAb#25で精製したPyRhopH複合体の還元条件下でのウェスタン解析。レーン1では精製した蛋白をクマシー染色で可視化。MAb#25は140 kDaのバンド(PyRhopH2)を、MAb#32は100 kDaのバンド(PyRhopH3)に反応する。抗PyRhopH1A血清(α -yRH1A)は135 kDaのバンドに反応する。77と75 kDaのバンド(矢頭)は解析中。(B) 抗PyRhopH1A血清は、間接蛍光抗体法で、メロゾイトの先端部に反応する。この反応はMAb#25とMAb#32の反応によく似る。パネル中のバーは10 μ mを表す。

の翻訳アミノ酸配列に基づいて作成した抗血清が、精製したPyRhopH複合体のウェスタン解析により、相当するサイズの蛋白に反応すること、また間接蛍光抗体法によりメロゾイトの先端部に特異的に反応することより確認した(図4)。共同研究者である英国のHolderらが行った熱帯熱マラリア原虫のPfRhopH複合体のMALDI-ToF解析の結果とあわせて、*P. yoelii*で同定した140 kDa蛋白をPyRhopH2, 135 kDa蛋白をPyRhopH1A, 100 kDa蛋白をPyRhopH3と名づけた。これらの構成

蛋白には既知のモチーフは存在せず、また、マラリア以外の生物種において相同な蛋白は見出されない。

b. RhopH1は多重遺伝子族にコードされる

熱帯熱マラリア原虫と*P. yoelii*ゲノム情報に対するBLAST検索により、RhopH1は両マラリア原虫種において多重遺伝子族を形成していることが判明した。*P. yoelii*ではPyRhopH1A相同体(PyRhopH1A-P)が他に一つ存在した。一方、熱帯熱マラリア原虫のゲノムには、RhopH1相同体が5つ見出されたが、このうち第9染色体上にあるものは、オーストラリアのKempらのグループにより、熱帯熱マラリア原虫感染赤血球の血管内皮細胞への接着に関与する可能性がある分子として報告されている*cytoadherence linked asexual gene 9* (*clag9*)と呼ばれるものであった。彼らは膜貫通領域予測アルゴリズムの結果と、彼らの抗Clag9抗体が熱帯熱マラリア原虫感染赤血球表面に反応することから、Clag9は感染赤血球膜に局在する四回膜貫通型蛋白であると提唱している^{(58), (59)}。そこで、我々はClag9が熱帯熱マラリア原虫のPfRhopH複合体に含まれているのかどうかを検討した。抗PfRhopH2抗体で免疫沈降したPfRhopH複合体を抗Clag9抗体を用いてウェスタン解析すると、約150 kDaの特異的バンドが反応し、Clag9がPfRhopH複合体に含まれることが示された。RhopH1を含めたRhopH複合体が、原虫の凍結融解で容易に抽出されることと合わせて、アルゴリズムで予測されたClag9の疎水性領域は、本当の膜貫通領域ではないと思われる。さらに、我々が作成した抗Clag9抗体を用いた間接蛍光抗体法では、メロゾイト先端部のみが反応し、感染赤血球表面には反応が見られなかったこと、原虫感染赤血球より分離精製した赤血球膜分画と原虫虫体分画をMALDI-ToF解析した結果、Clag9は原虫虫体分画にのみ見出されたことより、Clag9が感染赤血球表面に局在しているという以前の観察には疑問がある(投稿中)。熱帯熱マラリア原虫の第2染色体上のRhopH1相同体(PfRhopH1_2)もPfRhopH複合体に含まれているため(投稿準備中)、我々は*clag9*を含めて、この多重遺伝子族を*rhopH1*多重遺伝子族と呼ぶことを提唱している(表1, 図5)。

RhopH複合体の赤血球結合ドメインや赤血球側のレセプターは未同定であるが、RhopH1が多重遺伝子族にコードされていることは、この構成分子がRhopH複合体の赤血球結合特異性を決定している可能性を示唆する。

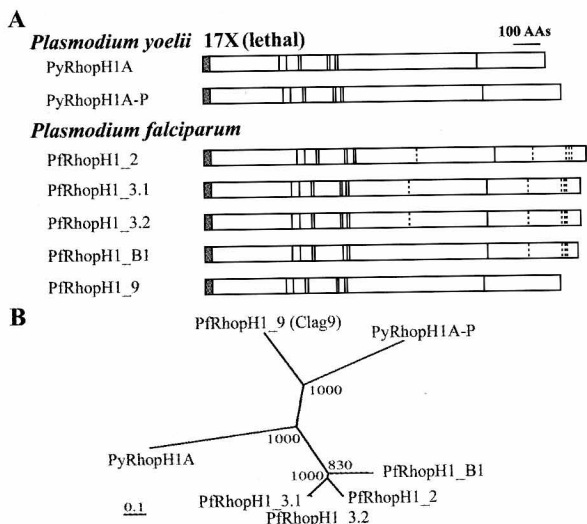


図5. マラリア原虫 *rhoph1* 多重遺伝子族。(A) 保存されているシステイン残基の位置を模式図中の垂直実線で表す。PfRhoph1_2 および 3.1, 3.2, B1 の間で保存されているシステイン残基の位置を垂直破線で表す。(B) Rhoph1 メンバーの翻訳アミノ酸配列を基にした系統樹解析。1000 に対するブートストラップ値を記す。熱帯熱マラリア原虫において、PfRhoph1_9 (Clag9) 以外のメンバーは系統的に近いことが分かる。

IV. おわりに

マラリア原虫メロゾイトのロプトリー頸部に局在し、赤血球侵入の初期選択に関与すると考えられている *rbl* 遺伝子族、マイクロネームに局在し、密着接合形成に関与すると考えられている *eb1* 遺伝子族に加えて、我々は、ロプトリー体部に局在する多重遺伝子族 *rhoph1* を見出した (図6)。これらの多重遺伝子族は、熱帯熱マラリアが流行地で頻繁に見られる赤血球の多型や変異に関係なくヒトに感染し、病原性を発揮する上で、重要な役割を果たしているものと思われる。

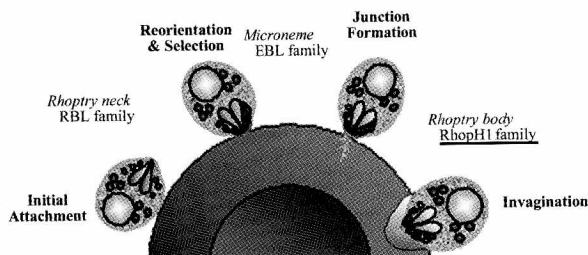


図6. 熱帯熱マラリア原虫の赤血球侵入の初期ステップと多重遺伝子族

文献

- Gardner MJ, Hall N, Fung E et al: Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Nature 2002; 419: 498-511.
- Barnwell JW, Nichols ME, Rubinstein P: In vitro evaluation of the role of the Duffy blood group in erythrocyte invasion by *Plasmodium vivax*. J Exp Med 1989; 169: 1795-802.
- Miller LH, Mason SJ, Clyde DF et al: The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. N Engl J Med 1976; 295: 302-4.
- Holder AA, Freeman RR: Characterization of a high molecular weight protective antigen of *Plasmodium yoelii*. Parasitology 1984; 88: 211-9.
- Oka M, Aikawa M, Freeman RR et al: Ultrastructural localization of protective antigens of *Plasmodium yoelii* merozoites by the use of monoclonal antibodies and ultrathin cryomicrotomy. Am J Trop Med Hyg 1984; 33: 342-6.
- Freeman RR, Trejdosiewicz AJ, Cross GA: Protective monoclonal antibodies recognising stage-specific merozoite antigens of a rodent malaria parasite. Nature 1980; 284: 366-8.
- Holder AA, Freeman RR: Immunization against blood-stage rodent malaria using purified parasite antigens. Nature 1981; 294: 361-4.
- Keen JK, Sinha KA, Brown KN et al: A gene coding for a high-molecular mass rhoptry protein of *Plasmodium yoelii*. Mol Biochem Parasitol 1994; 65: 171-7.
- Ogun SA, Holder AA: A high molecular mass *Plasmodium yoelii* rhoptry protein binds to erythrocytes. Mol Biochem Parasitol 1996; 76: 321-4.
- Keen J, Holder A, Playfair J et al: Identification of the gene for a *Plasmodium yoelii* rhoptry protein. Multiple copies in the parasite genome. Mol Biochem Parasitol 1990; 42: 241-6.
- Borre MB, Owen CA, Keen JK et al: Multiple genes code for high-molecular-mass rhoptry proteins of *Plasmodium yoelii*. Mol Biochem Parasitol 1995; 70: 149-55.
- Preiser PR, Jarra W, Capiod T et al: A rhoptry-protein-associated mechanism of clonal phenotypic variation in rodent malaria. Nature 1999; 398: 618-22.
- Galinski MR, Medina CC, Ingravallo P et al: A reticulocyte-binding protein complex of *Plasmodium vivax* merozoites. Cell 1992; 69: 1213-26.
- Galinski MR, Xu M, Barnwell JW: *Plasmodium vivax* reticulocyte binding protein-2 (PvRBP-2) shares structural features with PvRBP-1 and the *Plasmodium yoelii* 235

- kDa rhostry protein family. *Mol Biochem Parasitol* 2000; 108: 257–62.
15. Rayner JC, Galinski MR, Ingravallo P et al: Two *Plasmodium falciparum* genes express merozoite proteins that are related to *Plasmodium vivax* and *Plasmodium yoelii* adhesive proteins involved in host cell selection and invasion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 9648–53.
 16. Triglia T, Thompson JK, Caruana SR et al: Identification of proteins from *Plasmodium falciparum* that are homologous to the reticulocyte binding proteins in *P. vivax*. *Infect Immun* 2001; 69: 1084–92.
 17. Rayner JC, Vargas-Serrato E, Huber CS et al: A *Plasmodium falciparum* homologue of *Plasmodium vivax* reticulocyte binding protein (PvRBP 1) defines a trypsin-resistant erythrocyte invasion pathway. *J Exp Med* 2001; 194: 1571–81.
 18. Taylor HM, Triglia T, Thompson J et al: *Plasmodium falciparum* homologue of the genes for *Plasmodium vivax* and *Plasmodium yoelii* adhesive proteins, which is transcribed but not translated. *Infect Immun* 2001; 69: 3635–45.
 19. Kaneko O, Mu J, Tsuboi T et al: Gene structure and expression of a *Plasmodium falciparum* 220-kilodalton protein homologous to the *Plasmodium vivax* reticulocyte binding proteins. *Mol Biochem Parasitol* 2002; 121: 275–8.
 20. Galinski MR, Barnwell JW: *P. vivax*: merozoites, invasion of reticulocytes and considerations for malaria vaccine development. *Parasitology Today* 1996; 12: 20–9.
 21. Miller LH, Mason SJ, Dvorak JA et al: Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: Duffy blood group determinants. *Science* 1975; 189: 561–3.
 22. Haynes JD, Dalton JP, Klotz FW et al: Receptor-like specificity of a *Plasmodium knowlesi* malarial protein that binds to Duffy antigen ligands on erythrocytes. *J Exp Med* 1988; 167: 1873–81.
 23. Wertheimer SP, Barnwell JW. *Plasmodium vivax* interaction with the human Duffy blood group glycoprotein: identification of a parasite receptor-like protein. *Exp Parasitol* 1989; 69: 340–50.
 24. Adams JH, Hudson DE, Torii M: The Duffy receptor family of *Plasmodium knowlesi* is located within the micronemes of invasive malaria merozoites. *Cell* 1990; 63: 141–53.
 25. Fang XD, Kaslow DC, Adams JH et al: Cloning of the *Plasmodium vivax* Duffy receptor. *Mol Biochem Parasitol* 1991; 44: 125–32.
 26. Chitnis CE, Miller LH: Identification of the erythrocyte binding domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* proteins involved in erythrocyte invasion. *J Exp Med* 1994; 180: 497–506.
 27. Miller LH, Haynes JD, McAuliffe FM: Evidence for differences in erythrocyte surface receptors for the malarial parasites, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium knowlesi*. *J Exp Med* 1977; 146: 277–81.
 28. Camus D, Hadley TJ: A *Plasmodium falciparum* antigen that binds to host erythrocytes and merozoites. *Science* 1985; 230: 553–6.
 29. Sim BK, Orlandi PA, Haynes JD et al: Primary structure of the 175K *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen and identification of a peptide which elicits antibodies that inhibit malaria merozoite invasion. *J Cell Biol* 1990; 111: 1877–84.
 30. Sim BK, Chitnis CE, Wasniowska K et al: Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Science* 1994; 264: 1941–4.
 31. Sim BK, Toyoshima T, Haynes JD et al: Localization of the 175-kilodalton erythrocyte binding antigen in micronemes of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol Biochem Parasitol* 1992; 51: 157–9.
 32. Miller LH, Aikawa M, Johnson JG et al: Interaction between cytochalasin B-treated malarial parasites and erythrocytes. Attachment and junction formation. *J Exp Med* 1979; 149: 172–84.
 33. Kaneko O, Fidock DA, Schwartz OM et al: Disruption of the C-terminal region of EBA-175 in the Dd2/Nm clone of *Plasmodium falciparum* does not affect erythrocyte invasion. *Mol Biochem Parasitol* 2000; 110: 135–46.
 34. Reed MB, Caruana SR, Batchelor AH et al: Targeted disruption of an erythrocyte binding antigen in *Plasmodium falciparum* is associated with a switch toward a sialic acid-independent pathway of invasion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 7509–14.
 35. Adams JH, Kaneko O, Blair PL et al: An expanding *ebf* family of *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol* 2001; 17: 297–9.
 36. Michon P, Stevens JR, Kaneko O et al: Evolutionary relationships of conserved cysteine-rich motifs in adhesive molecules of malaria parasites. *Mol Biol Evol* 2002; 19: 1128–42.
 37. Triglia T, Thompson JK, Cowman AF: An EBA175 homologue which is transcribed but not translated in erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 2001; 116: 55–63.
 38. Mayer DC, Kaneko O, Hudson-Taylor DE et al: Characterization of a *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding protein paralogous to EBA-175. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 5222–7.

39. Maier AG, Duraisingh MT, Reeder JC et al : *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion through glycophorin C and selection for Gerbich negativity in human populations. *Nat Med* 2003 ; 9 : 87-92.
40. Booth PB, Tills D, Warlow A et al : Red cell antigen, serum protein and red cell enzyme polymorphisms in Karkar Islanders and inhabitants of the adjacent North Coast of New Guinea. *Hum Hered* 1982 ; 32 : 385-403.
41. Patel SS, Mehlotra RK, Kastens W : The association of the glycophorin C exon 3 deletion with ovalocytosis and malaria susceptibility in the Wosera, Papua New Guinea. *Blood* 2001 ; 98 : 3489-91.
42. Pasvol G, Anstee D, Tanner MJ : Glycophorin C and the invasion of red cells by *Plasmodium falciparum*. *Lancet* 1984 ; 1 : 907-8.
43. Serjeantson SW : A selective advantage for the Gerbich-negative phenotype in malarious areas of Papua New Guinea. *PNG Med J* 1989 ; 32 : 5-9.
44. Mayer DC, Mu JB, Feng X et al : Polymorphism in a *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding ligand changes its receptor specificity. *J Exp Med* 2002 ; 196 : 1523-8.
45. Gilberger TW, Thompson JK, Triglia T et al : A novel EBA-175 paralogue from *Plasmodium falciparum* defines a new trypsin-resistant receptor on human erythrocytes. *J Biol Chem* 2003 ; 278 : 14480-6.
46. Campbell GH, Miller LH, Hudson D et al : Monoclonal antibody characterization of *Plasmodium falciparum* antigens. *Am J Trop Med Hyg* 1984 ; 33 : 1051-4.
47. Holder AA, Freeman RR, Uni S et al : Isolation of a *Plasmodium falciparum* rhoptry protein. *Mol Biochem Parasitol* 1985 ; 14 : 293-303.
48. Lustigman S, Anders RF, Brown GV et al : A component of an antigenic rhoptry complex of *Plasmodium falciparum* is modified after merozoite invasion. *Mol Biochem Parasitol* 1988 ; 30 : 217-24.
49. Hienne R, Ricard G, Fusaï T et al : *Plasmodium yoelii* : Identification of rhoptry proteins using monoclonal antibodies. *Exp Parasitol* 1998 ; 90 : 230-5.
50. Sam-Yellowe TY, Shio H, Perkins ME : Secretion of *Plasmodium falciparum* rhoptry protein into the plasma membrane of host erythrocytes. *J Cell Biol* 1988 ; 106 : 1507-13.
51. Sam-Yellowe TY, Perkins ME : Interaction of the 140/130/110 kDa rhoptry protein complex of *Plasmodium falciparum* with the erythrocyte membrane and liposomes. *Exp Parasitol* 1991 ; 73 : 161-71.
52. Cowman AF, Baldi DL, Healer J et al : Functional analysis of proteins involved in *Plasmodium falciparum* merozoite invasion of red blood cells. *FEBS Lett* 2000 ; 476 : 84-8.
53. Carlton JM, Angiuoli SV, Suh BB et al : Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. *Nature* 2002 ; 419 : 512-9.
54. Brown HJ, Coppel RL : Primary structure of a *Plasmodium falciparum* rhoptry antigen. *Mol Biochem Parasitol* 1991 ; 49 : 99-110.
55. Shirano M, Tsuboi T, Kaneko O et al : Conserved regions of the *Plasmodium yoelii* rhoptry protein RhopH3 revealed by comparison with the *P. falciparum* homologue. *Mol Biochem Parasitol* 2001 ; 112 : 297-9.
56. Kaneko O, Tsuboi T, Ling IT et al : The high molecular mass rhoptry protein, RhopH1, is encoded by members of the *clag* multigene family in *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium yoelii*. *Mol Biochem Parasitol* 2001 ; 118 : 223-31.
57. Ling IT, Kaneko O, Narum D et al : Characterisation of the *rhopH2* gene of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium yoelii*. *Mol Biochem Parasitol* 2003 ; 127 : 47-57.
58. Holt DC, Gardiner DL, Thomas EA, et al : The cytoadherence linked asexual gene family of *Plasmodium falciparum* : are there roles other than cytoadherence ? *Int J Parasitol* 1999 ; 29 : 939-44.
59. Trenholme KR, Gardiner DL, Holt D et al : *clag9* : A cytoadherence gene in *P. falciparum* essential for binding parasitized erythrocytes to CD36. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 ; 97 : 4029-33.