

審査の結果の要旨

氏名 後藤 美穂

本研究は寄生性線虫である回虫 (*Ascaris suum*) に見られる代謝変換の調節機構の解明を目的として、酸素適応という観点からのアプローチを行った。まず、低酸素誘導転写因子 HIF-1 に注目し、回虫におけるホモログ cDNA のクローニングとその機能解析を行った。また、代謝変換に対する酸素の直接的な影響を評価した。得られた結果は下記のとおりである。

1. 縮重プライマーを用いた RT-PCR 法により回虫 *hif-1α* および *hif-1β* cDNA をクローニングした。得られた回虫 HIF-1 α と HIF-1 β 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 ドメインにおいて既知の生物種との高い保存性を示した。また、HIF-1 α 中には酸素濃度依存的なプロリン残基の水酸化に必要な LXXLAP モチーフが保存されていた。一方、いずれも PAS ドメイン以降の配列は他生物種とは異なる特徴を有していた。HIF-1 α の C 末端には哺乳類においてその活性化に必要とされている転写活性化ドメインは見出されなかった。また、HIF-1 β は C 末端の配列が脊椎動物のものよりも 250 アミノ酸程度短く転写活性化ドメインを欠いていた。このような C 末端の特徴的な配列は回虫 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している。
2. 組み換え HIF-1 α および HIF-1 β の発現系を構築し、酵母ツーハイブリッド法により回虫の HIF-1 α と HIF-1 β が相互作用することを確認した。このことから、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。
3. 回虫の受精卵および通常酸素条件下で発生した 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 real-time PCR により解析した。*hif-1α* および *hif-1β* はいずれも L3 において最も発現量が多く、それぞれ成虫の 8 倍と 6 倍程度であった。このような生活環における *hif-1* mRNA 発現量の大きな変動は自由生活性の生物種においては報告がなく、回虫では寄生に伴う低酸素環境への適応に深く関与していると考えられる。
4. 呼吸鎖複合体 II の各サブユニット遺伝子の転写開始点の上流領域の塩基配列を解析したところ、全ての遺伝子上流に HIF-1 の結合配列の候補が存在した。この様に、各サブユニット遺伝子が HIF-1 の直接の標的である可能性が示された。
5. *in vitro* 培養系を用いて回虫の成虫を通常酸素あるいは低酸素に曝露し、代謝変換が起こるかを呼吸鎖複合体 II サブユニット遺伝子の発現量およびミトコンドリア呼吸酵素の活性

により評価した。その結果、遺伝子の発現量に顕著な変化は見られなかった。酵素活性の点からも両者に有意な差は見られず、嫌氣的呼吸鎖に特徴的な活性を示した。このことから、成虫は外部酸素環境の変化に依らず嫌氣的な代謝経路である NADH-フマル酸還元系を維持することが明らかとなった。

以上、本論文は自由生活性の生物種とは異なった回虫の酸素適応機構に HIF-1 が関与していることを示した。回虫に見られる嫌氣的な代謝経路は蠕虫を含む低酸素に耐性をもつ生物にも共通に存在するが、その制御機構は未知である。本研究はこのような生物の代謝変換における酸素適応機構の解明に重要な貢献をすると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。