

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、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 種類を含むプロテインアレイを作製した。その中から新規ワクチン候補抗原を同定することを目的に、アルファスクリーン法を応用したハイスループット免疫スクリーニング系を確立し、マリ共和国成人及びブルキナファソ小児血清の一部を用いて予備スクリーニングを行った。その結果、約 1700 種の熱帯熱マラリア原虫タンパク質から抗原性の比較的高い 380 種類を選択することが出来た。今年度は、分子の機能に依拠したワクチン候補探索技術の有用性を検証した。赤血球への侵入型であるメロゾイトへの発現が予測され、赤血球侵入時に機能している可能性のある分子 193 種類を組換えタンパク質として大量合成し、それら全てに対する抗体を個別に作製した。これらの抗体の内 77 種について 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) に対する抗体、計 7 種類の抗体が培養熱帯熱マラリア原虫に対して *in vitro* 増殖阻害活性を示した。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。

[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、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た。本研究は、これらを用いて、新規抗原を高効率に同定すること、またあらたにマラリア原虫タンパク質の機能に依拠したワクチン候補探索技術の有用性を検証し、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を同定することを目的に実施した。本研究において新規のワクチン候補抗原が同定できれば、国際的なマラリアワクチン研究開発を先導することが期待できる。さらに本研究で同定された新規ワクチンが実用化されれば、乳幼児や妊産婦死亡の減少のみならず、医療費、労働力の損失等、発展途上国における経済的負担を軽減するという国際的最優先課題について、我が国のプレゼンスを高めることにつながることを期待される。

B. 研究方法

1) 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

マラリアワクチンの候補となるタンパク質は、ヒトの免疫システム特に抗体にさらされる必要がある。したがって、赤血球へのマラリア原虫の侵入を阻害するワクチンを開発するためには、赤血球への侵入ステージであるメロゾイトに発現して機能するタンパク質が、ワクチン候補となりうる。そこで、マラリアゲノムデータベース (PlasmoDB) から、熱帯熱マラリア原虫メロゾイト期に発現していることが予想される原虫遺伝子を下記の条件で選択した。(i) 遺伝子の転写がメロゾイト期に最大となっていること、(ii) プロテオーム解析でメロゾイトにペプチドが同定されていること、(iii) シグナル配列または膜貫通ドメインの存在が予測され、メロゾイト表面又はメロゾイトの赤血球侵入に重要な機能を持つ先端部小器官における局在が予想されること。その結果、全ゲノム5400遺伝子中193種を選択した。これらのcDNAをPCR法で増幅した後、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系専用プラスミドにクローン化した。コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いてそれぞれのタンパク質を大量合成の後、ヒスチジンタグを用いてアフィニティー精製を行い、熱帯熱マラリア原虫メロゾイト組換えタンパク質ライブラリーを作製した。さらにこれらの組換えタンパク質をそれぞれウサギ及びマウスに免疫し、特

異抗体を 193 種作製した。

2) 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 種類のウサギ抗体について、IgG を精製し、非特異的にヒト赤血球に吸着する抗体を除去した。次に、同調培養熱帯熱マラリア原虫に添加後、約 1 日培養し、全ての原虫を 1 度次の赤血球に侵入させ、培地中の抗体がメロゾイトの赤血球侵入を阻害するかどうかを昨年度に確立した 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検討した。その原理は、蛍光色素サイバークリーンで原虫の核を生きたまま染色した後、原虫感染赤血球数を FACS を用いて定量した。その結果を、陰性対照として用いたマラリアとは無関係の GST タンパク質に対する抗体のものと比較し、統計学的に有意な阻害効果が認められる抗体を探索した。

C. 研究結果および考察

1) 熱帯熱マラリア原虫メロゾイト期遺伝子の選択と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 種の遺伝子から、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の合成を試みた。その結果、193 種全ての組換えタンパク質がアフィニティー精製後 SDS-PAGE で予想バンドとして検出され、しかも免疫抗原として必要量を得ることが出来た。この結果は、大腸菌を用いた従来からの組換えタンパク質合成系では、ほとんど熱帯熱マラリア原虫の組換えタンパク質が得られないという報告と比較して、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系

は格段に優れていることを実証したものである。それらを用いて、193 種の抗体を作製できた。

2) 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、IgG 精製及び抗赤血球抗体の除去が終了した 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、陰性対照の抗 GST 抗体と比較して有意な増殖阻害活性を示した。

そこで、これまでワクチンとしてほとんど着目されて研究されていなかった PfGAMA, PfMSPDBL1, RALP1 の内、先ず PfGAMA に着目し、これがマラリア赤血球期ワクチン候補となりうるかを検討した。PfGAMA は一次構造上、既知の赤血球結合タンパク質 Erythrocyte Binding Antigen (EBA) 175 等の分子が有する DBL (Duffy Binding Like) ドメインは有していないので、赤血球への結合能はデータベースからは予測されなかった。抗 PfGAMA 抗体を用いた間接蛍光抗体法により、PfGAMA は赤血球への侵入型であるメロゾイトの先端部小器官への局在が確認された。更にこれを免疫電子顕微鏡法により観察したところ、メロゾイト先端部小器官の一つであるマイクロネームに局在していた。さらに、メロゾイトが赤血球への侵入直前には、PfGAMA はメロゾイト表面に移行することが判明し、ヒトの免疫にさらされることが判明した。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、PfGAMA 抗体もしくは EBA175 抗体単独の原虫増殖阻害活性と比較検討したところ、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。以上の結果から、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成法のマラリアワクチン研究への有用性が確認された。

3) 今後の課題

現在までに作製した 193 種の抗体の内、熱帯熱マラリア原虫増殖阻害活性を測定していない抗体についても同様の増殖阻害活性測定を行う。また、同定された新規の抗原に関しては、PfGAMA 同様個別の研究を進めてゆき、新規ワクチン候補分子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。したがって、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. 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, Randrianarivejosia 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, Krasaesub 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.
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、Thonkukiattkul 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 Kangwanrangsarn、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、
Thongkukiatkul 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、Thongkukiatkul 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ゾイト表面抗原 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。
- 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製法、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、自動化した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、リポソーム（人工膜）で内包された膜蛋白質を基質にし、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。

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。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、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。

B. 研究方法

1) 機能的膜蛋白質の合成

膜蛋白質の合成は、リポソーム添加型コムギ無細胞蛋白質合成系により行った。リポソームには大豆由来の脂質画分であるアゾレクチンを用いた。コムギ無細胞蛋白質合成の反応液相に精製したリポソームを添加し、目的の遺伝子の mRNA から蛋白質合成を行った。合成された膜蛋白質の確認は、遠心分離により膜蛋白質を取り込んだリポソーム（プロテオリポソーム）画分を回収し、SDS-PAGE により行った。ただし、膜蛋白質は熱変性により凝集し、電気泳動で分離できなくなるため、一般的なボイルではなく 42℃で処理した後、解析した。

2) 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

リポソーム作製時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の測定値を指標に、ビオチン化脂質の割合の至適化を行った。

3) 抗膜蛋白質抗体の評価

免疫沈降法は、プロテオリポソーム膜蛋白質と抗体を混合後、プロテインAにより回収した。イムノブロットリング法は、一般的な SDS-PAGE 後、PVDF 膜に蛋白質を転写後、抗体と反応させ検出を行った。

(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した。

C. 研究結果および考察

1) 機能的膜蛋白質の合成

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。我々は、シロイヌナズナのリン酸トランスポーターを用いて、コムギ無細胞蛋白質合成技術にリポソームを添加するタイミングを評価したところ、合成後にリポソームを添加しても活性はないが、合成中にリポソームを添加することにより機能を保持した膜蛋白質の合成に成功した。本手法で合成できる膜蛋白質は活性を保持していたことから、正しいフォールディングをしていることが示唆される。膜蛋白質を対象とした抗原抗体探索のための構造を保持した抗原作成に本手法が有用である可能性が示された。

2) 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

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ことがわかった。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。

3) 抗膜蛋白質抗体の評価

抗体はその反応性から大別して、構造認識抗体と一次配列認識抗体の2つである。方法論的には、前者は免疫沈降法、後者は一般的なイムノブロットリング法で検出可能である。そこで、上記アルファスクリーン法で膜蛋白質との反応性を示す抗体を、免疫沈降法および一般的なイムノブロットリング法を用いて評価した。その結果、免疫沈降法の結果とアルファスクリーン法のデータに相関があることがわかった。このことは、アルファスクリーン法は免疫沈降法と反応論的に類似していることを意味する。免疫沈降法を用いた数百種類の抗体を評価することは非常に難しいが、アルファスクリーン法であれば容易である。これらの事は、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であることを意味している。

4) 今後の課題

マラリア感染者の血清を用いて、同様の条件でワクチン候補 膜蛋白質抗原の同定が可能であるかどうか、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製法、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。さらに今回は、これまで困難であった膜蛋白質を抗原として、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考えられ

る。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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
 - 2) 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
 - 3) 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
 - 4) 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
- ##### 2. 学会発表
- 1) 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
- November 30 - December 3, 2011, Cold Spring Harbor Laboratory, USA
- 2) Keiichirou Nemoto, Gen-ichiro Arimura, Masahiro Nishihara, Motoaki Seki, Kazuo Shinozaki, Yaeta Endo, Tatsuya Sawasaki. Identification and Functional Analysis of Tyrosine Phosphorylation-dependent 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
 - 3) 清水康平、遠藤弥重太、澤崎達也. Stress-inducibile 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
 - 4) 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
 - 5) 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
 - 6) 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
 - 7) 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
 - 8) 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
 - 9) 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
 - 10) 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
 - 11) 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
 - 12) 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

- 13) 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

- 14) 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

- 15) 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

- 16) 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

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。この技術を利用して、マラリア原虫の蚊を介した伝搬を阻害することを目的とした伝搬阻止ワクチンの候補抗原の探索を行ってきた。今年度、熱帯熱マラリア原虫メロゾイトから新規赤血球期ワクチンとして申請者らが同定した PfGAMA と呼ばれるタンパク質が、蚊ステージのマラリア原虫にも発現していることが予想された。そこで、簡便に伝搬阻止活性を評価する系として申請者らが確立したネズミマラリア原虫をモデルとして、オーソログの PyGAMA 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、伝搬阻止効果が認められた。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、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系とネズミマラリアを組み合わせた *in vivo* ワクチン評価系は、新規マラリアワクチン抗原の探索に有用と考えられた。

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り、さらにはマラリア撲滅への切り札として開発が急がれているが、臨床試験が行われているワクチン候補抗原は P25 と呼ばれるオーキネート表面抗原1種にすぎない。そこで本研究は、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開発を推進することを目的とする。

熱帯熱マラリア原虫を用いて伝搬阻止効果を検証するためには、(i) 培養熱帯熱マラリア原虫を生殖母体

まで発育させることの不安定性、(ii) 熱帯熱マラリア原虫を吸血した蚊はヒトへ感染させることができるので徹底的なバイオハザード対策の必要性、等の技術的制約が存在している。そこで、新規伝搬阻止ワクチン候補抗原シーズの探索を簡便に実施するには、ネズミマラリア原虫をモデルとして用いることが有用である。

今年度は、熱帯熱マラリア原虫メロゾイトから新規赤血球期ワクチンとして申請者らが同定した PfGAMA と呼ばれるタンパク質が、蚊ステージのマラリア原虫にも発現していることがデータベース情報から予想された。そこで、ネズミマラリア原虫におけるオーソログの PyGAMA に着目し、その特異抗体が伝搬阻止効果を有するか否か検討した。

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) PyGAMA 組換えタンパク質の発現と抗血清の作製: 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の PfGAMA オーソログを、ネズミマラリア原虫 (*Plasmodium yoelii* XNL) のゲノムデータベースから探索した。その結果、一つの遺伝子が同定され、PyGAMA とした。その遺伝子の全長を *P. yoelii* 生殖母体期原虫の cDNA から PCR 法により増幅し、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合成し、ヒスチジンタグを用いてアフィニティー精製を行った。得られた精製組換えタンパク質を、ウサギ、マウスに免疫することで、抗血清を得た。

- 2) ネズミマラリア原虫 *P. yoelii* の *in vitro* 培養によるオーキネートの作製と間接蛍光抗体法による観察: *P. yoelii* 感染マウスから採血し、血液を pH=8.0 に調整した後、24 度で一晩培養し、生殖母体をオーキネートに発育させる。その原虫抗原を用いて抗原スライドを作製し、1) で作製した抗 PyGAMA 抗体と反応させ、蛍光標識二次抗体で可視化する。これにより、PyGAMA タンパク質の原虫における発現、及びその局在を解明した。
- 3) ネズミマラリア原虫 *P. yoelii* をモデルとした Direct feeding 法による伝搬阻止効果の測定: *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 1) で作製した抗 PyGAMA 抗体により受動免疫し、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、蚊体内に形成された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。

C. 研究結果および考察

- 1) PyGAMA の組換えタンパク質をコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系にて調整した。組換えタンパク質はヒスチジンタグ融合体として合成し、ニッケルセファロースに吸着させ洗浄の後、組換えタンパク質を溶出した。このアフィニティー精製 PyGAMA タンパク質は SDS-PAGE で予想バンドとして検出され、しかも免疫抗原として必要量を得ることが出来た。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。ウサギ抗血清から抗原アフィニティカラムを用いて、特異抗体を精製した。抗血清の抗体価は ELISA で評価した。抗 PyGAMA 抗体の反応性を検討するため、赤内型 *P. yoelii* 原虫を用いて間接蛍光

抗体法で抗原の局在を確認した。その結果、熱帯熱マラリア原虫の PfGAMA と同様、メロゾイトの先端部小器官であるマイクロネームに局在しており、抗体の特異性が確認された。そこで、蚊のステージの *P. yoelii* を抗原として用いて間接蛍光抗体法を行ったところ、接合体表面、およびオーキネートの先端部と表面に PyGAMA の局在が見出された。この GAMA のオーキネート表面への局在は、既知の伝搬阻止ワクチン候補抗原である P25 と同様であったため、特異抗体を用いた伝搬阻止活性の測定を実施した。

2) Direct feeding 法を用いて、PyGAMA の抗血清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。

3) 今後の課題

熱帯熱マラリア原虫 PfGAMA および三日熱マラリア原虫のオーソログ PvGAMA に対する特異抗体を用いて、マラリア流行地において患者血液を用いた membrane feeding 法により伝搬阻止効果を測定する。これにより、ヒトにおける単一抗原多価マラリアワクチンの実用化へと繋げる。

D. 結論

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、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系とネズミマラリアを組み合わせた in vivo ワクチン評価系は、新規マラリア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。

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, 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.

3) Doi M, Tanabe K, Tachibana S,