

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 Mitochondrial genetics in the malarial parasites: Atovaquone-resistant *Plasmodium berghei* as a model.

アトバコン耐性 *Plasmodium berghei* をモデルとしたマラリア原虫ミトコンドリアの遺伝学

氏名 Josephine Elizabeth Siregar ジョセフィン エリザベス シレガー

世界人口のおよそ 40%がマラリアの危険に晒されており、その大半は最貧国に居住している。毎年 5 億人以上がマラリアによって重篤な症状を示し、数百万人が死亡している。病原体は *Plasmodium* 属の原虫であり、これに感染した蚊が吸血することで伝染する。ヒトのマラリアには 4 種、*Plasmodium falciparum*、*P. vivax*、*P. malariae*、*P. ovale* がありそれぞれ生活環の周期や転帰が異なっている。

過去数十年間でクロロキンやスルファドキシシン・ピリメタミン合剤といった抗マラリア薬への耐性が急速に広がり、これがマラリア治療に際しての大きな問題となっている。これまでとは異なる代謝経路を標的とする新規で安全で低価格な薬剤が求められている。新規の薬剤を開発するには、原虫の細胞レベルおよび生化学レベルでの生物学を正しく理解することが必要である。

アトバコンやドキシサイクリンのように、ミトコンドリア機能を標的とすることが示唆される抗マラリア薬が実際に使用されており、ミトコンドリアに対する阻害剤は新たな化学療法剤

として期待されている。しかしマラリア原虫のミトコンドリア生合成や機能の実態についてはまだほとんどわかっていない。

本論文ではげっ歯類に感染する *Plasmodium berghei* をモデルとし、アトバコン耐性についてマラリア原虫ミトコンドリアの遺伝学的解析を報告する。

1. *P. berghei* シトクロム *b* 遺伝子のキノン結合ドメイン 2 に存在するアトバコン耐性に関わる変異

アトバコンはナフトキノン誘導体であり、ミトコンドリア電子伝達系に関わる補酵素ユビキノンと構造が類似した、最近開発された抗マラリア薬である。クロロキン耐性の *P. falciparum* に対しても有効であり、プログアニルとの合剤 MalaroneTM の主要構成成分である。これまでアトバコン耐性に寄与する変異は *P. berghei*、*P. yoelii*、*P. falciparum*、*Pneumocystis carinii*、*Toxoplasma gondii* のミトコンドリア DNA にコードされているシトクロム *b* (*cytb*) 遺伝子に見出されている。マラリア原虫では 10 種類の変異 (M133I、L144S、I258M、F267I、Y268C/N/S、L271F/V、K272R、P275T、G280D、V284F) が報告されており、その大部分はキノン結合ドメイン 2(Qo₂)に存在している。

これまでに私は *P. berghei* で M133I と L144S の 2 つの変異を報告したが、これらはキノン結合ドメイン 1(Qo₁)に存在していた。この変異株作成においては生体内の *P. berghei* に対してアトバコンの投与量を徐々に増加することにより変異体を分離したが、今回は原虫に対し一定量の薬剤の負荷を時間をおいて繰り返した。これによって、さらに 4 つの新規な変異 (L271V、K272R、Y268C、Y268N) を得たが、今回はほとんどが Qo₂ ドメインの変異であった。今回の方法はマラリアの治療現場での状況により近く、この方法によって *P. falciparum* の臨床分離株に対応する Qo₂ 変異 (Y268S・Y268N・Y268C) を得たことは興味深い。

2. アトバコンが *P. berghei* のシトクロム *bc*₁ 複合体に作用する直接的証拠

アトバコンはシトクロム *bc*₁ 複合体の強力な特異的な阻害剤であり、その分子標的はシトクロム *bc*₁ 複合体のユビキノール酸化ポケット (Qo 部位) であることが知られている。この薬剤は

様々なアピコンプレックス門原虫に対し幅広く活性を示すが、マラリア原虫、トキソプラズマ、さらにはニューモシスチス、酵母などでシトクロム *b* 遺伝子の変異がアトバコン耐性に関与していることが示されてきた。しかしこれまで変異と耐性の関連を示す直接の証拠は得られていなかった。そこで、アトバコン耐性に関わる構造と機能の相関を明らかにするために *P. berghei* のアトバコン耐性株の生化学的解析を行った。

最近、私達の研究グループで確立したマラリア原虫ミトコンドリアの単離法を用いてミトコンドリアを調製し、様々な *P. berghei* アトバコン耐性株ならびに感受性株についてアトバコン濃度におけるシトクロム *bc*₁ の活性阻害を検討した。その結果、変異株のミトコンドリアは野生株 (0.327 nM) に比較して高い IC₅₀ (1.45-43.5 nM) を示し、シトクロム *b* 遺伝子の Q₀ site に変異が入ることで耐性を獲得する点を直接示すことができた。IC₅₀ は 268C および 268N 変異を持つクローンで最大となりおよそ 100 倍に増加していた。アトバコンがシトクロム *bc*₁ 複合体のみを特異的に阻害していることを確認するため、アトバコン存在下での DHOD 活性を独立に測定した結果 DHOD 活性は 100 μM までのアトバコンに対して影響を受けないことがわかり、アトバコンの標的がシトクロム *b* であることが明確になった。

3. シトクロム *b* 遺伝子へのアトバコン耐性変異が *P. berghei* の蚊ステージでの発生に与える影響

真核生物のミトコンドリア呼吸鎖は核 DNA とミトコンドリア DNA (mtDNA) という 2 つのゲノムに支配されている。マラリア原虫は 2 つの核外 DNA を持っており、その 1 つがミトコンドリア遺伝子 (シトクロム酸化酵素の 2 つのサブユニット、シトクロム *b* と断片的な rRNA 遺伝子) を持つ 6 kb の直鎖状繰り返し配列である。シトクロム *bc*₁ 複合体におけるアトバコンの作用機構が判明したので、次にアトバコン耐性がどのように遺伝するかを調べた。すなわち、原虫の集団中での抗マラリア薬耐性の出現と広がりを理解することを目的として、ミトコンドリア DNA にコードされているシトクロム *b* 遺伝子の細胞質遺伝について解析を行った。

アトバコン耐性株のガメトサイトと親株に由来するガメトサイトを試験管内で混合し蚊 (*Anopheles stephensi*) に吸血させることにより交雑させた。蚊の体中でランダムな受精が起き、そ

の結果生じるスポロゾイトをマウスに感染させて遺伝子型を決定した。シトクロム *b* 遺伝子の第 268 コドンに変異を持つ PbLSJ2.1 と野生型 PbEpyr-r との交雑では、野生型 PbEpyr-r の遺伝子型のみが得られた。第 271・272 コドンに変異を持つ PbLSJ3.1 と PbEpyr-r との交雑では双方の遺伝子型が得られる場合と野生型 PbEpyr-r の遺伝子型のみが得られる場合があった。マラリア原虫ミトコンドリアのシトクロム *b* 遺伝子は哺乳類同様に母性遺伝するが、PbLSJ2.1 と PbLSJ3.1 を母方とするものの割合が少なかった。以上の結果は野生型の PbEpyr-r 株のシトクロム *b* は、アトバコン耐性変異型に対して優性であることを示している。

この実験で得られるアトバコン耐性型がアトバコン感受性型よりも少ないことから、蚊の中での原虫の生活環の進行が阻害を受けていると考えられる。そこで親株を自家交雑させ、原虫の発育について、オーキネートから蚊の唾液腺中のスポロゾイトの形成まで観察した。アトバコン耐性株はオーキネート期まで発達するが、オーシストを形成せず、アトバコン耐性株ではオーシスト形成の過程に障害があることがわかった。一方、アトバコン感受性株は全てスポロゾイトまで進んだ。

以上、ミトコンドリア機能を阻害するアトバコンの標的はシトクロム *b* である点を、耐性株ミトコンドリアのシトクロム *bc*₁ 複合体の酵素活性が実際にアトバコン耐性に変化していることを直接示すことによって明らかにした。*P. berghei* のアトバコン耐性変異がシトクロム *b* 遺伝子に入ると、赤血球中での原虫の増殖を抑えるが、さらにこの変異が、媒介蚊の体内での有性生殖の時期においても、原虫の生活環の進行に障害を与えることを交雑実験により示した。つまりアトバコン耐性株ではシトクロム *b* 遺伝子の変異により野生型と比べて適応度が低下していることを示した。これは *P. falciparum* の臨床現場でのアトバコン耐性の出現および拡大の可能性が低いことを示唆する重要な結果である。