

## 論文の内容の要旨

論文題目 Study on the regulation of the metabolic transition in the parasitic nematode *Ascaris suum*

和訳 寄生性線虫 *Ascaris suum* における代謝変換調節機構に関する研究

指導教員 北 潔 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 19 年 4 月進学

博士後期課程

国際保健学専攻

後藤 美穂

寄生性線虫である回虫 (*Ascaris suum*) は虫体が大きく、また入手が比較的容易であることから代謝や生理の生化学的解析に適したモデルとして古くから用いられてきた。私達の研究グループは特に、回虫に見られる独特な代謝変換を寄生における適応戦略の一側面と捉え、その生化学的解析を進めてきた。

回虫の受精卵は脊椎動物宿主の糞便とともに外界に排出され、通常酸素分圧下、約 3 週間で感染性の第三期幼虫 (L3) となる。この幼虫期には哺乳類と同様に酸素を最終電子受容体として酸化リン酸化により ATP を合成する。一方、成虫が生息する宿主小腸は酸素分圧が 5% 以下という低酸素環境であり、この成虫期には酸素を利用しない独特な糖分解経路である PEPCK (ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ)-コハク酸経路が誘導され、低酸素環境下でも ATP を合成することができる。この経路の最終反応段階であるコハク酸の生成には成虫ミトコンドリアに特有な嫌氣的電子伝達系である NADH-フマル酸還元系が関与している。さらに、この系の構成要素である呼吸鎖複合体 II にはコハク酸 - ユビキノン還元酵素として機能する幼虫型とその逆反応を触媒するキノール - フマル酸還元酵素として機能する成虫型が存在する。これらの呼吸鎖複合体 II サブユニット遺伝子の発現は生育段階特異的に転写レベルで制御されていることが明らかとなっている。しかしながら、その発現を制御する因子や調節機構に関しては研究がなく、未だ解

明されていない。

哺乳類をはじめとした脊椎動物では低酸素誘導転写因子 hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) が低酸素応答の中心的な役割を担うことが知られている。HIF-1 は HIF-1 $\alpha$  および HIF-1 $\beta$  サブユニットからなるヘテロ二量体を形成し機能するが、通常酸素分圧下では細胞質に存在する HIF-1 $\alpha$  中の特定のプロリン残基がプロリン水酸化酵素 PHD により水酸化され、von Hippel-Lindau tumor suppressor protein (pVHL) によりポリユビキチン化された後、プロテアソームによる分解を受ける。一方、低酸素分圧下では HIF-1 $\alpha$  のプロリン残基の水酸化とそれに伴う分解は阻害され、核内に移行した HIF-1 $\alpha$  は HIF-1 $\beta$  と二量体を形成する。これが DNA に結合し、哺乳類などでは血管内皮増殖因子や造血因子、解糖系諸酵素など低酸素適応に関与する標的遺伝子の発現を活性化することが知られている。

一方、無脊椎動物における HIF-1 の研究から、線形動物からヒトにいたるまで多細胞生物に広く保存されている HIF-1 経路の普遍性と同時にその標的遺伝子の多様性が明らかとなってきた。哺乳類と昆虫などの無脊椎動物では呼吸系や循環系が形態学的に大きく異なるのに対し、HIF-1 という共通の分子を用いて類似の低酸素応答を誘導しているという点は興味深い。さらに、HIF-1 とミトコンドリア呼吸鎖の機能的な相互作用に関する報告も増えてきている。このような背景から、回虫の HIF-1 と代謝変換との間に何らかの関連があるのではないかと考え、その解明のための第一歩として回虫 HIF-1 のクローニングとその解析を行った。

自由生活性線虫 *Caenorhabditis elegans* の配列を query とした BLAST 検索の結果得られた、線形動物 (*Brugia malayi*, *Strongyloides ratti*, *Ancylostoma caninum*) の *hif-1* のアミノ酸配列と塩基配列をもとに縮重プライマーを設計し、RT-PCR 法により回虫 *hif-1 $\alpha$*  および *hif-1 $\beta$*  cDNA を得た。これは寄生性生物において初めての全長 *hif-1* cDNA のクローニングの報告である。得られた回虫 HIF-1 $\alpha$  と HIF-1 $\beta$  のアミノ酸配列は、N 末端側の DNA への結合に必要な bHLH ドメインおよび二量体形成に必要な PAS ドメインにおいて他生物種との高い相同性を示したが、いずれも PAS ドメインよりも C 末端側の配列は他生物種とは異なる特徴を有していた。HIF-1 $\beta$  では C 末端の配列が他生物種のものよりも 250 アミノ酸程度短く、転写活性化ドメインを欠くことがわかった。また、HIF-1 $\alpha$  の PAS ドメイン以降の配列では他生物種との相同性がほとんど見られず、哺乳類において

その活性化に必須とされている転写活性化ドメインは見出されなかった。このような C 末端の特徴的な配列は HIF-1 の転写活性化機構や標的遺伝子との相互作用が他生物種とは異なる可能性を示唆している。一方、酸素濃度依存的にプロリン水酸化酵素により修飾を受ける際に必要な LXXLAP モチーフは HIF-1 $\alpha$  中に保存されていた。さらに、組み換え HIF-1 $\alpha$  および HIF-1 $\beta$  の発現系を構築し、酵母ツーハイブリッド法および免疫沈降法により回虫の HIF-1 $\alpha$  と HIF-1 $\beta$  が相互作用することを確認した。これらのことから、回虫においても HIF-1 の基本的な機能は保存されていることが示された。また、受精卵および通常酸素条件下で発生した感染幼虫包蔵卵中の L3、低酸素条件下に生息する成虫の各段階における *hif-1* mRNA の発現量を解析した結果、大きな発現量の変動を示した。*hif-1 $\alpha$*  および *hif-1 $\beta$*  はいずれも L3 において最も発現量が多く、その値はそれぞれ成虫の 8 倍と 6 倍程度であった。一般に HIF-1 の安定性および活性は翻訳後修飾により制御されていると考えられており、回虫に見られるような生活環における *hif-1* mRNA 発現量の変動は自由生活性の他生物種においては例がない。回虫では通常酸素環境下に生息する L3 の時期に発現量を多く保つことにより寄生生活へと移行した際に直面する低酸素環境への効率的な適応を可能としていると考えられる。

さらに、呼吸鎖複合体 II の各サブユニット遺伝子が HIF-1 の直接的な標的であるかどうかを検討するために、各遺伝子の転写開始点の上流領域の塩基配列を解析した。その結果、全ての遺伝子上流に HIF-1 の結合配列の候補が存在した。今後、ゲルシフトアッセイにより HIF-1 とこれらの候補配列との結合を確認する予定である。

以上、回虫の代謝変換機構について低酸素適応という側面から解析を試みてきたが、実際には酸素濃度変化が代謝変換の直接的な原因であるかどうかは未だ明らかではない。*in vitro* 培養の観察から、回虫の成虫は低酸素環境に適応するばかりでなく通常酸素環境下においても酸素による重大な障害を示すことなく数週間以上生存することが可能である。この際には成虫は代謝経路を好氣的なものに変化させているのだろうか？もし成虫が外部酸素環境に応じて代謝変換を行うのであれば、これは幼虫と成虫の代謝変換を理解する上で、酸素の直接的な影響をより単純化してとらえるためのモデルとなることが期待される。そこで、本研究では *in vitro* 培養系を用いて成虫を通常酸素あるいは低酸素に 16 時間または 5 日間曝露し、代謝変換が起こるかどうかを complex

II サブユニット遺伝子の発現およびミトコンドリア呼吸酵素の活性により評価した。さらに幼虫と成虫の間に発現量の差が見られた *hif-1* 遺伝子についても比較を行った。通常酸素曝露群、低酸素曝露群において計 8 種類の遺伝子の発現量を比較したが、いずれにおいても顕著な変化は見られなかった。また、酵素活性の点からも両者に有意な差は見られず、嫌気的な活性を示した。この結果から、成虫は外部酸素環境の変化に依らず嫌気的な代謝経路である NADH-フマル酸還元系を維持していると考えられる。幼虫から成虫への移行の際に見られる代謝変換を伴う低酸素適応と成虫の外部酸素環境への適応とは異なった機構により制御されていることが示唆された。

回虫の成虫に見られる嫌気的な代謝経路は、蠕虫を含む低酸素に耐性をもつ生物の一部にも共通に見られる。しかしながら、これらの生物に関する研究はゲノム情報の不足や分子生物学的および遺伝学的な手法の困難さから遅れており、代謝変換を支える分子基盤についての知見は非常に限られたものとなっている。本研究から、自由生活性生物とは異なった回虫の酸素適応機構の存在が示されたが、今後、さらなる解析を行うことにより寄生戦略としての代謝変換における酸素適応機構の解明、また、蠕虫の代謝変換を標的とした新たな創薬の可能性などが期待される。