

intranasal as well as subcutaneous immunization.

**Infection and Immunity.** 2010, 78: 3773-3782.

- 8) 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.

- 9) 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.

## 2. 学会発表

- 1) 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.

- 2) 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.

- 3) 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.

- 4) 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.

- 5) 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.

- Australia, August 16–20, 2010.
- 6) 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.
  - 7) 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.
  - 8) Ito D, Han ET, Takeo S, Thonkukiatkul 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.
  - 9) 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.
  - 10) 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.
  - 11) Arumugam TU, Takeo S, Thonkukiatkul 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.
  - 12) 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.
  - 13) Arumugam TU, Takeo S, Thonkukiatkul 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.
- 14) 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。
- 15) 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。
- 16) 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。
- 17) 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。
- 18) 橘真由美、石野智子、  
Jenwithisuk Rachaneeporn、  
Kangwanrangsang 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。
- 19) Jenwithisuk Rachaneeporn、  
Kangwanrangsang 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。
- 20) 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。
- 21) 伊藤大輔、韓 銀澤、竹尾 暁、  
Thongkukiatkul 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。
- 22) 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。
- 23) 金子 明、Taleo George、Chaves Luis F、Perlmann Hedvig、江藤秀顕、竹尾 暁、橋 真一郎、Troye-Blomberg Marita、坪井敬文、Drakeley Chris、田邊和桁  
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。
- 24) 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。
- 25) 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。
- 26) 坪井敬文（招待講演）  
マラリアと人類：歴史は語る  
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。
- 27) 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。
- 28) 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。
- 29) 入子英幸、大槻 均、橋真由美、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、群馬県、2010 年 8 月 2-5 日
- 30) 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。
- 31) 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。
- 32) 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。
- 33) 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

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、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）の3つの技術からなる、未精製のタンパク質を用いた高感度、ハイスループットな網羅的抗原抗体反応検出技術を開発することに成功した。今年度は、本手法で同定された抗体の特性の解析、自動分注機導入による機械的ハイスループット化、およびヒト血清内の抗体を同定するための条件検討を行い、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する技術基盤の構築を行った。

### A. 研究目的

ゲノムシーケンズ技術の発展に伴い、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、これらの研究成果により、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明らかになった。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) 同定された抗体の反応性の解析

抗体の中には、変性タンパク質ではなく、タンパク質の3次元構造を認識するものが存在する。前年度疾

患モデルマウスの血清を用いて同定した抗体が、タンパク質の構造を認識するかどうか調べるために、未変性のタンパク質抗原と血清中抗体と反応させた免疫沈降法と、界面活性剤と熱で変性させた抗原タンパク質を用いたウェスタンブロット法を行った。

## 2) 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）の導入行い、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。

## 3) 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。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

（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) 同定された抗体の反応性の解析

既存の方法では、変性タンパク質しか基質にできなかつたため、構造を認識する抗体の同定は不可能であった。しかし、我々の手法はタンパク質を変性させる過程がないため、構造を認識する抗体の同定も可能であると思われる。それを調べたところ、同定した抗体の8割は免疫沈降法のみで検出できた。残り2割および既存の抗原は、ウェスタンブロット法で強く検出できた。このことにより、既法で同定されている抗原は、変性タンパク質を認識する抗体であるが、本手法で同定できる抗体は、タンパク質の構造を認識する抗体も同定可能であることが示された。

### 2) 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わかった。また、混合のためのピペッティング回数、分注回数は多すぎると、結局、スループット性が下がることがわかったので、混合のためのピペッティング回数を基本3回、分注回数を基質タンパク質分注および血清分注の計2回に、また各溶液の希釈は自動ピペッティングで行うことにした。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穴プレート25枚分、9,600反応数を処理できるようになった。

### 3) 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、マウス血清と同様に、ヒト血清を用いて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  $\text{pg}/\mu\text{L}$  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ことが分かった。

#### 4) 今後の課題

マラリア感染患者の血清を用いて、同様の条件でワクチン候補抗原の同定が可能であるかどうか、系の最適化を行う。

#### 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組み込んだ、自動抗原抗体検出技術が完成した。これにより、マラリアワクチン候補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いえる。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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) Tsuboi T, Takeo S, Sawasaki T, Torii M and Endo Y, An efficient approach to the production of vaccines against the malaria parasite. **Methods in Molecular Biology**. 2010, 607:73-83.
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スの比較. 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ゼの比較. 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
- 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

ネズミマラリア評価系の開発

研究分担者 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ることで、これまで困難とされていたマラリア原虫分子の組換えタンパク質を自然状態に近い立体構造を持たせて合成することが可能になった。この手技を利用して、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行った。プロテオームデータを利用し、蚊の消化管内で発育する原虫の生活環（生殖母体からオーキネート）の間に発現する分子の中から、分泌シグナルを指標に原虫表面に発現する可能性の高い候補抗原を20種類選択した。ネズミマラリア原虫をモデルとして用いて、これらの分子の特異抗体が伝搬阻止効果を有するか否か検討したところ、統計学的に有意に効果を有する抗体が2種類得られた。

## A. 研究目的

現在開発の進められているマラリアワクチンは、1) スポロゾイトを標的とする感染阻止ワクチン、2) メロゾイトを標的とする発病阻止ワクチン、及

び、3) 媒介蚊体内の原虫を標的とする伝搬阻止ワクチンの3種に分類される。このうち伝搬阻止ワクチンは、媒介蚊体内における原虫（生殖母体、生殖体、接合体、オーキネート）を標的

とするもので、蚊体内の原虫の発育を阻害し、蚊からヒトへの感染を防御することを目的としている。吸血に伴い蚊の消化管内に感染赤血球が取り込まれる際に、原虫の発育を阻害する抗体と一緒に飲み込まれることで、消化管内でマラリア原虫の生活環が遮断されることが期待される。すなわち、伝搬阻止ワクチンは、地域レベルでのマラリア制圧に有効であると期待される。近年、熱帯熱、および三日熱マラリア原虫の接合体表面に発現する分子 Pfs25, Pvs25 に対する抗体が、強い伝搬阻止効果を有することが報告され、マラリア撲滅への切り札として注目を集めている。

本研究では、伝搬阻止ワクチンの候補抗原を複数同定することで、マラリア原虫の抗原変異に対応可能な実用的な伝搬阻止ワクチンの開発へと繋げることを目的とする。以上の目的を達成するためには、本来の標的分子の立体構造を認識する抗体の調整が最重要であるが、すでにマラリア研究において実績のある無細胞タンパク質合成システムを用いることでこの問題は克服できる。すなわち、前年度までに行われた、同システムを利用した赤血球ステージ原虫を標的としたワクチン候補抗原の探索が一定の成果を挙げたことから、コムギ胚芽を用いた組換えタンパク質がマラリア原虫本来の立体構造に極めて類似してい

ると考えられる。本研究では、蚊の体内でおきる原虫の発育過程すべて（生殖体の発育、受精、接合体の発育）を標的として捉え、より多くの候補分子からのスクリーニングをデータベースを最大限利用してシステムチックに行う。また、伝搬阻止効果をハイスループットに検証するためにネズミマラリア原虫をモデルとして用いる。

本研究によってネズミマラリアの系で、新たな伝搬阻止ワクチン候補抗原を見いだすことが出来れば、その成果をヒトマラリアワクチン開発に応用することを予定しており、ヒトマラリア制圧のワクチン開発の基礎研究として重要な意義を有している。

## B. 研究方法

- 1) マラリア原虫のゲノムデータベース (PlasmoDB) を利用して、熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、ネズミマラリア原虫の生殖母体と蚊ステージ原虫の両方に発現が予測されているものをリストアップする。そのうち、分泌シグナルおよび膜貫通ドメインを原虫表面への標的分子の局在の指標と考え、候補分子を 20 個程度選択する。
- 2) ネズミマラリア原虫 (*Plasmodium yoelii* XNL) をモデルとして以降の実験を行うため、*P. yoelii* 生殖母体期原虫の cDNA から

PCR 法により候補分子のコーディング領域の DNA 断片を増幅し、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する。得られたタンパク質を、ウサギ、マウスに免疫することで、抗血清を作製する。

### 3) 伝搬阻止効果の測定

**(Direct feeding 法)** *P. yoelii* に感染させたマウスを一群の媒介蚊 (*Anopheles stephensi*) に吸血させる。次いで、同じマウスを 2) で作製した抗血清により受動免疫し、別の一群の媒介蚊に吸血させる。5 日後に蚊の中腸に形成されるオーシスト数を比較検討して、抗血清の伝搬阻止活性を判定する。用いるマラリア原虫は、RFP を細胞質に発現するような遺伝子改変体であるため、オーシスト数の算定は蛍光顕微鏡下で簡便に行うことができる。

### 4) 伝搬阻止効果の測定

**(Membrane feeding 法)** 伝搬阻止効果における補体の関与の有無を明らかにし、さらに実験系を安定させるために *in vitro* の吸血実験を行う。3) と同様に準備したマラリア感染マウスから採血し、その生殖母体感染赤血球と抗血清、あるいは対照抗血清を混合し、membrane feeder を用いて蚊に吸血させる。その際に、補体の添加の有無による効果の違いも検討する。伝搬阻止効果は、上記

と同様にオーシスト数の算定により評価する。

## C. 研究結果および考察

1) ネズミマラリア原虫のプロテオームデータを参照し、生殖母体期で発現している 2560 個のタンパク質をリストアップした。さらに、熱帯熱マラリア原虫、あるいは三日熱マラリア原虫で相同体が見出されるもののうち、そのすべてで分泌シグナルを有するものを以降の解析を行う候補抗原とした。組換えタンパク質合成の観点から、膜結合領域が 4 つ未満のもの、全長が 700 アミノ酸を越えないものを優先的に選択し、最終的に 20 種類の候補抗原を選択した。

2) 1) で選んだ分子の *P. yoelii* の相同体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調整した。組換えタンパク質は GST 融合体として合成し、グルタチオンセファロースに吸着させた後、GST を切断して組換えタンパク質を回収した。これらを、マウスおよびウサギに常法により免疫し、抗血清を得た。ウサギ抗血清は、アフィニティ精製を行った。抗血清の抗体価は ELISA で評価した。特異性は、蚊のステージの原虫を抗原として用いた western blotting で確認した後、間接蛍光抗体法で候補抗原の局在を解析した。

これまでに 18 種類の分子に対する抗体の調整が終了した。このうち、生殖母体からオーキネートの表面に局在が見出された分子は 9 種類であった。

- 3) **Direct feeding** 法において、ポジティブコントロールである Pys25 の抗体を用いた時に、形成されるオーシスト数の有意な減少が認められた。したがって、伝搬阻止効果の評価系が確立できたと判断した。この **Direct feeding** 法を用いて、18 種類の抗血清の伝搬阻止効果を解析したところ、2 種類において統計学的に有意に蚊への感染を抑制するものが見出された。
- 4) **Direct feeding** 法の短所であるマウス個体差を含めた実験系のぶれ、さらに補体の必要性が評価できない点などを改善するために、生殖母体感染血液を用いた **membrane feeding** 法を立ち上げた。この方法は、マラリア流行地における伝搬阻止実験では主に用いられている方法であるが、ネズミマラリアでは高い感染率が得られず感度が低いという問題があった。今回、感染マウスからの採血の際に生殖体への分化を抑制する培地を用いること、また血清成分を除去することで、吸血蚊一匹あたりのオーシストの平均値が 500 を越える、**direct feeding** に匹敵する高い感染効率を与える系が確立できた。

## 5) 今後の課題

上でも述べたように、**Direct feeding** 法は実験条件の安定化が難しいため、今後は順次 **Membrane feeding** 法に移行し、得られた候補分子の抗血清の伝搬阻止効果を測定する必要がある。伝搬阻止効果が確認されたら、熱帯熱あるいは三日熱マラリア原虫の相同分子に対する特異抗体を作成し、感染流行地において患者血液を用いて **membrane feeding** 法により伝搬阻止効果を測定する。より効率の高い伝搬阻止抗体を得るために、抗原となる組換えタンパク質の領域、大きさ等を検討し、ワクチンとしての実用化へと繋げる。

## D. 結論

生殖母体から蚊の中腸細胞への侵入体（オーキネート）の間に発現する分子の中から、原虫表面への局在が予想される候補抗原を 20 種類選択した。ネズミマラリア原虫を用いた解析により、伝搬阻止活性を有する抗血清が 2 種類得られたことから、無細胞タンパク質合成系が伝搬阻止ワクチン候補抗原のスクリーニングにおいても極めて有効であることが示された。今後は、伝搬阻止効果測定の評価系の精度を上げると同時に、効果が示された分子については、ヒトマラリア原虫の相同体について同様の解析を感染流行地において患者血液を用いて行う

ことで、新規伝搬阻止ワクチンの開発へと道を開くことができる。

#### 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, 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.

## 2. 学会発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Tsuboi T, Tachibana M, Takeo S, Sattabongkot J, Wu Y, Torii M. 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.
- 6) 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.
- 7) Ito D, Han ET, Takeo S, Thonkukiatkul 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) Arumugam TU, Takeo S, Thonkukiatkul 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.
- 11) 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.
- 12) Arumugam TU, Takeo S, Thonkukiatkul 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.

- 13) 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。
- 14) 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。
- 15) Rachaneeporn Jenwithisuk、Niwat Kangwanrangsana、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。
- 16) 橘 真由美、石野 智子、Rachaneeporn Jenwithisuk、Niwat Kangwanrangsana、横内ゆき、Statabongkot 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。
- 17) 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。
- 18) 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。
- 19) 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。

20) 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。

21) 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。

22) 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。

23) 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。

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし