

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H00411

研究課題名(和文) 分子制御が可能な多抗原提示型ウイルス様粒子による蚊媒介感染症のワクチン開発

研究課題名(英文) Vaccine development of mosquito-borne infectious diseases using molecular controllable multiple antigen-displaying virus-like particles

研究代表者

朴 龍洙 (PARK, Enoch Y.)

静岡大学・グリーン科学技術研究所・教授

研究者番号：90238246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 43,670,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、カイコでノロウイルス様粒子、イヌパルボウイルス様粒子及びデングカプシド様粒子を作製し、VLPの表面にマラリアの2種類抗原、デングの4血清型の抗原を化学結合法でVLPの表面に提示した多価VLPの作製に成功した。これらの多価VLPは動物実験で高い抗体産生が認められた。特にデング4価VLPは4つの血清型に対して十分な中和活性を示した。この結果により、カイコで作製した多価VLPはワクチンとしての効果が立証され、カイコによる多価VLPワクチン作製基盤を世界に先駆けて確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、最近ワクチン候補として注目されているウイルス様粒子(VLP)をカイコで発現・精製した。さらにこれらのVLPの表面に複数の抗原を化学結合した複数の抗原提示に成功した。作製した多価VLPは動物実験で、高い抗体産生が認められ、またデングウイルスの中和活性も立証された。本研究成果は、古くから家畜化され、非常に安全なタンパク質発現系として認められているカイコがシルク以外にバイオ産業への貢献が期待できるものである。また、1つのVLPで複数のウイルスによる感染症を防御することができるため、将来安心・安全な社会づくりに大いに貢献できるものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, norovirus-like, canine parvovirus-like, and dengue capsid-like particles, potential vaccine candidates, were expressed in silkworm larvae. Multivalent VLPs were successfully prepared by displaying two antigens of malaria, or four dengue virus serotypes antigens on the surface of the VLPs using a chemical binding method. These multivalent VLPs were found to have high antibody generation in animal experiments. Significantly, the dengue tetravalent VLPs showed sufficient neutralizing activity against the four dengue serotypes. These results demonstrated the efficacy of the multivalent VLPs prepared by silkworms as a vaccine candidate and initiatively established the basis for a silkworm-based multivalent VLP vaccine.

研究分野：生物工学

キーワード：ウイルス様粒子 カイコ デングウイルス マラリア エンベロープ SpyTag Sptcatcher ワクチン 抗原提示

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ナノ粒子のワクチン化に関する研究が急増している。その素材として無機材料、リポソームなどが用いられるが、中でもウイルス様粒子 (VLP) が有望とされている。VLP は、ウイルスの構造タンパク質が自己組織化して形成され、遺伝物質を含まないため感染性がなく、かつ免疫誘導能を持つ優れた特性を有している。したがって、アジュバントがなくても強力に免疫を誘導するため、すでに酵母や昆虫細胞で発現したヒトパピローマウイルスや E 型肝炎ウイルス由来の VLP は、ワクチンとして実用化されている。しかし、酵母では、糖鎖を VLP に付加できないため、糖タンパク質を含む VLP の作製は困難である。また、昆虫細胞を用いる場合、高密度細胞培養が困難であるため VLP の生産性が低いのが現状である。申請者は、カイコを用いた VLP の効率的発現法を世界に先駆けて開発し、抗体や抗原を VLP の表面提示に成功した。しかし、カイコから発現した VLP はカイコ由来の夾雑タンパク質を多く含んでいるため従来法での精製は極めて困難であり、また VLP 表面への抗原タンパク質の提示は不均一であった。そこで、本研究では、カイコで発現した VLP を高純度で精製し、VLP 表面上の抗原提示を均一に制御する方法を開発し、これらの成果を蚊媒介感染症の原因であるマラリアやデング熱に有効な VLP ワクチン開発に挑戦する。

2. 研究の目的

本研究では、分子接着剤と呼ばれる SpyCatcher/SpyTag (以下、SpC/SpT) 化学修飾法を VLP 表面修飾に導入する。SpC/SpT は、SpC のリジンと SpT のアスパラギン酸の側鎖間イソペプチド結合を形成する。SpT 側に VLP 骨格タンパク質を融合させ VLP Carrier とし、この対峙した SpC 側に複数の抗原を融合させ、SpC/SpT の化学的修飾により VLP Carrier の表面に複数の抗原を提示した多価 VLP を作製する。多価 VLP の作製に必要なバクミドを作製し、カイコに導入・発現を行い、カイコから回収した多価 VLP を、磁気ナノ粒子 (MNP) により簡便に精製する。一方、デングウイルス (DENV) の 4 種の血清型 (DENV1~DENV4) やマラリアに対する優れた防御能を示す抗原を作製済みの多価 VLP に導入し、動物実験でそれぞれのワクチン効果を検証する。

3. 研究の方法

(1) ニッケルを修飾した磁気ナノ粒子の作製

カイコ発現系とナノテクノロジーを融合し、多価 VLP を特異的吸着と濃縮効果を可能とする磁気ナノ粒子 (MNP) を作製した。40 ml の超純水中の 5 mmol の FeCl_2 と 10 mmol の FeCl_3 に、5 ml の水酸化アンモニウムを加え、超常磁性酸化鉄ナノ粒子 (MNP) を合成した。この粒子に 150 μl の Tetraethyl orthosilicate を加え、Si をコーティングした MNP@SiO_2 を得た。 MNP@SiO_2 を 100 ml の無水トルエンに溶解し、3-Aminopropyltrimethoxysilane 存在下でアミノ基を付与した $\text{MNP@SiO}_2\text{@NH}_2$ を得た。ここに 2-Aminobenzamide を固定化した $\text{MNP@SiO}_2\text{@NH}_2\text{@2-AB}$ を分離した後、2 mmol の $\text{Ni(OAc)}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ と混合した均一溶液を作製し、12 時間還流した。こうして、 $\text{MNP@Si@NH}_2\text{@thin Ni}$ (MNP1)、 $\text{MNP@Si@NH}_2\text{@thick Ni}$ (MNP2) 及び $\text{MNP@Si@NH}_2\text{@Ni capsule}$ (MNP3) を合成し、透過型電子顕微鏡 (TEM) とエネルギー分散型 X 線分光分析 (EDS) を用いて、ニッケルと鉄の元素マッピングを行った。

(2) 抗原修飾基盤としての各種 VLP の作製

研究に必要な VLP として、ノロウイルス様粒子 (NoV-LP)、イヌパルボウイルス様粒子 (CPV-LP) 及びデングウイルスカプシドタンパク質 C2 からなるカプシド様粒子 (CLP) を作製した。

① NoV-LP の作製：ノロウイルス GII.4 東京株 (GenBank アクセッション番号：BAV93798.1) から完全長 VP1 遺伝子を、pFastBac-1 (Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan) にクローニングした。このプラスミドを大腸菌 BmDH10bac (CP⁻Chi⁻) に形質転換し、50 $\mu\text{g/ml}$ カナマイシン、7 $\mu\text{g/ml}$ ゲンタマイシン、10 $\mu\text{g/ml}$ テトラサイクリン、0.5 mM 5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド (X-Gal) 及び 0.25 mM の Isopropyl- β -D(-)-thiogalactopyranoside を添加し、青/白コロニーを選択した。白色コロニーから調製した組換えバクミドを BmNPV CP⁻Chi⁻/VP1 bacmid と命名した。カイコに発現するために BmNPV CP⁻Chi⁻/VP1 bacmid を *Bombyx mori* 細胞株にトランスフェクトした培養液に含まれている組換えウイルスストック (BmNPV CP⁻Chi⁻/VP1 ウイルス) を使用した。回収した組換えバキュロウイルスをカイコ 5 齢幼虫に感染させ、26°C、相対湿度 70%~85% 下で、人工飼料 (SilkMate S2, 日本農産) で飼育した。感染後 5 日の幼虫から脂肪体を回収し、0.1% Triton X-100 を含む Tris 緩衝生理食塩水 (TBS, pH7.6) に懸濁し、超音波処理した後、遠心分離 (10,000 \times g, 15 分, 4°C) し、0.45 μm ニトロセルロースフィルター (メルク、東京) でろ過した上澄みを精製に供した。サン

プルは、使用するまで-80°Cで保存した。

- ② CPV-LP の作製：イヌパルボウイルス (NC_001539.1) の VP2 の合成遺伝子を、PCR により増幅し、pFastBac-1 にクローニングした。以後 NoV-LP の作製と同様な方法で、CPV-LP を作製した。
- ③ CLP の作製：デングウイルス (DENV) 血清型 2 のカプシド遺伝子 (M29095.1) をコードする人工合成遺伝子を PCR 増幅し、pFastBac-1 にクローニングした。以後 NoV-LP の作製と同様な方法で、DENV 血清型 2 のカプシドからなるデングカプシド様粒子 (CLP) を作製した。

(3) ナノ粒子表面へのタンパク質の提示

VLP と提示予定のタンパク質をそれぞれ SpT と SpC に融合した後、両方をカイコで発現・精製し、化学修飾を行った。NoV-LP の場合、

① NoV-LP への SpT の融合：ノロウイルスの VP1 遺伝子の C 末端を SpT ペプチド (VPTIVMVDAYKRYK) と遺伝子融合させ、PCR で増幅した融合遺伝子を pFastBac-1 にクローニングした後、大腸菌 BmDH10bac (CP⁻Chi⁻) に形質転換して BmNPV バクミドを作製した。青/白コロニー選択により白色コロニーを形質転換体として単離した。

② 提示予定のタンパク質への SpC の融合：人工合成した SpC をコードする DNA 断片を pFastBac-1 にサブクローニングして目的タンパク質と SpC の融合タンパク質を発現した。SpC は、N 末端の VTTLGSLGSEGGPSGDMTTEE と C 末端の EATKGD AHT を欠失した SpC ΔNΔC も同時に設計した。緑色蛍光タンパク質 (EGFP) と mCherry を提示モデルとした。

①と②の組換えタンパク質の発現は、3-(2) にしたがって行った。その他、CPV-LP や CLP へのタンパク質の提示についても、上記の方法にしたがって作製した。

(4) 複数の抗原を提示した多価 VLP の作製と動物実験での評価

① マラリアの 2 抗原を提示した 2 価 VLP の作製：熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*)、三日熱マラリア原虫 (*P. vivax*)、四日熱マラリア原虫 (*P. malariae*)、卵形マラリア原虫 (*P. ovale*) の 4 種類が知られているが、動物実験系として整備されている *P. yoelli* を対象にした。人の肝細胞内の「赤外期」の PyCSP、赤血球の中の「赤内期」の PyMSP1₁₉ 及びハマダラカの中の「蚊体内期」の PyS25 と PyS28 タンパク質を抗原として選定した。それぞれの遺伝子を SpC に融合してカイコで発現・精製を行った後、(3)-①で作製済みの NoV-LP (SpT) とイソペプチド結合反応で、NoV-LP の表面に提示した。提示率を向上するために VLP:抗原の比を 1:0.5~1:4 に変化させて最適化を行った。提示率の高い 2 つの抗原 (PyCSP、PyMSP1₁₉) を同時に NoV-LP 表面に提示した 2 価 NoV-LP を作製し、VLP 形状の解析を行った。ワクチンとしての評価は、50 μg/1 回免疫/マウス×3 回免疫 (筋肉注射で 3 週間間隔、アジュバント ImjectAlum を使用) を行った後、*P. vivax* による攻撃実験から生存率を調べた。

② DENV の 4 血清型抗原を提示した 4 価 VLP の作製：DENV の抗原エピトープはウイルス表面のエンベロープ III 領域 (EDIII) に局在しているため、血清型 1~4 の EDIII、1EDIII~4EDIII を提示用抗原とした。それぞれの血清型の EDIII 領域を上記 (3)-② に従い、1EDIII-SpC~4EDIII-SpC を作製し、NoV-LP の表面に提示し、4 つの血清型抗原を提示した 4 価 NoV-LP を作製した。作製した抗原類は、25~50 μg/1 回免疫/マウス×3 回免疫 (2 週間間隔、アジュバント TiterMax Gold を使用) を Balb/c マウス (9 週齢のメス、n=5) に腹腔接種した。6 週目に実験殺を行い、全採血を実施した。デングウイルスへの中和活性は単発感染粒子 (SRIP) 法で求め、中和力価は、75%阻害を生じる血清希釈度 (IC75) として表し、PBS、血清無添加やジカウイルスを陰性コントロールとした。NoV-LP 以外、CPV-LP や CLP の 4 価 VLP 作製も (4)-①~② にしたがって行った。

4. 研究成果

(1) ニッケルを修飾した MNP によるカイコで発現した VLP の精製

3 種類の MNP (MNP1、MNP2 及び MNP3) を作製し、ニッケルと His との相互作用による VLP の精製を行った。タンパク質回収率が高い直径 100~200 nm の MNP3 (図 1A) を実験に用いた。大腸菌で発現した m-Cherry をバッチ方式で精製したところ、溶出 1 と 2 に精製度の高い目的タンパク質を回収することができた (図 1B)。カイコ脂肪体で発現した NoV-LP を精製したところ、同様に溶出 1 と 2 から回収することができた (図 1C, D)。この精製で 77.7% のタンパク質を除去し、回収率 50.8% であったが、カイコ脂肪体からの精製度が低く、2 次精製が必要であった。

(2) 抗原修飾基盤としての各種 VLP の作製

作製した VLP をカイコで発現し精製を行い、透過型電子顕微鏡 (TEM) で形状を確認した。NoV-LP は 35 nm、CPV-LP は 27 nm、CLP は 30 nm の粒子であった (図 2A-C)。これらの VLP を抗原提示用プラットフォームとした。

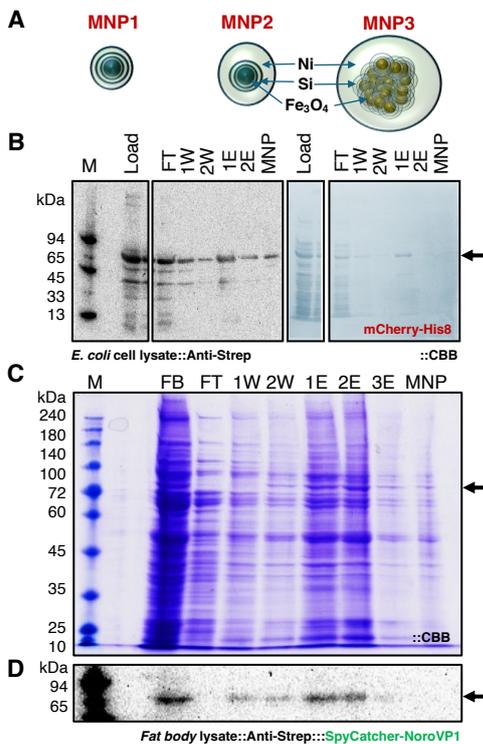


図 1. ナノ粒子を用いたカイコの脂肪体からのタンパク質の精製。(A) 合成した MNP の種類。MNP3 を用いた大腸菌ラーゼートからの精製 mCherry タンパク質 (B) とカイコの脂肪体からの精製 NoV-LP (C, D) のウェスタンブロット (WB) と CBB 染色膜。いずれも、洗浄バッファーには 20 mmol/l のイミダゾールを含み、1 ml の脂肪体と 7.5 mg の MNP を用いた。FB: 脂肪体、FT: フロースルー、W1: 第 1 洗浄画分、W2: 第 2 洗浄画分、E1: 第 1 溶出画分、E2: 第 2 溶出画分、M: 分子量マーカー、黒矢印は標的タンパク質を示す。

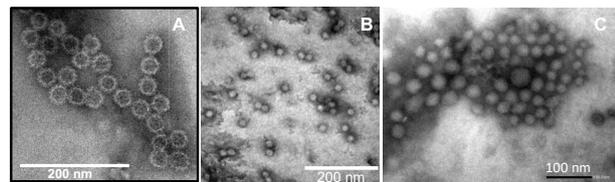


図 2. カイコの脂肪体で発現した各種 VLP の TEM 画像。A: NoV-LP、B: CPV-LP、C: CLP。

(3) ナノ粒子表面へのタンパク質の提示

VLP にタンパク質を提示するために SpT を融合するが、提示効率を向上する目的で VLP の表面改良を行った。NoV-LP を形成する VP1 タンパク質と SpT の間にペプチドリンカー (EA₃K) を 2 個、或いは 3 個挿入し、カイコで発現・精製を行った。また、提示用モデルタンパク質、mCherry や EGFP は SpC や SpC ΔNΔC (SpC の N 末端や C 末端を削った変異体) に融合し、カイコで発現・精製を行った。イソペプチド結合 (図 3A) による VP1-SpT (図 3B) と EGFP-SpC (図 3C) の結合による EGFP を提示した結果、リンカーを 3 個挿入した VP1-SpT と SpC ΔNΔC との提示率が、60%以上で、コントロールより約三倍高い提示率であった (図 3D)。EGFP 修飾を行った後、TEM で形状を解析したところ、リンカー 3 個の挿入により、直径 5 nm、SpC/SpT の表面修飾により直径が 6 nm、計 11 nm 大きい 43 nm の NoV-LP (図 3E) を形成した。さらに、EGFP と m-Cherry を同時に修飾したところ、同率の提示効率を得たため、2 価或いは 4 価 VLP 作製に用いた。

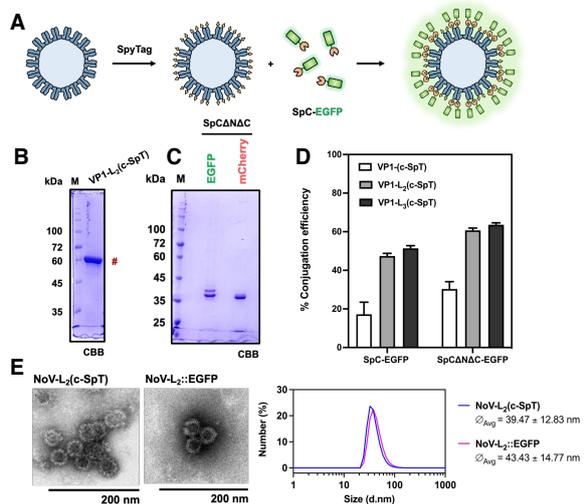


図 3. NoV-LP 表面への EGFP の提示。A: イソペプチド反応の模式図、B~C: VP1-SpT、EGFP-SpC の CBB 染色 SDS-PAGE、D: タンパク質提示率、E: VLP の TEM 画像及び粒子径分布。

(4) マラリア 2 抗原を提示した 2 価 NoV-LP の作製と動物実験での評価

予備実験で 4 つの抗原提示実験を行ったところ、赤外期の PyCSP と赤内期の PyMSP1₁₉ が高い提示率を示したため、2 価 VLP 作製に用いた。NoV-LP の VP1-SpT と PyCSP-SpC や PyMSP1₁₉-SpC との反応比 1 : 2 にした場合、それぞれ提示率 80% と 50% を示した。抗原修飾の結果、TEM 観察による VLP 形状の変化はなく、構造的安定であった。動物実験結果、NoV-LP による抗原産生能がなかったが、PyCSP と PyMSP1₁₉ は、それぞれは 4.5~5.5 レベル (Endpoint titer の log₁₀ 値) であったが、PyCSP と PyMSP1₁₉ 両方を提示した 2 価 NoV-LP の場合、4~5 であった (図 4a-1, 4b-1)。P. yoelii による攻撃実験での生存率は、コントロールと同程度で、6~7 日後死滅した (図 4a-2, 4b-2)。これは、PyCSP と PyMSP1₁₉ は、抗体産生はできるが、P. yoelii に対する防御能がないことを示し、選んだ抗原が P. yoelii 実験系には感受性が弱いのではと考えられる。

(5) DENV の 4 つの血清型抗原を提示した 4 価 VLP の作製と動物実験での評価

① NoV-LP を基盤とした DENV4 価 VLP の評価: DENV の 4 血清型 EDIII 領域 (1EDIII~4EDIII) を

VLP 表面に提示した。1EDIIII-SpC、2EDIIII-SpC、3EDIIII-SpC 及び 4EDIIII-SpC を NoV-LP の VP1-SpT の表面に修飾し、DENV4 価 NoV-LP を作製した。動物実験の結果、DENV4 価 VLP の抗体産生は、それぞれの血清型抗原の抗体産生量と同程度であり (図 5-I)、中和活性も全ての血清型抗原より高いか、同程度であった (図 5-II)。特に血清型 2 に対して高い中和活性を示した。したがって、本 DENV4 価 NoV-LP は 1 つの粒子で 4 つの血清型抗原に対する中和活性を持つことを明らかにした。

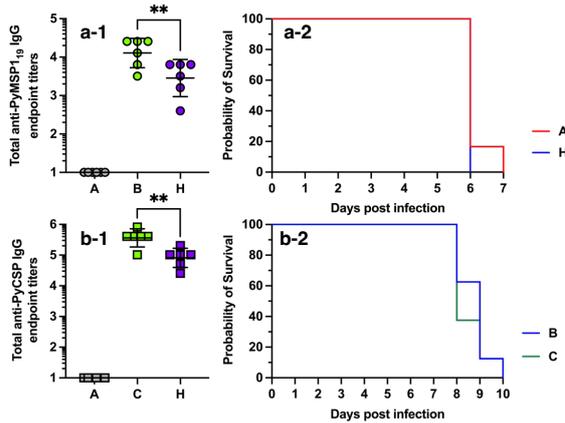


図 4. マラリアの 2 つの抗原を提示した 2 価 NoV-LP の評価。a: PyMSP1₁₉、b: PyCSP、1: 抗原産生、2: 生存率。A: NoV-LP、B: PyMSP1₁₉、C: PyCSP、H: マラリア 2 価 NoV-LP。

② CPV-LP や CLP を基盤とした DENV4 価 VLP の評価: デング 4 血清型抗原を提示した 4 価 CPV-LP と 4 価 CLP を作製した。血清型 2 の抗体産生と中和活性が他の血清型の結果より顕著であった (図 6)。抗体産生は、ほぼ同程度で高い抗原原性を示した (図 6-I)。デングウイルスの対する中和活性の場合、IC75 (log₁₀) の平均値で 2.5~3 であった (図 6-II)。何れの VLP のみでは、PBS 同様中和活性は認められなかった。成分ワクチンとして 1EDIIII と 2EDIIII の IC75 (log₁₀) の平均値は 1~2 であったが、3EDIIII と 4EDIIII は 1.0 以下で殆ど中和活性が無かった。したがって、本 4 価 DENV-VLP は、全ての血清型に対する抗原原性と中和活性を示したが、血清型ごとの親和性や感受性の差が生じることが示された。

③ 血清中のサイトカイン産生: CLP に 2EDIIII を提示した CLP/2EDIIII をマウスに免疫後、血清中のサイトカイン産生を評価した。CLP/2EDIIII 接種群は、IL-2: 74.4 pg/ml、IL-6: 99.5 pg/ml、IL-10: 7.2 ng/ml、TNF-α: 976.9 pg/ml、IFN-γ: 188.6 pg/ml で Th1 サイトカイン、炎症性 IL-6 や抗炎症性 IL-10 サイトカインを誘導したが、2EDIIII 接種群ではいずれのサイトカインも検出できなかった。これらの結果は、抗原提示 VLP は体液性免疫と細胞媒介免疫を誘導することを示唆している。

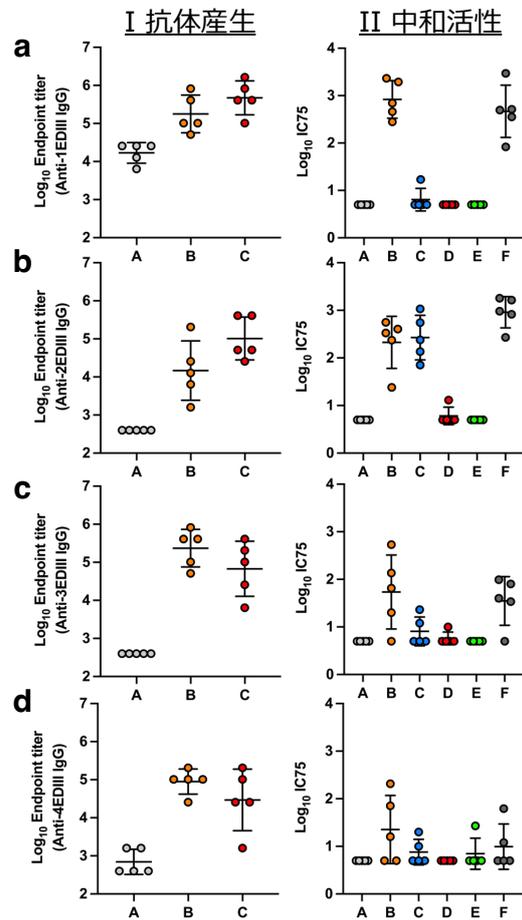


図 5. DENV の 4 価 NoV-LP の抗体産生 (I) と中和活性 (II)。a~d は、血清型 1~4 を示す。I の A~C は NoV-LP、1~4 血清型、4 価 NoV-LP を示す。II の A~F は、NoV-LP、1EDIIII、2EDIIII、3EDIIII、4EDIIII、4 価 NoV-LP を示す。

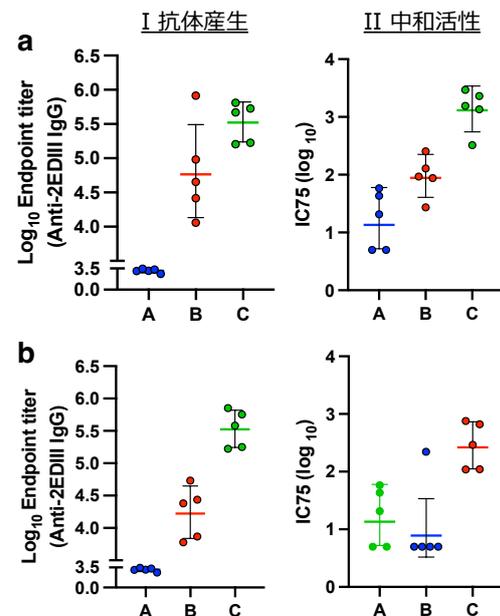


図 6. DENV の 4 価 CPV-LP (a) と 4 価 CLP (b) の血清型 2 に対する抗体産生 (I) と中和活性 (II)。A: PBS、a-B と b-B はそれぞれ CPV-LP と CLP、a-C と b-C はそれぞれ 4 価 CPV-LP と 4 価 CLP を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Utomo Doddy Irawan Setyo, Pambudi Sabar, Park Enoch Y.	4. 巻 12
2. 論文標題 Humoral immune response induced with dengue virus-like particles serotypes 1 and 4 produced in silkworm	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 AMB Express	6. 最初と最後の頁 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13568-022-01353-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Boonyakida Jirayu, Utomo Doddy Irawan Setyo, Soma Fahmida Nasrin, Park Enoch Y.	4. 巻 190
2. 論文標題 Two-step purification of tag-free norovirus-like particles from silkworm larvae (<i>Bombyx mori</i>)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Protein Expression and Purification	6. 最初と最後の頁 106010
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pep.2021.106010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Boonyakida Jirayu, Xu Jian, Satoh Jun, Nakanishi Takafumi, Mekata Tohru, Kato Tatsuya, Park Enoch Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification of antigenic domains and peptides from VP15 of white spot syndrome virus and their antiviral effects in <i>Marsupenaeus japonicus</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12766
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-92002-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Minkner Robert, Xu Jian, Takemura Kenshin, Boonyakida Jirayu, Watzig Hermann, Park Enoch Y.	4. 巻 18
2. 論文標題 Ni-modified magnetic nanoparticles for affinity purification of His-tagged proteins from the complex matrix of the silkworm fat body	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Nanobiotechnology	6. 最初と最後の頁 159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12951-020-00715-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Utomo Doddy Irawan Setyo, Pambudi Sabar, Sjatha Fithriyah, Kato Tatsuya, Park Enoch Y.	4. 巻 10
2. 論文標題 Production of dengue virus-like particles serotype-3 in silkworm larvae and their ability to elicit a humoral immune response in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 AMB Express	6. 最初と最後の頁 147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13568-020-01087-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kato Tatsuya, Machida Yuki, Takemura Kenshin, Xu Jian, Park Enoch Y.	4. 巻 323
2. 論文標題 Preparation of divalent antigen-displaying enveloped virus-like particles using a single recombinant Bombyx mori nucleopolyhedrovirus bacmid in silkworms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biotechnology	6. 最初と最後の頁 92 ~ 97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiotec.2020.08.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Minkner Robert, Xu Jian, Zagst Holger, Watzig Hermann, Kato Tatsuya, Oltmann-Norden Imke, Park Enoch Y.	4. 巻 1138
2. 論文標題 A systematic and methodical approach for the efficient purification of recombinant protein from silkworm larval hemolymph	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Chromatography B	6. 最初と最後の頁 121964 ~ 121964
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jchromb.2019.121964	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Suhaimi Hamizah, Xu Jian, Kato Tatsuya, Setyo Utomo Doddy Irawan, Sekiguchi Tomofumi, Park Enoch Y.	4. 巻 522
2. 論文標題 Identification of secretion domain of Neospora caninum profilin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 8 ~ 13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.11.056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Boonyakida Jirayu, Khoris Indra Mendi, Nasrin Fahmida, Park Enoch Y.	4. 巻 24
2. 論文標題 Improvement of Modular Protein Display Efficiency in SpyTag-Implemented Norovirus-like Particles	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomacromolecules	6. 最初と最後の頁 308 ~ 318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biomac.2c01150	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato Tatsuya, Kakuta Tatsuki, Yonezuka Ami, Sekiguchi Tomofumi, Machida Yuki, Xu Jian, Suzuki Tohru, Park Enoch Y.	4. 巻 65
2. 論文標題 Expression and Purification of Porcine Rotavirus Structural Proteins in Silkworm Larvae as a Vaccine Candidate	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Biotechnology	6. 最初と最後の頁 401 ~ 409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12033-022-00548-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Xu Jian, Sekiguchi Tomofumi, Boonyakida Jirayu, Kato Tatsuya, Park Enoch Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 Display of multiple proteins on engineered canine parvovirus-like particles expressed in cultured silkworm cells and silkworm larvae	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 1096363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fbioe.2023.1096363	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計25件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 15件)

1. 発表者名 Jirayu Boonyakida, Doddy Irawan Setyo Utomo, Jian Xu, Enoch Y. Park
2. 発表標題 Purification and characterization of norovirus-like particle and its SpyTag-variants from silkworm (<i>Bombyx mori</i>)
3. 学会等名 第73回 (2021年) 日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

1. 発表者名 Doddy Irawan Setyo Utomo1, Sabar Pambudi, Enoch Y. Park
2. 発表標題 The eliciting capability a humoral immune response in a mouse model induced with dengue virus-like particles serotypes 1 and 4 produced in silkworm larvae
3. 学会等名 第73回(2021年)日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年~2022年

1. 発表者名 Jirayu Boonyakida, Fahmida Nasrin, Indra Memdi Khoris, and Enoch Y. Park
2. 発表標題 Decoration of GII.4 Norovirus-like Particles via SpyTag/SpyCatcher Bioconjugation System for a Modular Protein-displaying Platform
3. 学会等名 The 1th SU-CNU Joint Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年~2022年

1. 発表者名 Tomofumi Sekiguchi, Enoch Y. Park
2. 発表標題 Development of an efficient antigen display system for Virus-Like Particles in silkworm
3. 学会等名 International e-workshop on Biosensors 2021 (国際学会)
4. 発表年 2020年~2021年

1. 発表者名 Doddy Irawan Setyo Utomo, Enoch Y. Park
2. 発表標題 Dengue Virus-like Particles Assembly from Structural Proteins Expressed in Silkworm and Characterization
3. 学会等名 7th International symposium toward the future of advanced researches in Shizuoka University (ISPAR-SU2021) (国際学会)
4. 発表年 2020年~2021年

1. 発表者名 Takafumi Nakanishi、Enoch Y. Park
2. 発表標題 Expression and purification of White spot syndrome virus antigen protein using silkworm expression system
3. 学会等名 International e-workshop on Biosensors 2021 (国際学会)
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 Jirayu Boonyakida、Jian Xu、Jun Satoh、Takafumi Nakanishi、Toru Mekata、Tatsuya Kato、and Enoch Y. Park
2. 発表標題 Identification of effective peptide derived from WSSV-VP15 for protection of Masupenaeus japonicus against WSSV
3. 学会等名 7th International symposium toward the future of advanced researches in Shizuoka University (ISPAR-SU2021) (国際学会)
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 朴 龍洙
2. 発表標題 カイコを用いたウイルス様粒子の作製と抗原提示
3. 学会等名 化学工学会第53回秋季大会バイオ部会シンポジウム「ポストコロナに向けた生物化学工学の新展開」(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤竜也、角田達紀、米塚亜美、町田佑樹、関口智史、徐剣、鈴木亨、朴龍洙
2. 発表標題 カイコを用いたブタロタウイルス構造タンパク質の発現
3. 学会等名 2022年度日本生物工学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 朴龍洙、関口智史、ブーニャキダジラク、徐剣、加藤竜也
2. 発表標題 イヌバルボウイルス様粒子の作製とEGFPの提示
3. 学会等名 2022年度日本生物工学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Jirayu Boonyakida, Takafumi Nakanishi, Jun Satoh, Yoshiko Shimahara, Tohru Mekata, and Enoch Y. Park
2. 発表標題 Immunostimulation of shrimp through oral administration of silkworm pupae expressing VP15 against WSSV
3. 学会等名 2022年度日本生物工学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 朴 龍洙
2. 発表標題 Display technology in virus-like particles using silkworm expression system
3. 学会等名 NIPER-PHARMACO2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Krishna Raja Muthuraman, Enoch Y. Park
2. 発表標題 Expression of dengue virus 1 - 4 serotypes envelope domain EDIII using silkworm expression system and their display on dengue virus-like particle
3. 学会等名 NIPER-PHARMACO2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Jirayu Boonyakida and Enoch Y. Park
2. 発表標題 Modular displaying of dengue envelope protein domain III (EDIII) on SpyTagged-Norovirus-like particles
3. 学会等名 2023年度日本生物工学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 朴 龍洙
2. 発表標題 複数のタンパク質を提示した ウイルス様粒子の作製
3. 学会等名 2023年度中部乳酸菌研究会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Jirayu Boonyakida, Takafumi Nakanishi, Jun Satoh, Yoshiko Shimahara, Tohru Mekata, and Enoch Y. Park
2. 発表標題 Silkworm pupa as a vehicle for delivering VP15-derived products through oral administration for immunization of kuruma shrimp
3. 学会等名 The 4th Congress of the International Society of Fish and Shellfish Immunology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Enoch Y. Park
2. 発表標題 Virus-like particles from Silkworm
3. 学会等名 A short meeting Nanobiotechnology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Enoch Y. Park
2. 発表標題 From Silkroad to Bioroad
3. 学会等名 BK21 4th Interdisciplinary Program in IT-Bio Convergence System "Change the future agriculture with new farming technology" (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Enoch Y. Park, Jirayu Boonyakida, Tomofumi Sekiguchi, Muthuraman Krishna Raja, Dody Irawan Setyo Utomo
2. 発表標題 SILKWORM BIOFACTORY AS A VIRUS-LIKE PARTICLES PREPARATION PLATFORM
3. 学会等名 The 30th FAOBMB & 8th BMB Conference (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Jirayu Boonyakida, Kazuhiko Nakayama, Kodai Kusakisako, Hiromi Ikadai, Enoch Y. Park
2. 発表標題 SPYTAGGED-NOROVIRUS-LIKE PARTICLE AS A MODULAR PLATFORM FOR BIVALENT DISPLAYING OF CSP AND MSP119 PROTEINS FROM PLASMODIUM YOELII
3. 学会等名 The 30th FAOBMB & 8th BMB Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Krishna Raja Muthuraman, Jirayu boonyakida, Enoch Y. Park
2. 発表標題 PHYSIOCHEMICAL ANALYSIS OF SILKWORM LARVAE EXPRESSED CANINE PARVO VIRUS LIKE PARTICLE DISPLAYING ENVELOPE DOMAIN (EDIII) OF DENGUE VIRUS SEROTYPES
3. 学会等名 The 30th FAOBMB & 8th BMB Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Enoch Y. Park
2. 発表標題 Silkworm Biofactory as a Potential Protein Expression System and its Possibility
3. 学会等名 International Conference for Green Science and Technology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Krishna Raja Muthuraman, Doddy Irawan Setyo Utomo, Jirayu boonyakida, Mami Matsuda, Ryouске Suzuki, and Enoch Y Park
2. 発表標題 Immunological Evaluation of Monovalent Capsid Virus-Like Particle Displayed Envelope Domain III (EDIII) of Dengue Serotype 2 using Silkworm Larvae
3. 学会等名 International Conference for Green Science and Technology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Jirayu Boonyakida, Enoch Y. Park
2. 発表標題 Norovirus-like particles as a modular platform for displaying antigenic proteins from Plasmodium yoelii
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 朴 龍洙、関口智史、Jirayu Boonyakida、徐 劍、加藤竜也
2. 発表標題 イヌパルボウイルス様粒子の表面への複数のタンパク質の提示
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

静岡大学教員データベース
<https://tdb.shizuoka.ac.jp/RDB/public/Default2.aspx?id=10747&l=0>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鈴木 亮介 (SUZUKI Ryosuke) (50342902)	国立感染症研究所・ウイルス第二部・室長 (82603)	
研究分担者	篠井 宏実 (IKADAI Hiromi) (80327460)	北里大学・獣医学部・准教授 (32607)	
研究分担者	加藤 竜也 (KATO Tatsuya) (00397366)	静岡大学・農学部・教授 (13801)	
研究分担者	宮崎 剛亜 (MIYAZAKI Takatsugu) (30775721)	静岡大学・グリーン科学技術研究所・准教授 (13801)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------