

審査の結果の要旨

氏名 大原 聡

本研究は、寄生性線虫である *Ascaris suum* の低酸素適応機構を明らかにするため、同じ線虫類で実験動物である *Caenorhabditis elegans* を用い解析をおこなったものであり、以下の結果を得ている。

C. elegans における *A. suum* 成虫型複合体Ⅱの発現

A. suum は好氣的環境である外界で発育する受精卵から第3期幼虫(L3)までは好氣的代謝をおこなっており、低酸素環境である宿主小腸内に寄生する成虫は嫌氣的な代謝である PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase) -コハク酸経路によりエネルギー転換反応をおこなっている。この嫌氣的代謝への転換は、宿主への寄生を成立させる重要な低酸素適応機構の一部であると考えられる。

複合体Ⅱはこの嫌氣的代謝経路の最終反応触媒酵素であるが、通常の好氣的代謝の際の複合体Ⅱがコハク酸-キノン酸化還元酵素(SQR)として機能するのに対し、PEPCK-コハク酸経路では逆反応を触媒するキノール-フマル酸酸化還元酵素(QFR)として機能している。私たちの研究グループは、この機能転換が、複合体Ⅱを構成する4つのサブユニットのうち2つが成虫と幼虫で異なったアイソフォームの発現に起因することを報告している。このような複合体Ⅱの部分的なサブユニットの発現転換による機能転換は、*A. suum* において初めて見出された現象であり、非常に興味深い。

A. suum の複合体Ⅱの研究の方向性として、低酸素での成虫型複合体Ⅱの生物学的意義の実験的な証明と、生化学的特性の解明の2つが考えられる。そこで本研究では、生物学的意義の証明を目的として、*C. elegans* での組み換えタンパク質としての発現を試みた。*C.*

C. elegans は、QFR 型の複合体 II を持たないため、*A. suum* 成虫型複合体 II が低酸素適応に寄与しているならば、本酵素を発現した *C. elegans* は低酸素に対する感受性が変化することが期待できる。

まず、*A. suum* の成虫型複合体 II の 4 つのサブユニットを発現するプラスミドベクターをそれぞれ構築した。そしてマイクロインジェクションにより、これら全てのプラスミドベクターが導入された *C. elegans* 株を得た。さらに、紫外線照射によりこれらのプラスミドベクターが、染色体内に組み込まれた株を得た。この株では、翻訳された各サブユニットがミトコンドリアに局在し、成虫型複合体 II の活性であるフマル酸還元酵素活性が野生株と比較して 4 倍に上昇していた。また、*C. elegans* の Ip サブユニット欠損株に *A. suum* 成虫型複合体 II を同様の手法で発現させたところ、表現型が相補された。これら一連の結果から、*A. suum* 成虫型複合体 II が *C. elegans* 内で活性を維持した状態で発現していることが示された。ミトコンドリア複合体 II の外来遺伝子としての発現は、大腸菌など他の発現系でもまだ成功しておらず、今回が初めてである。現在、*A. suum* 成虫型複合体 II 発現株の表現型の解析をおこなっており、今後、成虫型複合体 II の生物学的意義が明らかになると考えられる。また、これら一連の実験を通して、*C. elegans* が寄生性線虫の遺伝子を発現させる系として有用であることが示された。

マイクロアレイを用いた *C. elegans* と *A. suum* の低酸素応答遺伝子の比較

低酸素条件下では、酸化的リン酸化による ATP 産生の低下のみならず、酸素不足に付随する様々な変化が生じ、寄生性線虫はそれぞれの変化に対して適応機能を獲得していると考えられる。しかしながら、*A. suum* においては、今までの手法で低酸素適応の全体像を明確にすることは困難である。一方、*C. elegans* において、低酸素応答に重要な働きをする転写因子である HIF(hypoxia inducing factor)が存在することが近年明らかになり、この自由生活性の線虫が低酸素適応能を維持していることが示された。*A. suum* の嫌氣的代謝に関わる

酵素の一部は宿主内に侵入する直前の L3 において活性が上昇することから、*A. suum* の低酸素適応の一部は発生段階に依存すると考えられている。しかしながら、現段階では *C. elegans* と *A. suum* の低酸素適応機構が共通しているかどうかは不明である。この両者の低酸素適応の相違を明らかにすることは、今後寄生性線虫の低酸素適応の解析を進める上で非常に重要であると考えられる。そこで本研究では、マイクロアレイにより、*C. elegans* における低酸素応答遺伝子を網羅的に明らかにし、それらの *A. suum* におけるホモログの発現を好氣的な L3 および低酸素環境に生育する成虫で比較した。

本研究により、*C. elegans* が解糖系の遺伝子などをはじめ、多様な遺伝子が低酸素応答に働いていることが示された。また、*A. suum* との比較から、両者の低酸素関連遺伝子の一部は重複しているものの、必ずしも一致していないことが示された。これは、今後 *C. elegans* をモデルとして、寄生性線虫の研究を進める際に重要な知見となった。

以上、本論文は直接的な解析が困難である寄生性線虫 *A. suum* の解析をおこなう際に、*C. elegans* を用いることで、組み換えたんぱく質を用いた解析およびゲノムワイドでの低酸素適応関連遺伝子の解析をおこなうことができることを示した。本研究を通じ、寄生性線虫の低酸素適応の解明が進むと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。