

審査の結果の要旨

氏名 日野明紀菜

本研究は、マラリア原虫の生活環におけるエネルギー代謝変動についての新たな知見を得るため、マウスマラリア原虫 *Plasmodium berghei* ミトコンドリア複合体 II (コハク酸-ユビキノン酸化還元酵素: succinate-ubiquinone reductase: SQR) Fp サブユニット遺伝子 (*Pbsdha*) の遺伝子破壊株の作成およびその表現型解析を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. *Pbsdha* 遺伝子の発現解析を行うにあたり、*Pbsdha* 遺伝子プロモーター制御下で AGFP を発現する原虫 (*Pbsdha::AGFP*) を作製した。*Pbsdha::AGFP* 原虫の蛍光顕微鏡下での観察の結果、ミトコンドリアのマーカである MitoTracker と共局在する AGFP シグナルを検出した。このことから、AGFP がミトコンドリアで発現していることが示された。さらに、この AGFP シグナルはリング期を除く全ての赤血球内ステージおよび蚊ステージにおいて発現が観察された。なお、リング期原虫はミトコンドリアが非常に小さいことが知られており、AGFP の発現も検出限界以下であったと考えられる。以上の結果から、マラリア原虫生活環の全てにおいて *Pbsdha* 遺伝子が発現していることが示された。
2. 置換型二重交差相同組換えによる *Pbsdha* 遺伝子の遺伝子破壊株を作製した。5' UTR 部位と 3' UTR 部位による相同組み換えにより、*Pbsdha* 遺伝子と薬剤耐性マーカ遺伝子である *Toxoplasma gondii* ジヒドロ葉酸脱水素酵素 (*TgDHFR*) 遺伝子との置換を行った。
3. *Pbsdha*(-)原虫において遺伝子置換が起こっていることを確認するため、サザンブロットおよび PCR を行い、目的部位での遺伝子置換が起こっていることを確認した。さらにウェスタンブロットにより、*Pbsdha*(-)原虫において Fp ペプチドが存在しないこと、活性測定により SQR 活性が消失していることを確認した。
4. マラリア原虫生活環に沿って、マウス体内の赤血球内ステージ、ガメトサ

イト、蚊体内のガメート、オーキネート、オーシスト、さらにその後の蚊からマウスへの原虫の伝播における表現型解析を行った。その結果、赤血球内ステージでは遺伝子破壊を行なった *Pbsdha*(-)原虫は野生型と同様に増殖した。一方、*Pbsdha*(-)原虫は蚊ステージにおいて野生型と大きく異なる表現型を示した。*Pbsdha*(-)原虫は、蚊中腸内におけるオーキネート形成数が野生型に比較して1/5に減少しており、さらに、オーシストを全く形成しなかった。以降のステージの観察の結果、*Pbsdha*(-)原虫は新規感染が観察されなかった。

以上、本論文はマラリア原虫ミトコンドリア複合体 II が蚊ステージオーキネートからオーシストの形成にかけて重要な機能を持っていることを明らかにした。この結果は、生活環におけるエネルギー代謝の変動というマラリア原虫の生物学的にも興味深い結果を示しただけでなく、複合体 II が新規な伝播阻止型薬剤の標的となりうることを示しており、今後のマラリア制圧対策に大きく貢献すると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。