

(第7号様式)

## 学位論文審査結果の要旨

氏名	Sirasate Bantuchai
審査委員	主査 日浅 陽一 副査 東山 繁樹 副査 山田 武司 副査 長谷川 均 副査 武森 信暁

論文名 マラリア原虫スポロゾイトのロプトリータンパク質 (RON11) は蚊唾液腺侵入および肝細胞侵入に重要な分子である

### 審査結果の要旨

#### 【背景と目的】

マラリア原虫の生活環のうち、標的細胞に寄生できるのはメロゾイトとスポロゾイトの2つの侵入型ステージである。そのなかでもスポロゾイトは蚊の唾液腺とヒトの肝細胞に侵入し、生活環を確立する。その侵入にかかわる分子の同定とその機序の解析は、マラリアの感染、伝播の機序、予防法の確立において重要な課題である。Bantuchai氏は、メロゾイトとスポロゾイトの両方の侵入型に共通する分子の侵入機序を解明することを目的として、両ステージで発現する侵入関連分泌型タンパク質の同定と、その機能解析を試みてきた。その過程において、メロゾイトが赤血球に浸入する上で重要と想定されるロプトリー蛋白質に注目し、スポロゾイトの宿主細胞侵入における意義について検討した。特にロプトリー蛋白質の一つで膜貫通ドメインとカルシウム結合モチーフを有する rhoptry neck protein 11 (RON11)に着目して本研究を行った。

#### 【方法と結果】

マウスに感染するマラリア原虫である *Plasmodium berghei* を用いて、その RON11 (PbRON11) について、まず特異抗体を作成した。その抗体を用いて Western blot をしたところ、蚊の中腸

から採取したスポロゾイトで、予想される 100kDa 付近にバンドが確認できた。また PbRON11 のマラリア原虫の生活環における発現プロファイルを調べ、赤血球ステージのシゾント期と、スポロゾイトにおいて発現することを見いだした。また、両方のステージで先端部小器官のロプトリーに PbRON11 が局在することを確認した。スポロゾイトにおける mRNA 発現はオオシスト時期に限定されており、スポロゾイトのロプトリー蛋白質群に特徴的な転写パターンを示した。

スポロゾイトにおける PbRON11 の役割を解析する為に、スポロゾイト特異的に PbRON11 発現を抑制する遺伝子改変原虫 (PbRON11-cKD) をプロモーター置換により作成した。この原虫を媒介蚊に感染させると、中腸に形成されるオオシスト内でスポロゾイトが正常に形成され、体腔液に放出されるものの、その後の唾液腺への侵入効率が極端に抑制された。これらのことから、PbRON11 はスポロゾイトが蚊の唾液腺に侵入することに必須の分子であることが示された。さらに、スポロゾイトを体腔から回収し、肝由来培養細胞株に添加したところ、侵入効率が遺伝子改変をしていないコントロール原虫の 1/100 以下であることが明らかとなった。また、体腔から回収したスポロゾイトの滑走運動能は、PbRON11-cKD でほとんど見られなかったことから、PbRON11 はスポロゾイトの接着あるいは運動能に必須であることが示唆された。以上より、PbRON11 が唾液腺や肝細胞への侵入に重要な役割を担うことが示された。

#### 【結語】

PbRON11 を低発現させたスポロゾイトにおいて、接着能、滑走運動能の低下が認められ、さらにマラリアを媒介する蚊の唾液腺および哺乳類宿主の最初の感染標的である肝臓への侵入の阻害が観察された。その結果、PbRON11 はマラリアの伝播に重要な役割を果たすことが明らかとなり、今後、感染予防および治療の標的となり得る可能性が示唆された。

本論文の公開審査会は平成 30 年 1 月 15 日に開催された。申請者は研究内容を明確に英語で発表し、以下の内容を含む多くの質疑に対する確に応答した。主な質疑の内容として、1) マラリア媒介蚊の唾液腺および哺乳類の肝臓への感染において、RON11 の結合パートナーは何か。スポロゾイトとメロゾイトにおけるロプトリー内の局在に差がある意義、RON11 の発現と感染種特異性への影響。2) RON タンパクには RON11 と同じような機能をもつ RON2,4,5 が存在するが、それらの役割の違いについて、Ca<sup>2+</sup>の結合活性は接着と侵入に必須か。N 末端の PEXEL モチーフの推測される機能。G-蛋白質の関与はあるのか。3) 遺伝子改変原虫に viability の変化はあったのか。感染力の低下は RON11 の発現低下のみが影響しているのか。遺伝子発現と蛋白質発現のプロファイリング解析はされているか。4) *in vitro*の実験においてなぜヒト肝癌細胞を用いるのか。5) 実験動物であるマウスと原虫および遺伝子改変原虫について、ヒトマラリアと同様の肝機能障害などの感染症状を来すのか。6) 今後の臨床応用の戦略をどう考えるか。治療標的やワクチンの候補蛋白質になるのか、などであった。

マラリア原虫のスポロゾイトの侵入における key molecule として RON11 を世界で初めて同定した本研究は評価される。今後の治療および予防の標的として利用される可能性があり、臨床的にも有用な研究と考えられる。審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを全員一致で確認し、本論文が博士(医学)の学位論文に値するものと結論した。