

論文の内容の要旨

Investigation of organelle interaction in *Plasmodium falciparum*

- In the case of mitochondria and apicoplast -

(熱帯熱マラリア原虫におけるオルガネラ相互作用についての研究

-ミトコンドリアとアピコプラストについて-)

指導教員 北 潔 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月 1 日進学

博士後期課程

国際保健学専攻

小林 環

マラリアは、現在最も深刻な被害を引き起こしている熱帯寄生虫症である。ヒトに感染するマラリアのうち、特に熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) は重篤な症状である脳マラリアを引き起こし、多数の死者を出す原因になっている。このように重大な被害を引き起こすマラリアの制圧は大きな問題に直面している。これまでに効果のあった抗マラリア薬および殺虫剤に対して耐性を持つマラリア原虫と媒介蚊が出現し、治療や駆虫を困難にしている。また、化学療法以外の手段として期待されるワクチンの開発には、まだ長い時間が必要とされている。このような状況下で、マラリアの制圧はますます難しいものとなっている。現在の状況を打開するためには、分子生物学的、生化学的な側面から *P. falciparum* の生物学的な特性を知ることが急務となっている。

これまでに、生化学的な解析やゲノムプロジェクトの完了などから、*P. falciparum* には宿主とは異なる代謝系が存在することが示されている。その中でも興味深いものは、ミトコンドリアと、アピコプラストと呼ばれるプラスチドである。ミトコンドリアやプラスチドは、細胞内共生の結果として獲得されたオルガネラと考えられるが、どちらのオルガネラもそのゲノムの大部分は核へ移行しており、オルガネラの維持には核にコードされているタンパク質が必須である。*P. falciparum* も例外ではなく、ミトコンドリアとアピコプラスト構成タンパク質の多くは核遺伝子にコードされている。最近、オルガネラへのタンパク質移行シグナルについての遺伝生化学的解析から、*P. falciparum* 代謝系におけるミトコンドリアとアピコプラストの生理的意義と機能分担が明らかにされつつある。その中でもヘム生合成系はユニークなものであり、これまでの

報告によると、*P. falciparum* ではミトコンドリアとアピコプラストという二つのオルガネラにまたがってヘム生合成は行われていることが示唆されている。

以上の結果から、*P. falciparum* のミトコンドリアとアピコプラストは、独立したオルガネラというよりは、お互いに相互作用するオルガネラユニットとして機能している可能性が示唆される。実際に電子顕微鏡では、両者が近接して局在している様子が観察されている。しかし、現在までに相互作用を直接示す研究報告はない。このように、*P. falciparum* におけるミトコンドリアとアピコプラストの相互作用とその生理的意義については、様々な方向からの研究が必要と考えられる。そこで本研究ではマラリア原虫のこの 2 つのオルガネラの相互作用とその性質を調べる目的で、オルガネラ分画法を検討し、さらにその結果をふまえてミトコンドリアとアピコプラストの相互作用について調べた。

まず、パーコール密度勾配遠心を用いて純度の高いミトコンドリアの精製を試みた。精製の指標としては、ミトコンドリア特異的なコハク酸脱水素酵素やジヒドロオロト酸脱水素酵素の酵素活性を用いた。興味深いことに、パーコール密度勾配遠心後のミトコンドリア画分には、アピコプラストに局在するタンパク質であるフェレドキシンも含まれることが、ウェスタンブロットティングの結果、確認された。ミトコンドリアとアピコプラストの密度が密度勾配遠心では分離できないほど類似している可能性も考えられるため、ミトコンドリア内で Green Fluorescent Protein (GFP) を発現する組み換え原虫を作成し、Fluorescent Activated Organelle Sorting を行った。得られた GFP(+)画分に対して、ミトコンドリア又はアピコプラスト特異的なプライマーセットを用いて PCR を行ったところ、双方のオルガネラの局在が確認された。この結果は、ミトコンドリアの GFP を指標にしたソート後もミトコンドリアとアピコプラストの相互作用が保たれていることを示すものである。

本研究では、ミトコンドリアの精製法の検討および、*P. falciparum* におけるオルガネラ間の相互作用、特にミトコンドリアとアピコプラストについて検討した。これまでにアピコプラストとミトコンドリアの相互作用を直接に示す報告はなかったが、本研究において、ミトコンドリアとアピコプラストは細胞内で近傍に局在するのみならず、実際に相互作用する事を強く示唆する実験結果を初めて得る事ができた。

今後、この系を用いて *P. falciparum* ミトコンドリアとアピコプラストの双方を視野にいたした生化学的解析が可能になり、今回の研究結果が *P. falciparum* という、人類の脅威であり、かつ非常に興味深い生物の代謝系の謎を解く一つの鍵になると期待される。