

201003004A

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 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 坪 井 敬 文

平成 23 (2011) 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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 坪 井 敬 文

平成23(2011)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 -- 14 竹尾 暁
2. 抗原探索システムの開発	澤崎達也 -- 23 遠藤弥重太
3. ネズミマラリア評価系の開発	橘 真由美-- 29 石野智子 鳥居本美

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 38
---------------------	----------

IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 45
-----------------	----------

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

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喫緊の課題となっている。本研究は、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実施した。コドン改変することなく熱帯熱マラリア原虫全遺伝子 5400 種類の内、30%以上をカバーする 1699 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。これにアルファスクリーン法を応用し、高速免疫スクリーニングシステムの技術基盤を確立した。ま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ラリア免疫成人血清 10 人分、およびブルキナファソの小児から得られた血清 18 人分を用いて、1699 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、今後のスクリーニングに有用であると考えられる 384 種のタンパク質を選択できた。また、同定された候補分子の二次スクリーニングのため、FACS を応用した熱帯熱マラリア原虫 *in vitro* 増殖阻害活性測定系を確立した。以上より、新規赤血球期マラリアワクチン候補抗原のゲノムワイドな探索が可能となる準備が完了した。さらに、マラリア原虫の蚊を介した伝搬を標的とした伝搬阻止ワクチンの候補抗原の探索をネズミマラリア実験系により試行したところ、2 種類の新規候補分子を同定できた。以上より、新規マラリアワクチン伝搬阻止ワクチン候補抗原のゲノムワイドな探索も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
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

マラリア撲滅が2007年に再度宣言されて以来、マラリアワクチン開発は最重要課題として認識された。そのためには、これまで研究が進められてきたわずかな数の既知ワクチン候補の研究のみ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喫緊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組換えタンパク質を合成し、熱帯熱マラリア原虫のゲノムワイドなプロテインアレイ及びそれを用いたハイスループットスクリーニングシステムを構築し、新規抗原を高効率に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) 抗原抗体反応系の自動化

分注精度と分注スピードに優れた高機能分注機（JANUS、パーキンエルマー社）を導入し、再現性と精度の高いプロトコール作成のための条件検討を行った。特に、分注液量、混合のためのピペッティング回数、分注回数を中心に検討した。

##### 2) ヒト血清を用いたモデル抗原抗体反応検出

前年度のマウス血清を用いた至適化に引き続き、ヒト血清を用いて、既存の p53、ヒストンなどの自己抗原タンパク質を用いて、検出条件を調べた。その方法論として、ビオチン化 p53 もしくはヒストンの濃度検討、ヒト血清濃度検討を行い、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。

### 3) 熱帯熱マラリア原虫赤血球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、本研究に用いる赤血球期熱帯熱マラリア原虫のビオチン化組換えタンパク質数を昨年度よりも増加させ、合計 1699 種類とした。

### 4) ハイスルーブット抗原抗体アッセイを用いた熱帯熱マラリア原虫プロテインアレイの絞り込み

これらのプロテインアレイとマラリア感染者血清との抗原抗体反応の検出には、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用いた。上記 1699 種類の組換えタンパク質と、マリ共和国成人免疫血清 10 名分に加えて、ブルキナファソの小児から得られた血清 624 種のうち 18 名分を用いて抗原タンパク質の絞り込みを実施した。

### 5) ブルキナファソにおけるマラリア流行地からのヒト血清試料の入手

アフリカの高度マラリア流行地では、成人になるとほぼ全てのヒトはマラリア防御免疫を獲得している。したがって、蚊からの感染率が均一な同一流行地域において「防御免疫有り」および「防御免疫無し」のヒトから本研究に役立つ血清試料を得るためには、まだ完全に防御免疫が獲得されていない小児を対象としたコホート研究が必要である。したがって、厳密な研究により熱帯熱マラリアに対する防御免疫の有無が評価されたヒト血清は、西アフリカ、ブルキナファソのマラリア流行地において米国国立アレルギー・感染症研究所が実施していたコホート研究対象者から得た。312 人の小児から、流行期の前と流行期間中の 2 回採血していた血清計 624 サンプルを、米国国立アレルギー・感染症研究所の許可を得て入手した。

### 6) ネズミマラリア原虫モデルを用いたマラリア伝搬阻止ワクチン候補抗原の探索

ネズミマラリア原虫 (*Plasmodium yoelii*) をモデルとし、蚊へ感染することのできるマラリア原虫生殖母体にのみ発現する分子で細胞表面に発現していると考えられるもの 20 を選択した。それらの候補分子をクローン化し、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成法によって組換えタンパク質を作製し、動物に免疫することで、抗血清を作製した。

これらの抗血清の伝搬阻止活性を、(i) *P. yoelii* に感染させたマウスを用いた受動免疫実験、および (ii) membrane feeder を用いた *in vitro* 吸血実験により評価した。

#### (倫理面への配慮)

本研究でのヒト血清試料の使用は、既に愛媛大学医学部臨床研究倫理審査委員会にて承認されている(「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：愛大医病倫 1007002 号)

#### ・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) 抗原抗体反応系の自動化

最小の分注液量は、5  $\mu$ L の時、最も精度が良いことが分かった。また、混合のためのピペティング回数、分注回数は多すぎると、結局、スル

ープロット性が下がることが分かったので、混合のためのピペッティングは3回を基本、基質タンパク質および血清分注で2回とし、各溶液の希釈は自動ピペッティングで行うこととした。これらの、至適化したプロトコールを用いた再現性スコアは、0.9であった。これは、非常に再現性良く実験ができることを示している。これらの至適化により、1日6時間の実験で、384プレート25枚分、9,600反応数を処理できるようになった。

## 2) ヒト血清を用いたモデル抗原抗体反応検出

ビオチン化 p53 もしくはヒストンを用い、アルファスクリーン法によるヒト血清の抗原抗体反応至適条件を調べたところ、0.5 pg/ $\mu$ L のタンパク質量を検出でき、血清中の 0.05% の抗原を同定でき、1  $\mu$ 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) ハイスループット抗原抗体アッセイを用いた熱帯熱マラリア原虫プロテインアレイの絞り込み

熱帯熱マラリア原虫全ゲノム 5400 中 1699 種類(全ゲノムの 30%以上をカバー) の赤血球期分子を含むプロテインアレイを用いて、マリ共和国から得られた 10 名分、およびブルキナファソから得られた 18 名分のヒト血清との反応性をハイスループット抗原抗体アッセイ法により検討した。その結果、1699 種のプロテインアレイの内、マリまたはブルキナファソ計 28 種の血清試料の何れとも反応性の低いタンパク質が約 1000 種類存在していることが明らかとなった。そこで、今後の大量の血清試料を用いた免疫スクリーニング効率を上げるため、ハイスループット抗原抗体アッセイで用いる 384 穴プレートにあ

わせて、384 種類にまでプロテインアレイに載せる組換えタンパク質の数を絞り込むこととした。その絞り込み基準は、得られている種々の情報のうち、下記の条件に合致するものを優先的に選択した。(i) これまでのタイの血清を用いた免疫スクリーニングで、タイ血清中の防御免疫と正の相関が認められていた分子、(ii) 10 種類のマリ血清の熱帯熱マラリア原虫増殖阻害活性と抗体価の間に正の相関が認められた分子、および 18 種類のブルキナファソ血清の臨床的防御免疫と正の相関が認められた分子、(iii) 抗体価の比較的高い分子、(iv) マラリアゲノムデータベース上でシグナル配列または膜貫通ドメインの存在が予測され、原虫表面に存在する可能性の高い分子。現在これらの条件を満たす分子 384 種類の選択を終了した。

## 4) FACS を用いた迅速かつ簡便な in vivo マラリア原虫増殖阻害効果判定法の確立

FACS 法、pLDH 法および顕微鏡法によるマラリア原虫増殖阻害活性測定結果を比較検討した。その結果、FACS 法を用いて得られた熱帯熱マラリア原虫増殖阻害活性は、顕微鏡法及び pLDH 法の何れとも正の相関を示し、しかも、FACS 法のみで「侵入阻害活性」と「成長阻害活性」が区別できることが判明し、FACS 法が最もハイスループットで今後の研究に有用な方法であると考えられた。

今後は、これまでに絞り込みに成功した熱帯熱マラリア原虫プロテインアレイ 384 種、マリ 52 種、ブルキナファソ 624 種、合計 676 種の血清試料を用いて、本解析を実施する。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、FACS による熱帯熱マラリア

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をすすめてゆく予定である。

5) ネズミマラリア原虫モデルを用いたマラリア伝搬阻止ワクチン候補抗原の探索

ネズミマラリア原虫のプロテオームデータを参照し、生殖母体で発現している 2560 個のタンパク質から 20 種類の候補抗原を選択した。それらの組換えタンパク質を無細胞タンパク質合成系を用いて合成し、抗血清を得た。抗体価は ELISA で評価し、特異性は、western blotting 及び間接蛍光抗体法で解析した。18 種類の分子に対する抗体の確認が終了した。

これらの抗血清の伝搬阻止活性を、*P. yoelii* に感染させたマウスを用いた受動免疫実験により評価した。その結果、伝搬阻止効果が知られている Pys25 抗体を用いた時に、形成されるオーシスト数の有意な減少が認められたことから、伝搬阻止効果の評価系が確立できたと判断した。この実験系を用いて、18 種類の抗血清の伝搬阻止効果を解析したところ、2 種類が伝搬阻止活性を有することが判明した。

また、よりスループットの高い membrane feeder を用いた *in vitro* 吸血実験系の確立を試みたところ、吸血蚊一匹のオーシストの平均値が 500 を越える高い感染効率を与える系が確立できた。今後順次 Membrane feeding の系に移行し、得られた候補抗血清／抗体の伝搬阻止効果を測定する予定である。また、伝搬阻止効果が確認されたら、ヒトマラリア原虫の相同分子に対する特異抗体を作成し、伝搬阻止効果を測定する。これにより、ヒトマラリア伝搬阻止ワクチンの新規抗原の同定が可能となる。

#### D. 結論

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を基盤とし、ビオチン化タンパク質ライブラリーを応用した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さらに改良した。また、1699 種類の熱帯熱マラリア原虫プロテインアレイから 384 種類の抗原タンパク質に絞り込むことに成功し、大量の血清サンプルを使用した大規模免疫スクリーニングの準備が完了した。さらに、ネズミマラリア原虫を用いたマラリア伝搬阻止ワクチン候補抗原探索法も確立した。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確立した。

E. 健康危険情報  
なし

#### F. 研究発表

- 論文発表
  - Nemoto K, Seto T, Takahashi H, Nozawa A, Seki M, Shinozaki K, Endo Y and Sawasaki T, Autophosphorylation profiling of *Arabidopsis* protein kinases using the cell-free system., **Phytochemistry**. 2011, In press
  - Nozawa A, Ogasawara T, Matsunaga S, Iwasaki T, Sawasaki T and Endo Y, Production and partial purification of membrane proteins using a liposome-supplemented wheat cell-free translation system. **BMC Biotechnology**. 2011, 11(1):35
  - Madono M, Sawasaki T, Morishita R and Endo Y, Wheat germ cell-free protein production



- system for post-genomic research, **New Biotechnology**. 2011, 28(3):211-7
- 4) Makino S, Sawasaki T, Endo Y, Takai K, Use of domain enzymes from wheat RNA ligase for in vitro preparation of RNA molecules, **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 2011, 404(4): 1050-4
  - 5) Kanchiswamy C N, Muroi A, Maffei M E, Yoshioka H, Sawasaki T, Arimura G, Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinases and their substrate HsfB2a are differently involved in the heat response signaling pathway in Arabidopsis, **Plant Biotechnology**. 2010, 27(5): 469-73
  - 6) Arimura G and Sawasaki T, Arabidopsis CPK3 plays extensive roles in various biological and environmental responses, **Plant Signaling and Behavior**. 2010, 5 (10): 1263-5
  - 7) Tadokoro D, Takahama S, Shimizu K, Hayashi S, Endo Y and Sawasaki T, Characterization of a caspase-3-substrate kinome using an N- and C-terminally tagged protein kinase library produced by a cell-free system, **Cell Death and Disease**. 2010, 1, Article number e89
  - 8) Matsuoka, K, Komori H, Nose M, Endo Y, Sawasaki T, Simple screening method for autoantigen proteins using the N-terminal biotinylated protein library produced by wheat cell-free synthesis, **Journal of Proteome Research**. 2010, 9: 4264–73
  - 9) Makino S, Sawasaki T, Endo Y, Takai K, In vitro dissection revealed that the kinase domain of wheat RNA ligase is physically isolatable from the flanking domains as a non-overlapping domain enzyme, **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 2010, 397: 762-6
  - 10) Matsunaga S, Matsuoka K, Shimizu K, Endo Y, Sawasaki T, Biotinylated-sortase self-cleavage purification (BISOP) method for cell-free produced proteins, **BMC Biotechnology**. 2010,10, Article number 42
  - 11) Nagamangala Kanchiswamy C, Takahashi H, Quadro S, Maffei M E, Bossi S, Berteza C, Atsbaha Zebelo S, Muroi A, Ishihama N, Yoshioka H, Boland W, Takabayashi J, Endo Y, Sawasaki T and Arimura G Regulation of Arabidopsis defense responses against Spodoptera littoralis by CPK-mediated calcium signaling, **BMC Plant Biology**. 2010, 97.
  - 12) Takai K, Sawasaki T and Endo Y, The Wheat-Germ Cell-Free Expression System, **Current Pharmaceutical Biotechnology**. 2010,11(3): 272-8
  - 13) Tanaka Y, Komori H, Mori S, Soga Y, Tsubaki T, Terada M, Miyazaki T, Fujino T, Nakamura S, Kanno H. Sawasaki T, Endo Y, Nose M, Evaluating the Role of Rheumatoid Factors for the Development of Rheumatoid Arthritis in a Mouse Model with a Newly Established ELISA System, **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**. 2010, 220(3): 199-206.

- 14) Watanabe M, Miyazono K, Tanokura M, Sawasaki T, Endo Y and Kobayashi I, Cell-free protein synthesis for structure determination by X-ray crystallography. **Methods in Molecular Biology**. 2010, 607:149-60.
- 15) Sawasaki T and Endo Y, Cell-free-based protein microarray technology using agarose/DNA microplate. **Methods in Molecular Biology**. 2010, 607:63-72.
- 16) Miyata T, Harakuni T, Sugawa H, Sattabongkot J, Kato A, Tachibana M, Torii M, Tsuboi T, Arakawa T. Adenovirus-vectored *Plasmodium vivax* ookinete surface protein, Pvs25, as a potential transmission-blocking vaccine. **Vaccine**. 2011, 29: 2720-2726.
- 17) Ito D, Han ET, Takeo S, Thongkukiattkul A, Otsuki H, Torii M, Tsuboi T. Plasmodial ortholog of *Toxoplasma gondii* rhoptry neck protein 3 is localized to the rhoptry body. **Parasitology International**. 2011, 60: 132-138.
- 18) Chen JH, Lu F, Lim CS, Kim JY, Ahn HJ, Suh IB, Takeo S, Tsuboi T, Sattabongkot J, Han ET. Detection of *Plasmodium vivax* infection in the Republic of Korea by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). **Acta Tropica**. 2010, 113: 61–65.
- 19) Tsuboi T, Takeo S, Sawasaki T, Torii M, Endo Y. An efficient approach to the production of vaccines against the malaria parasite. **Methods in Molecular Biology**. 2010, 607:73-83.
- 20) Tsuboi T, Takeo S, Arumugam TU, Otsuki H, Torii M. The wheat germ cell-free protein synthesis system: a key tool for novel malaria vaccine candidate discovery. **Acta Tropica**. 2010, 114: 171-176.
- 21) Buates S, Bantuchai S, Sattabongkot J, Han ET, Tsuboi T, Udomsangpetch R, Sirichaisinthop J, Tan-Ariya P. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for clinical detection of *Plasmodium falciparum* gametocytes. **Parasitol International**. 2010, 59: 414-420.
- 22) Miyata T, Harakuni T, Tsuboi T, Sattabongkot J, Kohama H, Tachibana M, Matsuzaki G, Torii M, Arakawa T. *Plasmodium vivax* ookinete surface protein, Pvs25, linked to cholera toxin B subunit induces potent transmission-blocking immunity by intranasal as well as subcutaneous immunization. **Infection and Immunity**. 2010, 78: 3773-3782.
- 23) Blagborough AM, Yoshida S, Sattabongkot J, Tsuboi T, Sinden RE. Intranasal and intramuscular immunization with baculovirus dual expression system-based Pvs25 vaccine substantially blocks *Plasmodium vivax* transmission. **Vaccine**. 2010, 28: 6014-6020.
- 24) Chen JH, Jung JW, Wang Y, Ha KS, Lu F, Lim CS, Takeo S, Tsuboi T, Han ET.

Immunoproteomics profiling of blood stage *Plasmodium vivax* infection by high-throughput screening assays.

**Journal of Proteome Research.** 2010, 9: 6479-6489.

- 25) Gueirard P, Tavares J, Thiberge S, Bernex F, Ishino T, Milon G, Franke-Fayard B, Janse CJ, Ménard R, Amino R. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A.** 2010, 107: 18640-18645.

2. 学会発表

- 1) 根本圭一郎、関原明、篠崎一雄、遠藤弥重太、澤崎達也. コムギ無細胞タンパク質発現系を用いた植物チロシンキナーゼ (PPTK) の網羅的探索・同定および機能解析. 第 52 回日本植物生理学会年会. 仙台、2011 年 3 月 20-22 日
- 2) Matsunaga S, Kojima Y, Morishita R, Sawasaki T, Ryo A. An In Vitro Cleavage Assay System for XMRV Protease by Wheat-Germ Cell Free Protein Production. the 50th annual meeting the american society for cell biology. December 10-15, 2010, Pennsylvania, USA.
- 3) Miyakawa K, Sawasaki T, Matsunaga S, Yamamoto N, Ryo A. Identification of a Host Factor Antagonizing Vpu-Mediated BST-2/Tetherin Down-Regulation. the 50th annual meeting the american society for cell biology. December 10-15, 2010, Pennsylvania, USA.
- 4) Yasuoka S, Endo Y, Sawasaki T. Screening of Cancer-Related E3 Ubiquitin Ligase by Wheat Cell-Free System. the 50th annual meeting the american society for cell biology. December 10-15, 2010, Pennsylvania, USA.
- 5) Nishimori K, Matsuoka K, Endo Y, Sawasaki T. Development of a Cell-Free Based Screening Method to Identify Cancer Specific Autoantigen Proteins. the 50th annual meeting the american society for cell biology. December 10-15, 2010, Pennsylvania, USA
- 6) 安岡左起、佐々木敦朗、遠藤弥重太、澤崎達也. コムギ無細胞系を基盤としたがん化促進ユビキチン化 E3 リガーゼの構築. BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会). 神戸、2010 年 12 月 7-10 日
- 7) 林祥太、清水康平、橋本季明、吉川潮、遠藤弥重太、澤崎達也. Caspase-3 により切断されるプロテインカイネーゼの比較. BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会). 神戸、2010 年 12 月 7-10 日
- 8) 清水康平、高濱正吉、遠藤弥重太、澤崎達也. Caspase-3 cleavage of stress-responsible TRB3 attenuates activated Akt and activates caspase-3 activity. BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会). 神戸、2010 年 12 月 7-10 日

- 9) 高橋守、宮島早紀、小笠原富夫、遠藤弥重太、澤崎達也. 無細胞基質プロテオリポソームを用いた細胞への膜タンパク質導入技術の開発. BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会). 神戸、2010年12月7-10日
- 10) 岩崎隆宏、遠藤弥重太、澤崎達也. Regulation of Myosin Phosphatase during Apoptosis. BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会). 神戸、2010年12月7-10日
- 11) 酒巻和弘、坂本尚久、河村拓馬、千場久美子、澤崎達也、小山田耕二. 細胞死に伴う小胞形成の時系列的変動の解析. BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会). 神戸、2010年12月7-10日
- 12) 根本圭一郎、瀬藤拓也、関原明、篠崎一雄、遠藤弥重太、澤崎達也. 植物 protein Kinase ライブラリーを用いた Plant Protein Tyrosine Kinase の探索と同定. 第5回無細胞生命科学研究会. 岡山、2010年9月29-30日
- 13) 高橋守、宮島早紀、小笠原富夫、遠藤弥重太、澤崎達也. 無細胞基盤プロテオリポソームを用いた細胞への膜タンパク質導入技術の開発. 第5回無細胞生命科学研究会. 岡山、2010年9月29-30日
- 14) 安岡佐起、遠藤弥重太、澤崎達也. コムギ無細胞系を基盤としたがん化促進ユビキチン化 E3 リガーゼの探索. 第5回無細胞生命科学研究会. 岡山、2010年9月29-30日
- 15) 林祥太、清水康平、橋本李明、吉川潮、鎌田真司、遠藤弥重太、澤崎達也. Caspase-3,6,7 により切断されるプロテインカイネースの比較. 第5回無細胞生命科学研究会. 岡山、2010年9月29-30日
- 16) 有村源一郎、Chidananda Nagamangala kanchiswam、高橋宏隆、吉岡博文、遠藤弥重太、澤崎達也. 無細胞タンパク質合成系を用いた植物のカルシウム依存リン酸化制御機構の解明. 第5回無細胞生命科学研究会. 岡山、2010年9月29-30日
- 17) 清水康平、高濱正吉、遠藤弥重太、澤崎達也. TRB3 が caspase-3 に切断されるかどうかは細胞生存と細胞死のターニングポイントの一つである. 第62回日本細胞生物学会大会. 大阪、2010年5月19-21日
- 18) 岩崎隆宏、遠藤弥重太、澤崎達也. アポトーシス時におけるミオシンホスファターゼ活性調節機構. 第62回日本細胞生物学会大会. 大阪、2010年5月19-21日
- 19) 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. Adaptive and Innate Immune Responses to Neglected Tropical Diseases, San Diego, USA, January 9–11, 2010.
- 20) Miura K, Takeo S, Sakamoto H, Kaneko T, Varma S, Torii M, Sirima SB, Tsuboi T. Identification of *Plasmodium falciparum* blood-stage potential vaccine candidates: high-throughput immunoscreening approach with Burkina Faso children sera. Adaptive and Innate Immune Responses to Neglected Tropical Diseases, San Diego, USA, January 9–11, 2010.
- 21) 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 Symposium, Structural Genomics: Expanding the Horizons of Structural Biology, Breckenridge, USA, January 8–13, 2010.
- 22) Tsuboi T, Tachibana M, Takeo S, Sattabongkot J, Wu Y, Torii M. Sexual stage parasites and transmission-blocking antibodies. Keystone Symposium, Malaria: New Approaches to Understanding Host-Parasite Interactions, Copper Mountain, USA, April 11–16, 2010.
- 23) Chen JH, Jung JW, Wang Y, Lu F, Ha KS, Tsuboi T, Han ET. Evaluation of putative immunogenic proteins from vivax malaria blood stage by high-throughput screening assays. Keystone Symposium, Malaria: New Approaches to Understanding Host-Parasite Interactions, Copper Mountain, USA, April 11–16, 2010.
- 24) Tsuboi T, Tachibana M, Takeo S, Sattabongkot J, Wu Y, Torii M. (Invited speaker) Wheat germ cell-free system-expressed Pfs230 is an effective transmission-blocking vaccine candidate antigen. 12th International Congress of Parasitology, Melbourne, Australia, August 16–20, 2010.
- 25) Miura T, Takeo S, Otsuki H, Torii M, Tsuboi T. Erythrocyte proteome screening for interaction partners of malarial merozoite RhopH complex. 12th International Congress of Parasitology, Melbourne, Australia, August 16–20, 2010.
- 26) Ito D, Han ET, Takeo S, Thongkukiatkul A, Otsuki H, Torii M, Tsuboi T. Characterization of putative rhoptry neck protein 3 (PFRON3) in *Plasmodium falciparum* merozoite. 12th International Congress of Parasitology, Melbourne, Australia, August 16–20, 2010.
- 27) Arumugam TU, Takeo S, Thonkukiatkul A, Miura K, Otsuki

- H, Zhou H, Long CA, Thompson J, Healer J, Crabb B, Cowman A, Torii M, Tsuboi T.  
A new Pf merozoite micronemal protein is a novel blood-stage vaccine candidate antigen.  
12th International Congress of Parasitology, Melbourne, Australia, August 16-20, 2010.
- 28) Sakamoto H, Takeo S, Kaneko T, Sattabongkot J, Torii M, Tsuboi T.  
A novel blood-stage malaria vaccine candidate with human erythrocyte binding capacity.  
The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan. September 7-10, 2010.
- 29) Arumugam TU, Takeo S, Thonkuiatkul A, Miura K, Otsuki H, Zhou H, Long CA, Sattabongkot J, Torii M, Tsuboi T.  
Wheat germ cell-free system facilitated the identification of a novel malaria vaccine candidate.  
The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan. September 7-10, 2010.
- 30) Miura T, Takeo S, Otsuki H, Sawasaki T, Endo Y, Torii M, Tsuboi T.  
RhopH complex from mouse malaria parasite interacts with erythrocyte calmyrin.  
ASTMH 59th annual meeting, Atlanta, USA, November 3-7, 2010.
- 31) Arumugam TU, Takeo S, Thonkuiatkul A, Miura K, Otsuki H, Zhou H, Long CA, Sattabongkot J, Torii M, Tsuboi T.  
Identification of a novel blood stage vaccine candidate for *Plasmodium falciparum*.  
ASTMH 59th annual meeting, Atlanta, USA, November 3-7, 2010.
- 32) 坪井 敬文 (シンポジスト)  
マラリアワクチン研究の最前線-我が国発の技術による国際貢献  
厚生労働省主催、平成 21 年度 地球規模保健課題推進研究事業シンポジウム、東京、3/30、2010。
- 33) 原國哲也、宮田 健、坪井敬文、Sattabongkot Jetsumon、橘 真由美、鳥居本美、李 長春、渡部久実、松崎吾朗、新川 武  
酵母 *Pichia pastoris* 発現ネズミマラリアメロゾイト表面蛋白質 MSP1-19 のワクチン効果  
第 79 回日本寄生虫学会大会、旭川市、5/20-21、2010。
- 34) 新川 武、宮田 健、池原 歩、原國哲也、坪井敬文、Sattabongkot Jetsumon、橘 真由美、鳥居本美、松崎吾朗  
新たなワクチンプラットフォーム創製のための三部構成四価免疫賦活複合体 (TITs)  
第 79 回日本寄生虫学会大会、旭川市、5/20-21、2010。
- 35) 宮田 健、原國哲也、池原 歩、坪井敬文、Sattabongkot Jetsumon、橘 真由美、鳥居本美、松崎吾朗、新川 武  
新たなワクチンプラットフォーム創製のための三部構成五価免

- 疫賦活複合体 (TIPs)  
第 79 回日本寄生虫学会大会、旭  
川市、5/20-21、2010。
- 36) 橘真由美、石野智子、Jenwithisuk  
Rachaneeporn、Kangwanrangsana  
Niwat、横内ゆき、Sattabongkot  
Jetsumon、坪井敬文、鳥居本美  
コムギ胚芽無細胞タンパク質合  
成法を用いた三日熱マラリア伝  
搬阻止ワクチン候補抗原 Pvs230  
の作製  
第 79 回日本寄生虫学会大会、旭  
川市、5/20-21、2010。
- 37) Jenwithisuk Rachaneeporn、  
Kangwanrangsana Niwat、橘真由美、  
石野智子、坪井敬文、鳥居本美  
A novel protein is targeted to  
the crystalloids of *Plasmodium*  
*yoelii* ookinetes  
第 79 回日本寄生虫学会大会、旭  
川市、5/20-21、2010。
- 38) 大槻 均、入子英幸、石野智子、  
金子 修、福本宗嗣、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 79 回日本寄生虫学会大会、旭  
川市、5/20-21、2010。
- 39) 伊藤大輔、韓 銀澤、竹尾 暁、  
Thongkukiattkul Amporn、大槻  
均、鳥居本美、坪井敬文  
熱帯熱マラリア原虫メロゾイト  
rhoptry neck protein 3 の性状  
解析  
第 79 回日本寄生虫学会大会、旭  
川市、5/20-21、2010。
- 40) 北村 圭、熊谷 貴、Bentum  
Bethel K、三田村俊秀、坪井敬文、  
太田信生  
熱帯熱マラリア原虫におけるオ  
ートファジーの役割  
第 79 回日本寄生虫学会大会、旭  
川市、5/20-21、2010。
- 41) 金子 明、Taleo George、Chaves  
Luis F、Perlmann Hedvig、江藤  
秀顕、竹尾 暁、橘 真一郎、  
Troye-Blomberg Marita、坪井敬  
文、Drakeley Chris、田邊和祐  
島嶼マラリア根絶 10 年後の三日  
熱マラリア再燃  
第 79 回日本寄生虫学会大会、旭  
川市、5/20-21、2010。
- 42) 大前比呂思、伊藤 誠、中澤 港、  
亀井喜世子、Bakotee Bernard、  
Suraj Eka、長岡史晃、坪井敬文、  
木村英作  
ソロモン諸島のマラリア調査に  
おける尿診断法の試み  
第 79 回日本寄生虫学会大会、旭  
川市、5/20-21、2010。
- 43) 坪井敬文 (招待講演)  
マラリアワクチン研究の最前線  
第 9 回四国免疫フォーラム、東  
温市、6/19、2010。
- 44) 坪井敬文 (招待講演)  
マラリアと人類：歴史は物語る  
第 114 回日本医学放射線学会中  
国・四国地方会、今治市、6/26、  
2010。
- 45) 坂本寛和、竹尾 暁、坪井敬文  
熱帯熱マラリア原虫メロゾイト  
の機能未知抗原 PfMSPDBL1 は赤  
血球侵入に関与するか？  
第 18 回分子寄生虫学ワークショ  
ップ、草津町、8/2-5、2010。

- 46) 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  
抗原タンパク質 H103 の機能解  
明に向けて  
第 18 回分子寄生虫学ワークショ  
ップ、草津町、8/2-5、2010。
- 47) Stephan Hegge、徳永 順士、石  
野 智子、鳥居 本美 マラリア原  
虫スポロゾイトの肝細胞への侵  
入過程の **real time imaging** 解析  
第 18 回 分子寄生虫学ワークシ  
ョップ、草津町、8/2-5、2010。
- 48) 入子英幸、大槻 均、橘真由美、  
石野智子、鳥居本美、坪井敬文、  
福本宗嗣 熱帯熱マラリア原虫  
感染赤血球内における膜系構造  
の形成過程の解析 第 18 回 分  
子寄生虫学ワークショップ、草津  
町、8/2-5、2010。
- 49) Thangavelu U. Arumugam、竹尾 暁、  
Amporn Thonkukiatkul、三浦憲豊、  
大槻 均、Carole A Long、Jetsumon  
Sattabongkot、鳥居本美、坪井敬  
文  
マイクロネームに局在する新規  
熱帯熱マラリア赤血球期ワクチ  
ン候補抗原の同定  
第 9 回分子寄生虫・マラリア研究  
フォーラム、長崎市、10/8-9、2010。
- 50) 加藤晶、竹尾 暁、Jetsumon  
Sattabongkot、鳥居本美、坪井敬  
文  
熱帯熱マラリア原虫の各侵入型  
原虫における新規内膜複合体関  
連分子の同定  
第 9 回分子寄生虫・マラリア研究  
フォーラム、長崎市、10/8-9、2010。
- 51) 三浦豊和、竹尾 暁、坪井敬文  
赤血球寄生期マラリア原虫の  
RhopH タンパク質複合体：相互作  
用する宿主赤血球分子の探索  
第 33 回日本分子生物学会年会、  
神戸市、12/7-10、2010。
- 52) 埜本竜宏、竹尾 暁、坪井敬文  
マラリア原虫メロゾイトにおけ  
る抗原タンパク質 H103 の機能解  
明  
第 33 回日本分子生物学会年会、  
神戸市、12/7-10、2010。
- 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



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

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

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。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ラリア原虫全遺伝子 5400 種類の内、30%以上をカバーする 1699 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。また、二次スクリーニングに有用な、FACS を応用した熱帯熱マラリア原虫 *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ラリア免疫成人血清 10 人分、およびブルキナファソの小児から得られた血清 18 人分を用いて、1699 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、384 種のタンパク質が今後のスクリーニングに有用であると考え、選択した。以上より、新規マラリアワクチン候補抗原のゲノムワイドな探索が可能となる準備が完了したと考えられ、今後マリ 52 種、ブルキナファソ 624 種、合計 676 種の血清試料を用いて、本解析を実施する予定である。

[研究協力者]

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

マラリア撲滅が2007年に再度宣言されて以来、マラリアワクチン開発は最重要課題として再認識された。そのためには、これまで研究が進められてきたわずかな数の既知ワクチン候補の研究のみ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喫緊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組換えタンパク質を合成し、熱帯熱マラリア原虫のゲノムワイドなプロテインアレイ及びそれを用いたハイスループットスクリーニングシステムを構築し、新規抗原を高効率に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赤血球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、本研究に用いる赤血球期熱帯熱マラリア原虫の分子数を昨

年度よりも増加させ、合計1699種類とした。各分子毎に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を用いた熱帯熱マラリア原虫プロテインアレイの絞り込み

これらのビオチン化組換えタンパク質アレイとマラリア感染者血清との抗原抗体反応の検出には、昨年度に確立した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用いた。上記1699種類の組換えタンパク質と、昨年度用いたマリ共和国成人免疫血清10名分に加えて、本年度は下記のようにブルキナファソの小児から得られた血清624種のうち18名分を用いて抗原タンパク質の絞り込みを実施した。

3) ブルキナファソにおけるマラリア流行地からのヒト血清試料の入手

アフリカの高度マラリア流行地では、成人になるとほぼ全てのヒトはマラリア防御免疫を獲得している。したがって、蚊からの感染率が均一な同一流行地域において「防御免疫有り」および「防御免疫無し」のヒトから本研究に役立つ血清試料を得るためには、まだ完全に防御免疫が獲得されていない小児を対象としたコホート研究が必要である。したがって、熱帯熱マラリアに対する防御免疫の有無が厳密なコホート研究により評価されたヒト血清は、西アフリカ、ブルキナファソのマラリア流行地において米国国立アレルギー・感染症研究所が実施していたコホート研究対象者から得た。312人の小児から、流行期の前と流行期間中の2

回採血していた血清計 624 サンプルを、米国国立アレルギー・感染症研究所の三浦憲豊博士の協力により、同研究所の許可を得て入手した。

(倫理面への配慮)

本研究でのヒト血清試料の使用は、既に愛媛大学医学部臨床研究倫理審査委員会にて承認されている(「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:愛大医病倫1007002号)

4) 熱帯熱マラリア原虫 *in vitro* 増殖阻害活性測定系のさらなるハイスループット化

本免疫スクリーニングで候補分子が同定された後には、その中からよりマラリア原虫増殖抑制効果の高い抗体を誘導できる分子の二次スクリーニングを行う必要がある。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) 活性の測定を用いた増殖阻害活性測定系を昨年度確立した。しかし、本研究申請で取り扱う試料数は膨大なものになることが予想されたため、さらなるハイスループット化を追求するため、本年度は FACS を用いた増殖阻害活性測定系の確立を試行した。

### C. 研究結果および考察

1) ハイスループット抗原抗体アッセイを用いた熱帯熱マラリア原虫プロテインアレイの絞り込み

熱帯熱マラリア原虫全ゲノム 5400 中 1699 種類(全ゲノムの 30%以上をカバー)の赤血球期分子を含むプロテインアレイを用いて、マリ共和国から得られた 10 名分、およびブルキナファソから得られた 18 名分のヒト血清との反応性をハイスループット抗原抗体アッセイ法により検討した。その結果、1699 種のプロテインアレイの内、マリまたはブルキナファソ

計 28 種の血清試料の何れとも反応性の低いタンパク質が約 1000 種類存在していることが明らかとなった。そこで、今後の大量の血清試料を用いた免疫スクリーニング効率を上げるため、ハイスループット抗原抗体アッセイで用いる 384 穴プレートにあわせて、384 種類にまでプロテインアレイに載せる組換えタンパク質の数を絞り込むこととした。その絞り込み基準は、得られている種々の情報のうち、下記の条件に合致するものを優先的に選択した。(i)これまでのタイの血清を用いた免疫スクリーニングで、タイ血清中の防御免疫と正の相関が認められていた分子、(ii)10 種類のマリ血清の熱帯熱マラリア原虫増殖阻害活性と抗体価の間に正の相関が認められた分子、および 18 種類のブルキナファソ血清の臨床的防御免疫と正の相関が認められた分子、(iii)抗体価の比較的高い分子、(iv)マラリアゲノムデータベース上でシグナル配列または膜貫通ドメインの存在が予測され、原虫表面に存在する可能性の高い分子。現在これらの条件を満たす分子 384 種類の選択を終了した。上記の絞り込みの作業量のみを考慮しても、とても通常の ELISA 法では実施することが困難である。したがって、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。

2) FACS を用いた迅速かつ簡便な *in vivo* マラリア原虫増殖阻害効果判定法の確立

昨年度作製した陽性コントロールとなる熱帯熱マラリア原虫 AMA1 に対する抗体を用いて、FACS 法、pLDH 法および顕微鏡法によるマラリア原虫増殖阻害活性測定結果を比較検討した。その結果、FACS 法を用いて得られた熱帯熱マラリア原虫増殖阻害活

性は、顕微鏡法及び pLDH 法の何れとも正の相関を示し、しかも、FACS 法のみで「侵入阻害活性」と「成長阻害活性」が区別できることが判明し、FACS 法が最もハイスループットで今後の研究に有用な方法であると考えられた。

### 3) 今後の課題

これまでに絞り込みに成功した熱帯熱マラリア原虫プロテインアレイ 384 種、マリ 52 種、ブルキナファソ 624 種、合計 676 種の血清試料を用いて、本解析を実施する。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、FACS による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を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) Miyata T, Harakuni T, Sugawa H, Sattabongkot J, Kato A, Tachibana M, Torii M, Tsuboi T, Arakawa T. Adenovirus-vectored *Plasmodium vivax* ookinete surface protein, Pvs25, as a potential transmission-blocking vaccine. **Vaccine**. 2011, 29: 2720-2726.
- 2) Ito D, Han ET, Takeo S, Thongkukiakul A, Otsuki H, Torii M, Tsuboi T. Plasmodial ortholog of *Toxoplasma gondii* rhoptry neck protein 3 is localized to the rhoptry body. **Parasitology International**. 2011, 60: 132-138.
- 3) Chen JH, Lu F, Lim CS, Kim JY, Ahn HJ, Suh IB, Takeo S, Tsuboi T, Sattabongkot J, Han ET. Detection of *Plasmodium vivax* infection in the Republic of Korea by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). **Acta Tropica**. 2010, 113: 61-65.
- 4) Tsuboi T, Takeo S, Sawasaki T, Torii M, Endo Y. An efficient approach to the production of vaccines against the malaria parasite. **Methods in Molecular Biology**. 2010, 607:73-83.
- 5) Tsuboi T, Takeo S, Arumugam TU, Otsuki H, Torii M. The wheat germ cell-free protein synthesis system: a key tool for novel malaria vaccine candidate discovery. **Acta Tropica**. 2010, 114: 171-176.
- 6) Buates S, Bantuchai S, Sattabongkot J, Han ET, Tsuboi T, Udomsangpetch R, Sirichaisinthop J, Tan-Ariya P. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for clinical detection of *Plasmodium falciparum* gametocytes. **Parasitol International**. 2010, 59: 414-420.
- 7) Miyata T, Harakuni T, Tsuboi T, Sattabongkot J, Kohama H, Tachibana M, Matsuzaki G, Torii M, Arakawa T. *Plasmodium vivax* ookinete surface protein, Pvs25, linked to cholera toxin B subunit induces potent transmission-blocking immunity by