

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 森澤 亜希

---

熱帯熱マラリアはマラリア原虫 *Plasmodium falciparum* のヒト赤血球への感染によって起こる寄生虫性疾患で重篤な症状を併発する。その主要な原因の一つとして、感染赤血球(PRBC)に発現する抗原性蛋白・PfEMP-1 と宿主の血管内皮細胞上の分子との結合による血流阻害や組織機能障害が考えられる。

PfEMP-1 をコードしている *var* 遺伝子(*var*)はゲノム上では多数存在し赤血球初期ステージでは多数転写されるが、後期ステージでは1個に限定される。その *var* により翻訳され、PRBC 表面上に輸送された PfEMP-1 分子内の各ドメインと個々の受容体との結合性によって PRBC の接着性の有無や強弱が決定されるが、その多様性は後期ステージでの *var* の発現が1世代毎にランダムに変化する為に生じると考えられている。

本研究では周囲の環境の、*var* 発現に対する影響を明らかにすることを目的とし、第1章では複数のレセプターにおける *var* 発現への影響について調べた。CD36 や ICAM-1 など発現する為にヒト血管内皮の *in vitro* モデルである C32 細胞に対する接着性のあるマラリア原虫 ItG 株において、保存性の高い DBL- $\alpha$  ドメインに関して *var* の発現パターンを解析した。本研究で用いた ItG 株では優位に発現した *var* (*var*-1/ItG)とマイナーな *var* (*var*-2/ItG-*var*-5/ItG)が同定され、ItG 株の代表的な *var* として登録されているものは *var*-3/ItG と一致していた。優位な *var*-1/ItG による PfEMP-1 (PfEMP-1/ItG-1)が ItG 株の接着性を担っている可能性を調べる為、C32 細胞に接着した感染赤血球のみを回収して培養することで選択された、C32 接着性のより強い PRBC (ItG/C32)での PfEMP-1/ItG-1 の発現を、PfEMP-1/ItG-1 に特異的な抗血清を用いた蛍光抗体法で調べた。未処置の ItG 株と比較して ItG/C32 では PfEMP-1/ItG-1 を発現する PRBC が増加した。一方、PfEMP-1/ItG-1 を発現する PRBC を選抜した (ItG/8A)ところ、これら PRBC の C32 細胞及び CD36 単独発現細胞への接着性は、選抜前の PRBC と比較して増加していたが、C32 への接着能力は CD36 へのものより高かった。以上の結果、複数のレセプターが発現する細胞への接着は、単一レセプターに接着する PfEMP-1 と異なることが示唆された。

第2章では、患者体内の環境における発現する *var* を明らかにする目的で、

タイ由来熱帯熱マラリア患者分離株における C32 細胞, CD36, ICAM-1 発現細胞への接着性と発現する *var* について調べた. 分離株 TAb28, LEK, CD049 の各細胞への接着性について検討したところ, 3 検体いずれも全ての細胞に対して接着性を持っていた. またこれらの分離株で発現する *var* の同定を, 機能レベルでの保存性の高い DBL- $\alpha$  ドメインを用いて行ったところ, 全ての株から優位な発現をするものを含む複数の *var* が同定された. これらの塩基配列を比較すると, 株間で同じ *var* の発現は認められなかったが, アミノ酸配列で比較すると TAb28 と CD049 で一致するものが認められた. また, これらの分離株が CD36 及び ICAM-1 に結合することから, 接着の主要レセプターである CD36 や ICAM-1 に結合する部位に関してもアミノ酸レベルでの共通性が存在することで PRBC の接着性を保持している可能性が推測された.

第 3 章では, 優位に発現している *var* が異なっていながら ICAM-1 に対して接着性を持っているタイ由来分離株 CD049 と LEK の PfEMP-1 分子において, その ICAM-1 結合部位の保存性について検討した. ICAM-1 に対して接着性を持つ A4tres を基にして PfEMP-1 分子内の ICAM-1 結合部位の組換え蛋白質 rI<sub>57-380</sub> を合成し, これによる CD049 と LEK の PRBC との ICAM-1 接着競合を検討した. その結果, rI<sub>57-380</sub> を ICAM-1 発現細胞に前処理した場合, 未処置のものを比較して CD049 及び LEK 結合は同程度阻害された. また, PRBC を ICAM-1 発現細胞と結合させておき rI<sub>57-380</sub> を添加したところ, CD049 と LEK の PRBC いずれも解離したが程度に差が生じた. これらの結果, 異なる *var* にコードされた PfEMP-1 分子間においても, リガンド部位のアミノ酸配列や構造レベルでの類似性があることが示唆された. また, ICAM-1 結合部位のように塩基配列レベルでの保存性が低くクローニングが困難な部位であっても, 組換え蛋白質による接着競合を調べることで構造の類似性を検討する事が可能である事を示した.

このように本論文は, ランダムに発生すると考えられている *var* 発現のスイッチングを起こし異なる PfEMP-1 を発現する PRBC の中で, そのレセプターの数や種類, 感染などの周囲の環境より影響を受け, それに適応した多様性を生じさせている可能性を示し, また, 異なった *var* にコードされている PfEMP-1 分子でもアミノ酸レベルでは類似性がある可能性があり, 組換え蛋白質による接着競合について調べることで, 塩基配列では保存性の低いレセプター結合部位の構造上の類似性について検討できる可能性をも示したもので, 医学・生物学上貢献するところが少なくない. よって審査委員一同は, 本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた.