

- high-throughput immunoscreening.
ASTMH 58th annual meeting,
Washington DC, USA, November
18-22, 2009.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) 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 回分子寄生虫学・マラリア研究フォーラム、豊中市、10/9-10、2009.
- 25) 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 回分子寄生虫学・マラリア研究フォーラム、豊中市、10/9-10、2009.
- 26) 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 回分子寄生虫学・マラリア研究フォーラム、豊中市、10/9-10、2009.
- 27) 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 回分子寄生虫学・マラリア研究フォーラム、豊中市、10/9-10、2009.
- 28) 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 回分子寄生虫学・マラリア研究フォーラム、豊中市、10/9-10、2009.
- 29) 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.
- 30) 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
マラリア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
第 32 回日本分子生物学会年会、
横浜、12/9-12、2009.

2. 実用新案登録
なし

F. 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
なし

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」

分担研究報告書

抗原探索システムの開発

研究分担者 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

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

研究要旨

我々が開発してきたコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を基盤とし、未精製のタンパク質を用いた網羅的な抗原抗体反応の検出の技術開発を目指し研究を進めたところ、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（アルファスクリーン法）を開発することに成功した。これにより、マラリア流行の血清疫学指標となりうる新規抗原タンパク質のスクリーニングがゲノムワイドに可能となる技術基盤ができたと考えられる。

A. 研究目的

ゲノムシーケンス技術の発展に伴い、ヒトやマラリア原虫を含め、非常に多くの生物種のゲノム配列が決定され、これらの研究成果は、ヒトでは2万5千種類、マラリア原虫では約5,400種類の遺伝子が存在していることがわかった。我々は、コムギ胚芽無細胞系を基盤に、タンパク

質を自動で合成できる技術や機械の開発を進め、cDNA 鋳型さえあれば、マラリア原虫がもつ全てのタンパク質を1週間程度で取りそろえる技術を開発することに成功している。本研究の目的として、これらのタンパク質ライブラリーを用いて、ワクチン候補探索に必須な、高感度かつハイスループットに抗原抗体反応を検

出可能とする技術の開発を目指した。

B. 研究方法

1) タンパク質のビオチン化技術の開発

数千種類規模のタンパク質を精製してから用いることは現実的に不可能である。そのため、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には、目的タンパク質のみを特異的にラベルおよび検出する技術が必須である。我々は、様々なタグを用いて試みたところ、ビオチンライゲーション部位と呼ばれるアミノ酸配列 (GLNDIFEAQKIEWHE) の付加と、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た。また、未精製ビオチン化タンパク質を用いたアルファスクリーン法による抗原抗体反応におけるビオチン濃度およびビオチンリガーゼの至適条件を調べた。

2) 未精製ビオチン化タンパク質を用いて抗原抗体反応検出

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調べた。

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、N 末端へのビオチン化配列の付加を行った DNA 鋳型を作成し、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて、ビオチン化されたマウスタンパク質ライブラリーの作成を行い、それらと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。

(倫理面への配慮)

愛媛大学研究等倫理規程を遵守し、倫理委員会の承認の下に患者様に適切な説明の上、同意を得た臨床検体のみを研究に使用する。特に、患者様個人情報の管理には万全を期し、本研究はタンパクレベルの研究でありヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針 (文部科学省、厚生労働省、経済産業省、平成 13 年告示) の対象外であるが、それに準じて連結可能匿名化を行い、本研究に関与しない個人情報管理者が個人情報を管理するようにする。

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、その時に、ビオチン濃度が500~1000 nMの場合、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。ビオチンリガーゼに関しては、2 μ g（コムギ無細胞合成の1 μ Lに相当）を必要とした。

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、膜上の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。

4) 今後の課題

ヒトの血清を用いて、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。

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。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といえる。

E. 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.
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 germcell-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スの網羅的探索、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. HUP02009. September 26-30, 2009, The Westin HarbourCastle, 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, Vpu 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關与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

なし

2. 実用新案登録
なし

F. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

3. その他

1. 特許取得

なし

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」

分担研究報告書

ネズミマラリア評価系の開発

研究分担者 大槻 均、橘 真由美
愛媛大学大学院医学系研究科 助教
石野智子
愛媛大学大学院医学系研究科 准教授
鳥居本美
愛媛大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて作成したネズミマラリア原虫メロゾイト表面タンパク質でマウスを免疫し、ネズミマラリア原虫を感染させた所、強い防御免疫を得る事が出来た。コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系による組換えタンパク質が *in vivo* においてもマラリアワクチンの抗原として有効である事が示された。また、LDH アッセイ系により、迅速・簡便にマウスを用いた *in vivo* でのワクチン効果の判定を行える事が示された。

A. 研究目的

マラリアワクチンの抗原としてのコムギ胚芽無細胞タンパク質合成法によるマラリア原虫組換えタンパクの有用性を評価し、マウスを用いた新規マラリアワクチン抗原探索系を確立するために、ネズミマラリア原虫のメロゾイト表面タンパク質を合成し、マウスを免疫した。免疫マウスにネズミマラリア原虫を感染させ、原虫の感染率と生存率を比較することにより、ワクチン効果を検証した。感染率の測定には、顕微鏡下による計測に代わり、新規に LDH アッセイ系を導入して迅速なスクリーニング系としての有用性を確認した。

B. 研究方法

- 1) 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
従来の熟練と長時間を要する顕微鏡下での感染率の測定を、より迅速で簡便であるがこれまでネズミマラリア原虫系では用いられていなかった原虫由来 LDH アッセイ系による測定で置き換えられるかを検討するため、ネズミマラリア原虫の感染率を顕微鏡下での計測と LDH アッセイ系による測定の両方で行い、両法による結果を比較した。
- 2) 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

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて、既にワクチン効果の示されているネズミマラリア原虫 *Plasmodium yoelii* のメロゾイト表面タンパク質 MSP-1 を合成した。組換え MSP-1 を BALB/c マウスに 25 μ g ずつ 3 回腹腔内投与して免疫した。また、対照群は同量のグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) で免疫した。

3) コムギ胚芽無細胞タンパク質免疫マウスに対する感染実験

MSP-1 免疫マウスと対照群マウスに、同時に 1×10^4 個の *P. yoelii* 強毒株 17XL 株感染赤血球を経静脈的に投与して感染させた。感染マウスの赤血球感染率は、LDH アッセイ法によって測定し、対照群と比較した。また生存率を比較した。

C. 研究結果および考察

1) 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感染率を測定したうえで、段階希釈により感染率を変化させた感染赤血球を 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系であり、ネズミマラリア原虫を用いた *in vivo* 実験系の測定系として有用である事が示された。

2) 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作成した組換え MSP-1 で 3 回免疫したマウスの血清は、ELISA で *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* 強毒株 17XL 株原

虫による感染実験では、MSP-1 免疫マウスは対照群と較べ、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、その後血液中の原虫を排除して治癒した。以上の結果からコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系による組換えタンパク質は *in vivo* でも高いワクチン効果を示す事が明らかになった。

3) 今後の課題

熱帯熱マラリア原虫のコムギ胚芽無細胞系による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メロゾイト期のタンパク質について、*P. yoelii* にオルソログがあるものを組換えタンパク質として作成し、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

コムギ胚芽無細胞系で作成した組換えタンパク質はマウスを用いた *in vivo* 系においても高いワクチン効果を示し、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探索に有用である事が示された。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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) 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.
 - 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, 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.
 - 6) 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, Thongkukiatkul 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) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Sungkapong Tippawan、Culleton Richard、矢幡一英、坪井敬文、鳥居本美、Sattabongkot Jetsumon、金子 修、Chotivanch 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
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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
マラリア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
第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、12/9-12、2009.

- F. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|---|----------------------------------|-----|-----------|------|
| Cao J, Kaneko O, Thongkuiatkul A, Tachibana M, Otsuki H, Gao Q, Tsuboi T, Torii M | Rhoptry neck protein RON2 forms a complex with microneme protein AMA1 in <i>Plasmodium falciparum</i> merozoites | Parasitol Int. | 58 | 29-35 | 2009 |
| Maeda T, Saito T, Harb OS, Roos DS, Takeo S, Suzuki H, Tsuboi T, Takeuchi T, Asai T | Pyruvate kinase type-II isozyme in <i>Plasmodium falciparum</i> localizes to the apicoplast | Parasitol. Int. | 58 | 101-105 | 2009 |
| 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 <i>Plasmodium falciparum</i> | Parasitol Int. | 58 | 196-199 | 2009 |
| Otsuki H, Kaneko O, Thongkuiatkul A, Tachibana M, Iriko H, Takeo S, Tsuboi T, Torii M | Single amino acid substitution in <i>Plasmodium yoelii</i> erythrocyte ligand determines its localization and controls parasite virulence | Proc Natl Acad Sci U S A. | 106 | 7167-7172 | 2009 |
| Takeo S, Hisamori D, Matsuda S, Vinetz J, Sattabongkot J, Tsuboi T | Enzymatic characterization of the <i>Plasmodium vivax</i> chitinase, a potential malaria transmission-blocking target | Parasitol Int. | 58 | 243-248 | 2009 |

| | | | | | |
|---|--|---|-------------|--------------------|-------------|
| <p>VanBuskirk KM, O'Neill MT, De La Vega P, Maier AG, Krzych U, Williams J, Dowler MG, Sacci, Jr. JB, Kangwanrangsang N, Tsuboi T, Kneteman NM, Heppner, Jr. DG, Murdock BA, Mikolajczak SA, Aly ASI, Cowman AF, Kappe SHI</p> | <p>Preerythrocytic, live-attenuated <i>Plasmodium falciparum</i> vaccine candidates by design</p> | <p>Proc Natl Acad Sci U S A.</p> | <p>106</p> | <p>13004-13009</p> | <p>2009</p> |
| <p>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</p> | <p>Sterile protection against <i>Plasmodium knowlesi</i> in rhesus monkeys from a malaria vaccine: comparison of heterologous prime boost strategies</p> | <p>PLoS ONE.</p> | <p>4(8)</p> | <p>e6559</p> | <p>2009</p> |
| <p>Culleton R, Ndounga M, Zeyrek FY, Coban C, Casimiro PN, Takeo S, Tsuboi T, Yadava A, Carter R, Tanabe K.</p> | <p>Evidence for the transmission of <i>Plasmodium vivax</i> in the Republic of the Congo, west central Africa</p> | <p>J Infect Dis</p> | <p>200</p> | <p>1465-1469</p> | <p>2009</p> |

| | | | | | |
|---|--|-----------------------------------|-------|-------------|------|
| Hayakawa T, Arisue N, Udono T, Hirai H, Sattabongkot J, Toyama T, Tsuboi T, Horii T, Tanabe K. | Identification of <i>Plasmodium malariae</i> , a human malaria parasite, in imported chimpanzees | PLoS ONE | 4(10) | e7412 | 2009 |
| Takeo S, Arumugam TU, Torii M, Tsuboi T | Wheat germ cell-free technology for accelerating the malaria vaccine research | Expert Opin Drug Discov. | 4 | 1191-1199 | 2009 |
| 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. | 77 | 5496-5500 | 2009 |
| Takai K, Sawasaki T, Endo Y. | Practical cell-free protein synthesis system using purified wheat embryos | Nature Protocols | 5 | 227-238 | 2010 |
| 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 acts as an NADH-dependent oxidoreductase | J Biol Chem. | 284 | 28642-28649 | 2009 |
| 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. | 73 | 1661-1664 | 2009 |

| | | | | | |
|---|--|--------------------------|-----|-------------|------|
| 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 <i>Arabidopsis</i> seedlings | J Exp Bot. | 60 | 3067-3073 | 2009 |
| 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 | 9 | art. no. 39 | 2009 |
| 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. | 583 | 1243-50 | 2009 |
| Tetsutani K, Ishiwata K, Ishida H, Tu L, Torii M, Hamano S, Himeno K, Hisaeda H | Concurrent infection with <i>Heligmosomoides polygyrus</i> suppresses anti- <i>Plasmodium yoelii</i> protection partially by induction of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) Treg in mice | Eur J Immunol. | 39 | 2822-2830 | 2009 |
| 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 <i>Plasmodium falciparum</i> merozoites | Parasitol Int. | 58 | 29-35 | 2009 |