

審査の結果の要旨

氏名 ジョセフィン エリザベス シレガー

本研究は、薬剤耐性の広がりとなっているマラリア原虫について、その細胞レベルおよび生化学レベルでの理解を深めて新規薬剤開発に資するため、げっ歯類に感染するマラリア原虫 *Plasmodium berghei* をモデル系に用い、ミトコンドリアに対する阻害剤であるアトバコンへの耐性について遺伝学的解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 治療現場での状況に近い方法で薬剤負荷を繰り返し、*P. berghei* の新規アトバコン耐性株を 10 株樹立した。これらの株は、ミトコンドリア DNA にコードされているシトクロム *b* 遺伝子に、それぞれ Y268C、Y268N、L271V+K272R のいずれかの変異を持っていた。これらの変異はシトクロム *b* のキノン結合部位に存在しており、とくに Y268C と Y268N はヒトの熱帯熱マラリア原虫 *P. falciparum* のアトバコン耐性臨床分離株に対応する変異であった。
2. *P. berghei* のアトバコン耐性株ならびに感受性株からミトコンドリアを調製し、アトバコン濃度によるシトクロム *bc*<sub>1</sub> の活性阻害を検討したところ、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 IC<sub>50</sub> (1.45-43.5 nM) を示した。とくに Y268C および Y268N 変異を持つ株で最大となりおよそ 100 倍に増加していた。このことから、シトクロム *b* 遺伝子のキノン結合部位に変異が入ることで耐性が獲得されるということが直接的に示された。またアトバコン存在下での DHOD 活性を独立に測定したところ、DHOD 活性は 100 μM までのアトバコンに対して影響を受けなかったことから、アトバコンがシトクロム *bc*<sub>1</sub> 複合体のみを特異的に阻害していることが示された。
3. ミトコンドリア DNA 上のシトクロム *b* 遺伝子に Y268C 変異を持つアトバコン耐性株 PbLSJ2.1 と、核ゲノム上の DHFR 遺伝子に S110N 変異を持つピリメタミン耐性株 PbEpyr-r に由来するガメトサイトを、試験管内で混合して蚊 (*Anopheles stephensi*) に吸血させることにより交雑させ、その結果生じるスポロゾイトをマウスに感染させたのち両遺伝子の遺伝子型

を決定した。得られたシトクロム *b* 遺伝子がすべて野生型であったことから、アトバコン耐性変異をもつシトクロム *b* 遺伝子は次世代へ受け継がれないことが示された。そこで親株を自家交雑させ、原虫の発育をオーキネートから蚊の唾液腺中のスポロゾイトまで観察した結果、アトバコン耐性株はオーシスト形成の過程に障害があることが示された。

以上、本論文は *P. berghei* のアトバコン耐性株を用いた生化学的・遺伝学的解析から、アトバコンの標的がシトクロム *b* であることを直接示し、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明らかにした。これは臨床現場においてアトバコン耐性の出現・拡大の頻度が低いことをよく説明しており、今後耐性が出現しにくい抗マalaria薬開発の可能性を示唆する重要な結果であると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。