

## 審査の結果の要旨

氏名 原田 倫世

本研究はクリプトスポリジウム症に対する薬剤標的であるシアン耐性酸化酵素 (Alternative oxidase, AOX) の機能解析を目的として、その病原体 *Cryptosporidium parvum* AOXの局在が予測される縮退したミトコンドリア (マイトソーム) の調製法を検討し、AOXの局在・発現・活性について解析した。さらに、AOX特異的阻害剤アスコフラノン (AF) の誘導体を用いた構造活性相関解析を行い、下記の結果を得た。

1. 生化学的な解析に十分な研究試料を得るために、SCID マウスへのオーシストの感染時期や接種量の最適化を行った。その結果、5 週齢のマウスに  $1 \times 10^5$  オーシストを感染させた場合にマウス 20 匹の糞便から従来の 2 倍に相当する約  $2 \times 10^9$  個の原虫を得ることが可能となった。
2. *C. parvum* の細胞破碎法を検討し、*C. parvum* のマイトソームタンパク質である Hsp70 を指標にしてウエスタンブロットにより評価した。細胞をガラスビーズとペッスルで穏やかに破碎した時のみ、Hsp70 は  $5,000 \times g$  沈殿画分に多く観察されたことから、この  $5,000 \times g$  沈殿画分を *C. parvum* 粗マイトソーム画分とする調製法を確立した。
3. 未変性組換え *C. parvum* AOX を抗原とした抗体 (抗 A 抗体) を作製し、細胞分画後の標品を用いたウエスタンブロット解析を行った結果、28 kDa のタンパク質と反応し、この抗原は  $5,000 \times g$  沈殿画分に存在した。また、粗マイトソーム画分より AOX の活性を検出し (比活性; 50 nmol/min/mg)、この活性は AF により阻害された。以上の様に AOX が粗マイトソーム画分に存在することを同定した。
4. AF は芳香環とゲラニル構造を持つリンカー部位、フラノン環の 3 つの部分から構成されているが、構造活性相関解析からリンカー構造とフラノン環が必須ではなく、芳香環の構造が最も重要であることを示した。さらに AF の芳香環置換基の全て (ホルミル基・メチル基・クロロ基・水酸基) を持つことが望ましいが、特にクロロ基が必須であり、ホルミル基はアセチル基に置換可能であることを示した。

以上、本論文は *C. parvum* において AOX が粗マイトソーム画分に存在していることを明らかにし、AOX の阻害剤である AF の阻害に関わる構造を同定した。これらの結果はこれまで効果的な薬剤のなかったクリプトスポリジウム症に対して AF を新規薬剤とする上での基盤となる知見となるだけでなく、マイトソームに AOX が局在する生物として初めての実験的な報告である。基礎・臨床の両者に関わる重要な貢献となることから、学位の授与に値するものと考えられる。