

200903005A

厚生労働科学研究費補助金
地球規模保健課題推進研究事業

コムギ無細胞タンパク質合成法を
活用したマラリアワクチン候補抗原の
網羅的探索技術の開発に関する研究

(H 21 - 地球規模 - 一般 - 005)

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 坪 井 敬 文

平成 22 (2010) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金
地球規模保健課題推進研究事業

コムギ無細胞タンパク質合成法を
活用したマラリアワクチン候補抗原の
網羅的探索技術の開発に関する研究

(H21 ー地球規模 ー一般 ー005)

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 坪 井 敬 文

平成22(2010)年5月

目次

I. 総括研究報告

コムギ無細胞タンパク質合成法を活用したマラリア ワクチン候補抗原の網羅的探索技術の開発に 関する研究	坪井敬文 --- 1
--	------------

II. 分担研究報告

1. ゲノムワイドなマラリア原虫抗原探索の 技術基盤の確立	坪井敬文 -- 13 竹尾 暁
2. 抗原探索システムの開発	澤崎達也 -- 21 遠藤弥重太
3. ネズミマラリア評価系の開発	大槻 均 -- 28 橘 真由美 石野智子 鳥居本美

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 33
---------------------	----------

IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 39
-----------------	----------

厚生労働科学研究費補助金(地球規模保健課題推進研究事業)

総括研究報告書

コムギ無細胞タンパク質合成法を活用したマalariaワクチン候補抗原の網羅的探索技術の開発に関する研究

研究代表者 坪井敬文

愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター 教授

研究要旨

マalaria撲滅が 2007 年に再度宣言されて依頼、マalariaワクチン開発は最重要世界保健課題の一つとして再認識された。そのためには、既知のワクチン候補のみの研究では限界に達しており、新たなワクチン候補分子の探索が、緊急の課題となっている。本申請では、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を基盤とするハイスループットなマalariaワクチン候補抗原探索系の技術開発を目的とした。その結果、基盤技術として、ビオチン化タンパク質ライブラリーの作成法、及び高感度かつハイスループットな抗原抗体反応スクリーニング法(アルファスクリーン法)を開発することに成功した。さらに本法を用いて、熱帯熱マalaria原虫タンパク質ライブラリーを構築したところ、熱帯熱マalaria原虫遺伝子を何ら改変することなくゲノムワイドに組換えタンパク質として発現することに成功した。また、防御抗体を保有するヒト血清を選択するために必要な熱帯熱マalaria原虫 *in vitro* 増殖阻害活性測定系を確立した。それを用いて、マリ共和国の高度流行地住民から得たマalaria免疫成人血清の熱帯熱マalaria増殖阻害活性を測定し、その血清サンプルの内 10 名分を用いて、熱帯熱マalaria原虫タンパク質ライブラリーから抗原タンパク質の絞り込みを試行した。その結果、抗体価と原虫増殖阻害活性が正に相関し、ヒトに防御抗体を誘導している可能性のある原虫抗原を同定することが出来た。さらに、ネズミマalariaを用いた *in vivo* ワクチン効果判定系も LDH アッセイ系を用いて高速化することが出来、マalariaワクチン候補抗原の評価系として実施可能なことも示された。以上より、新規マalariaワクチン候補抗原のゲノムワイドな探索が可能となる技術基盤が確立したと考えられた。

研究分担者名

遠藤弥重太	愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター 教授
澤崎達也	愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター 准教授
竹尾 暁	愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター 講師
鳥居本美	愛媛大学大学院医学系研究科 教授
石野智子	愛媛大学大学院医学系研究科 准教授
大槻 均	愛媛大学大学院医学系研究科 助教
橘 真由美	愛媛大学大学院医学系研究科 助教

研究協力者名

三浦憲豊	米国国立アレルギー・感染症研究所 主任研究員
------	------------------------

A. 研究目的

薬剤耐性マラリア原虫や媒介蚊の出現は、現在のマラリア対策にとって大きな障害となっている。そのため、マラリアワクチンの開発が期待されながらも未だ実用化されていない。そこでマラリアゲノム情報を活用して新規ワクチン候補を探索することが必須の研究課題と考えられている。しかし大腸菌等既存の方法ではマラリア原虫タンパク質合成の成功率が低く、研究の障害となっていた。我々が開発したコムギ胚芽無細胞タンパク質合成法は、生きた細胞を使わず試験管内で組換えタンパク質を合成できる独創的な新技術である。本研究は、この技術を用いてマラリアゲノムワイドな高品質タンパク質ライブラリーを作製し、患者血清中のマラリア防御抗体を用いてスクリーニングすることにより新規なマラリアワクチン候補抗原を同定することを目的に実施した。本研究において新規のワクチン候補抗原が同定できれば、国際的なマラリアワクチン研究開発を先導することが期待できる。さらに本研究で同定された新規ワクチンが実用化されれば、乳幼児や妊産婦死亡

の減少のみならず、医療費、労働力の損失等、発展途上国における経済的負担を軽減するという国際的最優先課題について、我が国のプレゼンスを高めることにつながることを期待される。

B. 研究方法

- 1) タンパク質のビオチン化技術の開発
ゲノムワイドな組換えタンパク質ライブラリーを用いて特異的な抗原抗体反応を検出するため、コムギ無細胞系で合成したビオチンリガーゼ、およびビオチン化合物をコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系に加えることにより、タンパク質の特異的部位へのビオチン化を試み、その至適条件を検討した。
- 2) 未精製ビオチン化タンパク質を用いての抗原抗体反応検出
抗原のエピトープが既に同定されている p53 タンパク質とそのモノクローナル抗体をモデルに用いて、アルファスクリーン法における抗原抗体反応のパフォーマンスを検討した。
- 3) マウスプロテインライブラリーを用いた自己抗原の同定
マウス遺伝子の中から、既知の自己

抗原および自己免疫感受性遺伝子座上にコードされた遺伝子を 229 種類選別し、ビオチン化されたマウスタンパク質ライブラリーを作製した。それらを自己免疫疾患モデルマウスもしくは健常マウスの血清を用いて、アルファスクリーン法により抗原抗体反応を検出した。

4) 熱帯熱マalaria原虫メロゾイト期組換えタンパク質の合成

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて、熱帯熱マalaria原虫タンパク質の内マalaria原虫の赤血球期にのみ発現が予想されている遺伝子 1600 クローンを選択した。それぞれからコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いてビオチン化組換えタンパク質ライブラリーを合成した。

5) ハイスループット抗原抗体アッセイ

これらのビオチン化組換えタンパク質ライブラリーとマalaria感染者血清との抗原抗体反応を検出するため、アルファスクリーン法を応用した上記高速免疫スクリーニングシステムを確立した。本年度は作製した 1600 種類の組換えタンパク質のうち、より早期に合成が完了していた 744 種と下記のマリ共和国ヒト免疫血清を用いて抗原タンパク質の絞り込みを実施した。

6) マリ共和国におけるマalaria流行地からのヒト血清試料の入手

熱帯熱マalariaに対する防御免疫を保有していると考えられる血清は、米国立アレルギー・感染症研究所の三浦憲豊博士の協力により、アフリカ、マリ共和国のマalaria流行地において採取していた 52 人分を、同研究所の許可を得て入手した。

7) 熱帯熱マalaria原虫 in vitro 増殖阻害活性測定系の確立

より迅速で簡便な熱帯熱マalaria原虫 in vitro 増殖阻害活性測定系を原虫

LDH 活性の測定を用いて確立し、上記マリ共和国マalaria免疫成人血清 52 人分の原虫増殖阻害率を測定した。

8) LDH アッセイ系を用いた迅速かつ簡便な in vivo ワクチン効果判定法の確立
ネズミマalaria原虫由来 LDH 活性による感染原虫率の測定と、顕微鏡法による結果を比較し、さらに既知抗原 MSP1 をモデルとして用いて、そのワクチン効果を判定した。

(倫理面への配慮)

本研究計画においては、日本、マリ共和国国民からの血清試料の入手が含まれるため、WHOの基準に従った倫理基準に基づいて実施された。血清試料提供者には研究主旨を説明した上で自由意志による同意を書面で得た。またそれらの試料は匿名化を行った。マリ共和国におけるマalaria患者血清の採取に当たってはマリ共和国保健省の許可を得、患者への説明を十分行なった上で同意を得て実施した。また、本血清試料の利用は愛媛大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の許可を得ている。

・疫学研究に関する倫理指針

該当有

・動物実験等の実施に関する基本指針

該当有

・遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律

該当有

C. 研究結果および考察

1) タンパク質のビオチン化技術の開発

コムギ胚芽無細胞系にビオチン化技術を融合することにより、非常に高効率(70~90%)に目的のタンパク質のみにビオチンを付加することが分かった。また、その未精製ビオチン化タンパク質を

用いて、アルファスクリーン法による抗原抗体反応が可能であることが分かった。

2) 未精製ビオチン化タンパク質を用いた抗原抗体反応の検出

ビオチン化 p53 を用いた、アルファスクリーン法による抗原抗体反応至適条件を調べたところ、0.5 pg/ μ L のタンパク質量を検出でき、血清中の 0.05% の抗体を同定でき、1 μ L の血清で 1000 種類の抗原抗体反応が可能なが分かった。

3) マウスプロテインライブラリーを用いた血清中に含まれる自己抗原の同定

アルファスクリーン法により、96 種類の自己免疫疾患モデルマウス特異的自己抗原を同定した。それらを Gene Ontology 解析を行ったところ、反応した自己抗原の多くは、膜タンパク質および自己免疫感受性遺伝子座上の遺伝子であることがわかった。ヒトの血清を用いても、ほぼ同じ条件で自己抗原の同定が可能である。

今後は、より多くの患者血清を用いて、系の至適化を行う。

4) 熱帯熱マalaria原虫メロゾイト期組換えタンパク質の合成

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて、熱帯熱マalaria原虫メロゾイト期にのみ発現が示唆されている遺伝子及び熱帯熱マalaria赤血球期原虫完全長 cDNA ライブラリーから、合計 1600 種類の組換えタンパク質を合成した。

5) マリ共和国ヒト血清試料の熱帯熱マalaria原虫 in vitro 増殖阻害活性測定の測定

マリ共和国ヒト血清試料の熱帯熱マalaria原虫増殖阻害活性を pLDH 法を用いて測定した。52 人分の血清試料の増殖阻害活性は、最高 92% から最低 4% と幅広く分布しており、中央値 43% であった。入手した血清サンプルは少量で

あるため、全種のタンパク質を用いた本スクリーニングに先行して、先ず 52 人分から 10 人分を選択して抗原タンパク質の絞り込みを行った。

6) ハイスループット抗原抗体アッセイの試行および抗原の絞り込み

その結果、上記の組換えタンパク質の内 744 種類のうち、184 種のタンパク質が少なくとも 1 種の血清サンプルと反応し、その内 45 種のタンパク質で抗体価と増殖阻害活性が正に相関した。また、その内 16 種は、原虫表面への発現が予測されていた。

今後は、これまでに作製に成功した熱帯熱マalaria原虫タンパク質ライブラリーの全タンパク質 1600 種、血清試料を 52 種類用いて、解析を実施する。また、同定された新規の抗原に関しては、個別に動物を用いて抗血清を作製し、熱帯熱マalaria原虫 in vitro 増殖阻害活性測定系を用いてワクチン候補抗原の同定にすすめてゆく予定である。

7) LDH アッセイ系を用いた迅速かつ簡便な in vivo ワクチン効果判定法の確立

顕微鏡法でネズミマalaria原虫感染率を測定した感染赤血球検体を LDH アッセイ法で測定した所、両法の計測値は相関係数 0.98 ($p < 0.0001$) で有意に正相関し、LDH アッセイ法が顕微鏡法と同等の測定精度を持つ測定系として有用である事が示された。

8) コムギ胚芽無細胞タンパク質合成 MSP1 によるマウスの免疫と感染実験

コムギ胚芽無細胞系で合成した組換え MSP-1 で 3 回免疫したマウスの血清は、ELISA でネズミマalaria原虫 (*P. yoelii*) 抽出抗原と特異的に反応し、原虫由来の MSP-1 に対する抗体が産生されている事が示された。*P. yoelii* 原虫による感染実験では、MSP-1 免疫マウスは対照群と比べ、著明に低い感染率を示した ($p < 0.001$)。また、対照群では

感染後 8 日までに全頭が死亡したのに対し、MSP-1 免疫マウスは 75%のマウスが生存した。以上の結果からコムギ胚芽無細胞タンパク合成系による組換え MSP1 タンパク質は *in vivo* でも高いワクチン効果を示す事が明らかになった。

今後は、熱帯熱マラリア原虫組換えタンパク質と、流行地の患者血清によるスクリーニングで陽性となった原虫抗原タンパク質について、*P. yoelii* に相同体遺伝子があるものを組換えタンパク質として合成し、マウスに免疫して感染実験を行う事で、ワクチン効果のある原虫タンパク質の *in vivo* 探索を行う。基本的に抗体のみに依存する *in vitro* のアッセイ系と異なり、細胞性免疫などの多様な免疫系の関与が期待出来るマウスの *in vivo* 系は、さらに広範にワクチン候補抗原を発見できる可能性があると考えられる。

D. 結論

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を基盤とした、1)ビオチン化タンパク質ライブラリーの作成法、2)高感度かつハイスループットな抗原抗体反応スクリーニング法を開発することに成功した。また、ネズミマラリア原虫を用いた *in vivo* 系も、迅速かつ簡便な LDH アッセイ法と組み合わせる事により、マラリアワクチン候補抗原の迅速な探索に有用である事が示された。これにより、ゲノムワイドな新規マラリアワクチン候補抗原のスクリーニングが可能となる技術基盤ができた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Takai K, Sawasaki T, Endo Y.

Practical cell-free protein synthesis system using purified wheat embryos. **Nature Protocols** 2010, 5:227-38.

- 2) Shimada H, Hirai K, Simamura E, Hatta T, Iwakiri H, Mizuki K, Hatta T, Sawasaki T, Matsunaga S, Endo Y, Shimizu S. Paraquat toxicity induced by voltage-dependent anion channel 1 acting as an NADH- dependent oxidoreductase. **J Biol Chem.** 2009, 284: 28642-9.
- 3) Nozawa A, Matsubara Y, Tanaka Y, Takahashi H, Akagi T, Seki M, Shinozaki K, Endo Y, Sawasaki T. Construction of a protein library of arabidopsis transcription factors using a wheat cell-free protein production system and its application for DNA binding analysis. **Biosci Biotechnol Biochem.** 2009, 73:1661-4.
- 4) Igawa T, Fujiwara M, Takahashi H, Sawasaki T, Endo Y, Seki M, Shinozaki K, Fukao Y, Yanagawa Y. Isolation and identification of ubiquitin-related proteins from Arabidopsis seedlings. **J Exp Bot.** 2009, 60:3067- 73.
- 5) Takahashi H, Nozawa A, Seki M, Shinozaki K, Endo Y, Sawasaki T. A simple and high-sensitivity method for analysis of ubiquitination and polyubiquitination based on wheat cell-free protein synthesis. **BMC Plant Biology** 2009, 9: art. no. 39
- 6) Nishi M, Ryo A, Tsurutani N, Ohba K, Sawasaki T, Morishita R, Perrem K, Aoki I, Morikawa Y, Yamamoto N. Requirement for microtubule integrity in the SOCS1-mediated intracellular dynamics of HIV-1 Gag. **FEBS Lett.** 2009 583:1243-50.
- 7) Cao J, Kaneko O, Thongkukiatkul

- A, Tachibana M, Otsuki H, Gao Q, Tsuboi T, Torii M.
Rhoptry neck protein RON2 forms a complex with microneme protein AMA1 in *Plasmodium falciparum* merozoites.
Parasitol Int. 2009, 58:29-35.
- 8) Maeda T, Saito T, Harb OS, Roos DS, Takeo S, Suzuki H, Tsuboi T, Takeuchi T, Asai T.
Pyruvate kinase type-II isozyme in *Plasmodium falciparum* localizes to the apicoplast.
Parasitol. Int. 2009, 58:101-105.
- 9) Iriko H, Jin L, Kaneko O, Takeo S, Han ET, Tachibana M, Otsuki H, Torii M, Tsuboi T.
A small-scale systematic analysis of alternative splicing in *Plasmodium falciparum*.
Parasitol Int. 2009, 58:196-199.
- 10) Otsuki H, Kaneko O, Thongkukiattkul A, Tachibana M, Iriko H, Takeo S, Tsuboi T, Torii M.
Single amino acid substitution in *Plasmodium yoelii* erythrocyte ligand determines its localization and controls parasite virulence.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2009, 106:7167-7172.
- 11) Takeo S, Hisamori D, Matsuda S, Vinetz J, Sattabongkot J, Tsuboi T.
Enzymatic characterization of the *Plasmodium vivax* chitinase, a potential malaria transmission-blocking target.
Parasitol Int. 2009, 58:243-248.
- 12) VanBuskirk KM, O'Neill MT, De La Vega P, Maier AG, Krzych U, Williams J, Dowler MG, Sacci, Jr. JB, Kangwanransan N, Tsuboi T, Kneteman NM, Heppner, Jr. DG, Murdock BA, Mikolajczak SA, Aly ASI, Cowman AF, Kappe SHI.
Preerythrocytic, live-attenuated *Plasmodium falciparum* vaccine candidates by design.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2009, 106:13004-13009.
- 13) Jiang G, Shi M, Conteh S, Richie N, Banania G, Geneshan H, Valencia A, Singh P, Aguiar J, Limbach K, Kamrud KI, Rayner J, Smith J, Bruder JT, King CR, Tsuboi T, Takeo S, Endo Y, Doolan DL, Richie TL, Weiss WR.
Sterile protection against *Plasmodium knowlesi* in rhesus monkeys from a malaria vaccine: comparison of heterologous prime boost strategies.
PLoS ONE. 2009, 4(8):e6559.
- 14) Culleton R, Ndounga M, Zeyrek FY, Coban C, Casimiro PN, Takeo S, Tsuboi T, Yadava A, Carter R, Tanabe K.
Evidence for the transmission of *Plasmodium vivax* in the Republic of the Congo, west central Africa.
J Infect Dis. 2009, 200:1465-1469.
- 15) Hayakawa T, Arisue N, Udono T, Hirai H, Sattabongkot J, Toyama T, Tsuboi T, Horii T, Tanabe K.
Identification of *Plasmodium malariae*, a human malaria parasite, in imported chimpanzees.
PLoS ONE. 2009, 4(10):e7412.
- 16) Takeo S, Arumugam TU, Torii M, Tsuboi T.
Wheat germ cell-free technology for accelerating the malaria vaccine research.
Expert Opin Drug Discov. 2009, 4:1191-1199.
- 17) Arakawa T, Tachibana M, Miyata T, Harakuni T, Kohama H, Matsumoto Y, Tsuji N, Hisaeda H, Stowers A, Torii M, Tsuboi T.
Malaria ookinete surface protein-based vaccination via the intranasal route completely blocks parasite transmission in both passive and active vaccination

- regimens in a rodent model of malaria infection.
Infect Immun, 2009, 77: 5496-5500.
- 18) Tetsutani K, Ishiwata K, Ishida H, Tu L, Torii M, Hamano S, Himeno K, Hisaeda H.
Concurrent infection with *Heligmosomoides polygyrus* suppresses anti-*Plasmodium yoelii* protection partially by induction of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) Treg in mice.
Eur J Immunol. 2009, 39:2822-30.
2. 学会発表
- 1) Sawasaki T, Endo Y, Morishita R, Takai K, Membrane protein production and purification without affinity tag based on wheat germ cell-free system. Keystone Symposia Structural Genomics: Expanding the Horizons of Structural Biology (J2). January 8-13, 2010, Colorado, USA.
- 2) Takeo S, Sawasaki T, Torii M, Sattabongkot J, Endo Y, Tsuboi T, Functional production of malarial parasites' proteins with wheat germ cell-free system. Keystone Symposia Structural Genomics: Expanding the Horizons of Structural Biology (J2). January 8-13, 2010, Colorado, USA.
- 3) 船橋一世、澤崎達也、遠藤弥重太. Screening of human protein kinases binding to SOCS1 protein 第32回日本分子生物学会年会. 横浜、2009年12月9-12日
- 4) 船橋一世、澤崎達也、遠藤弥重太. Screening of human protein kinases binding to SOCS1 protein 第32回日本分子生物学会年会. 横浜、2009年12月9-12日
- 5) 清水康平、田所大典、高濱正吉、遠藤弥重太、澤崎達也. Cell biological analysis of TRB3 cleaved by caspase-3. 第32回日本分子生物学会年会. 横浜、2009年12月9-12日
- 6) 橋本季明、吉田茂生、澤崎達也、遠藤弥重太、吉川潮、鎌田真司. Screening of novel caspase substrates functioning at mitotic phase. 第32回日本分子生物学会年会. 横浜、2009年12月9-12日
- 7) 熱田翠薫、吉田篤司、吉崎慎二、八島さやか、松永智子、澤崎達也、梁明秀. Production and characterization of new monoclonal antibodies against human PD-1 that inhibit PD-1/PD-L1 interaction. 第32回日本分子生物学会年会. 横浜、2009年12月9-12日
- 8) 田所大典、高濱正吉、澤崎達也、遠藤弥重太. Complementary screening of Caspase-3-cleaved kinome and the cell biological analysis of the new substances. 第32回日本分子生物学会年会. 横浜、2009年12月9-12日
- 9) 高濱正吉、澤崎達也、岡山明子、赤木達也、遠藤弥重太、山本直樹、梁明秀. 細胞極性抑制キナーゼ aPKC による HIV-1 Gag のリン酸化及びその生理的意義. 第23回日本エイズ学会学術集会・総会. 名古屋、2009年11月26-28日
- 10) 正岡崇志、梁明秀、巽正志、杉浦亙、松永智子、森下了、澤崎達也、山本直樹. 酵素活性を指標とした新規の HIV プロテアーゼ阻害剤耐性検査法の基盤技術の開発. 第23回日本エイズ学会学術集会・総会. 名古屋、2009年11月26-28日

- 11) 田所大典、高濱正吉、澤崎達也、遠藤弥重太. カスパーゼ3により切断されるプロテインカイネーゼの網羅的探索、及び新規基質の細胞生物学的解析. 第4回無細胞生命科学研究会. 岐阜、2009年11月16-17日
- 12) 清水康平、田所大典、高濱正吉、澤崎達也、遠藤弥重太. Caspase-3によるTRB3切断の細胞生物学的解析. 第4回無細胞生命科学研究会. 岐阜、2009年11月16-17日
- 13) Matsuoka K, Komori H, Nose M, Endo Y, Sawasaki T. New Screening Method for Autoantigen Protein Based on Biotinylated Protein Library. HUPO2009. September 26-30, 2009, The Westin Harbour Castle, Toronto.
- 14) 高橋宏隆、澤崎達也、遠藤弥重太. In vitro high-throughput screening of host protein kinases binding to HIV-1 accessory proteins, Vif, Vpr and Vpr, based on wheat cell-free system. 第10回熊本エイズセミナー・エイズグローバルCOE合同国際シンポジウム. 熊本、2009年9月28-29日
- 15) 高濱正吉、澤崎達也、遠藤弥重太. Atypical protein kinase C positively regulates the Vpr incorporation into HIV-1 particles by phosphorylating Gag p6. 第10回熊本エイズセミナー・エイズグローバルCOE合同国際シンポジウム. 熊本、2009年9月28-29日
- 16) Chidananda Nagamangala Kanchiswamy、高橋宏隆、Massimo Maffei、Wilhelm Boland、高林純示、澤崎達也、有村源一郎. 被食誘導遺伝子の発現制御に関するシロイヌナズナ calcium-dependent protein kinase の同定. 第50回日本植物生理学会年会. 名古屋、2009年3月23-24日
- 17) 高橋宏隆、関原明、篠崎一雄、遠藤弥重太、澤崎達也. コムギ無細胞系を用いたモデル植物におけるユビキチン化経路探索法の構築. 第50回日本植物生理学会年会. 名古屋、2009年3月23-24日
- 18) 加藤晃、清水正則、高橋宏隆、澤崎達也、遠藤弥重太、関原明、篠崎一雄、小林裕和. 高等植物の σ 因子をリン酸化するタンパク質キナーゼの探索. 第50回日本植物生理学会年会. 名古屋、2009年3月23-24日
- 19) 松岡和弘、小森浩章、長岡亜紀子、坪井敬文、斉藤知行、能勢真人、青木一郎、澤崎達也、遠藤弥重太. コムギ無細胞系を基盤としたタンパク質ライブラリーを用いた関節リウマチにおける自己抗原タンパク質の網羅的な解析. 第3回無細胞生命科学研究会. 弘前、2009年3月16-17日
- 20) 野澤彰、澤崎達也、小笠原富夫、松永智子、岩崎隆宏、遠藤弥重太. コムギ無細胞系を用いた膜タンパク質生産法の開発. 第3回無細胞生命科学研究会. 弘前大学、2009年3月16-17日
- 21) 松永智子、中川直樹、澤崎達也、竹尾暁、坪井敬文、遠藤弥重太. 自己切断を利用した蛋白質精製ベクターの開発. 第3回無細胞生命科学研究会. 弘前

大学、2009年3月16-17日

- 22) Otsuki H, Kaneko O, Thongkuiatkul A, Tachibana M, Iriko H, Takeo S, Tsuboi T, Torii M.
Erythrocyte-binding-like molecule and virulence of *Plasmodium yoelii*.
Forty-third annual U.S.- Japan Parasitic Diseases Panel Meeting, Tokyo, Japan, January 7-8, 2009.
- 23) Takeo S, Sakamoto H, Hirabayashi N, Torii M, Tsuboi T.
Novel antigens at *Plasmodium falciparum* schizont-merozoite stages as potential vaccine candidates.
Forty-third annual U.S.- Japan Parasitic Diseases Panel Meeting, Tokyo, Japan, January 7-8, 2009.
- 24) Kawazu S, Yano K, Otsuki H, Arai M, Komaki-Yasuda K, Tsuboi T, Torii M, Igarashi I, Kano S.
Disruption of 2-Cys peroxiredoxin TPx-1 gene in *Plasmodium berghei* hinders the sporozoite development.
Forty-third annual U.S.- Japan Parasitic Diseases Panel Meeting, Tokyo, Japan, January 7-8, 2009.
- 25) Suktawonjaroenpon W, Watanabe R, Han ET, Buates S, Krasaesub S, Takeo S, Sirichaisinthop J, Tsuboi T, Sattabongkot J.
Update on field evaluation of LAMP for malaria diagnosis in Thailand.
Forty-third annual U.S.- Japan Parasitic Diseases Panel Meeting, Tokyo, Japan, January 7-8, 2009.
- 26) Tsuboi T, Wu Y. <Invited speaker>
Pfs230: Prefertilization Transmission-blocking Vaccine Candidate.
Malaria Transmission Blocking Strategies. Bangkok, Thailand, March 12-13, 2009.
- 27) Tsuboi T, Takeo S, Otsuki H, Tachibana M, Sattabongkot J, Torii M. <Invited speaker>
Wheat germ cell-free protein synthesis system: a breakthrough for the post-genome malaria vaccine candidate discovery.
Vivax malaria research III: 2009 and beyond, Gamboa, Panama, May 24-28, 2009.
- 28) Tachibana M, Iriko H, Muratova O, Song G, Wu Y, Sattabongkot J, Takeo S, Otsuki H, Torii M, Tsuboi T.
Immunization with N-terminal region of a gametocyte protein Pfs230 successfully induce transmission-blocking antibodies against *Plasmodium falciparum*.
The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan. September 8-11, 2009.
- 29) Tachibana M, Iriko H, Muratova O, Song G, Wu Y, Sattabongkot J, Takeo S, Otsuki H, Torii M, Tsuboi T.
Immunization with N-terminal region of a gametocyte protein Pfs230 successfully induce transmission-blocking antibodies against *Plasmodium falciparum*.
ASTMH 58th annual meeting, Washington DC, USA, November 18-22, 2009.
- 30) Takeo S, Sakamoto H, Kaneko T, Tachibana M, Miura K, Varma S, Sattabongkot J, Torii M, Tsuboi T.

- Identification of novel blood-stage vaccine candidates against *Plasmodium falciparum* by high-throughput immunoscreening. ASTMH 58th annual meeting, Washington DC, USA, November 18-22, 2009.
- 31) Aguiar JC, Bolton J, Wanga J, Urquhart A, Sacci JB, Limbach K, Tsuboi T, Ockenhouse C, Richie TL. Discovering novel pre-erythrocytic antigens for malaria vaccines. ASTMH 58th annual meeting, Washington DC, USA, November 18-22, 2009.
- 32) 宮田 健、小濱秀泰、原國哲也、坪井敬文、Sattabongkot Jetsumon、橘真由美、鳥居本美、松崎吾朗、新川 武
マラリアワクチン開発のための三部構成五価免疫賦活複合体
第 78 回日本寄生虫学会大会、東京都、3/27-28、2009.
- 33) Sungkapong Tippawan、Culleton Richard、矢幡一英、坪井敬文、鳥居本美、Sattabongkot Jetsumon、金子 修、Chotivanh Kesinee
Characterization of *Plasmodium vivax* subtelomeric transmembrane protein (PvSTP), a homolog of *P. falciparum* SURFIN.
第 78 回日本寄生虫学会大会、東京都、3/27-28、2009
- 34) 横内ゆき、大槻 均、橘 真由美、伊与久菜摘、韓 銀澤、竹尾 暁、坪井敬文、鳥居本美
LDH 活性測定によるネズミマラリア原虫感染率の迅速簡便測定法の確立
第 78 回日本寄生虫学会大会、東京都、3/27-28、2009.
- 35) 坂本寛和、竹尾 暁、金子隆昌、谷上弘恵、松岡和弘、橘真由美、澤崎達也、Sattabongkot Jetsumon、鳥居本美、坪井敬文
高速免疫スクリーニングによる新規熱帯熱マラリア赤血球期ワクチン候補抗原の探索
第 78 回日本寄生虫学会大会、東京都、3/27-28、2009.
- 36) 橘真由美、Wu Yimin、入子英幸、大槻 均、Sattabongkot Jetsumon、竹尾 暁、鳥居本美、坪井敬文
コムギ無細胞系を用いた抗体誘導可能な熱帯熱マラリア伝搬阻止ワクチン候補抗原 Pfs230 の作製
第 78 回日本寄生虫学会大会、東京都、3/27-28、2009.
- 37) Kangwanransan Niwat、Jenwithisuk Rachaneeporn、橘真由美、坪井敬文、鳥居本美
A novel ookinete surface protein with high potential of transmission-blocking vaccine candidate.
第 78 回日本寄生虫学会大会、東京都、3/27-28、2009.
- 38) 小濱秀泰、宮田 健、原國哲也、坪井敬文、Sattabongkot Jetsumon、橘真由美、鳥居本美、松崎吾朗、新川 武
酵母 *Pichia pastoris* 発現三日熱マラリア伝搬阻止ワクチン Pvs25 の感染防御効果
第 78 回日本寄生虫学会大会、東京都、3/27-28、2009.
- 39) 高橋優三、奥祐三郎、青木 孝、赤尾信明、嶋田淳子、鈴木 守、松岡裕之、有園直樹、坪井敬文、金澤 保、由井克之、竹内 勤
日本における寄生虫学・医動物学教育の現況調査報告
第 78 回日本寄生虫学会大会、東

- 京都、3/27-28、2009.
- 40) 加藤 晶、竹尾 暁、坪井 敬文
マラリア原虫メロゾイトにおける新規
Inner Membrane Complex 関連分子
の探索
第 17 回分子寄生虫学ワークショップ、
草津町、8/6-9、2009.
- 41) 竹尾 暁、坪井 敬文
網羅と決め打ち:コムギ胚芽無細胞
系組換えタンパク質合成法を用いた、
マラリア原虫赤血球期発現分子
の解析
第 17 回分子寄生虫学ワークショップ、
草津町、8/6-9、2009.
- 42) 金子 隆昌、坂本 寛和、竹尾 暁、
坪井 敬文
マラリア原虫に対する増殖阻害率を
測定済みの抗体を用いた新規ワク
チン候補抗原の探索
第 17 回分子寄生虫学ワークショップ、
草津町、8/6-9、2009.
- 43) 埜本 竜宏、竹尾 暁、坪井 敬文
熱帯熱マラリア原虫メロゾイトにおけ
る新規抗原タンパク質の性状解析
第 17 回分子寄生虫学ワークショップ、
草津町、8/6-9、2009.
- 44) 北村 圭、熊谷 貴、Bethel Bentum
K、三田村俊秀、坪井敬文、朝日博
子、太田伸生
熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium*
falciparum におけるオートファジー
の役割
第 17 回分子寄生虫学ワークショップ、
草津町、8/6-9、2009.
- 45) 佐野 桂、畑 昌幸、坪井敬文、上
田貴志、由比良子、伊藤喜重、中
野明彦、北 潔、室伏きみ子、佐々
木成江
熱帯熱マラリア原虫ミトコンドリア
DNA polymerase の解析
第 8 回分子寄生虫・マラリア研究フ
ォーラム、豊中市、10/9-10、2009.
- 46) 大槻 均、石野智子、金子 修、橘
真由美、坪井敬文、鳥居本美
ネズミマラリア原虫赤血球結合タン
パク(EBL)の細胞内輸送ドメインの
機能解析
第 8 回分子寄生虫・マラリア研究フ
ォーラム、豊中市、10/9-10、2009.
- 47) 北村 圭、熊谷 貴、Bethel Bentum
K、三田村俊秀、坪井敬文、太田伸
生
熱帯熱マラリア原虫のオートファジ
ー関連分子
第 8 回分子寄生虫・マラリア研究フ
ォーラム、豊中市、10/9-10、2009.
- 48) Akira Kaneko、Luis Fernando
Chaves、George Taleo、Hedvig
Perlmann、Hideaki Eto、Satoru
Takeo、Takafumi Tsuboi、Chris
Drakeley、Kazuyuki Tanabe、
Marita Troye-Blomberg
Plasmodium vivax resurgence a
decade after malaria elimination on
Aneityum island.
第 8 回分子寄生虫・マラリア研究フ
ォーラム、豊中市、10/9-10、2009.
- 49) 竹尾 暁、坂本寛和、金子隆昌、埜
本竜宏、Jetsumon Sattabongkot、坪
井敬文
熱帯熱マラリア原虫の赤血球期分
子:免疫スクリーニングから新規抗
原分子の解析
第 8 回分子寄生虫・マラリア研究フ
ォーラム、豊中市、10/9-10、2009.
- 50) 竹尾 暁、坂本寛和、金子隆昌、
坪井敬文
赤血球期マラリアワクチン候補抗原
分子を探索する免疫スクリーニング
第 32 回日本分子生物学会年会、
横浜、12/9-12、2009.
- 51) 大槻 均、金子 修、Amporn
Thongkukiatkul、橘 真由美、入子
英幸、竹尾 暁、坪井 敬文、鳥居

本美	なし
マalaria原虫の赤血球侵入に必須な分子(EBL)の細胞内移行と病原性を決定する部位の同定	2. 実用新案登録 なし
第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、12/9-12、2009.	
G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)	3. その他 なし
1. 特許取得	

厚生労働科学研究費補助金(地球規模保健課題推進研究事業)
「コムギ無細胞タンパク質合成法を活用したマalariaワクチン候補抗原の網羅的探索
技術の開発に関する研究」

分担研究報告書

ゲノムワイドなマalaria原虫抗原探索の技術基盤の確立

研究分担者 坪井敬文

愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター 教授

竹尾 暁

愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター 講師

研究要旨

申請者らは、マalaria原虫組換えタンパク質の合成に優れているコムギ胚芽無細胞タンパク質合成法を用いて熱帯熱マalaria原虫のゲノムワイドに組換えタンパク質を発現し、その中から新規抗原を同定することを目的に本研究を実施した。コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いることにより、コドン改変することなく熱帯熱マalaria原虫全遺伝子 5400 種類の内、1600 種類を組換えタンパク質として合成することに成功した。これを用いて、アルファスクリーン法を応用した高速免疫スクリーニングシステムを確立し、さらに自動液体分注ロボットシステムの導入により、高速免疫スクリーニングの技術基盤を確立した。同時に、上記タンパク質ライブラリーのスクリーニングに用いる防御抗体を保有するヒト血清を選択するために必要な、熱帯熱マalaria原虫 *in vitro* 増殖阻害活性測定系を確立した。本スクリーニングの準備のため、マリ共和国の高度流行地住民から得たマalaria免疫成人血清 52 人分の熱帯熱マalaria増殖阻害活性を測定し、その血清サンプルの内 10 名分を用いて、より早期に合成が完了していた 744 種のタンパク質ライブラリーから抗原タンパク質の絞り込みを試行した。その結果、184 種のタンパク質が少なくとも 1 種の血清サンプルと反応し、その内 45 種のタンパク質で抗体価と増殖阻害活性が正に相関した。以上より、新規マalariaワクチン候補抗原のゲノムワイドな探索が可能となる技術基盤が確立したと考えられた。

[研究協力者]
三浦憲豊

(米国国立アレルギー・感染症研究所)

A. 研究目的

マラリア撲滅が 2007 年に再度宣言されて依頼、マラリアワクチン開発は緊急の課題として再認識された。そのためには、既知のワクチン候補のみの研究では限界に達しており、新たなワクチン候補分子の探索が、緊急の課題となっている。申請者らは、マラリア原虫組換えタンパク質の合成に優れているコムギ胚芽無細胞タンパク質合成法を用いて熱帯熱マラリア原虫のゲノムワイドに組換えタンパク質を発現し、その中から新規抗原を同定することを目的に本研究を実施した。本研究において新規のワクチン候補抗原が同定できれば、国際的なマラリアワクチン研究開発を先導することが期待できる。さらに本研究で同定された新規ワクチンが実用化されれば、乳幼児や妊産婦死亡の減少のみならず、医療費、労働力の損失等、発展途上国における経済的負担を軽減するという国際的最優先課題について、我が国のプレゼンスを高めることにつながることを期待される。

B. 研究方法

1) 熱帯熱マラリア原虫メロゾイト期組換えタンパク質の合成

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて、熱帯熱マラリア原虫タンパク質の内、マラリアゲノム情報データベース(PlasmoDB)より、マラリア原虫の赤血球への侵入型であるメロゾイト期にのみ発現が示唆されている遺伝子を選択した。それに加えて、既に保有している熱帯熱マラリア赤血球期原虫完全長 cDNA ライブラリーから、合計 1600 クローンを選択した。それぞれ個別に PCR を用いて *in vitro* 転写用の鋳型 DNA を作製した。転写後、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いてビオチン化組

換えタンパク質ライブラリーを合成した。

2) ハイスループット抗原抗体アッセイ

これらのビオチン化組換えタンパク質ライブラリーとマラリア感染者血清との抗原抗体反応を検出するために、アルファスクリーン法を応用した高速免疫スクリーニングシステムを確立し、さらに自動液体分注ロボットシステム(JANUS, パーキンエルマー社)の導入により、高速免疫スクリーニングの技術基盤を確立した。本年度は作製した 1600 種類の組換えタンパク質のうち、より早期に合成が完了していた 744 種と下記のマリ共和国ヒト免疫血清のうち、10名分を用いて抗原タンパク質の絞り込みを実施した。

3) マリ共和国におけるマラリア流行地からのヒト血清試料の入手

熱帯熱マラリアに対する防御免疫を保有していると考えられる血清は、米国立アレルギー・感染症研究所の三浦憲豊博士の協力により、アフリカ、マリ共和国のマラリア流行地において米国立アレルギー・感染症研究所が承認を得て採取していた免疫成人血清 52 人分を、同研究所の許可を得て入手した。

(倫理面への配慮)

本血清試料の利用は愛媛大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の許可を得ている。「患者血清を用いた新規マラリアワクチン抗原の同定」、承認番号:疫16-1)

4) 熱帯熱マラリア原虫 *in vitro* 増殖阻害活性測定系の確立

従来の熱帯熱マラリア原虫 *in vitro* 増殖阻害活性測定系は、熟練と長時間を要する顕微鏡下での感染率の測定を用いていたため、高速スクリーニングには適していなかった。そこで、より迅速で簡便な熱帯熱マラリア原虫由来の乳酸脱水素酵素(pLDH)活性の測定を用

いて、感染原虫数の測定に置き換えられることが報告されていた方法の導入を行った。その際、原虫阻害効果が既知の陽性対照が必須であるため、熱帯熱マラリア原虫 AMA1 タンパク質をコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて合成・精製しウサギ抗血清を作成した。作製した抗 AMA1 抗体の熱帯熱マラリア原虫に対する増殖阻害率を、pLDH 法及び顕微鏡法で比較検討したところ、有意な正の相関が得られたため、本法が確立されたと考え、上記マリ共和国マラリア免疫成人血清 52 人分の原虫増殖阻害率を測定した。

C. 研究結果および考察

1) 熱帯熱マラリア原虫メロゾイト期組換えタンパク質の合成

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて、熱帯熱マラリア原虫メロゾイト期にのみ発現が示唆されている遺伝子及び熱帯熱マラリア赤血球期原虫完全長 cDNA ライブラリーから、合計 1600 種類の組換えタンパク質を合成した。

2) マリ共和国ヒト血清試料の熱帯熱マラリア原虫 in vitro 増殖阻害活性測定の測定

マリ共和国ヒト血清試料の熱帯熱マラリア原虫増殖阻害活性を pLDH 法を用いて測定した。52 人分の血清試料の増殖阻害活性は、最高 92% から最低 4% と幅広く分布しており、中央値 43% であった。入手した血清サンプルは少量であるため、全種のタンパク質を用いた本スクリーニングに先行して、先ず 52 人分から 10 人分を選択して抗原タンパク質の絞り込みを行うことにした。その 10 人分は、増殖阻害率が均等に分布するように選択した(4%, 17%, 26%, 37%, 45%, 53%, 61%, 68%, 76%, 92%)。

3) ハイスループット抗原抗体アッセイの試行および抗原の絞り込み

上記の組換えタンパク質の内 744 種類を用いて、10 種類のヒト血清との反応性をアルファスクリーン法を用いて検討した。その結果、184 種のタンパク質が少なくとも 1 種の血清サンプルと反応し、その内 45 種のタンパク質で抗体価と増殖阻害活性が正に相関した。また、その内 16 種は、データベース上シグナル配列や膜貫通ドメインの存在が予測されており、原虫表面への発現が予測されていることから、今後優先的にこれらの分子の解析を行う。

以上の結果から、本法のハイスループット免疫スクリーニング系としての有用性が確認された。

4) 今後の課題

これまでに作製に成功した熱帯熱マラリア原虫タンパク質ライブラリーの全タンパク質 1600 種、血清試料を 52 種類用いて、解析を実施する。また、同定された新規の抗原に関しては、個別に動物を用いて抗血清を作製し、熱帯熱マラリア原虫 in vitro 増殖阻害活性測定系を用いてワクチン候補抗原の同定にすすめてゆく予定である。

D. 結論

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いたハイスループット抗原抗体反応スクリーニングにより、ゲノムワイドな新規マラリアワクチン候補抗原のスクリーニングが可能と考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Cao J, Kaneko O, Thongkukiattkul A, Tachibana M, Otsuki H, Gao Q, Tsuboi T, Torii M.
Rhoptry neck protein RON2 forms a complex with microneme protein AMA1 in *Plasmodium falciparum* merozoites.
Parasitol Int. 2009, 58:29-35.

- 2) Maeda T, Saito T, Harb OS, Roos DS, Takeo S, Suzuki H, Tsuboi T, Takeuchi T, Asai T.
Pyruvate kinase type-II isozyme in *Plasmodium falciparum* localizes to the apicoplast.
Parasitol. Int. 2009, 58:101-105.
 - 3) Iriko H, Jin L, Kaneko O, Takeo S, Han ET, Tachibana M, Otsuki H, Torii M, Tsuboi T.
A small-scale systematic analysis of alternative splicing in *Plasmodium falciparum*.
Parasitol Int. 2009, 58:196-199.
 - 4) Otsuki H, Kaneko O, Thongkukiatkul A, Tachibana M, Iriko H, Takeo S, Tsuboi T, Torii M.
Single amino acid substitution in *Plasmodium yoelii* erythrocyte ligand determines its localization and controls parasite virulence.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2009, 106:7167-7172.
 - 5) Takeo S, Hisamori D, Matsuda S, Vinetz J, Sattabongkot J, Tsuboi T.
Enzymatic characterization of the *Plasmodium vivax* chitinase, a potential malaria transmission-blocking target.
Parasitol Int. 2009, 58:243-248.
 - 6) VanBuskirk KM, O'Neill MT, De La Vega P, Maier AG, Krzych U, Williams J, Dowler MG, Sacci, Jr. JB, Kangwanransan N, Tsuboi T, Kneteman NM, Heppner, Jr. DG, Murdock BA, Mikolajczak SA, Aly ASI, Cowman AF, Kappe SHI.
Preerythrocytic, live-attenuated *Plasmodium falciparum* vaccine candidates by design.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2009, 106:13004-13009.
 - 7) Jiang G, Shi M, Conteh S, Richie N, Banania G, Geneshan H, Valencia A, Singh P, Aguiar J, Limbach K, Kamrud KI, Rayner J, Smith J, Bruder JT, King CR, Tsuboi T, Takeo S, Endo Y, Doolan DL, Richie TL, Weiss WR.
Sterile protection against *Plasmodium knowlesi* in rhesus monkeys from a malaria vaccine: comparison of heterologous prime boost strategies.
PLoS ONE. 2009, 4(8):e6559.
 - 8) Culleton R, Ndounga M, Zeyrek FY, Coban C, Casimiro PN, Takeo S, Tsuboi T, Yadava A, Carter R, Tanabe K.
Evidence for the transmission of *Plasmodium vivax* in the Republic of the Congo, west central Africa.
J Infect Dis. 2009, 200:1465-1469.
 - 9) Hayakawa T, Arisue N, Udono T, Hirai H, Sattabongkot J, Toyama T, Tsuboi T, Horii T, Tanabe K.
Identification of *Plasmodium malariae*, a human malaria parasite, in imported chimpanzees.
PLoS ONE. 2009, 4(10):e7412.
 - 10) Takeo S, Arumugam TU, Torii M, Tsuboi T.
Wheat germ cell-free technology for accelerating the malaria vaccine research.
Expert Opin Drug Discov. 2009, 4:1191-1199.
 - 11) Arakawa T, Tachibana M, Miyata T, Harakuni T, Kohama H, Matsumoto Y, Tsuji N, Hisaeda H, Stowers A, Torii M, Tsuboi T.
Malaria ookinete surface protein-based vaccination via the intranasal route completely blocks parasite transmission in both passive and active vaccination regimens in a rodent model of malaria infection.
Infect Immun. 2009, 77: 5496-5500.
2. 学会発表
- 1) Otsuki H, Kaneko O,

- Thongkukiattkul A, Tachibana M, Iriko H, Takeo S, Tsuboi T, Torii M.
Erythrocyte-binding-like molecule and virulence of *Plasmodium yoelii*.
Forty-third annual U.S.- Japan Parasitic Diseases Panel Meeting, Tokyo, Japan, January 7-8, 2009.
- 2) Takeo S, Sakamoto H, Hirabayashi N, Torii M, Tsuboi T.
Novel antigens at *Plasmodium falciparum* schizont-merozoite stages as potential vaccine candidates.
Forty-third annual U.S.- Japan Parasitic Diseases Panel Meeting, Tokyo, Japan, January 7-8, 2009.
- 3) Kawazu S, Yano K, Otsuki H, Arai M, Komaki-Yasuda K, Tsuboi T, Torii M, Igarashi I, Kano S.
Disruption of 2-Cys peroxiredoxin TPx-1 gene in *Plasmodium berghei* hinders the sporozoite development.
Forty-third annual U.S.- Japan Parasitic Diseases Panel Meeting, Tokyo, Japan, January 7-8, 2009.
- 4) Suktawonjaroenpon W, Watanabe R, Han ET, Buates S, Krasaesub S, Takeo S, Sirichaisinthop J, Tsuboi T, Sattabongkot J.
Update on field evaluation of LAMP for malaria diagnosis in Thailand.
Forty-third annual U.S.- Japan Parasitic Diseases Panel Meeting, Tokyo, Japan, January 7-8, 2009.
- 5) Tsuboi T, Wu Y. <Invited speaker>
Pfs230: Prefertilization Transmission-blocking Vaccine Candidate.
Malaria Transmission Blocking Strategies. Bangkok, Thailand, March 12-13, 2009.
- 6) Tsuboi T, Takeo S, Otsuki H, Tachibana M, Sattabongkot J, Torii M. <Invited speaker>
Wheat germ cell-free protein synthesis system: a breakthrough for the post-genome malaria vaccine candidate discovery.
Vivax malaria research III: 2009 and beyond, Gamboa, Panama, May 24-28, 2009.
- 7) Tachibana M, Iriko H, Muratova O, Song G, Wu Y, Sattabongkot J, Takeo S, Otsuki H, Torii M, Tsuboi T.
Immunization with N-terminal region of a gametocyte protein Pfs230 successfully induce transmission-blocking antibodies against *Plasmodium falciparum*.
The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan. September 8-11, 2009.
- 8) Tachibana M, Iriko H, Muratova O, Song G, Wu Y, Sattabongkot J, Takeo S, Otsuki H, Torii M, Tsuboi T.
Immunization with N-terminal region of a gametocyte protein Pfs230 successfully induce transmission-blocking antibodies against *Plasmodium falciparum*.
ASTMH 58th annual meeting, Washington DC, USA, November 18-22, 2009.
- 9) Takeo S, Sakamoto H, Kaneko T, Tachibana M, Miura K, Varma S, Sattabongkot J, Torii M, Tsuboi T.
Identification of novel blood-stage vaccine candidates against *Plasmodium falciparum* by