

## 審査の結果の要旨

氏名 増田 功

本研究はマラリア原虫をはじめとする寄生性生物群アピコンプレックス類とその近縁系統群に着目しており、細胞内のエネルギー転換の中心であるミトコンドリアについて生化学的および分子生物学的解析を行った。本研究では系統的にアピコンプレックス類とその姉妹系統群である渦鞭毛藻類との中間に位置する貝類寄生虫*Perkinsus*を用いて、そのミトコンドリア電子伝達鎖(mtETC)とミトコンドリア遺伝子(mt遺伝子)発現系の解析を行い、下記に示す結果を得ている。

1. *Perkinsus*ミトコンドリア濃縮画分を得るため、*P. marinus*培養細胞を様々な手法を用いて破碎し、*Perkinsus*ミトコンドリアの調製法の条件検討を行った。その結果、ガス平衡化圧を300 psiに調整したN<sub>2</sub> cavitation法とパーコール密度勾配超遠心法を組み合わせることにより、mtETC複合体であるコハク酸脱水素酵素(SDH)の高い活性を示す画分が得られた。これは酵素活性を有するmtETCが*Perkinsus*細胞に存在する初めての生化学的証拠である。さらに、*Perkinsus*ミトコンドリア濃縮画分を得る予備的手法を確立したといえる。
2. *Perkinsus*のmtETCに存在すると考えられる様々な酵素の活性を生化学的手法により測定したところ、mtETC複合体II、III、IVの明らかな活性が確認され、アピコンプレックス類*Cryptosporidium*に含まれるAlternative oxidase(AOX)の活性も検出された。また、暫定公開されている*P. marinus*ゲノムデータベースにおいて近縁生物のホモログ配列を用いたBLAST検索を行った結果、AOXや、多くのアピコンプレックス類が有するタイプII NADH脱水素酵素のような特殊な酵素を含む、mtETC複合体の主要サブユニットのホモログ配列が見つかった。このことから、*Perkinsus*のmtETCはアピコンプレックス類のそれと類似していることが示された。
3. *P. marinus*のゲノムデータベースにおけるBLAST検索では*Perkinsus*のmt遺伝子と考えられる配列は見つからなかった。そこで、PCRおよびRACEを行うことで、*Perkinsus*のmt遺伝子としては初の報告となる、*cox1*のmRNAの完全長配列(1434 nt)を決定した。近縁生物のmt遺伝子と同様に、本遺伝子の末端領域には標準的な開始コドン・終止コドンが見出されなかった。またサザンハイブリダイゼーションの結果から、本遺伝子は数

kb程度の比較的小さなDNA分子の集合体として形成されている、渦鞭毛藻類のミトコンドリアゲノムに類似した構造のDNA分子にコードされていることが示された。

4. *cox1*の塩基配列と推定アミノ酸配列を注意深く比較することによって、本遺伝子の翻訳時にAGGコドン(8箇所)とCCCコドン(2箇所)において+1フレームシフトが起こっていることが示唆された。これらのコドンを含むフレームシフトモチーフは近縁種*P. olseni*の*cox1*でも完全に保存されていた。また、*P. marinus*ゲノムデータベースから見出されたもう1つのmt遺伝子*cob*様配列についてもAGGコドン(5箇所)でのフレームシフトを適用することで、近縁生物ホモログに極めて類似したアミノ酸配列が推定された。以上の結果から、*Perkinsus*のmt遺伝子発現特異的にこのフレームシフトが起こっていると考えられた。このようなフレームシフトは既に幾つかの生物から報告されているが、1遺伝子に10回という頻度は異常に高頻度であり、例えばコドン認識能が特殊化したtRNAが関わるような、極めて効率の高いフレームシフト機構が存在すると考えられた。

本研究ではまず、*Perkinsus*のmtETCが近縁生物群アピコンプレックス類のそれと類似した特徴を持つことが明らかとなった。*Perkinsus*は純粋培養系が確立しており扱いが容易であり細胞収量も高いことから、培養に宿主を必要とするアピコンプレックス類よりも生化学的解析に適した生物である。今後、本研究を基盤とし*Perkinsus*を用いた研究が進められることによって、アピコンプレックス類と近縁生物の持つミトコンドリアの機能についてさらなる知見が得られると期待できる。さらに本研究では、貝類寄生虫*Perkinsus*のmt遺伝子発現系において高頻度なフレームシフトという特徴的な現象が起こっていることが示された。この分子機構を解明することは、遺伝子発現における読み枠の維持という、全生物に共通する機構の理解に大きく貢献すると考えられる。以上のように本研究は様々な側面において学術的貢献が期待でき、学位の授与に値するものと考えられる。