

令和元年6月5日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19416

研究課題名(和文)新規内部共生オルガネラの解明

研究課題名(英文) Analysis of novel mitochondrion-related organelles in *Entamoeba histolytica*

研究代表者

野崎 智義 (Nozaki, Tomoyoshi)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・教授

研究者番号：60198588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：細菌内部共生による真核生物のオルガネラはミトコンドリアと色素体でのみ確認され多様な進化を辿っている。嫌気環境に適応し、そのミトコンドリアが高度に変異した赤痢アメーバのミトソームと他のオルガネラとの相互作用を担う機能未知の膜タンパク質の機能の解明を通じて特殊進化の謎の解明を目指した。膜貫通ドメインを有するETMP1を同定した。更にETMP1と結合するEHDドメインをもつ新規タンパク質を同定した。細胞内局在と生理機能を解析した結果、ETMP1はEHDと協調してミトソーム-小胞間の接触部位を形成し、オルガネラ間の物質の輸送、品質保証に関与していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、酸素の中で進化をした真核生物において、その中の細菌の内部共生に由来してできたミトコンドリアに似た細胞内小器官であるミトソームの細胞内での相互作用を担うタンパク質が同定された。様々な環境の中で進化するオルガネラの多様性の一端が解明された。

研究成果の概要(英文)：We characterized two proteins involved in mitosome (uniquely evolved mitochondrion-related organelle in anaerobic eukaryotic cells)-vesicle contact, which possibly allows substrate/product transport and quality control of mitosomes. We concluded by various experimental approaches using biochemistry, cell biology, and genetics that ETMP1, a novel lineage-specific mitochondrial transmembrane protein, interacts with EHD-domain containing proteins, which are localized to a variety of vesicles/vacuoles. Thus, this study shed new light on organellogenesis in eukaryotes.

研究分野：寄生虫学、感染症、進化、分子生物学、生化学、分子生物学、代謝学、細胞生物学、オミクス解析、創薬

キーワード：進化 オルガネラ ミトコンドリア 代謝 内部共生

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞の構築単位 (= 細胞内小器官・オルガネラ) の理解は生物学の最重要命題の一つである。動物・植物等の高等真核生物が多様で高次な生命機能を発揮できるのは、内部共生オルガネラ (オルガネラ = 細胞内小器官) に負うところが大きい。内部共生オルガネラとは一般にミトコンドリアと葉緑体 (色素体) を指し、ミトコンドリアは酸素呼吸、葉緑体は光合成により効率良く ATP を産生する能力を真核生物に与え、必要不可欠な役割を果たしている。ミトコンドリアや葉緑体は細菌が別の細菌を細胞内に取り込む、いわゆる「内部共生(endosymbiosis)」によって生じたことが示されている。ミトコンドリアはプロテオバクテリアが一度だけ内部共生して成立したとされる。一方葉緑体は光合成細菌シアノバクテリアを一度、或いは二度以上繰り返し共生させて成立した。内部共生によるオルガネラの成立は希であり、内部共生により生まれた内部共生オルガネラは他に知られていない。我々は嫌気的環境で特異な進化を遂げてきた赤痢アメーバ(*Entamoeba histolytica*)を用いてミトコンドリア (マイトソーム) の特殊進化に係る研究を行ってきた背景をもつ。

### 2. 研究の目的

本研究において、進化において飛躍的な能力を生物に与え「希な出来事」とされる内部共生が、ミトコンドリア・葉緑体以外のこれまで知られていない新規オルガネラの成立に関与していることを示すことを長期的な目的とする。同時に本研究期間には、赤痢アメーバでインシリコ解析により演繹されたマイトソームの膜タンパク質の機能を明らかにし、ミトコンドリア様オルガネラの構成成分・生理機能を解明し、内部共生に関する祖先生物の遺伝的系譜を明らかにすることを目的とした。ミトコンドリアは真核生物の成立の初期に一度だけの細菌の内部共生を契機として成立したとされる。様々な生物系統 (スーパーグループ) において、嫌気的環境下での進化圧により、機能縮退および様々な新規機能の賦与が起こっており、赤痢アメーバはミトコンドリアの特殊進化 (代謝・輸送機構など) を示す魅力的な例であり、オルガネラ進化の優れたモデル生物である。

### 3. 研究の方法

- (1) インシリコ解析により同定された膜貫通ドメインを有するマイトソームタンパク質 (ETMPs) を獲得する。
- (2) 代表的な ETMPs である ETMP1 の細胞内局在、機能を細胞生物学的手法、逆遺伝学的手法、生化学的手法により明らかにする。
- (3) ETMP1 と相互作用するタンパク質を免疫沈降法、質量分析解析により同定する。
- (4) ETMP1 結合タンパク質の細胞内局在、機能を細胞生物学的手法、逆遺伝学的手法、生化学的手法により明らかにする。
- (5) ETMP1 とその結合タンパク質の相互作用の赤痢アメーバマイトソームの維持における役割を明らかにし、同時に、ミトコンドリア様内部共生オルガネラの進化的多様性の一端を示す。

### 4. 研究成果

赤痢アメーバから *Entamoeba* 属に特異的な新規マイトソーム膜貫通型タンパク質である ETMP1 を発見した。インシリコ解析により1つの膜貫通領域と2つの coiled-coil 領域を有していた。N末端 HA 標識付加した ETMP1 を発現させた原虫株を作成し、間接蛍光抗体法により ETMP1 がマイトソームに局在することを確認した。更に炭酸ソーダ処理による分画並びに免疫電顕観察により ETMP1 はマイトソーム膜に挿入されていることを確認した。ETMP1 は 90 kDa と 180 kDa の2種類の複合体を形成した。免疫沈降法により、タンパク質相互作用で ETMP1 と結合するタンパク質を濃縮し、質量分析により同定したところ、Eps15 homology-domain (EHD) を有するタンパク質 EHD1 と EHD2 が同定された。

N末 HA 標識した EHD1 と EHD2 を発現する株を確立し、間接蛍光抗体法により EHD1, 2 が小胞及び小胞とマイトソームの接合部位に局在することを確認した。小胞上の EHD1, 2 はレトロマー複合体の構成タンパク質の1つである Vps26 と共局在した。更にテトラサイクリン誘導型発現株を用いて N末 HA 標識した EHD1 を発現させたところ、小胞同士の結合部位や内部陥入部位に蓄積が観察された。EHD1 は multi-vesicular body の形成に関与することが示された。EHD1 と EHD2 を大腸菌組換えタンパク質として発現・精製し、ATPase 活性並びに膜結合活性を確認した。PIPs に高親和性を示し、膜結合活性は EHD2 がより高かった。

更に EHD1 と EHD2 の機能を詳細に明らかにするために、テトラサイクリン誘導下で GFP-EHD1 を発現する形質転換体を作成しライブイメージングによる観察を行った。6時間の誘導ではエンドソーム膜に局在した、18時間以上の誘導では membrane contact site と multivesicular body の間に強い集積が観察された。GFP-EHD1 の発現は液性マーカーである dextran や 受容体依存的に取り込まれるマーカーである transferrin に影響を与えず、これらのマーカーを含むまたは含まない様々なサイズの小胞の間に蓄積が確認された。また、細胞膜家の transferrin の集積の近傍に GFP-EHD1 が高濃度で集積していたことから、細胞膜やその受容体のリサイクリングに関与している可能性が示唆された。一方、GFP-EHD2 は細胞質中に小さな点や GFP-EHD1 が集積するのより c サイズの小さな小胞上に観察され、EHD1 とは異なる機能が示唆された。組換え His-EHD1 とリポソームを用いて Membrane tubulation assay を行ったところ、

phosphatidylinositol-4,5-diphosphateが必要なこと、EHD1によるATP加水分解はtubulationではなく、膜からのscissionに必要であることが示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3件)

全て査読あり

Santos, H. J., Hanadate, Y., Imai, K., and Nozaki, T. An Entamoeba-specific mitosomal membrane protein with potential association to the Golgi apparatus. *Genes*, 2019 (in press)

Santos, H. J., Makiuchi, T., and Nozaki, T. Reinventing an organelle: The reduced mitochondrion in parasitic protists. *Trends Parasitol.* 34:1038-1055, 2018. (Review)

Makiuchi, T., Santos, H., Tachibana, H., Nozaki, T. Hetero-oligomer of dynamin-related proteins participates in the fission of highly divergent mitochondria from *Entamoeba histolytica*. *Sci Rep* 7:13439, 2017.

〔学会発表〕(計 4件)

Santos Herbert Jimenez(サントス ハルベルト・ヒメネス) Discovery of a lineage-specific mitosomal membrane protein possibly involved in vacuole-mitosome contact in *Entamoeba histolytica*, ASCB EMBO meeting 2017(国際学会), 2017

Santos Herbert Jimenez(サントス ハルベルト・ヒメネス), A Lineage-specific mitosomal membrane protein possibly involved in vacuole-mitosome contact in *Entamoeba histolytica*, The U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program: The 48th Joint Conference on Parasitic Diseases(国際学会), 2017

Herbert J. Santos(サントス ハルベルト・ヒメネス), Yuki Hanadate, Kenichiro Imai, and Tomoyoshi Nozaki. A lineage-specific mitosomal membrane protein possibly involved in vacuole-mitosome contact in *Entamoeba histolytica*. FEBS Advanced Lecture Course on Lipid Dynamics and Membrane Contact Sites(国際学会), August 31 - September 7, 2018, Spetses Island, Greece

Herbert J. Santos, Fuyuki Tokumasu, Suzumi M. Tokuoka, Fumie Hamano, Tomoyoshi Nozaki. Elucidation of biosynthesis of very long chain fatty acids in the protozoan pathogen *Entamoeba histolytica*. 88th Annual meeting of the Japanese Society of Parasitology (国内学会) March 14-16, 2019, Nagasaki, Japan

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
該当なし

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：サントス ハルベルト・ヒメネス

ローマ字氏名： Santos, Herbert Jimenez

所属研究機関名：東京大学

部局名：大学院医学系研究科(医学部)

職名：助教

研究者番号(8桁): 90793779

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。