

(第3号様式)

学位論文要旨

氏 名 Niwat Kangwanrangsarn

論 文 名 マラリア原虫オオキネート表面に発現する新規 CPW-WPC ファミ
リータンパク質の同定

学位論文要旨

【背景と目的】

マラリアコントロールの為の様々な政策にも関わらず、現在でも世界では年間70万人がマラリア感染によって死亡している。抗マラリア薬は複数開発されているものの、薬剤耐性原虫の出現などによりその効果は限定的である。一方で、赤血球感染ステージ原虫の複数の抗原を標的にしたワクチン開発が進められているが、感染流行地において十分な効果が認められるものは未だ見いだされていない。このような現状を踏まえて、近年、媒介蚊によるマラリア原虫の伝播を阻止しようとする「伝搬阻止法」の開発とそれによるマラリア撲滅の可能性に大きな期待が寄せられている。赤血球に寄生しているマラリア原虫は、蚊の吸血に伴い消化管の中に取り込まれると、その一部（雌雄の生殖母体）が雌雄の生殖体へと分化し、有性生殖を行った後、オオキネートと呼ばれる侵入型原虫へと分化し、消化管壁細胞を通り抜ける。これが、蚊によるマラリア原虫の伝播のなかで重要なステップである。そこで、蚊の消化管の中で、有性生殖あるいはオオキネートの形成・細胞侵入を阻止することで、マラリア原虫の伝播を抑制しようとするのが伝搬阻止法の考え方である。伝搬阻止ワクチン開発の為には、複数の候補抗原を見いだすことが必須であるが、これまでマラリア原虫の有性生殖期や蚊の体内での生物学的解析は大きく立ち後れていた。本論文は、オオキネート表面に発現する分子を同定することで、新規伝搬阻止ワクチン候補抗原を探索しようとするものである。

【結果及び考察】

有性生殖ステージで発現するタンパク質の多くが、翻訳抑制を受けることが報告されていることから、申請者らはDOZI (development of zygote inhibited)やCITH (homolog of worm CAR-I and fly Trailer Hitch)と呼ばれるリボ核タンパク質により発現調節を受けている分子

氏名 Niwat Kangwanrangsak

群に着目して検索を行い、117の遺伝子のうち7つがCPW-WPCと呼ばれる機能未知の繰り返しドメインを有するタンパク質のファミリーに属することを見いだした。これらの7つの分子は全て分泌シグナルを有し、また、ヒトやネズミの複数のマラリア原虫種、さらには近縁原虫種において幅広く保存されることが判明した。このうちの1つをCPW-WPC-1と名づけて解析を行った。

ネズミマラリア原虫(*Plasmodium yoelii* XNL)を用いて、CPW-WPC-1ファミリー分子の遺伝子発現とタンパク質発現の時期の解析を行った。コムギ胚芽無細胞タンパク質合成法を用いて組換えCPW-WPC-1を合成し、これを抗原としてマウスを免疫して特異抗体を作製した。ネズミマラリア原虫をICRマウスに感染させ、4日後に全採血したものをpH 8のオオキネート培地を用いて24℃で培養して、末梢血中の生殖母体を生殖体へと分化・受精させ、さらにオオキネートまで発育させた。これらのサンプルを経時的に採取して以下の解析に用いた。RT-PCRによる遺伝子発現時期の解析の結果、CPW-WPCファミリー分子は生殖母体・生殖体で強い遺伝子発現が見いだされたが、その後は虫体の発育に伴って発現は低下し、成熟オオキネートではほとんど検出されなくなった。また、特異抗体を用いたウェスタンブロット法により、PyCPW-WPC-1は融合体・オオキネートにおいてタンパク質の発現上昇が検出されたことから、翻訳調節を受けていることを明らかにした。特異抗体を用いた蛍光抗体法によって、PyCPW-WPC-1が接合体やオオキネートの表面に局在することが明らかとなった。以上のことから、PyCPW-WPC-1は接合体・オオキネートの表面に特異的に発現するタンパク質であることが示された。

次に、PyCPW-WPC-1の機能解析を行うために、相同組換え法により *pypcw-wpc-1* 遺伝子欠損マラリア原虫を作出した。欠損原虫を *in vitro* 培養したところ、正常な形態のオオキネートが野生型と同等の割合で得られた。さらに、遺伝子欠損原虫を感染させたネズミをマラリア媒介蚊 (*Anopheles stephensi*) に吸血させて、消化管外壁上に形成されるオオシストの数を計測することで、蚊の消化管への侵入能およびオオシストへの発育効率を評価したところ、これらは野生型とほぼ同等であった。すなわち、オオキネートの形成、蚊の消化管壁の侵入および通過、さらにオオシスト形成にはCPW-WPC-1は必須な分子でないことが判明した。他のCPW-WPCファミリー分子が機能を相補している可能性が考えられるので、今後は、他のメンバー分子の発現解析、およびダブルノックアウト原虫作出などによって、CPW-WPCファミリーの機能を明らかにして行くとともに、抗CPW-WPC-1抗体が伝播を阻止できるか否かの解析を行う。

【結語】

本研究により、媒介蚊の体内においてマラリア原虫の接合体およびオオキネートの表面に局在し、伝搬阻止ワクチン開発などに繋がることを期待される新規マラリア原虫分子を見いだした。

キーワード (3~5)	マラリア、伝搬阻止ワクチン開発、媒介蚊、オオキネート
-------------	----------------------------