

審査の結果の要旨

氏名 畑 昌 幸

本研究では、熱帯熱マラリア原虫のミトコンドリアおよびアピコプラストの生化学的解析に用いることが可能な試料の調製法を改良し、さらにその過程でオルガネラ間相互作用についての情報を得ることを目的として、 N_2 -cavitation 法および Percoll 密度勾配遠心分離法の条件検討を行った。また実際に得られたミトコンドリア画分を用いて、熱帯熱マラリア原虫ミトコンドリアの呼吸鎖複合体 II (コハク酸-キノン還元酵素 : SQR) について生化学的解析を行った。それにより、以下のような結果を得た。

1. 2001 年に高島らによって報告された N_2 -cavitation 法によるマラリア原虫の細胞破碎の条件検討を行った結果、高い酵素活性を持つミトコンドリアを回収率良く調製する方法を確立した。すなわち 360 ml の熱帯熱マラリア原虫の培養から、タンパク質で 2.5 mg、SQR (コハク酸-キノン還元酵素)、DHOD (ジヒドロオロト酸脱水素酵素) 活性で高島らの約 7 倍の量の粗ミトコンドリア画分を回収できた。これにより、熱帯熱マラリア原虫のミトコンドリアに対して、より信頼性の高い生化学的な解析が可能となった。
2. 得られた熱帯熱マラリア原虫粗ミトコンドリア画分の呼吸鎖複合体 II の酵素学的解析により、その酵素学的性質を明らかにした。また呼吸鎖複合体 II のユビキノン-2 (UQ₂) に対する親和性が、培地の組成によって変化することを見出した。
3. Percoll 密度勾配遠心分離法の最適化を行い、純度の高いミトコンドリア画分を得る条件を検討した。ウェスタンブロット解析、PCR によるオルガネラ DNA の検出、DHOD 活性の測定、蛍光を持つタンパク質を発現しているオルガネラの観察を行い、ミトコンドリア、アピコプラスト、食胞がそれぞれ異なる画分に分離され、それぞれを主に含む画分を調製する方法を確立できた。これまで分離は不可能とされてきたマラリア原虫のミトコンドリアとアピコプラストを分離した初めての報告である。純度の高いミトコンドリア画分では DHOD 比活性が粗ミトコンドリア画分の約 4 倍に上昇し、ヘムの代謝産物であるヘモゾインの混入も検出限界以下になった。このミトコンドリア画分を用いることにより、それぞれのオルガネラの性質の詳細な解析が可能となった。
4. 実際に、Percoll による分離後の画分を用いて呼吸鎖複合体 II のネイティブ

電気泳動による精製と活性染色を行い、酵素のバンドを検出することが出来た。

以上、本研究によりこれまで生化学的な解析が困難であったマラリア原虫のミトコンドリアおよびアピコプラストについて、さらなる生化学的、分子生物学的な解析が可能となるサンプルの調製方法を確立し、実際に呼吸鎖複合体IIの生化学的解析を行うことが可能であることを示した。本研究により確立されたミトコンドリア調製法により得られた画分で、さらに詳細な酵素学的解析や、ミトコンドリア酵素に対する阻害剤試験などが可能となり、また、分離されたミトコンドリアやアピコプラストを用いて酵素の局在やオルガネラ核様体の解析など、オルガネラ自体の機能解析も可能となった。本研究により、他の生物と大きく異なるマラリア原虫オルガネラの性質を明らかにし、薬剤標的としての解析につなげることが可能となったと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。