

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 杉 達紀

Toxoplasma gondii (以下トキソプラズマ)は、トキソプラズマ症を引き起こす病原体である。本原虫はアピコンプレクサ門に属する原虫で、同門に属するマラリア原虫やクリプトスポリジウム、ネオスポラなどの病原原虫と近縁である。これらの原虫では、市販されている有効なワクチンが存在しない。薬剤による治療には、耐性原虫や副作用といった問題がある。本研究では、抗原虫作用を持つ薬剤の標的候補および、薬剤耐性に関わる機序について着目し、トキソプラズマが持つプロテインキナーゼが原虫の生存に果たす役割について解析を行った。

トキソプラズマのプロテインキナーゼが原虫の増殖や細胞の分化に関わることは、従来の阻害剤を利用した研究により証明されている。しかし、個別のプロテインキナーゼがどのような細胞機能を果たし、抗原虫薬剤の標的となりうるのかについては、未解明なところが多い。

第一章、第二章では、プロテインキナーゼの細胞内機能解析の手段として ASKA-GI (Analog sensitive kinase allele based-gene inhibition) をトキソプラズマでのプロテインキナーゼ解析に応用した。その結果として、*T. gondii* Calcium dependent protein kinase 1 (TgCDPK1) が原虫の侵入、ひいては効率的な原虫の増殖における重要な役割を果たすことを明らかにした。また、TgCDPK1 を主標的とする阻害剤である 1NM-PP1 が特異的な抗トキソプラズマ活性を示すことを明らかにした。第二章においては ASKA-GI が *in vivo* のマウス感染モデルにおいても適用可能であることを検証した。

ASKA-GI のトキソプラズマへの応用を検討する中で、1NM-PP1 を含む「こぶつきキナーゼ阻害剤」(analog sensitive kinase allele を選択的に阻害する低分子化合物) に感受性のプロテインキナーゼがトキソプラズマのゲノムに非常に多くコードされていることを発見した。これは哺乳類ゲノムにはない特徴である。「こぶつきキナーゼ阻害剤」がトキソプラズマに特異的な薬剤クラスと考えられることから、このクラスのさらなる薬剤妥当性を検討するため、原虫による薬剤耐性の獲得について解析した。第三章においては、化学無作為変異で得られた原虫ライブラリの中から薬剤耐性原虫を選択し、原因変異点として TgMAPK1 遺伝子内のアミノ酸置換を同定した。

トキソプラズマへの対策が困難である理由の一つとして、トキソプラズマによる潜伏感染が挙げられる。潜伏感染状態のトキソプラズマは環境抵抗性のシスト壁に包まれ、薬剤による排除を受けない。また、食肉生産家畜において潜伏感染が成立することで、食肉中に含まれるシストが感染源として問題となる。トキソプラズマのプロテインキナーゼの中で MAPK ファミリーは潜

伏感染への移行を司ることが示唆されているが、先行の研究では潜伏感染を引き起こす標的の具体的な遺伝子は未解明であった。第四章において、第三章で同定された TgMAPK1 に変異を持つ原虫を用いて、TgMAPK1 の原虫における役割について詳細な解析を行った。1NM-PP1 は親株のトキソプラズマには、潜伏感染状態への細胞分化を誘導したが、TgMAPK1 に耐性型の変異が導入されることで分化誘導が起こらなくなった。TgMAPK1 の機能阻害がどのようにして分化誘導につながるかを明らかにするため、トキソプラズマの増殖における TgMAPK1 の機能を解析した。その結果、細胞の分裂速度の維持に TgMAPK1 が役割を果たしていることが明らかになった。

本論文において、筆者はトキソプラズマのプロテインキナーゼの原虫の増殖および細胞分化における役割について、その機能と薬剤標的としての妥当性の両面において解析を試みた。今回トキソプラズマに適用可能であることを示した ASKA-GI は、トキソプラズマが持つプロテインキナーゼの解析において強力な力を発揮する道具となる。また、こぶつきキナーゼ阻害剤は抗トキソプラズマ薬の有効な候補低分子クラスとして有望である。本論文で明らかになった細胞分化における TgMAPK1 の機能は、トキソプラズマの「速い増殖と潜伏を切り替える」という寄生戦略に迫る足掛かりになる。また、トキソプラズマの潜伏感染状態を標的とする薬剤開発の標的候補分子を提供することが期待される。

以上のように、本研究はトキソプラズマの新規な薬剤標的候補分子の探索に着目しながら、病原体の生態を明らかにするための解析法を新たに構築し、それをもってトキソプラズマ特有の潜伏感染を引き起こす機構を明らかにすることに成功しており、生物学としての学術上および薬剤開発という社会意義について貢献が大きい。よって審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値のあるものと認めた。