

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860279

研究課題名(和文)1900種の組換えマラリア原虫タンパク質を用いたワクチン候補抗原スクリーニング

研究課題名(英文)Genome-wide immunoscreening of antibodies responsible for Plasmodium falciparum growth inhibitory activity of Malian adult IgG

研究代表者

森田 将之(Morita, Masayuki)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・研究員

研究者番号：60709632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：新規マラリアワクチン候補抗原探索のため、1900種のタンパク質からなる熱帯熱マラリア原虫タンパク質ライブラリーとマリ成人IgGの抗原抗体反応を網羅的に解析した。抗原抗体反応値とマリ成人IgGの培養熱帯熱マラリア原虫に対する増殖阻害活性の相関を解析した結果、3種の抗原に対する抗体の反応値が増殖阻害活性と有意に正に相関した。さらに、最も高い正の相関を示したLSA3に対する特異的ヒト抗体は培養熱帯熱マラリア原虫に対して24%の増殖阻害活性を示すことを実験的に証明できた。以上より、本スクリーニングにより、LSA3を有望な新規赤血球期マラリアワクチン候補抗原として同定できた。

研究成果の概要(英文)：To identify novel malaria vaccine candidates, I used 1900 Plasmodium falciparum proteins prepared using wheat germ cell-free system. Using the proteins, I measured the immunoreactivity of Malian adult IgG samples. Antibody reactivities against 3 proteins were positively correlated with growth inhibitory activity against in vitro cultured P.falciparum. Immunoreactivity of LSA3 has the highest correlation coefficient. Anti LSA3 specific antibody purified from Malian adult IgGs showed growth inhibitory activity against P.falciparum. The results suggest that LSA3 is a blood-stage malaria vaccine candidate.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリアワクチン候補抗原 コムギ胚芽無細胞タンパク質合成法 GIA ハイスループットスクリーニング

1. 研究開始当初の背景

マラリアは熱帯・亜熱帯地域において毎年2億人以上が罹患し、60万人以上が死に至る重篤な寄生原虫感染症である。これまで有効とされていた抗マラリア薬に対する耐性マラリア原虫が拡がりつつあり、新たな対策としてマラリアワクチンの開発が必要とされている。しかし、これまで40年以上マラリアワクチンを開発するために数多くの研究が行われてきたが、実用化に至ったワクチンは未だに一つもない。長年研究されてきたワクチン候補抗原も臨床試験において効果が無いことが相次いで明らかになり、ワクチン候補から除外された。このような状況を打開するために、新規ワクチン候補抗原同定の必要性が叫ばれている。熱帯熱マラリア流行地域居住者は熱帯熱マラリア原虫に繰返し感染することにより熱帯熱マラリアに対する防御抗体を獲得することが知られている。このことから、この防御抗体が認識する熱帯熱マラリア原虫抗原を明らかにできれば新規ワクチン候補の同定につながると考えられている。新規マラリアワクチン候補の探索は、2002年にマラリア原虫ゲノムが解読されてから飛躍的に進展すると考えられた。しかし、マラリア原虫遺伝子はAT含量が約76%と非常に高く、また、繰返し配列も非常に多い。そのため、既存の大腸菌を用いたタンパク質発現系による組換えタンパク質合成成功率は約10%と非常に低い。愛媛大学が開発したコムギ胚芽無細胞合成系は、80%以上という非常に高い成功率で組換えマラリア原虫タンパク質を合成することが可能である。この技術を用いてゲノムワイドにマラリア原虫タンパク質を合成することにより、1900種の組換え熱帯熱マラリア原虫タンパク質ライブラリーを作製している。さらに、極微量サンプルでハイスループットなタンパク質相互作用検出が可能なアルファスクリーンを、熱帯熱マラリア原虫タンパク質ライブラリーと熱帯熱マラリア流行地域居住者の抗体との抗原抗体反応の検出に最適化することで、熱帯熱マラリア原虫タンパク質とヒト抗体の反応を網羅的に解析でき、新規マラリアワクチン候補抗原が同定できると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、熱帯熱マラリア流行地域居住者から得たヒトIgGサンプルと、コムギ胚芽無細胞系で合成した熱帯熱マラリア原虫タンパク質ライブラリーの抗原抗体反応を網羅的に測定・解析することでマラリア防御抗体が認識する抗原を選抜することを目的としている。熱帯熱マラリア流行地域居住者の抗体は *in vitro* で培養熱帯熱マラリア原虫に対して増殖阻害活性 (Growth Inhibitory Activity: GIA) を示すことがわかっている。本研究で測定された抗原抗体反応値とGIAの相関を解析することで熱帯熱マラリア原虫の増殖阻害活性に寄与する抗原、つまり有望

な新規マラリアワクチン候補抗原が同定する。

3. 研究の方法

(1)コムギ胚芽無細胞系で合成されたピオチン化組換え熱帯熱マラリア原虫タンパク質

アルファスクリーンによって抗原抗体反応を検出するには、組換えタンパク質をピオチン化しビーズと結合させる必要がある。申請者らは、コムギ胚芽無細胞系にてピオチン化組換えタンパク質をハイスループットに合成する技術を確立しており、既に1900種のピオチン化組換え熱帯熱マラリア原虫タンパク質を作製している。

(2)マリ共和国の成人から得たヒトIgGサンプル

海外研究協力者である米国国立アレルギー・感染症研究所の三浦憲豊博士よりマラリア流行地域であるマリ共和国の成人IgGサンプルの供与を受けた。既にこのヒトIgGサンプルを培養熱帯熱マラリア原虫に添加することによって増殖阻害活性 (GIA) を測定している。

(3)アルファスクリーンによるワクチン候補抗原のハイスループットスクリーニング

アルファスクリーンは、ドナービーズを励起することによって生じる一重項酸素が近傍にあるアクセプタービーズに届くと発光する現象を応用している。具体的には、ピオチン化組換えマラリア原虫タンパク質とヒトIgGサンプルをインキュベートし、そこにストレプトアビジンコーティングしたドナービーズ、プロテインGコーティングしたアクセプタービーズを加えて解析を行うと、抗原と抗体が結合した場合にのみ発光を検出することができる。アルファスクリーンは、ELISAのようにプレートに組換えタンパク質を固相化せず、溶液中で抗原と抗体を反応させ発光を検出する。そのため本研究で行うスクリーニングでは、組換えタンパク質は立体構造を維持して抗原抗体反応を検出できると考えられる。

(4)抗原抗体反応値とGIAの相関解析

アルファスクリーンで得られた抗原抗体反応値とヒトIgGサンプルのGIAの相関を解析する。統計学的に有意な正の相関を示す抗原を選抜する。

(5)選抜された抗原に対する抗体のGIA測定

スクリーニングから選抜された抗原が培養熱帯熱マラリア原虫に対してGIAを示すことを確認するために、選抜抗原に対する抗体のGIAを測定する。

4. 研究成果

(1)マリ成人IgGの組換え熱帯熱マラリア原虫タンパク質に対する反応性

各 IgG サンプルに対するアルファスクリーン反応値の平均値がカットオフポイント（陰性対照の平均値+3SD）よりも大きい抗原を陽性反応抗原として選抜した。その結果、891 抗原（全抗原の約 50%）が陽性反応抗原として選抜された。大腸菌を用いたタンパク質合成系で構築されたタンパク質アレイでは、ヒト抗体と陽性反応を示した抗原の割合は 20% 以下であることが報告されている。大腸菌を用いたタンパク質合成系とは異なり、コムギ胚芽無細胞系はそのタンパク質合成システムが真核型である。このことからコムギ胚芽無細胞系で合成されたタンパク質は正常なコンフォメーションを維持しているために陽性反応抗原をより多く検出できたことが考えられる。以上より、コムギ胚芽無細胞系で構築されたマラリア原虫タンパク質ライブラリーはヒト抗体との反応を解析する上で非常に有用なプラットフォームとなると考えられた。

(2) 抗原抗体反応値と GIA の相関解析

GIA の標的となるマラリア原虫タンパク質はマラリア原虫の表面に局在すると考えられるため、陽性反応抗原からシグナルペプチドまたは膜貫通領域を有する抗原を選抜した。選抜された 325 種の抗原のアルファスクリーン反応値と GIA の相関をピアソンの積率相関係数によって解析した結果、LSA3-C、GLURP、RAMA の 3 種の抗原のアルファスクリーン反応値と GIA が有意に正に相関した。

(3) LSA3 特異的抗体の GIA の測定

アルファスクリーンによるスクリーニングで選抜された抗原に対する抗体が GIA を示すことを実証するため、最も相関係数が高かった LSA3 に対する特異的抗体を用いて GIA を測定した。組換え LSA3 をカラムに固定し、マリ成人 IgG から LSA3 特異的ヒト IgG を単離し、GIA を測定した。その結果、LSA3-C 特異的ヒト IgG は培養熱帯熱マラリア原虫の増殖を 24% 阻害した。スクリーニングの結果が実験的に証明されたことから、本研究で応用したコムギ無細胞系で構築されたマラリア原虫タンパク質ライブラリーとアルファスクリーンは新規マラリアワクチン候補抗原の探索に有用であることが示された。また、LSA3 はこれまでにマラリア原虫の肝臓期でワクチン候補抗原として報告されていた。本研究では、LSA3 が赤血球期マラリア原虫においても発現していることをウエスタンブロットングおよび蛍光抗体観察によって確認できた。このことから、LSA3 は肝臓期のみだけでなく、赤血球期においても有効なマラリアワクチン候補となり得る可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Takashima E., Morita M., Tsuboi T. Vaccine candidates for malaria: what's new? Expert Review of Vaccines, 2016, 15, 1-3, 査読有

Morita M., Koyama T., Sanai H., Sato A., Hiramoto A., Masuyama A., Nojima M., Wataya Y., Kim H.S. Stage specific activity of synthetic antimalarial endoperoxides, N-89 and N-251, against Plasmodium falciparum. Parasitology International, 2015, 64, 113-117, 査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

森田将之、高島英造、長岡ひかる、伊藤大輔、Bernard N. Kanoi、中田貴敬、西莉菜、飯村忠浩、鳥居本美、坪井敬文
タンパク質輸送機構に関連すると考えられる熱帯熱マラリア原虫デングラニュールタンパク質 PV1 の機能解析
第 85 回日本寄生虫学会大会 (2016.3.19-20, 宮崎県宮崎市)

Morita M., Takashima E., Kanoi B.N., Miura K., Long C.A., Tsuboi T. Genome-wide immunoscreening of antibodies responsible for Plasmodium falciparum growth inhibitory activity of Malian adult IgG
The American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH) 64th Annual Meeting (2015.10.25-29, Philadelphia (USA))

Morita M., Takashima E., Kanoi B.N., Miura K., Long C.A., Tsuboi T. Genome-wide immunoscreening of antigens contributing to Plasmodium falciparum growth inhibitory activity of Malian adult IgG
Protein Island Matsuyama (PIM) International Symposium 2015, The 13th Matsuyama International Symposium on Proteo-Sciences (2015.9.25, 愛媛県松山市)

森田将之、高島英造、伊藤大輔、中田貴敬、Bernard N. Kanoi、飯村忠浩、鳥居本美、坪井敬文
超解像顕微鏡によるマラリア原虫デングラニュールタンパク質群の寄生胞内動態解析
第 2 3 回分子寄生虫学ワークショップ / 第 1 3 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会 (2015.8.30-2015.9.2, 北海道帯広市)

Morita M., Takashima E., Kanoi B.N.,
Miura K., Long C.A., Tsuboi T.
Genome-wide immunoscreening to identify
blood-stage malaria vaccine candidates of
Plasmodium falciparum
25th Annual Molecular Parasitology/Vector
Biology Symposium (2015.4.28-29, Athens
(USA))

森田将之、高島英造、Bernard N. Kanoi、
三浦憲豊、坪井敬文
免疫スクリーニングによる熱帯熱マラリア
原虫ゲノム網羅的な赤血球期ワクチン候補
抗原の探索
第 84 回日本寄生虫学会大会
(2015.3.21-22、東京都三鷹市)

Morita M., Takashima E., Kanoi B.N.,
Miura K., Tsuboi T.
Immunoscreening of the target proteins
contributing to growth inhibitory
activity of human IgG against Plasmodium
falciparum
The American Society of Tropical Medicine
and Hygiene (ASTMH) 63rd Annual Meeting
(2014.11.2-6, New Orleans (USA))

Morita M., Takashima E., Kanoi B.N.,
Miura K., Tsuboi T.
Genome-wide screening of the antigens
contributing to growth inhibitory
activity of human IgG against Plasmodium
falciparum in Malian adults
Protein Island Matsuyama (PIM)
International Symposium 2014, The 12th
Matsuyama International Symposium on
Proteo-Sciences (2014.9.17, 愛媛県松山
市)

森田将之、高島英造、Bernard N. Kanoi、
三浦憲豊、坪井敬文
原虫増殖阻害活性と抗体価の相関解析による
マラリアゲノム網羅的ワクチン候補探索
第 22 回分子寄生虫学ワークショップ/第 12
回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同
大会 (2014.8.31-2014.9.3, 北海道帯広市)

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.pros.ehime-u.ac.jp/malaria/>

6 . 研究組織
研究代表者
森田 将之 (Morita Masayuki)
愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・研
究員
研究者番号 : 60709632