

201103004A

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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 坪 井 敬 文

平成 24 (2012) 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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 坪 井 敬 文

平成24(2012)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 -- 18 竹尾 暁
2. 抗原探索システムの開発	澤崎達也 -- 29 遠藤弥重太
3. ネズミマラリア評価系の開発	橘 真由美 -- 34 石野智子 鳥居本美

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 44
---------------------	----------

IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 51
-----------------	----------

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以来、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。すでに、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 1700 種類を組換えタンパク質として合成し、我々が確立したハイスループット免疫スクリーニング系を用いて、抗原性の比較的高い 380 種類を選択した。さらに今年度は、リポソーム（人工膜）で内包された膜蛋白質を基質にした抗原抗体反応を検出できる実験系の構築を行い、マラリアワクチン候補となりうる新規膜タンパク質抗原のスクリーニングをゲノムワイドに可能とする技術基盤の構築を行った。また、分子の機能に依拠したワクチン候補探索技術の有用性も検証した。赤血球侵入時に機能している可能性のある原虫分子 77 種に対する抗体を作製し、FACS を応用したマラリア原虫増殖阻害活性測定系を用いてワクチン活性を検証した。その結果、4 種の既知のワクチン候補抗原及び 3 種の新規ワクチン候補抗原、計 7 種類に対する抗体が熱帯熱マラリア原虫の増殖を阻害した。したがって、免疫スクリーニングに加えて、機能に依拠したワクチン候補探索技術によっても、これまで難渋していた新規マラリアワクチン候補タンパク質の探索が可能と考えられた。また、上記の新規ワクチン抗原の一つ GAMA に対する抗体は伝搬阻止活性を有することが、ネズミマラリ

ア in vivo 評価系を用いて確認された。したがって、GAMA は一つの抗原で赤血球期及び伝搬阻止ワクチンとなる、つまり、これまでマラリアワクチンでは全く報告のない、単一抗原多価ワクチン候補であることが示唆された。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マラリア原虫のゲノムワイドなプロテインアレイを作製し、それを用いたハイスクリーンシステムも構築し、新規ワクチン候補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) 機能的ビオチン化プロテオリポソーム膜蛋白質との抗原抗体反応検出系の構築

リポソーム添加型コムギ無細胞蛋白質合成系にビオチン化脂質を混合す

ることにより、ビオチン化リポソームの作製を行った。アルファスクリーン法を用いてビオチン化膜蛋白質に対する抗原抗体反応測定系の作製を行った。

2) 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及び特異抗体の作製

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて、赤血球への侵入型であるメロゾイト期の組換えタンパク質を193種合成し、それらに対する抗体を作製した。

3) FACSを応用したマラリア原虫増殖阻害活性測定系によるワクチン候補抗原の探索

上記193種類の抗体のうち、77種類の抗体について、IgGを精製し、FACSを用いた熱帯熱マラリア原虫増殖阻害活性測定系を用いて原虫増殖阻害活性を測定した。

4) 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、抗体の伝搬阻止活性を、*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。

(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) 機能的ビオチン化プロテオリポソーム膜蛋白質との抗原抗体反応検出系の構築

これまで機能を保持した膜蛋白質の合成は困難であった。リポソーム作製時にビオチン化脂質を混合する割合を至適化したところ、ビオチン化脂質を1~5%の間で混合すればアルファスクリーン法による検出が最大値になる機能性膜蛋白質の合成が可能であることが判明した。非標識リポソームでは、バックグラウンドレベルの測定値であることから、アルファスクリーン法を基盤とした本手法は、膜蛋白質を対象にした抗原抗体反応の検出に適していることがわかった。以上より、本手法が膜蛋白質を対象としたワクチン候補の探索に応用可能な技術として確立したと考えられる。

2) 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及び特異抗体の作製

マラリアゲノムデータベースからメロゾイトに強く発現していると予想された193種の遺伝子を選択した。コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて組換えタンパク質を合成し、193種全ての組換えタンパク質に対する抗体を得た。

3) FACSを応用したマラリア原虫増殖阻害活性測定系によるワクチン候補抗原の探索

上記で作製した抗体の内、77種の抗体について、FACSを応用したマラリア原虫増殖阻害活性測定系を用いて、ワクチン活性を有する抗体を探索した。その結果、4種の既知のワ

クチン候補抗原 (AMA1, MSP1, EBA175, Rh5)、及び3種の新規ワクチン候補抗原 (PfGAMA, PfMSPDBL1, RALP1)、計7種類に対する抗体が増殖阻害活性を示した。

また、PfGAMA はヒト赤血球表面に結合し、この結合は既知の赤血球結合能を有するワクチン候補抗原 EBA175 とは異なり、赤血球表面のシアル酸には依存していないことが明らかとなった。したがって、PfGAMA (シアル酸非依存的) に対する抗体と、EBA175 (シアル酸依存的) に対する抗体を同時に作用させれば、それぞれの原虫増殖阻害活性を増強できるカクテルワクチン候補となる可能性が考えられた。そこで PfGAMA 抗体と EBA175 抗体を混合したところ、両者の混合により培養熱帯熱マラリア原虫の赤血球への増殖阻害活性が飛躍的に増強することが明らかとなった。以上の結果から、PfGAMA は熱帯熱マラリア原虫メロゾイトの赤血球侵入に重要な役割を果たすこと、さらに新規赤血球期ワクチン候補となる可能性が示唆された。

4) ネズミマラリア原虫モデルを用いた GAMA のマラリア伝搬阻止ワクチン活性の検証

PfGAMA オーソログをネズミマラリア原虫 (*Plasmodium yoelii* XNL) から探索し、PyGAMA とした。PyGAMA をコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系により合成し、抗体を作製した。Direct feeding 法を用いて、PyGAMA の抗体の伝搬阻止効果を検討したところ、統計学的に有意に蚊への感染を抑制した。したがって、GAMA はマラリア赤血球期ワクチンのみならず伝搬阻止ワクチン候補抗原ともなり得ることが示唆された。

D. 結論

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を応用することにより、免疫スクリーニングに加えて、機能に依拠したワクチン候補探索技術も確立することが出来た。さらに、技術的に合成が非常に困難であった膜蛋白質も、探索の標的とすることが出来るようになった。さらに、ネズミマラリア原虫を用いたマラリアワクチン候補抗原の in vivo 評価系も確立した。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。以上より、これまで難渋していた新規マラリアワクチン候補タンパク質の探索がゲノムワイドに可能となった。

E. 健康危険情報 なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wang Y, Kaneko O, Sattabongkot J, Chen JH, Lu F, Chai JY, Takeo S, Tsuboi T, Ayala FJ, Chen Y, Lim CS, Han ET. Genetic polymorphism of *Plasmodium vivax* msp1p, a paralog of merozoite surface protein 1, from worldwide isolates. **American Journal of Tropical Medicine & Hygiene.** 2011, 84: 292-297.
- 2) 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.
- 3) Ito D, Han ET, Takeo S, Thongkukiatkul 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.
- 4) Chen JH, Wang Y, Ha KS, Lu F, Suh IB, Lim CS, Park JH, Takeo S, Tsuboi T, Han ET.
Measurement of naturally acquired humoral immune responses against the C-terminal region of the *Plasmodium vivax* MSP1 protein using protein arrays. **Parasitology Research**. 2011, 109:1259–1266.
 - 5) Doi M, Tanabe K, Tachibana SI, Hamai M, Tachibana M, Mita T, Yagi M, Zeyrek FY, Ferreira MU, Ohmae H, Kaneko A, Randrianarivelojosa M, Sattabongkot J, Cao YM, Horii T, Torii M, Tsuboi T.
Worldwide sequence conservation of transmission-blocking vaccine candidate Pvs230 in *Plasmodium vivax*. **Vaccine**. 2011, 29:4308-4315.
 - 6) Tachibana M, Wu Y, Iriko H, Muratova O, Macdonald NJ, Sattabongkot J, Takeo S, Otsuki H, Torii M, Tsuboi T.
N-terminal pro-domain of Pfs230 synthesized using cell-free system is sufficient to induce the complement dependent malaria transmission-blocking activity. **Clinical and Vaccine Immunology**. 2011, 18:1343-1350.
 - 7) Farrance CE, Rhee A, Jones RM, Musiychuk K, Shamloul M, Sharma S, Mett V, Chichester JA, Streatfield SJ, Roeffen W, van de Vegte-Bolmer M, Sauerwein RW, Tsuboi T, Muratova OV, Wu Y, Yusibov V.
A Plant-Produced Pfs230 Vaccine Candidate Blocks Transmission of *Plasmodium falciparum*. **Clinical and Vaccine Immunology**. 2011, 18:1351-1357.
 - 8) Rui E, Fernandez-Becerra C, Takeo S, Sanz S, Lacerda MV, Tsuboi T, Del Portillo HA.
Plasmodium vivax: comparison of immunogenicity among proteins expressed in the cell-free systems of *Escherichia coli* and wheat germ by suspension array assays. **Malaria Journal**. 2011, 10:192.
 - 9) Miyata T, Harakuni T, Tsuboi T, Sattabongkot J, Ikehara A, Tachibana M, Torii M, Matsuzaki G, Arakawa T.
Tricomponent immunopotentiating system (TIPS) as a novel molecular design strategy for malaria vaccine development. **Infection and Immunity**. 2011, 79:4260-4275.
 - 10) Sirichaisinthop J, Buates S, Watanabe R, Han ET, Suktawonjaroenpon W, Krassaesub S, Takeo S, Tsuboi T, Sattabongkot J
Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for malaria diagnosis in a field setting. **American Journal of Tropical Medicine & Hygiene**. 2011, 85:594-596.
 - 11) Arumugam TU, Takeo S, Yamasaki T, Thonkukiatkul A, Miura K, Otsuki H, Zhou H, Long CA, Sattabongkot J, Thompson J, Wilson DW, Beeson JG, Healer J, Crabb BS, Cowman AF, Torii M, Tsuboi T
Discovery of GAMA, a *Plasmodium falciparum* merozoite micronemal protein, as a novel blood-stage vaccine candidate antigen. **Infection and Immunity**. 2011, 79:4523-4532.

- 12) Nozawa A, Fujimoto R, Matsuoka H, Tsuboi T, Tozawa Y. Cell-free synthesis, reconstitution, and characterization of a mitochondrial dicarboxylate-tricarboxylate carrier of *Plasmodium falciparum*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 2011, 414:612–617.
- 13) Cherif MS, Shuaibu MN, Kurosaki T, Helegbe GK, Kikuchi M, Yanagi T, Tsuboi T, Sasaki H, Hirayama K. Immunogenicity of novel nanoparticle-coated MSP-1 C-terminus malaria DNA vaccine using different routes of administration. **Vaccine**. 2011, 29:9038-9050.
- 14) Yildiz Zeyrek F, Palacpac N, Yuksel F, Yagi M, Honjo K, Fujita Y, Arisue N, Takeo S, Tanabe K, Horii T, Tsuboi T, Ishii KJ, Coban C. Serologic markers in relation to parasite exposure history help to estimate transmission dynamics of *Plasmodium vivax*. **PLoS One**. 2011;6(11):e28126.
- 15) Ord RL, Rodriguez M, Yamasaki T, Takeo S, Tsuboi T, Lobo CA. Targeting sialic acid dependent and independent pathways of invasion in *Plasmodium falciparum*. **PLoS One**. 2012;7(1):e30251.
- 16) Volz JC, Bártfai R, Petter M, Langer C, Josling GA, Tsuboi T, Schwach F, Baum J, Rayner JC, Stunnenberg HG, Duffy MF, Cowman AF. PfSET10, a *Plasmodium falciparum* methyltransferase, maintains the active var gene in a poised state during parasite division. **Cell Host & Microbe**. 2012;11(1):7-18.
- 17) Tachibana M, Sato C, Otsuki H, Sattabongkot J, Kaneko O, Torii M, Tsuboi T. *Plasmodium vivax* gametocyte protein Pvs230 is a transmission-blocking vaccine candidate. **Vaccine**. 2012, 30:1807-1812.
- 18) Sakamoto H, Takeo S, Maier AG, Sattabongkot J, Cowman AF, Tsuboi T. Antibodies against a *Plasmodium falciparum* antigen PfMSPDBL1 inhibit merozoite invasion into human erythrocytes. **Vaccine**. 2012, 30:1972-1980.
- 19) Bullen HE, Charnaud SC, Kalanon M, Riglar DT, Dekiwadia C, Kangwanransan N, Torii M, Tsuboi T, Baum J, Ralph SA, Cowman AF, de Koning-Ward TF, Crabb BS, Gilson PR. Biosynthesis, localisation and macromolecular arrangement of the *Plasmodium falciparum* translocon of exported proteins; PTEX. **The Journal of Biological Chemistry**. 2012, 287(11):7871-7884.
- 20) Ohnuki H, Inoue H, Takemori N, Nakayama H, Sakaue T, Fukuda S, Miwa D, Nishiwaki E, Hatano M, Tokuhisa T, Endo Y, Nose M, Higashiyama S, BAZF, a novel component of cullin3-based E3 ligase complex, mediates VEGFR and Notch cross-signalling in angiogenesis. **Blood**. 2012, 119(11) : 2688-98
- 21) Tsuge S, Mizutani Y, Matsuoka K, Sawasaki T, Endo Y, Naruishi K, Maeda H, Takashiba S, Shiogama K, Inada K, Tsutsumi Y, Specific in situ visualization of plasma cells

- producing antibodies against *Porphyromonas gingivalis* in gingival radicular cyst. Application of the enzyme-labeled antigen method. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. 2011, 59 (7): 673-689
- 22) Akagi T, Shimizu, K, Takahama S, Iwasaki T, Sakamaki K, Endo Y, Sawasaki T, Caspase-8 cleavage of the interleukin-21 (IL-21) receptor is a negative feedback regulator of IL-21 signaling. **FEBS Letters**. 2011, 585 (12): 1835-1840
- 23) 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, 72 (10): 1136-1144
- 24) Alexandre JSF, Yahata K, Kawai S, Torii M, Kaneko O
PEXEL-independent trafficking of *Plasmodium falciparum* SURFIN4.2 to the parasite-infected red blood cell and Maurer's clefts. **Parasitology International**.
- 25) Kaewthamasorn M, Yahata K, Alexandre JSF, Xangsayarath P, Nakazawa S, Torii M, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, Kaneko O. Stable allele frequency distribution of the polymorphic region of SURFIN4.2 in *Plasmodium falciparum* isolates from Thailand. **Parasitology International**. 61:317- 323, 2012
2. 学会発表
- 1) Tsuboi T, Takeo S, Arumugam TU, Sakamoto H, Yamasaki T, Miura K, Long CA, Sattabongkot J, Torii M.
Post-genome novel blood-stage malaria vaccine candidate discovery by wheat germ cell-free system.
Forty-fifth annual U.S.- Japan Parasitic Diseases Panel Meeting, Tokyo, Japan, January 10-11, 2011.
- 2) Ito D, Han ET, Takeo S, Thongkukiatkul A, Otsuki H, Torii M, Tsuboi T.
Plasmodial ortholog of *Toxoplasma gondii* rhoptry neck protein 3 is localized to the rhoptry body.
Forty-fifth annual U.S.- Japan Parasitic Diseases Panel Meeting, Tokyo, Japan, January 10-11, 2011.
- 3) Tsuboi T <Invited Lecturer>
Post-genome discovery of novel malaria vaccine candidates using wheat germ cell-free system.
Special Lecture at the Papua New Guinea Institute of Medical Research, Goroka, Papua New Guinea, August 29, 2011.
- 4) Tsuboi T, Takeo S, Arumugam TU, Sakamoto H, Yamasaki T, Miura K, Long CA, Sattabongkot J, Torii M.
Post-genome discovery of novel malaria vaccine candidates using wheat germ cell-free system.
International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 6-10, 2011.

- 5) Sakamoto H, Takeo S, Tsuboi T
Antibody against a novel *Plasmodium falciparum* antigen MSPDBL1 inhibits erythrocyte invasion of merozoites.
International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 6–10, 2011.
- 6) Arumugam TU, Takeo S, Yamasaki T, Thonkukiatkul A, Miura K, Sattabongkot J, Healer J, Crabb B, Cowman A, Torii M, Tsuboi T.
Post genomic identification of a novel malaria vaccine candidate by functional approach.
International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 6–10, 2011.
- 7) Tsuboi T <Invited Lecturer>
Post-genome discovery of novel malaria vaccine candidates using wheat germ cell-free system.
Special Lecture at the Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme, Ouagadougou, Burkina Faso, October 27, 2011.
- 8) Richards JS, Arumugam TU, Reiling L, Fowkes FJ, Healer J, Hodder AN, Anders RF, Takeo S, Gilson PR, Thompson JK, Narum DL, Chitnis CE, Cross N, Langer C, Siba PM, King CL, Mueller I, Torii M, Crabb BS, Cowman AF, Tsuboi T, Beeson JG.
Associations between protection from malaria and antibodies to known and predicted merozoite antigens.
ASTMH 60th annual meeting, Philadelphia, USA, December 4–8, 2011.
- 9) Ord RL, Rodriguez M, Yamasaki T, Takeo S, Tsuboi T, Lobo C.
Targeting sialic acid-dependent and -independent pathways of invasion in *Plasmodium falciparum*.
ASTMH 60th annual meeting, Philadelphia, USA, December 4–8, 2011.
- 10) Arumugam TU, Takeo S, Yamasaki T, Thonkukiatkul A, Miura K, Otsuki H, Zhou H, Long CA, Sattabongkot J, Thompson J, Wilson DW, Beeson JG, Healer J, Crabb BS, Cowman AF, Torii M, Tsuboi T.
Identification of a novel *Plasmodium falciparum* merozoite micronemal protein as a blood-stage vaccine candidate.
ASTMH 60th annual meeting, Philadelphia, USA, December 4–8, 2011.
- 11) Fowkes FJ, McGready R, Hommel M, Cross N, Simpson J, Lackovic K, Richards JS, Viladpai-nguen SJ, Avril M, Smith J, Narum DL, Anders RF, Tsuboi T, Nosten F, Beeson JG.
Acquisition and maintenance of IgG responses to *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* during pregnancy.
ASTMH 60th annual meeting, Philadelphia, USA, December 4–8,

- 2011.
- 12) Lu F, Chen JH, Li J, Cheng Y, Wang B, Ha KS, Tsuboi T, Han ET.
Evaluation of naturally acquired humoral immune responses against immunoreactive proteins of *Plasmodium vivax* by protein arrays.
ASTMH 60th annual meeting, Philadelphia, USA, December 4–8, 2011.
- 13) Arumugam TU, Takeo S, Yamasaki T, Thonkuiatkul A, Miura K, Otsuki H, Zhou H, Long CA, Sattabongkot J, Thompson J, Wilson DW, Beeson JG, Healer J, Crabb BS, Cowman AF, Torii M, Tsuboi T.
A new sialic acid independent invasion ligand of Pf merozoite is a novel blood-stage vaccine candidate antigen.
Molecular Approaches to Malaria 2012, Lorne, Australia, February 19–23, 2012.
- 14) Ito D, Yamasaki T, Takeo S, Han ET, Thonkuiatkul A, Torii M, Tsuboi T.
RALP1 is localized at rhoptry neck of *Plasmodium falciparum* merozoite and translocates to moving junction.
Molecular Approaches to Malaria 2012, Lorne, Australia, February 19–23, 2012.
- 15) Tsuboi T, Takeo S, Sakamoto H, Kaneko T, Arumugam TU, Yamasaki T, Ito D, Takashima E, Sattabongkot J, Torii M.
Two post-genome approaches for the discovery of novel malaria blood-stage vaccine candidates using wheat germ cell-free system.
Molecular Approaches to Malaria 2012, Lorne, Australia, February 19–23, 2012.
- 16) Tachibana M, Sudo M, Yokouchi Y, Ishino T, Tsuboi T, Torii M.
Identification of novel molecule that is specifically expressed on the surface of microgamete.
Molecular Approaches to Malaria 2012, Lorne, Australia, February 19–23, 2012.
- 17) Li J, Chen JH, Lu F, Cheng Y, Wang B, Kong DH, Ha KS, Lim CS, Ito D, Tsuboi T, Han ET.
Pv12, a novel putative GPI-anchored rhoptry specific protein of *Plasmodium vivax*.
Molecular Approaches to Malaria 2012, Lorne, Australia, February 19–23, 2012.
- 18) Murata E, Tokunaga N, Tachibana M, Tsuboi T, Torii M, Ishino T.
The investigation of the mechanism how malaria sporozoites invade salivary glands.
Molecular Approaches to Malaria 2012, Lorne, Australia, February 19–23, 2012.
- 19) Shinzawa N, Ishino T, Tachibana M, Tsuboi T, Torii M.
Functional dissection of vectorial

- capacity in Plasmodium-refractory *Anopheles stephensi*.
Molecular Approaches to Malaria 2012, Lorne, Australia, February 19-23, 2012.
- 20) Richards JS, Arumugam TU, Reiling L, Fowkes FJ, Healer J, Hodder AN, Anders RF, Takeo S, Gilson PR, Thompson JK, Beeson JG, Narum DL, Chitnis CE, Cross N, Langer C, Siba PM, King CL, Mueller I, Torii M, Crabb BS, Cowman AF, Tsuboi T, Beeson J.
Associations between protection from malaria and antibodies to known and predicted merozoite antigens.
Molecular Approaches to Malaria 2012, Lorne, Australia, February 19-23, 2012.
- 21) 加藤 晶、今西 祥子、竹尾 暁、Sattabongkot Jetsumon、Li Fengwu、Vinetz Joseph、鳥居 本美、坪井 敬文
熱帯熱マラリア原虫の3つの宿主侵入期における新規内膜複合体関連分子の同定
第80回日本寄生虫学会大会、東京都、7/17-18、2011。
- 22) 宮田 健、原國 哲也、坪井 敬文、Jetsumon Sattabongkot、橘 真由美、鳥居 本美、松崎 吾朗、新川 武
三部構成免疫賦活システム (TIPs)
第80回日本寄生虫学会大会、東京都、7/17-18、2011。
- 23) 原國 哲也、宮田 健、坪井 敬文、Jetsumon Sattabongkot、橘 真由美、鳥居 本美、松崎 吾朗、新川 武
酵母 *Pichia pastoris* 発現コレラトキシンB鎖 (CTB) を用いたワクチンプラットフォームの開発
第80回日本寄生虫学会大会、東京都、7/17-18、2011。
- 24) ジャン ニン、アレキサンダー ジーン、矢幡 一英、坪井 敬文、チェン キジュン、金子 修
Identification of a region responsible for *Plasmodium falciparum* Pf332 export to the infected erythrocyte
第80回日本寄生虫学会大会、東京都、7/17-18、2011。
- 25) 坂本寛和、竹尾 暁、坪井 敬文
熱帯熱マラリア原虫の新規抗原 MSPDBL1 に対する抗体は原虫の赤血球侵入を阻害する
第80回日本寄生虫学会大会、東京都、7/17-18、2011。
- 26) Arumugam Thangavelu U.、竹尾 暁、Thonkukiatkul Amporn、三浦 憲豊、山崎 勤、大槻 均、Long Carole A.、Sattabongkot Jetsumon、鳥居 本美、坪井 敬文
機能予測に基づくポストゲノム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80回日本寄生虫学会大会、東京都、7/17-18、2011。
- 27) 橘 真由美、須藤 もえ、横内 ゆき、石野 智子、坪井 敬文、

- 鳥居 本美
 雄性生殖体に発現する新規伝搬
 阻止ワクチン候補抗原の同定
 第 80 回日本寄生虫学会大会、東
 京都、7/17-18、2011。
- 28) Niwat Kangwanrangsang、橘 真
 由美、坪井 敬文、石野 智子、
 鳥居 本美
 マラリア原虫オオキネート表面
 に発現する新規タンパク質の同
 定と性状解析
 第 80 回日本寄生虫学会大会、東
 京都、7/17-18、2011。
- 29) 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
 リガンド (EBL) の細胞内輸送ド
 メインの解析
 第 80 回日本寄生虫学会大会、東
 京都、7/17-18、2011。
- 30) 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
 感染赤血球内における熱帯熱マ
 ラリア原虫-宿主間の物質輸送
 経路の解析
 第 80 回日本寄生虫学会大会、東
 京都、7/17-18、2011。
- 31) 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 rhoptry
 neck protein 3 は AMA1 非存在
 下で RON2 および RON4 と複合体
 を形成する
 第 80 回日本寄生虫学会大会、東
 京都、7/17-18、2011。
- 32) 宮田 健、原國 哲也、坪井 敬
 文、Jetsumon Sattabongkot、
 橘 真由美、鳥居 本美、新川
 武
 三日熱マラリア伝搬阻止ワクチ
 ン候補抗原 (Pvs25) の高分子量
 化による可溶性凝集体構築とそ
 のワクチン効果
 第 81 回日本寄生虫学会大会、西
 宮市、3/23-24、2012。
- 33) 早川 枝李、徳舛 富由樹、臼
 倉 治郎、坪井 敬文、
 Wellems Thomas、松岡 裕
 之
 熱帯熱マラリア感染赤血球の内
 部に構築される 3 次元膜構造の
 観察
 第 81 回日本寄生虫学会大会、西
 宮市、3/23-24、2012。
- 34) 伊藤 大輔、長谷川 倫之、三浦
 憲豊、Thongkukiattkul Amporn、
 竹尾 暁、鳥居 本美、坪井 敬
 文
 熱帯熱マラリア原虫 RALP1 はロ
 プトリー頸部に局在し密着接合
 形成に関与する
 第 81 回日本寄生虫学会大会、西
 宮市、3/23-24、2012。
- 35) 坂本 寛和、金子 隆昌、竹尾
 暁、Maier Alexander G.、
 Sattabongkot Jetsumon、
 Cowman Alan F.、坪井 敬文
 熱帯熱マラリア原虫の新規メロ
 ゴイト表面抗原 MSPDBL1 に対す
 る抗体は原虫の赤血球侵入を阻
 害する
 第 81 回日本寄生虫学会大会、西
 宮市、3/23-24、2012。
- 36) 徳永 順士、村田 英理、坪井

- 敬文、石野 智子、鳥居 本美
マラリア原虫スポロゾイトのロ
プトリータンパク質の同定と発
現解析
第 81 回日本寄生虫学会大会、西
宮市、3/23-24、2012。
- 37) 入子 英幸、大槻 均、蓼本 早
百合、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のヘモグロ
ビン輸送機構
第 81 回日本寄生虫学会大会、西
宮市、3/23-24、2012。
- 38) 橘 真由美、石野 智子、横内
ゆき、坪井 敬文、鳥居 本美
ネズミマラリア原虫の蚊人工吸
血法（メンブレンフィーディン
グ法）の確立
第 81 回日本寄生虫学会大会、西
宮市、3/23-24、2012。
- 39) 吉田 栄人、伊従 光洋、坪井
敬文、Sattabongkot Jetsumon、
Mlambo Godfree、Blagborough
Andrew、Sinden Robert E.、
Kumar Nirbhay
バキュロウイルスベクターを用
いた熱帯熱・三日熱マラリア伝
播阻止ワクチンの開発研究
第 81 回日本寄生虫学会大会、西
宮市、3/23-24、2012。
- 40) Cherif Mahamoud Sama、Shuaibu
Mohammed Nasir、黒崎 友亮、
児玉 幸修、Helegbe Gideon
Kofi、菊池 三穂子、柳 哲雄、
坪井 敬文、佐々木 均、由比
克之、平山 謙二
Nanoparticle-coated PyMSP-1
plasmid engages CD40 on DCs to
produce high levels of IL-12.
第 81 回日本寄生虫学会大会、西
宮市、3/23-24、2012。
- 41) 石野智子、村田英理、徳永順士、
橘真由美、坪井敬文、鳥居本美
マラリア原虫先端部小器官（ロ
プトリー）に局在する分子のス
ポロゾイトにおける機能解析
第 81 回日本寄生虫学会大会、西
宮市、3/23-24、2012。
- 42) 遠藤 弥重太. コムギ無細胞タン
パク質合成法の開発とその応用.
日本農芸化学会 2012 年度大会.
京都. 2012 年 3 月 22-26 日
- 43) Keiichirou Nemoto, Gen-ichiro
Arimura, Masahiro Nishihara,
Motoaki Seki, Kazuo Shinozaki,
Yaeta Endo, Tatsuya Sawasaki.
Identification and Functional
Analysis of Tyrosine
Phosphorylationdependent MAP
Kinase Cascade. 第 53 回日本植
物生理学会年会. 京都. 2012 年
3 月 16-18 日
- 44) 清水康平、遠藤弥重太、澤崎達
也. Stress-inducible caspase
substrate TRB3 promotes nuclear
translocation of procaspase-3.
第二回公開シンポジウム「修飾シ
グナル病」学術領域の新展開. 東
京. 2012 年 1 月 28 日
- 45) 遠藤 弥重太. RIBOENGINE、コム
ギ胚芽無細胞タンパク質合成法
とその活用. 第 2 回 酵素学講
習会（酵素学ウインタースクー
ル）. 徳島. 2012 年 1 月 23-27
日

- 46) Yaeta Endo. RIBOENGINE, Wheat germ cell-free protein production system for functional and structural genomics. Towards structural studies of membrane proteins: a BioNMR symposium. January 16-19. 2012, ETH, Zurich
- 47) Keiichitou Nemoto, Motoaki Seki, Kazuo Shinozaki, Yaeta Endo, Tatsuya Sawasaki. Tyrosine-autophosphorylation protein kinases in Arabidopsis. Plant Genomes & Biotechnology: from Genes to Networks. November 30 - December 3. 2011, Cold Spring Harbor Laboratory, USA
- 48) 岩崎 隆宏, 田所 大典, 高濱 正吉, 遠藤 弥重太, 澤崎 達也. Regulation of eEF2K activity in Fas-induced apoptosis. 第34回日本分子生物学会年会. 横浜、2011年12月13-16日
- 49) 高橋 守, 竹田 浩之, 遠藤 弥重太, 澤崎 達也. C 無細胞基盤プロテオリポソームを用いた細胞への膜蛋白質導入技術の開発. 第34回日本分子生物学会年会. 横浜、2011年12月13-16日
- 50) 林 祥太, 清水 康平, 橋本 季明, 吉川 潮, 鎌田 真司, 遠藤 弥重太, 澤崎 達也, 竹田 浩之. カスパーゼ 3, 6, 7 により切断されるプロテインキナーゼの比較. 第34回日本分子生物学会年会. 横浜、2011年12月13-16日
- 51) 安岡 佐起, 竹田 浩之, 遠藤 弥重太, 澤崎 達也. コムギ無細胞系を基盤とした p53 をユビキチン化する E3 リガーゼの同定. 第34回日本分子生物学会年会. 横浜、2011年12月13-16日
- 52) 竹田 浩之, 小笠原 富夫, Chang Wei Liu, Pei-Ju Jih, 澤崎 達也, 遠藤 弥重太. コムギ無細胞系発現プロテオリポソームを用いた抗膜タンパク質抗体作製. 第34回日本分子生物学会年会. 横浜、2011年12月13-16日
- 53) 小原 賢大, 藤木 春美, 竹田 浩之, 遠藤 弥重太, 澤崎 達也. コムギ無細胞系基盤タンパク質ライブラリーを用いた新規乳がんマーカー探索. 第6回無細胞生命科学研究会. 姫路、2011年11月16-17日
- 54) 竹田 浩之, 小笠原 富夫, Chang Wei Liu, Pei-Ju Jih, 澤崎 達也, 遠藤 弥重太. コムギ無細胞系発現プロテオリポソームを用いた抗膜タンパク質抗体作製. 第6回無細胞生命科学研究会. 姫路、2011年11月16-17日
- 55) Atsushi Muroi, Tomio Ogasawara, Kyoko Shinya, Akiko Makino, Teridah E Ginting, Yaeta Endo, Tatsuya Sawasaki. CONSTRUCTION OF INFLUENZA VIRUS-LIKE PARTICLES USING A LIPOSOME-SUPPLEMENTED WHEAT CELL-FREE TRANSLATION SYSTEM. IUMS2011. 札幌、2011年9月6-16日
- 56) Yaeta Endo, Tatsuya Sawasaki, Lassale Michael W. An attempt

- to prepare membrane proteins using the wheat cell-free protein production system. XXII International Congress and General Assembly of the IUCr. August 20-28. 2012, Spain
- 57) Yaeta Endo. Wheat Germ Cell-Free Protein Production System for Post-Genomic Research. Pre-conference Workshop: Eukaryotic Gene Expression Systems Workshop (ICSG2011). May 9-14, 2011, Toronto, Canada
- 58) 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 感染赤血球内における熱帯熱マラリア原虫一宿主間の物質輸送経路の解析 第80回日本寄生虫学会、東京都、2011年3月
- 59) 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リガンド (EBL) の細胞内輸送ドメインの解析 第80回日本寄生虫学会、東京都、2011年3月
- 60) 橘真由美、須藤萌、横内ゆき、石野智子、坪井敬文、鳥居本美 雄性生殖体に発現する新規伝搬阻止ワクチン候補抗原の同定 第80回日本寄生虫学会、東京都、2011年3月
- 61) 新澤直明、石野智子、鳥居本美 マラリア媒介ハマダラカ *Anopheles stephensi* の感染抵抗性システムを用いたマラリア感染防御機構の解析 第80回日本寄生虫学会、東京都、2011年3月
- 62) Kangwanrangsang Niwat、橘真由美、坪井敬文、石野智子、鳥居本美 マラリア原虫スオオキネート表面に発現する新規タンパク質の同定と性状解析 第80回日本寄生虫学会、東京都、2011年3月
- 63) 徳永順士、村田英理、石野智子、鳥居本美 マラリア原虫スポロゾイトのロプトリー分子の探索及び発現プロファイル解析 第80回日本寄生虫学会、東京都、2011年3月
- 64) 石野智子、Hegge Stephan、徳永順士、村田英理、杉野友香、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80回日本寄生虫学会、東京都、2011年3月
- 65) 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 rhoptry neck protein 3 は AMA1 非存在下で RON2 および RON4 と複合体を形成する 第80回日本寄生虫学会、東京都、2011年3月
- 66) 加藤晶、今西祥子、竹尾暁、Statabongkot Jetsumon、Li Fengwu、Vinetz Joseph、鳥居本美、坪井敬文 熱帯熱マラリア原虫の3つの宿主侵入期における新規内膜複合体関連分子の同定 第80回日本寄生虫学会、東京都、2011年3月

- 67) Arumugam Thangavelu、竹尾暁、Thongkukiattkul Amporn、三浦憲豊、山崎勤、大槻均、Long Carole、Statabongkot Jetsumon、鳥居本美、坪井敬文 機能予測に基づくポストゲノム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80回日本寄生虫学会、東京都、2011年3月
- 68) 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。三部構成免疫賦活システム(TIPs) 第80回日本寄生虫学会、東京都、2011年3月
- 69) 原國哲也、宮田健、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* 発現コレラトキシン B 鎖(CTB)を用いたワクチンプラットフォームの開発 第80回日本寄生虫学会、東京都、2011年3月
- 70) 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。
- 71) 徳永順士、村田英理、石野智子、鳥居本美 マラリア原虫スポロゾイトにおけるロプトリータンパク群の性状解析 第19回分子寄生虫学ワークショップ、神戸、2011年10月
- 72) JS Richards, TU Arumugam, L Reiling, FJ Fowkes, J Healer, AN Hodder, RF Anders, S Takeo, PR Gilson, JK Thompson, DL Narum, CE Chitnis, N, Cross, C Langer, PM Siba, CL King, I Mueller, M Torii, BS Crabb, AF Cowm, T Tsuboi, J Beesom. Associations between protection from malaria and antibodies to known and predicted merozoite antigens. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 60th Annual Meeting, Philadelphia, PA, USA December 4-8, 2011
- 73) TU Arumugam, S Takeo, T Yamasaki, A Thongkukiattkul, K Miura, H Otsuki, H Zhou, CA Long, J Sattabongkot, J Thompson, DW Wilson, JG Beeson, J Healer, BS Crabb, AF Cowman, M Torii, T Tsuboi. Identification of a novel *Plasmodium falciparum* merozoite micronemal protein as a blood-stage vaccine candidate. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 60th Annual Meeting, Philadelphia, PA, USA December 4-8, 2011
- 74) Murata E, Tokunaga N, Tachibana M, Tsumoi T, Torii M, Ishino T. The investigation of the mechanism how malaria sporozoites invade salivary glands. MAM 2012 Conference (Molecular Approaches to Malaria), Lorne, Victoria, Australia, February 19-23, 2012

- 75) Shinzawa N, Ishino T, Tachibana M, Tsuboi T, Torii M. Functional dissection of vectorial capacity in Plasmodium-refractory *Anopheles stephensi*. MAM 2012 Conference (Molecular Approaches to Malaria), Lorne, Victoria, Australia, February 19-23, 2012
- 76) Tachibana M, Sudo M, Yokouchi Y, Ishino T, Tsuboi T, Torii M. Identification of novel molecule that is specifically expressed on the surface of microgamete. MAM 2012 Conference (Molecular Approaches to Malaria), Lorne, Victoria, Australia, February 19-23, 2012
- 77) Arumugam TU, Takeo S, Yamasaki T, Thongkukiatkul A, Miura K, Otsuki H, Zhou H, Long CA, Sattabongkot J, Thompson J, Wilson DW, Beeson JG, Healer J, Crabb BS, Cowman AF, Torii M, Tsuboi T. A new sialic acid independent invasion ligand of Pf merozoite is a novel blood stage vaccine candidate antigen. MAM 2012 Conference (Molecular Approaches to Malaria), Lorne, Victoria, Australia, February 19-23, 2012
- 78) Itoh D, Yamasaki T, Takeo S, Han E, Thongkukiatkul A, Torii M, Tsuboi T. RALP1 is located at rhoptry neck of *Plasmodium falciparum* merozoite and translocates to moving junction. MAM 2012 Conference (Molecular Approaches to Malaria), Lorne, Victoria, Australia, February 19-23, 2012
- 79) Richards JS, Arumugam TU, Reiling L, Fowkes FJ, Healer J, Hodder AN, Anders RF, Takeo S, Gilson PR, Thompson JK, Beeson JG, Narum DL, Chitnis CE, Cross N, Langer C, Siba PM, King CL, Mueller I, Torii M, Crabb BS, Cowman AF, Tsuboi T, Beeson J. Associations between protection from malaria and antibodies to known and predicted merozoite antigens. MAM 2012 Conference (Molecular Approaches to Malaria), Lorne, Victoria, Australia, February 19-23, 2012
- 80) Tsuboi T, Takeo S, Sakamoto H, Kaneko T, Arumugam TU, Yamasaki T, Itoh D, Takashima E, Sattabongkot J, Torii M. Two post-genome approaches for the discovery of novel malaria blood-stage vaccine candidates using wheat germ cell-free system. MAM 2012 Conference (Molecular Approaches to Malaria), Lorne, Victoria, Australia, February 19-23, 2012
- G. 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