

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 小林 郷介

多くのアピコンプレクサ門原虫が家畜に病害をもたらすことが知られている（アイメリア原虫、イソスポラ原虫、トキソプラズマ原虫、サルコシスティス原虫、クリプトスポリジウム原虫、ロイコチトゾーン原虫、マラリア原虫、バベシア原虫、タイレリア原虫、ネオスポラ原虫など）。これらの原虫の増殖には「宿主細胞への侵入」が不可欠であり、これを阻害する薬剤の開発は原虫感染症の予防、治療において極めて有効と考えられる。しかしながら、これら原虫の侵入に関する研究は進んでおらず、薬剤開発に必要な情報は乏しい。一方で、ヒトに重篤な疾患を引き起こすマラリア原虫の侵入に関しては、他の原虫に比べ解析が進んでいる。したがって、侵入現象を理解することを目的として、マラリア原虫を用いた解析を試みた。

熱帯熱マラリア原虫の病原性や生存において赤血球侵入は不可欠であり、この過程は Duffy binding-like (DBL)ファミリーに属する原虫の分子などによって媒介される。このうち BAEBL と呼ばれる分子はメロゾイト侵入時に赤血球膜とのジャンクション形成に関わる分子とされ、現在までに glycophorin C がシアル酸依存型レセプターとして提唱されていた。しかしその後、シアル酸非依存型レセプターの存在も示唆されるようになり、本分子の赤血球結合様式に関して諸説入り乱れる状況であった。したがって、本研究は BAEBL のレセプターを探すことを目的として着手された。

第1章では熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* をモデルとして、他の原虫にも応用可能な「宿主細胞への侵入を解析する手法」の開発を目指した。レトロウイルスベクターを用いたレセプタースクリーニングはウイルス学などの分野ですでに応用されているが、細胞内寄生型原虫の宿主細胞レセプターのスクリーニングに応用する際には幾つかの難点がある。したがって、従来法を改良することで応用を試みた。その結果、BAEBL の結合因子としてヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) の一種を見出した。このことから本法によって、原虫の宿主細胞レセプターを効率的にスクリーニングできることが示された。

第2章では、BAEBL とヘパラン硫酸 (HS) の相互作用や、メロゾイトの赤血球侵入における血球表面 HS の重要性について詳細な解析を行った。その結果、BAEBL は赤血球表面

のシアル酸および HS 双方に結合するものの、シアル酸は結合に不可欠な因子であるのに対し、HS は結合効率にのみ影響を与えていることから、前者の重要性が示された。また、HS の類似化合物であるヘパリンを添加すると BAEBL の赤血球結合が阻害されることも明らかとなった。メロゾイト侵入においても、赤血球表面の HS が侵入効率に影響しており、ヘパリンの添加によって侵入が阻害されるなど、結合試験と酷似する結果を示した。さらに、BAEBL のアミノ酸配列中に予測された 5 か所のヘパリン結合モチーフのうち 2 か所が、赤血球結合において極めて重要な役割を担うことが、モチーフ欠損型 BAEBL を用いた解析により見出された。この結果は、同モチーフがシアル酸と HSPG の両者との結合に関わっている可能性や、ヘパリンがモチーフをブロックすることで BAEBL の赤血球結合阻害が起こる可能性などを示唆している。

第 3 章では、ヘパリンがメロゾイトの侵入を強力にブロックする点に着目し、ヘパリンによるメロゾイト侵入阻害メカニズムの解明を目指した。その結果、虫体由来の様々な分子がヘパリンと結合し、そのうち赤血球結合性分子のほとんどがヘパリンと結合する可能性が示された。また、メロゾイトの表面には、ヘパリンと結合する因子が存在することも示された。さらに、メロゾイト侵入に関わる 3 つの分子 EBA-175、BAEBL、EBL-1 の赤血球結合がヘパリンによって阻害されることも示した。これらの結果は、メロゾイト侵入を媒介する複数の経路が、ヘパリンにより同時に遮断されることで、侵入阻害が引き起こされる可能性を示唆しており、ヘパリンの構造を元にしたメロゾイト侵入阻害薬の開発へつながる成果と言える。

以上本論文は、様々な原虫に応用可能なレセプタースクリーニング系を確立し、熱帯熱マラリア原虫メロゾイトの赤血球侵入において、赤血球表面の HSPG が侵入効率に寄与することや、ヘパリンなどの糖類がメロゾイトの侵入阻害を引き起こすメカニズムの一端を明らかとしたもので、学術上獣医学のみならず、医学にも貢献することが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（獣医学）論文として価値あるものと認めた。