

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07096

研究課題名（和文）赤痢アメーバのミトソームに存在する”非”合理的な分裂制御はなぜ成立したのか？

研究課題名（英文）The significance of a DRP hetero-oligomer in the fission of Entamoeba mitosomes.

研究代表者

牧内 貴志 (MAKIUCHI, Takashi)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：80587709

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：赤痢アメーバの2種類のダイナミン関連タンパク質（EhDrpAおよびEhDrpB）について、未解明であるEhDrpA-EhDrpBヘテロ複合体の成立背景の解明を試みた。電子顕微鏡観察から、ヘテロ複合体が機能する特殊化したミトコンドリアであるミトソームの分裂にEhDrpBホモ複合体のサイズでは適さないことが示唆された。また、モデル近縁種を用いた解析から、シスト化過程におけるミトソームの分裂がEhDrpAおよびEhDrpBの相同タンパク質の量的変動によって制御されている可能性が示唆され、更に両タンパク質の発現プロファイルの違いからシスト化過程での各ホモ複合体の機能的な違いも予想された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

赤痢アメーバは、2種類のダイナミン関連タンパク質からホモ複合体2種類とヘテロ複合体、計3種類の機能が異なる複合体を形成している可能性が高い。寄生性真核生物からは、ゲノム・代謝経路・オルガネラ等で縮退進化が報告されている。赤痢アメーバにおいても同様な進化が報告されているが、オルガネラのダイナミクス制御分子に関して、本研究から四次構造の多様化によって遺伝子数以上の機能分化を生み出すという縮退進化の一助と考えられる特殊な進化が起きた可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：The unexplained heterocomplex comprised of two dynamin-related proteins in *Entamoeba histolytica* (EhDrpA and EhDrpB) was investigated to elucidate the rationale of its establishment. This heterocomplex participates in the fission of mitosomes that have undergone reductive evolution of mitochondria. Electron microscopy observations suggested that the EhDrpB homocomplex is unlikely to be involved in mitosomal fission as its size is unsuitable for the fission constriction site. Analyses using the stage conversion model *Entamoeba invadens* suggested the possibility that quantitative changes in EhDrpA and EhDrpB homologs may regulate mitosomal fission during encystation. Moreover, the differences in the expression profiles between these homologs indicate that the resulting homocomplexes may have different functions during encystation. Therefore, it is thought that the heterocomplex has been established to create functional differentiation through quaternary structure diversification.

研究分野：寄生虫学

キーワード：寄生虫 赤痢アメーバ ミトコンドリア ミトソーム ダイナミン

### 1. 研究開始当初の背景

*Entamoeba* 属生物は、嚢子（感染・休眠ステージ）を宿主が経口摂取することで消化器系への侵入を果たし、その後脱嚢して栄養型（二分裂増殖ステージ）へと変態する。ヒトにおいては、赤痢アメーバ（*Entamoeba histolytica*）が世界人口の約1%に感染し、年間約10万人の死亡原因となる医学上重要な寄生原虫である。一方で、真核生物の適応進化と多様性を考える上でも重要なマイトソームと呼ばれる特殊化したミトコンドリアを持つことが知られている<sup>(1)</sup>。*Entamoeba* マイトソームは、栄養型の増殖やステージ転換において重要な機能を持つため、*Entamoeba* 属生物の生活史全体を通じて重要なオルガネラと言える。一方で、マイトソームを娘細胞へと分配する過程で重要な“分裂”プロセスには多くの未解明な点がある。ペルオキシソームなどの一重膜オルガネラは、分裂および他の膜系からの *de novo* 形成というオルガネラ数を増加させる2つの手段を持つ。しかしながら、ミトコンドリアやマイトソームは、二重膜オルガネラという構造上の制約から、“分裂”が唯一の数の増加手段と考えられている。ミトコンドリアの分裂時における膜の切断は、外膜上にリクルートされた dynamin-related GTPase protein (DRP) が螺旋状でホモ複合体の分裂リングを形成し、GTPの加水分解に伴う構造変化によって実行する、というモデルが考えられている。一方で申請者らは、「*E. histolytica* マイトソームの分裂には2種類のDRP (EhDrpA および EhDrpB) で構成されたヘテロ複合体の形成が重要」という、ミトコンドリア分裂DRPに“四次構造の多様性”が存在することを示す前例の無い報告を行った<sup>(2)</sup>。しかしながら“多様性の成立要因”と“ヘテロ複合体形成の生理的意義”は現在のところ不明である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ヘテロ複合体形成の生理的意義の解明を行うことによって、四次構造の多様性が生じた背景・要因を明らかにすることである。具体的に2つの仮説の検証を試みた。

- (1) オルガネラサイズへの適応：ミトコンドリアの分裂時に生じる収縮部位の外径は  $109 \pm 24$  nm と見積もられており<sup>(3)</sup>、このサイズは概ね *in vitro* で再構成されたミトコンドリア分裂DRPのホモ複合体リングの径と一致する。一方、*E. histolytica* マイトソームのサイズはミトコンドリアより小さいため、その切断にはミトコンドリアよりも小さなリングが必要であり、ヘテロ複合体形成が重要となった可能性がある。
- (2) ステージ転換時のマイトソームの分裂制御：*in vitro* ステージ転換モデルである *Entamoeba invadens* のトランスクリプトームデータから、嚢子化の初期に *EhDrpB* 相同遺伝子の、後期に *EhDrpA* 相同遺伝子の発現量の低下が読みとれた<sup>(4)</sup>。*E. histolytica* において、EhDrpA と EhDrpB のいずれか一方の発現抑制でマイトソームの分裂が阻害されること<sup>(2)</sup>を合わせて考えると、*Entamoeba* 属生物はステージ転換の際に、2種類のDRPの量的変化によってヘテロ複合体の形成を調節し、マイトソームの分裂制御を行っている可能性がある。

### 3. 研究の方法

- (1) *E. histolytica* DrpA および DrpB の組換えタンパク質 (rEhDrpA および rEhDrpB) を調製するために、先行研究<sup>(2)</sup>で調製したプラスミドを鋳型に用いたPCRによって標的遺伝子領域の増幅を行った。その後、制限酵素消化およびライゲーション反応を行い、pCold<sup>TM</sup> I (TaKaRa) ベクター内に挿入した。これを BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) コンピテントセルに導入し、ベクターのプロトコールに従って組換えタンパク質の発現誘導を行なった。組換えタンパク質の精製には 1 mM dithiothreitol (DTT) 存在下で cOmplete<sup>TM</sup> His-Tag Purification Resin (Merck Millipore) を用いて行なった。組換えタンパク質の溶出後、PD-10 カラム (GE healthcare) を用いて緩衝液を 20 mM Hepes-KOH (pH7.2) / 200 mM NaCl / 2 mM DTT / 10 mM MgCl<sub>2</sub> / 2 mM EGTA / 10% Glycerol に置換し、Amicon<sup>®</sup> Ultra (30K) (Merck Millipore) を用いてタンパク質を濃縮した後、実験に使用するまで -80°C に保管した。rEhDrpA および rEhDrpB の精製度の確認は、Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) によって行った。
- (2) GTPase 活性は、基質である GTP から遊離した Pi を Malachite Green Phosphate Assay Kits (BioAssay Systems) によって検出することで測定した。活性測定には 5 pmol の組換えタンパク質、反応用緩衝液 20 mM Hepes-KOH (pH 7.2) / 50 mM KCl / 2 mM MgCl<sub>2</sub> / 1 mM DTT および基質 GTP (0、25、50、100、200、400、800、および 1200 μM) を使用し、室温で 20 分間の反応を行った。
- (3) rEhDRP を用いた *in vitro* での複合体再構成は、緩衝液 20 mM Hepes-KOH (pH7.2) / 1 mM MgCl<sub>2</sub> / 2 mM EGTA / 1 mM DTT / 5 mM NaF / 0.5 mM AlCl<sub>3</sub> を用いて GDP、もしくは GTP の非加水分解性アナログである β,γ-Methyleneguanosine 5'-triphosphate (GMP-PCP) を最終濃度 1 mM で添加した後、常温にて 30 分静置することによって行なった。透過型電子顕微鏡による組換え rEhDRP の観察は、2% 酢酸ウラニルによるネガティブ染色後に行なった。

- (4) マイトソームの分裂過程にあると考えられる収縮部位の径を測定するために、急速凍結置換法によって固定した細胞から、該当する像を免疫電子顕微鏡観察にて取得した。マイトソームのマーカータンパク質である Cpn60 の局在が確認できたオルガネラの像のみを解析に採用した。
- (5) *E. invadens* の DrpA および 2 種類の DrpB (DrpB1 および B2) の検出に必要な抗血清は、ウサギを用いて調製した。EiDrpA 用抗血清は pCold™ I ベクターを用いて作製した組換え EiDrpA を抗原に調製した。DrpB に関しては、それぞれを個別に認識できるであろう領域でペプチドを合成し、それらを抗原とした。各抗血清の反応性は、各 DRP の組換えタンパク質を用いたウエスタンブロットによって確認した。*E. invadens* の嚢子化は先行研究<sup>(4)</sup>を参考に行ない、24 時間毎に 120 時間まで、3 系列の細胞抽出液を調製した。SDS-PAGE 後に上記の抗血清を用いたウエスタンブロットを行うことで、各タンパク質の発現量を確認した。
- (6) 嚢子化過程におけるマイトソームの数的変化を観察するために、*E. invadens* の嚢子化誘導後 24 時間毎に 120 時間までの細胞を用いて免疫蛍光抗体法による観察用検体を調製した。一次抗体として *E. histolytica* APSK (マイトソーム局在性タンパク質) に対する抗血清を、二次抗体として Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (Life Technologies)を用いて *E. invadens* を標識し、LSM880 を用いて三次元像を取得した。

#### 4. 研究成果

- (1) 「オルガネラサイズへの適応」に関する結果
  - ① SDS-PAGE 後の CBB 染色によってタンパク質を検出した結果、rEhDrpA および rEhDrpB 共に純度よく精製できていることを確認した。
  - ② 両組換えタンパク質の GTPase 活性を計測して  $K_m$  および  $V_{max}$  を計算した結果、rEhDrpA では  $K_m = 558\mu\text{M}$  および  $V_{max} = 2.8\mu\text{M}/\text{min}$  であり、rEhDrpB では  $K_m = 73\mu\text{M}$  および  $V_{max} = 5.3\mu\text{M}/\text{min}$  であった。
  - ③ rEhDrpA および rEhDrpB を用いた *in vitro* 複合体再構成および透過型電子顕微鏡観察の結果、rEhDrpB に関して GDP もしくは GMP-PCP 添加時にリング状構造が効率的に形成されることが明らかとなった。GDP 結合型 DRP は収縮したリングを形成し、GMP-PCP 結合型 DRP は弛緩したリングを形成する<sup>(6)</sup>。GDP 結合型 rEhDrpB リングの外径および内腔径はそれぞれ  $30.64 \pm 3.00 \text{ nm}$  ( $n = 155$ ) および  $11.69 \pm 1.97 \text{ nm}$  ( $n = 41$ ) であった。一方で、GMP-PCP 結合型 rEhDrpB リングの外径および内腔径はそれぞれ  $31.23 \pm 3.63 \text{ nm}$  ( $n = 153$ ) および  $12.58 \pm 2.24 \text{ nm}$  ( $n = 45$ ) であった。両条件の外径間および内腔径間には統計学的な有意差は存在しない。
  - ④ マイトソームの分裂の際に生じると考えられる収縮部位を計測した結果、その外径が  $73.41 \pm 19.88 \text{ nm}$  ( $n = 23$ ) であった。この径はミトコンドリアの収縮部位の測定結果である  $109 \pm 24 \text{ nm}$  ( $n = 100$ )<sup>(3)</sup>と比べて小さい値であった。
- (2) 「オルガネラサイズへの適応」に関する考察
 

*E. histolytica* の DRP の酵素学的特徴として、EhDrpB は EhDrpA に比べて基質親和性および GTPase 活性が高いことが示唆された。これらの特徴の違いがヘテロ複合体としてマイトソームの分裂に機能する際に、どのような意義を持つかは現在のところ不明である。一方、構造解析の結果から、弛緩状態と考えられる GMP-PCP 結合型 rEhDrpB ホモ複合体リングの外径および内腔径は、分裂過程にあると考えられるマイトソームの収縮部位の径よりも小さい値であった。この結果から、EhDrpB がマイトソームの分裂には適していない可能性が考えられる。現時点で、rEhDrpA ホモ複合体リングの観察には至っていないため、rEhDrpA と rEhDrpB とが混在した条件下で観察されたリング径がヘテロ複合体の正確な観察であるかは不明であるが、GDP 結合型リングの外径および内腔径はそれぞれ  $32.46 \pm 4.56 \text{ nm}$  ( $n = 68$ ) および  $10.91 \pm 2.58 \text{ nm}$  ( $n = 28$ )、GMP-PCP 結合型リングの外径および内腔径はそれぞれ  $33.39 \pm 3.50 \text{ nm}$  ( $n = 115$ ) および  $12.14 \pm 2.08 \text{ nm}$  ( $n = 30$ ) であった。これらの値は rEhDrpB のみの再構成条件下での観察とは異なる値であり、EhDrpB ホモ複合体リングと EhDrpA-EhDrpB ヘテロ複合体リングの間には、構造上の違いが存在するかもしれない。
- (3) 「ステージ転換時のマイトソームの分裂制御」に関する結果
  - ① 嚢子化過程における EiDrpA および EiDrpB2 の発現プロファイルを確認した結果、栄養型の発現量を 100%とした時、EiDrpA は 24 時間後では  $96.58 \pm 20.57\%$ 、48 時間後では  $103.99 \pm 19.01\%$ 、72 時間後では  $111.67 \pm 15.96\%$ 、96 時間後では  $97.99 \pm 21.11\%$ 、120 時間後では  $70.46 \pm 30.54\%$ であった。一方で、EiDrpB2 は 24 時間後では  $124.47 \pm 21.38\%$ 、48 時間後では  $72.19 \pm 20.06\%$ 、72 時間後では  $76.21 \pm 19.14\%$ 、96 時間後では  $62.82 \pm 0.83\%$ 、120 時間後では  $45.76 \pm 4.44\%$ であった。EiDrpB1 用抗血清に関しては、rEiDrpB1 との反応性は

確認できたが、内在性 EiDrpB1 の発現量が検出限界以下である可能性があり、検出には至らなかった。あるいは、EiDrpB1 用抗血清調製用に用いたペプチド領域に翻訳後修飾が導入され、抗体との結合が阻害された可能性も考えられたが、利用した領域には既知の翻訳後修飾モチーフは存在しない。

- ② EhAPSK 用抗血清を用いて *E. invadens* マイトソームとして検出したドット状のシグナル数は、栄養型において  $78 \pm 3$  個/細胞 ( $n = 15$ )、嚢子化誘導後 24 時間後では  $42 \pm 2$  個/細胞 ( $n = 24$ )、48 時間後では  $43 \pm 19$  個/細胞 ( $n = 15$ )、72 時間後では  $31 \pm 2$  個/細胞 ( $n = 16$ )、96 時間後では  $44 \pm 23$  個/細胞 ( $n = 15$ )、120 時間後では  $45 \pm 23$  個/細胞 ( $n = 17$ ) であった。

(4) 「ステージ転換時のマイトソームの分裂制御」に関する考察

*E. histolytica* の発現抑制株を用いた解析において、野生株と比較して EhDrpA では約 69%、EhDrpB では約 73%に発現量が減少することで、マイトソームの分裂阻害が観察できる<sup>(2)</sup>。*E. invadens* の嚢子化過程においては、誘導後 48 時間後に EiDrpB2 の発現量が約 72%へと減少し、120 時間後には EiDrpA の発現量が約 69%へと減少する。嚢子化過程にある *E. histolytica* が *E. invadens* と同様な DRP の発現プロファイルである場合、嚢子化開始後 48 時間以降から DRP の発現量によるマイトソームの分裂の制御が起こっている可能性が考えられる。一方で、嚢子化誘導後 24 時間から 120 時間までの間は、マイトソームの数に大きな変動が無いことが示唆された。この結果は、嚢子形成の開始後 24 時間から 48 時間までの間がマイトソーム数の増加と減少のバランスがとれた状態にあることを示唆しているのかもしれない。加えて、EiDrpA と EiDrpB2 の発現プロファイルが異なることから、嚢子化過程におけるこれらの DRP ホモ複合体の機能的な違いが予想された。

(5) 総括と今後の展望

*E. histolytica* は、2 種類のダイナミン関連タンパク質からホモ複合体 2 種類とヘテロ複合体、計 3 種類の機能が異なる複合体を形成している可能性が高い。寄生性真核生物からは、ゲノム・代謝経路・オルガネラ等で縮退進化が報告されている。*E. histolytica* においても同様な進化が報告されているが、オルガネラのダイナミクス制御分子に関して、本研究から四次構造の多様化によって遺伝子数以上の機能分化を生み出すという縮退進化の一助と考えられる特殊な進化が起きた可能性が示された。今後の展望として、rEhDrpA のホモ複合体リングの観察を成功させることによって、ヘテロ複合体の再構成も含め、複合体間でのより詳細な構造レベルでの比較解析を行う予定である。

<引用文献>

- ① Makiuchi, T. & Nozaki, T. Highly divergent mitochondrion-related organelles in anaerobic parasitic protozoa. *Biochimie* 100, 3–17, (2014).
- ② Makiuchi, T., Santos, H. J., Tachibana, H., & Nozaki, T. Hetero-oligomer of dynamin-related proteins participates in the fission of highly divergent mitochondria from *Entamoeba*. *Scientific Reports* 7(1), 13439 (2017).
- ③ Ingerman, E. *et al.* Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J. Cell Biol.* 170, 1021–1027, (2005).
- ④ De Cadiz, A. E., Jeelani, G., Nakada-Tsukui, K., Caler, E. & Nozaki, T. Transcriptome analysis of encystation in *Entamoeba invadens*. *PLoS One* 8, e74840, (2013).
- ⑤ Mears, J. A., & Hinshaw, J. E. Visualization of dynamins. *Methods in Cell Biology* 88, 237–56 (2008).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Makoto Kazama, Kazuhiro Yoshida, Sanae Ogiwara, Takashi Makiuchi, Hiroshi Tachibana	4. 巻 66(3)
2. 論文標題 Influence of heterologous transplant of DNA-lacking mitochondria from Entamoeba histolytica on proliferation of Entamoeba invadens	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Eukaryotic Microbiology	6. 最初と最後の頁 483-493
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jeu.12693	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masayuki Tanaka, Takashi Makiuchi, Tomoyoshi Komiyama, Takashi Shiina, Ken Osaki, Hiroshi Tachibana	4. 巻 13(2)
2. 論文標題 Whole genome sequencing of Entamoeba nuttalli reveals mammalian host-related molecular signatures and a novel octapeptide-repeat surface protein	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS Neglected Tropical Diseases	6. 最初と最後の頁 e0007923
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pntd.0007923	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Santos Herbert J., Makiuchi Takashi, Nozaki Tomoyoshi	4. 巻 34
2. 論文標題 Reinventing an Organelle: The Reduced Mitochondrion in Parasitic Protists	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Trends in Parasitology	6. 最初と最後の頁 1038 ~ 1055
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pt.2018.08.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 牧内 貴志, Herbert J. Santos, 福西 菜穂子, 野崎 智義, 橘 裕司
2. 発表標題 赤痢アメーバにおけるミトソームの分裂に関わるダイナミン関連タンパク質の解析
3. 学会等名 第89回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中 政之, 牧内 貴志, 橘 裕司
2. 発表標題 Entamoeba nuttalliの全ゲノム解析によって明らかになったEntamoeba種間の共通遺伝子群と種特異的な新規表面タンパク質
3. 学会等名 第89回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中 政之, 牧内 貴志, 小見山 智義, 椎名 隆, 大崎 研, 橘 裕司
2. 発表標題 サル腸管寄生アメーバの全ゲノム解析によって明らかになったEntamoeba種共通遺伝子群と種特異的な新規表面タンパク質
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 牧内 貴志, Herbert J. Santos, 福西 菜穂子, 野崎 智義, 橘 裕司
2. 発表標題 赤痢アメーバのミトソームの分裂に関わるダイナミン関連タンパク質
3. 学会等名 第27回分子寄生虫学ワークショップ 第17回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 牧内 貴志, Herbert J. Santos, 福西 菜穂子, 野崎 智義, 橘 裕司
2. 発表標題 赤痢アメーバの特殊化ミトコンドリアの分裂に関わるダイナミン関連タンパク質
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 牧内貴志、Herbert J. Santos、野崎智義、橘 裕司
2. 発表標題 Entamoebaマイトソームの分裂に関わるダイナミン関連タンパク質の解析
3. 学会等名 第88回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Makiuchi Takashi、Herbert J. Santos、Nozaki Tomoyoshi、Tachibana Hiroshi
2. 発表標題 Dynamin-related proteins for the fission of Entamoeba mitosomes
3. 学会等名 14th International Congress of Parasitology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nozaki Tomoyoshi、Makiuchi Takashi、Herbert J. Santos、Tachibana Hiroshi
2. 発表標題 Analysis of the fission mechanism of mitosomes in Entamoeba histolytica
3. 学会等名 19th International Seminar on Amebiasis 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 牧内貴志、Herbert J. Santos、野崎智義、橘 裕司
2. 発表標題 赤痢アメーバの特殊化ミトコンドリアの分裂に関わるダイナミン関連タンパク質
3. 学会等名 第26回分子寄生虫学ワークショップ 第16回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 風間 真、吉田和弘、荻原早苗、牧内貴志、橘 裕司
2. 発表標題 嫌気性アメーバにおける縮退ミトコンドリア(マイトソーム)の異種間移植
3. 学会等名 日本共生生物学会第2回大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関