

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21770084

研究課題名（和文） 貝類寄生虫パーキンサスに見出された縮退色素体の維持機構の解明

研究課題名（英文） Maintenance mechanism of reduced plastid found in an oyster parasite *Perkinsus marinus*.

研究代表者

松崎 素道 (MATSUZAKI MOTOMICHI)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00511396

研究成果の概要(和文): 貝類寄生虫パーキンサスには縮退した色素体の存在が示唆されている。その同定と維持機構の解明を目的として、色素体特異的なタンパク質にタグ付き蛍光タンパク質を融合して強制発現する株を作出した。これにより、4枚の生体膜に包まれた色素体を同定し、そこに独自のDNAを持たないことを証明し、タンパク質輸送にTic/Toc輸送体が関与していることを示唆することができた。

研究成果の概要(英文): An oyster parasite *Perkinsus marinus* has been suggested to harbor reduced plastid. To identify it and to elucidate the maintenance mechanism, I established a parasite strain overexpressing plastid-specific protein fused with multiple-tagged fluorescent protein. This strain identified a plastid surrounded by 4 membranes, proved absence of plastid DNA, and suggested involvement of Tic/Toc translocon on the protein transport into the plastid.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：細胞生物学・進化生物学・寄生虫学

科研費の分科・細目：基礎生物学、生物多様性・分類

キーワード：進化、色素体、微細構造、タンパク質輸送、形質転換

1. 研究開始当初の背景

色素体は光合成に関わる植物に特徴的なオルガネラである。元来シアノバクテリアに由来すると考えられているが、細胞が色素体を持つ他の真核生物を取り込む「二次共生」によって、植物に限らず幅広い生物が色素体を獲得している。たとえばアピコンプレックス門の寄生性原虫（以下、マラリア原虫類とす

る）は、非光合成性でありながらも原虫の生存に必須な二次共生色素体「アピコプラスト」を持っている。

しかし二次共生そのものはごく稀なイベントだと考えられている。なぜならば、生物が色素体を維持するためには、細胞質側から遺伝子産物を協調的に送り込む複雑な機構を獲得する必要があり、これは容易ではないと

想定されるためである。たとえばアピコプラストの場合、マラリア原虫類と不等毛藻類・渦鞭毛藻類とがその共通祖先において二次共生色素体を獲得し、それが受け継がれた結果成立したと考えられている (chromalveolate 仮説・Cavalier-Smith 1999 など)。

この仮説に対しては、系統上根本側で分岐する (basal な) 生物群のほとんどが非光合成性であり節約的でないという批判が寄せられている (Bodyl 2005 など)。実際、二次共生色素体の維持機構がどれほど複雑なのか、また果たしてアピコプラストとその他藻類の色素体とでどれほど共通の機構が用いられているのかは、明らかでない。すなわち、色素体進化についての仮説的枠組みは成立しているものの、それに基づく実証的研究が不足している状態である。

さて貝類に対して病原性を示す寄生性原生生物 *Perkinsus marinus* (パーキンサス) は、系統解析により渦鞭毛藻とマラリア原虫類との分岐点近くに位置づけられており (Leander and Keeling 2004 など)、chromalveolate 仮説の実証をする上で重要な“basal な生物”として格好の材料である。研究代表者らは、これまでの研究によってパーキンサスには二次共生色素体が存在し、しかしながらそれは独自のゲノムを失い極めて縮退化した色素体であることを強く示唆する結果を得ている (Matsuzaki *et al.* 2008・一部未発表データを含む)。光合成能がなく DNA を欠いていることから、この色素体は極めて限定的な機能要素と、それを支える最低限の維持要素のみからなると考えられ、二次共生色素体の維持機構を解明する上で有用な生物であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、新たに縮退化色素体を持つことが示唆されたパーキンサスを材料に用いて、この色素体の維持機構を既知の多様な色素体と比較検討することを目的とした。一般的に色素体を維持するためには、内部に保持された独自の DNA から発現するタンパク質と、核ゲノムから転写翻訳され細胞質側から送り込まれるタンパク質の双方が必要である。パーキンサスではすでに独自の DNA を欠くことが示唆されているが、これを確定することが重要である。また色素体へのタンパク質輸送は、他の生物を自らのオルガネラとして取り込むための根幹となる機構であり、パーキンサス色素体についてタンパク質輸送機構を解明し他の生物と比較検討することが求められる。

3. 研究の方法

細胞学的に色素体が DNA を欠くことを証明し、またタンパク質輸送機構を解明するために、Fernandez-Robledo *et al.* (2008) で報告された形質転換系を用いる。色素体のマーカータンパク質として MEP 経路酵素を用い、そのタグ付き蛍光融合タンパク質を発現する組換え体を得る。

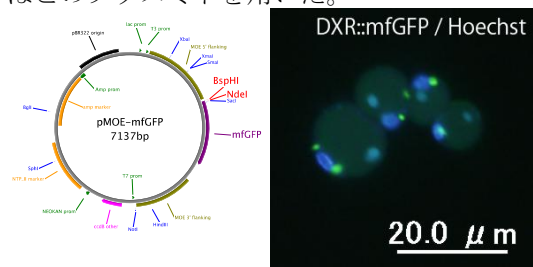
得られた組換え体を用いて、色素体移行シグナルを改変した持った遺伝子を導入し、その局在変化を追跡することで色素体移行シグナルの性質を明らかにする。

またタンパク質輸送機構に関わる既知のタンパク質について、アンチセンス RNA による遺伝子ノックダウンを行い、蛍光融合タンパク質の輸送の変化を検証することで輸送装置の性質を明らかにする。

4. 研究成果

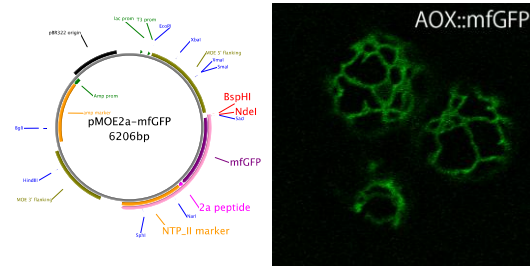
(1) 形質転換ベクターの構築

①まず既報の形質転換系の追試と、細胞生物学的・生化学的解析を容易にする目的とを兼ねて、タグ付き蛍光タンパク質 mfgFP (Kobayashi *et al.* 2008) との融合タンパク質を発現するベクター pMOE-mfgFP を構築した。このプラスミドはパーキンサス由来の高発現プロモーターを利用しているため、融合タンパク質は過剰発現になる。これに先行研究で推定色素体への局在が明らかになった酵素 DXR の遺伝子 (*ispC*) を組み込み形質転換したところ、細胞核近傍に 1 細胞あたり 1~2 個の輝点が認められた。これは親株において抗 DXR 抗体を用いた免疫蛍光法で観察された輝点と同様であった。すなわち過剰発現ではあるが、局在の擾乱はなく局在解析に適していることを意味している。以降の局在解析にはこのプラスミドを用いた。



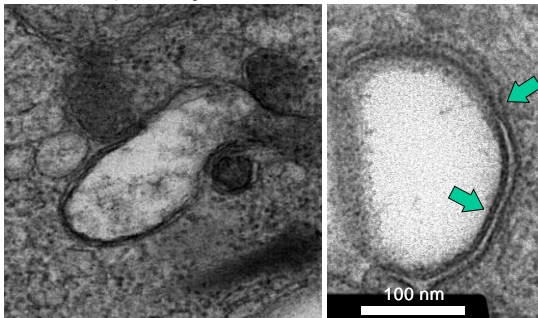
②既報の形質転換系では、蛍光を発する細胞を顕微操作で単離する必要があり、多数の形質転換株を作成するには煩雑であった。そこで蛍光融合遺伝子とカナマイシン耐性遺伝子を 2a ペプチドを介して発現させるプラスミド pMOE2a-mfgFP を構築した。2a ペプチドは翻訳時にペプチド鎖の切断を誘起し、複数

のタンパク質を局在を乱すことなく同時発現させることができる。得られたプラスミドで形質転換を行い、抗生物質 G418 存在下で選択したところ、予想通り融合タンパク質を発現する株を得ることができた。これはトリパノゾーマに次いで 2a ペプチドが真核単細胞生物で機能することを示す 2 例目であり、今後近縁なマラリア原虫類の細胞学的解析において応用が期待できる成果である。さらにこのプラスミドにミトコンドリアで機能する代替末端酸化酵素 AOX の遺伝子を組み込み形質転換したところ、液胞を網状に取り囲むミトコンドリアを可視化し生化学的に標識することができた。研究代表者らは、本研究とは独立にパーキンソンのミトコンドリアにフレームシフトを頻用する特異な遺伝子発現機構が存在することを示しており (Masuda et al. 2010)、その解明が加速されると期待している。本研究において改良された形質転換系は、色素体の維持機構を解析しその多様性を論じるためのツールとして重要な成果物であると評価できる。

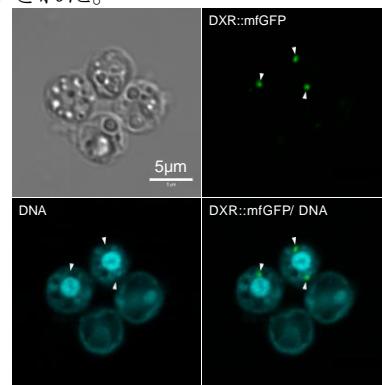


(2) 融合タンパク質強制発現株の細胞学的解析

①樹立した DXR::mfGFP 強制発現株を電子顕微鏡で観察したところ、中空で 4 枚の生体膜に囲まれた構造が見出された。この構造は強制発現株特異的に観察されたことから、DXR が過剰に蓄積し肥大化した色素体だと考えられる。本種において色素体の微細構造が示されたのは初めてであり、色素体内部にリボソームが含まれないことが明らかになった。これは色素体に独自の DNA が存在しないことと整合する観察である。また 4 枚の包膜は、近縁の渦鞭毛藻の包膜が一般に 3 枚であっても、祖先的には 4 枚であったことを示唆しており、chromalveolate 仮説の妥当性を支持するものと言える。



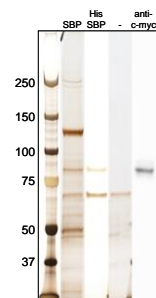
②オルガネラに DNA が存在しないことを証明する方法として in situ nick translation 法が知られている。これは細胞内の DNA をビオチン化し、蛍光修飾したストレプトアビジンを特異的に結合させる手法で、ごく微量の DNA を感度良く観察できる。DXR 蛍光融合タンパク質の強制発現株に対して実施したところ、細胞質中に液胞を取り囲むようにミトコンドリア DNA が明瞭に観察される一方、DXR の輝点の位置には観察されなかった。電子顕微鏡でリボソームが観察されないこと、暫定ゲノムデータベース中に色素体遺伝子発現系のタンパク質 (ポリメラーゼや翻訳因子など) が存在しないことも整合しており、パーキンソンの色素体には DNA が存在しないことが示された。



③色素体移行シグナル配列のうち、色素体内腔への取り込みに重要だと予想されるフェニルアラニン残基をアラニン、イソロイシン、チロシンへと変異させた株を作出した。その全てにおいても少なくとも色素体の辺縁部まで輸送されていることが示されており、これは他の色素体と比較して妥当な結果である。

(3) 融合タンパク質の生化学的解析

DXR::mfGFP 強制発現株や移行シグナル変異導入株において、融合タンパク質の輸送に伴うプロセッシングを解析した。ウェスタンブロットティング法では、N 末端の推定移行シグナル配列が切断されていることが示唆された。これは他生物の色素体タンパク質と同様 Tic/Toc 輸送体が関与していることを支持する結果である。この点をより確実に実証する目的で mfGFP に存在するタグ配列を利用して融合タンパク質をアフィニティ精製した。現時点では精製後の収量が著しく少ないため十分な解析が行えていないが、今後精製法を改善し、質量分析によって実際の切断点を決



定することで結論を得たい。

以上の研究過程は当初の想定を超えて困難に満ちたものであったことから、遺伝子ノックダウンによってタンパク質輸送装置の性質を明らかにすることまでは及ばなかった。しかし、色素体維持機構の解明という観点からは、1)独自のDNAを欠くことを確定し、2)色素体包膜が4枚からなることを示し、3)すでに知られているTic/Toc輸送体が関与していることを示唆することができた。今後、本研究で確立した手法を用い引き続き研究を進めていくことで、パーキンサスの色素体やアピコプラストが、藻類色素体と起源を共にするのかどうかを実証できるものと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

①Fernández Robledo JA, Caler E, Matsuzaki M, Keeling PJ, Shanmugam D, Roos DS, Vasta GR. (2011) “The search for the missing link: a relic plastid in *Perkinsus*?” , International journal for parasitology, 41:1217-1229, DOI: 10.1016/j.ijpara.2011.07.008 (査読有)

②松崎素道(2011)「貝類寄生虫パーキンサスの生物学」藻類、59巻、14-16ページ(査読無)

[学会発表] (計19件)

①松崎素道「貝類寄生虫パーキンサスが明らかにするオルガネラ進化の最終局面」第81回日本寄生虫学会大会、2012年3月23日、兵庫医科大学(兵庫県西宮市)

②松崎素道、増田功、黒岩晴子、黒岩常祥、野崎久義、北潔「蛍光融合タンパク質を利用したパーキンサス色素体およびミトコンドリアの細胞学・生化学的解析」日本植物学会第75回大会、2011年9月17日、東京大学(東京都目黒区)

③ Matsuzaki M, Kuroiwa H, Kuroiwa T, Nozaki H, Kita K. “Biogenetic Aspect of DNA - lacking Plastid of the Oyster Pathogen *Perkinsus marinus*” 11th International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis, 2010年8月30日、トロムソ大学(ノルウェー)

④ Matsuzaki M, Kuroiwa H, Kuroiwa T, Nozaki H, Kita K. “Biochemical and microscopical studies of a vestigial plastid in *Perkinsus marinus*” 18th Meeting of the International Society for Evolutionary Protistology, 2010年7月3日、石川県立美術館(石川県金沢市)

⑤ Matsuzaki M, Kuroiwa H, Kuroiwa T, Nozaki H, Kita K. “A DNA-lacking plastid in the oyster pathogen *Perkinsus marinus*” , The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2009年9月8日、淡路夢舞台国際会議場(兵庫県淡路市)

⑥ Matsuzaki M, Kuroiwa H, Kuroiwa T, Nozaki H, Kita K. “A DNA-lacking plastid in the oyster pathogen *Perkinsus marinus*” , The 9th International Phycological Congress, 2009年8月6日、代々木オリンピックセンター(東京都渋谷区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松崎 素道 (MATSUZAKI MOTOMICHI)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：00511396

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし