

厚生労働科学研究費補助金(国際医学協力研究事業)

分担研究報告書

ワクチン分子の無細胞系合成システムの確立

分担研究者 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： 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、熱帯熱マラリア原虫メロゾイト期に特異的な分子のビオチン化マラリアタンパク質アレイを作製した。これをマラリア免疫ヒト血清を用いてスクリーニングし、マラリア防御抗体と特異的に反応する PfMSPDBL1を見出した。さらに、抗 PfMSPDBL1 抗体が培養熱帯熱マラリア原虫の増殖阻害活性を有することを明らかにした。その結果、それまで解析が全く行われていなかった未知の原虫分子 PfMSPDBL1 がマラリア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系のマラリアワクチン研究への有用性が確認された。

A．研究目的

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緊急の課題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、緊急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。

B．研究方法

1) 熱帯熱マラリア原虫メロゾイト期組換えビオチン化タンパク質アレイの合成

マラリアゲノム情報データベースより、メロゾイト期にのみ発現が示唆されている遺伝子 114 種類を選択した。熱帯熱マラリア原虫 3D7 株のメロゾ

イト期 cDNA からコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いてこれらの組換えタンパク質を合成し、ビオチン化マラリアタンパク質アレイを作製した。

2) ハイスループット抗原抗体アッセイの実施

これらのビオチン化タンパク質アレイとマラリア免疫ヒト血清との抗原抗体反応を検出するために、申請者らが確立したアルファスクリーン法を応用した。

3) 抗体の作製と熱帯熱マラリア原虫増殖阻害アッセイ

ヒト防御抗体と特異的に反応するマラリア原虫タンパク質を同定した後、これらを実験動物に免疫して特異抗体を作製し、培養熱帯熱マラリア原虫 3D7 株に上記で作製した抗体を加え、原虫増殖阻害活性を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究で使用したタイ国におけるマラリア患者血液の採取に当たって

は、タイ国保健省の許可を得、患者への説明を十分行なった上で同意を得て実施した。また、本血清試料の利用は愛媛大学医学部臨床研究倫理審査委員会で許可を得ている。また、実験動物における抗体の作製は、愛媛大学動物実験委員会において許可を得ている。

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組換えビオチン化タンパク質アレイの合成

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて、熱帯熱マラリア原虫タンパク質の内、マラリアゲノム情報データベース (PlasmoDB) より、メロゾイト期にのみ発現が示唆されている遺伝子 114 種類を選択し、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いてビオチン化マラリアタンパク質アレイを作製した。

2) ハイスループット抗原抗体アッセイの実施

上記のビオチン化マラリアタンパク質アレイを用いて、タイから得られた熱帯熱マラリアに対する防御抗体を含有しているヒト血清 22 人分との反応性をアルファスクリーン法を用いて検討した。その結果、それまで解析が全く行われていなかった未知の原虫分子 PfMSPDBL1 がマラリア防御ヒト抗体と特異的に反応していることが明らかとなった。

3) 抗体の作製と熱帯熱マラリア原虫増殖阻害アッセイ

抗 PfMSPDBL1 抗体を用いて熱帯熱マラリア原虫増殖阻害アッセイを行った結果、熱帯熱マラリア原虫 3D7 株に対する増殖阻害活性を有していることが明らかとなった。また、間接蛍光抗体法を用いて PfMSPDBL1 のメロゾイトにおける局在を観察したところ、メロゾイト表面であった。

以上の結果から、PfMSPDBL1 は新規赤血球期マラリア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。

4) 今後の課題

アルファスクリーン法で同定されたその他の新規の抗原に関しても、PfMSPDBL1 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は、新規マラリアワクチン候補抗原の網羅的な同定に有用と考えられた。

E . 研究発表

1 . 論文発表

- 1) 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.

- 2) 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.

- 3) 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.

2 . 学会発表

- 1) 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.

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.

- 2) Ito D, Yamasaki T, Takeo S, Han ET, Thonkukiatkul 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.

- 3) 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.

- 4) 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.

- 5) 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.

- 6) 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.

- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Tsuboi T.
From the Bench to the Field - Understanding the importance of clinical samples -
Parasitology Clinical Research Workshop, Suita, Japan, June 21-22, 2012
- 10) Tsuboi T.
Application of cell-free protein synthesis technology for production of malaria protein.
Cell-Free Protein Synthesis Workshop, Bangkok, Thailand, June 25-27, 2012.
- 11) Tsuboi T.
Identification of novel malaria vaccine candidates using wheat germ cell-free system.
The 10th Matsuyama International Symposium on Cell-Free Sciences, Matsuyama, Japan, September 25, 2012.
- 12) Arumugam TU, Tachibana M, Yamasaki T, Thonkukiatkul A, Cowman AF, Torii M, Tsuboi T.
Identification of GAMA as a multi-stage malaria vaccine candidate.
The 10th Matsuyama International Symposium on Cell-Free Sciences, Matsuyama, Japan, September 25, 2012.
- 13) Ito D, Hasegawa T, Yamasaki T, Takeo S, Han ET, Thonkukiatkul A, Torii M, Tsuboi T.
RALP1 is localized at rhoptry neck of *Plasmodium falciparum* merozoite and translocates to moving junction.
The 10th Matsuyama International Symposium on Cell-Free Sciences, Matsuyama, Japan, September 25, 2012.
- 14) Sasaoka C, Sakamoto H, Ito D, Takeo S, Sattabongkot J, Torii M, Takashima E, Tsuboi T.
Molecular characterization of hypothetical *Plasmodium falciparum* protein, PfH04.
The 10th Matsuyama International Symposium on Cell-Free Sciences, Matsuyama, Japan, September 25, 2012.
- 15) Sugino Y, Maki R, Tokunaga N,

- Shinzawa N, Tsuboi T, Ishino T, Torii M.
RALP1 has an important role during the liver infection.
The 10th Matsuyama International Symposium on Cell-Free Sciences, Matsuyama, Japan, September 25, 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.
The 10th Matsuyama International Symposium on Cell-Free Sciences, Matsuyama, Japan, September 25, 2012.
- 17) Murata E, Tokunaga N, Tachibana M, Tsuboi T, Torii M, Ishino T.
Rhoptry neck protein 2 is produced in oocyst-derived sporozoites and required for salivary gland invasion.
The 10th Matsuyama International Symposium on Cell-Free Sciences, Matsuyama, Japan, September 25, 2012.
- 18) Cherif MS, Shuaibu MN, Kurosaki T, Kodama Y, Helegbe GK, Kikuchi M, Yanagi T, Tsuboi T, Sasaki H, Yui K, Hirayama K.
Differential activation of dendritic cells by nanoparticle-coated PyMSP-1 DNA vaccine using different route of delivery.
ASTMH 61st annual meeting, Atlanta, USA, November 11-15, 2012.
- 19) Ishino T, Murata E, Tokunaga N, Tachibana M, Tsuboi T, Torii M.
Rhoptry neck protein 2 is produced in oocyst-derived sporozoites and required for salivary gland invasion.
ASTMH 61st annual meeting, Atlanta, USA, November 11-15, 2012.
- 20) Cheng Y, Wang Y, HAN ET, Tsuboi T, Ito D, Kong DH, Ha KS, Chen JH, Lu F, Li J, Wang B, Sattabongkot J.
Identification of a novel erythrocyte-binding ligand of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 paralog, PvMSP1P.
ASTMH 61st annual meeting, Atlanta, USA, November 11-15, 2012.
- 21) Kapulu MC, Yannick DF, Biswas S, Miura K, Blagborough AM, Williams AR, Draper SJ, Goodman AL, Turner AV, Nicosia A, Tsuboi T, Wu Y, Gilbert SG, Cohuet A, Sinden RE, Hill AV.
Comparative assessment of transmission blocking malaria vaccine candidate antigens using an adenovirus-MVA prime-boost regime.
ASTMH 61st annual meeting, Atlanta, USA, November 11-15, 2012.
- 22) Miura K, Takashima E, Deng B, Tullo G, Diouf A, Moretz SE, Long CA, Tsuboi T.
Functional comparison of leading *Plasmodium falciparum* transmission blocking vaccine candidates by standard membrane feeding assay.
ASTMH 61st annual meeting, Atlanta,

USA, November 11-15, 2012.

- 23) 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。
- 24) 早川 枝季、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。
- 25) 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。
- 26) 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。
- 27) 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。
- 28) 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。
- 29) 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。
- 30) 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。
- 31) 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。

- 32) 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alaria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。
- 33) 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alaria原虫の物質輸送機構
第20回分子寄生虫学ワークショップ、神戸市、8/26-29、2012。
- 34) 新澤直明、石野智子、橘真由美、坪井敬文、鳥居本美
マalaria抵抗性ハマダラカを用いたマalaria原虫媒介機構の解明
第20回分子寄生虫学ワークショップ、神戸市、8/26-29、2012。
- 35) 石野智子、徳永順士、杉野 友香、野崎 守、橘真由美、坪井敬文、鳥居本美
スポロゾイトロプトリー分子の機能分担
第20回分子寄生虫学ワークショップ、神戸市、8/26-29、2012。
- 36) 杉野 友香、楨 利衣、徳永順士、新澤直明、坪井敬文、石野智子、鳥居本美
ロプトリータンパク質(RALP1)は宿主肝臓への感染に関わる
第20回分子寄生虫学ワークショップ、神戸市、8/26-29、2012。
- 37) 高島英造、アルムガム T ウマサンカール、坪井敬文
コムギ無細胞系を利用したヒト/マalaria原虫タンパク質相互作用のゲノムワイド探索の試み
第20回分子寄生虫学ワークショップ、神戸市、8/26-29、2012。
- 38) 笹岡千紗、伊藤大輔、高島英造、坪井敬文
無症状マalaria原虫感染者において強い抗原性を有する原虫タンパク質 H04
第20回分子寄生虫学ワークショップ、神戸市、8/26-29、2012。
- 39) 伊藤大輔、長谷川倫之、山崎勤、三浦憲豊、Amporn Thongkukiatkul、竹尾暁、鳥居本美、坪井敬文
マalaria原虫メロゾイトの赤血球侵入におけるロプトリー頸部分子 RALP1の機能解析
第20回分子寄生虫学ワークショップ、神戸市、8/26-29、2012。
- 40) 坪井敬文、山崎勤、Arumugam Thangavelu U.、伊藤大輔、高島英造、鳥居本美
機能予測に基づくポストゲノム熱帯熱マalaria赤血球期ワクチン候補抗原の探索
第10回分子寄生虫・マalaria研究フォーラム、前橋市、10/12-13、2012。