

氏名(本籍)	木村理沙(千葉県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第6583号
学位授与年月日	平成25年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	熱帯熱マラリア原虫抗酸化因子ペルオキシレドキシンの赤血球内寄生期における生理的役割に関する研究

主査	筑波大学教授	薬学博士	永田 恭介
副査	筑波大学教授	理学博士	岡村 直道
副査	筑波大学教授	Doctor of Public Health	我妻 ゆき子
副査	筑波大学教授	博士(医学)	倉根 一郎

## 論文の内容の要旨

### (目的)

新しいマラリア制圧戦略の開発のためには、マラリア原虫の巧妙な宿主細胞内適応機構の理解が必要である。マラリア原虫は赤血球内で酸化ストレスに曝されるため、抗酸化機構は寄生適応に重要である。近年、マラリア原虫のペルオキシレドキシシン (Prx) が分子シャペロンとしてシグナル伝達系において調節機能を持つことが明らかになり、この分子が抗酸化機構において重要な役割を果たしており、その結果細胞内レドクスバランスに関わる種々の細胞内生理現象の制御に関わる中心的分子である可能性が議論されている。熱帯熱マラリア原虫の Prx のうち、Pfl-Cys-Prx と PfTPx-1 は細胞質に局在し、PfTPx-2 はミトコンドリアに局在する。本研究では原虫 Prx の原虫細胞内における生理機能を逆遺伝学的手法を用いて明らかにし、原虫 Prx が赤血球内における寄生適応において果たす役割、また原虫 Prx のマラリア治療の標的としての可能性について評価することを目的としている。

### (対象と方法)

研究には培養熱帯熱マラリア原虫株 (FCR-3) を用いている。PfTPx-1 欠損原虫は既に作製されている。今回ダブルクロスオーバー法によって、Pfl-Cys-Prx および PfTPx-2 欠損原虫を作製している。

Pfl-Cys-Prx 欠損原虫の活性酸素種、活性窒素種に対する感受性を評価するために、40  $\mu$ M のパラコートまたは 20  $\mu$ M のニトロプルシドナトリウムを加え増殖率を観察している。また、食胞内におけるヘムの重合を阻害する抗マラリア薬であるクロロキンを各種濃度で培養中に加え、IC<sub>50</sub> 値を測定している。PfTPx-2 欠損原虫にはミトコンドリアの電子伝達系を阻害する抗マラリア薬であるアトバコンを各種濃度で培養中に加え、IC<sub>50</sub> 値を測定している。

分子シャペロン機能解析に関連して、PfTPx-1 欠損原虫株の高温条件 (40°C) 下での増殖率を観察している。組換え体 PfTPx-1 の分子シャペロン活性について検討するために、エノラーゼ活性の熱変性抑制を測定している。高温条件 (50°C) 下における組換え体 PfTPx-1 表面の構造変化についてタンパク表面疎水領域に結合するプローブである bis-ANS を用いて解析を行っている。原虫細胞内において PfTPx-1 が、高温ストレス (40°C、1 時間) によって多量体ポリマーを形成するののかについて、Native-PAGE-ウエスタンブロットによ

り解析している。一方、高温ストレス（40℃ 24時間）下に、PfTPx-1欠損原虫細胞内のアグリゲーションしたタンパクの蓄積量について、不溶性のタンパクを回収してSDS-PAGEによって検討している。

PfTPx-1欠損原虫株について、マイクロアレイ法を用いて厳密に同調した原虫の細胞周期を通じたトランスクリプトーム解析をおこない、野生株と比較することによってPfTPx-1が原虫細胞内において抗酸化因子以外の機能を果たす可能性について検討を行っている。

#### (結果)

本研究において、Pfl-Cys-Prx欠損株およびPfTPx-2欠損株を新たに樹立することに成功したが、解析した範囲においては野生株と異なる表現型を見出すことができなかったと述べている。

高温ストレス（40℃）下において、PfTPx-1欠損株は増殖率が低下し、高温感受性となっている可能性を見いだしている。PfTPx-1の分子シャペロン効果を評価するために、熱変性させたエノラーゼにPfTPx-1を加えると、加えなかった場合と比較して、エノラーゼ活性低下に関して有意な抑制を観察している。さらに、PfTPx-1欠損株では高温処理条件で細胞内の低分子（40 kDa以下）タンパク群の変性が増えている傾向を認めている。酵母の2-Cys型Prxは、高温ストレスによって高分子の複合体を形成し、この複合体ではペルオキシダーゼ活性よりもシャペロン活性の方が優位であることが報告されているが、原虫においては高温ストレス処理によるPfTPx-1の高分子量体へのフォームシフトを見いだしていない。一般的に分子シャペロンは高温処理によって表面疎水性が増大することが報告されているが、PfTPx-1は高温処理によって表面疎水性が低下することを見いだしている。

トランスクリプトーム解析により、PfTPx-1欠損株で発現が上昇するか、あるいは低下する遺伝子をそれぞれ49、108遺伝子見いだしている。発現が上昇する遺伝子には、DNA修復・複製、細胞周期制御、リン酸化反応、トランスポーター、脂質・脂肪酸代謝などに関わる遺伝子群が含まれており、発現が低下する遺伝子には、ガメトサイト期に発現するものが含まれていることを見いだしている。

#### (考察)

Pfl-Cys-Prx欠損株については、PfTPx-1欠損株とは異なり、活性酸素種感受性、活性窒素種感受性、高温感受性いずれにおいても親株との違いを見出せなかった結果について、細胞質に局在する2つのPrxであるPfTPx-1とPfl-Cys-Prxが細胞内において全く別の機能を担っている可能性を考察している。このことにより、PfTPx-1をマラリア治療の標的として考えた場合、Pfl-Cys-Prxによる機能相補を考慮する必要がないと考察している。

また本研究により、PfTPx-1は既に報告されている抗酸化因子としての機能に加え、作用機序については酵母の2-Cys型Prxとは異なる点が多いが、分子シャペロンとして機能することによって原虫の高温感受性に関わっている可能性を主張している。熱帯熱マラリアの患者が発熱を繰り返すことに鑑みて、PfTPx-1は原虫の生理にとって重要なタンパクであると結論づけている。PfTPx-1欠損株において発現の低下が認められたDNA修復・複製及び細胞周期制御、リン酸化、トランスポーター、脂質・脂肪酸代謝などに関わる遺伝子群は、抗酸化因子としてPfTPx-1の機能を相補するのではなく、PfTPx-1がシグナル伝達の調節因子として細胞内レドックス状態の変化に伴って発現が制御されている遺伝子群ではないかと推測している。一方、PfTPx-1欠損熱帯熱マラリア原虫において、ガメトサイト期特異的タンパク質をコードする遺伝子の発現が低下するという結果から、ガメトサイト形成には細胞内レドックス調節による発現制御が関与する可能性を示唆している。

## 審査の結果の要旨

本研究を要するに、PfTPx-1の原虫生理における重要性を示し分子機能の一端を明らかにし、PfTPx-1を

分子標的とした創薬は直接的な殺原虫には至らないものの、その効果は原虫の生命・生活環の維持に影響を与え、耐性原虫が出にくいことも期待される薬となることを示唆しており、他のマラリア制御法と併用することで今後のマラリア制圧に寄与できる可能性を見いだしており、価値ある研究と考えられる。

平成 25 年 1 月 17 日、博士（医学）学位論文審査専門委員会において審査委員全員出席のもとに最終試験を行い、論文について説明をもとめ、関連事項について質疑応答を行った結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。