

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 25 日現在

機関番号：17104

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650061

研究課題名(和文)細胞内共生細菌から探るミトコンドリアタンパク質輸送制御系の進化的形成解明

研究課題名(英文) Analysis of evolution of mitochondrial transport regulation system from endosymbiotic bacteria Wolbachia

研究代表者

北田 栄 (Kitada, Sakae)

九州工業大学・情報工学研究院・准教授

研究者番号：20284482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアの共生進化には2つの未解明な問題がある。一つは共生体ゲノムのほとんどが宿主の染色体遺伝子に転移したこと。二つ目は転移した遺伝子のタンパク質が、初期のミトコンドリア内に輸送されるシステムが構築されたこと。本研究では後者に注目する。真核生物と細胞内共生細菌ウォルバキア(あるいはボルバキアとも呼ぶ)のタンパク質をモデルとし、生物情報学と実験的解析からミトコンドリアの新しい進化的概念の提唱や実証を行った。この結果、ミトコンドリア輸送制御システムに類似性を持つウォルバキア遺伝子を複数発見した。また、ウォルバキア感染モデル哺乳動物細胞培養系の構築に成功した。

研究成果の概要(英文)：There are two unknown events in mitochondrial symbiotic evolution. One is most gene transfer of symbiont genome to host chromosome. The other is a dynamic system that the transferred gene products, mitochondrial proteins, import into mitochondria. In this research, we focused later evolutionary event in mitochondria. As model proteins from eukaryote and endosymbiotic bacteria Wolbachia, we tried to investigate and propos novel mitochondrial evolution using bioinformatics and experimental analyses. As the results, we found Wolbachia genes which could be homologous to genes of mitochondrial transport regulation system. Under cell culture experiment, we constructed mammalian cells system infected Wolbachia.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア ウォルバキア ボルバキア 進化 共生

### 1. 研究開始当初の背景

1967年マーグリリス(Lynn Margulis)は、原始的な真核細胞に好気性細菌の一種が細胞内に取り込まれ、さらに光合成細菌が内在し進化したとする仮説(共生説)を提唱した。唐突な仮説に当初は反対が多かったが、分子生物学の発展、種々のゲノム解析からこの共生説は現在受け入れられている。ミトコンドリアDNAと各種細菌ゲノムの比較では、プロテオバクテリア細菌がミトコンドリアに近縁である。なかでもリケッチア目ウォルバキア属は最もミトコンドリアに近い。ウォルバキアは節足動物や線虫類あるいは二枚貝の一部の細胞内に共生し、宿主の生殖に影響を与え、卵細胞を通じて母系垂直伝播する。また、ウォルバキアゲノムDNAが宿主ショウジョウバエ染色体に転移していることが発見された。遺伝子の転移はミトコンドリアなどの共生進化の過程でも起きたと考えられている。

宿主にコードされた共生体タンパク質が、どのようにして初期のミトコンドリアに輸送され、現在のミトコンドリアが形成されたのだろうか? 真核細胞内でのこのダイナミックな進化はほとんどわかってない。

研究代表者はウォルバキアに近いリケッチアの遺伝子にミトコンドリア輸送シグナルペプチダーゼに類似したタンパク質をみいだした。そのタンパク質は一部シグナルペプチダーゼ様の活性を示した。この結果は、寄生・共生体では別の機能をしていた遺伝子が、ミトコンドリアに進化する過程で不要になり、その遺伝子がミトコンドリアシグナルペプチダーゼに機能変化したと考えられる。

研究代表者は2007年の報告で、共生から初期のミトコンドリアに至る過程で、共生体が必要としなくなったタンパク質が機能進化し、タンパク質輸送システムに変化させたのではないかと議論した。共生体からミトコンドリアへ進化してきた過程で、どのように数1000ものタンパク質が元のオルガネラに運ばれるようになったのか? 真核細胞に普遍的で葉緑体にもあてはまる根本的なこの問題は全くわかっていない。進化を実験的に再現することは困難であるが、今ある生命情報を精査し、その進化の痕跡を手掛かりに、実験によってタンパク質の輸送システム構築の由来や進化のダイナミックを議論することは可能であろう。ほとんどの研究者が未だ行っていないオルガネラ進化の実験的研究は、萌芽的で新しいものになると考えられる。今回の研究でもこの仮説を研究の主軸におき、タンパク質輸送システム獲得の分子進化、機能進化の解明にチャレンジしていく。

多くの研究者は、統計数理による分子進化的解析から、細菌とミトコンドリアの共生進化の関係を示し、明確な類似性があることはわかってきた。しかし、これまでの

ような解析だけでは、個体レベル、オルガネラレベル、タンパク質分子レベルの階層的な進化モデルを描くことは難しい。今回、その一部の解明にチャレンジする。

この一連の研究から、真核生物の進化における新しい仮説やモデルが得られると期待できる。共生説が真核生物の進化の一部のフレームとすれば、今回の研究は、そのキャンパスの一部に線を引き、色を添える作業の第一歩かもしれない。この部分的な提案や解明をきっかけに、多くの研究者が共生説の具体的な中身、仕組み、構成に興味をもち、キャンパスがいつか科学的論理の絵の具で埋め尽くされ、共生説による進化の本質的写真が浮かび上がると期待している。ミトコンドリアの機能の多くは理解されてきた。今回の研究は共生段階でそれがどのように構築されたのか、その過程を理解しようとする研究である。この成果は生命科学の応用面でも大きな意味を持つ。ミトコンドリアがどのように進化し構成されてきたかを知ることは、そのオルガネラを操作しようとするにもつながる。すなわち、オルガネラ機能を改変する技術、あるいはこの機能を応用する技術などオルガネラ工学の発展に大きく寄与するであろう。

### 2. 研究の目的

ミトコンドリアの共生進化には2つの未解明な問題がある。一つは共生体ゲノムのほとんどが宿主の染色体遺伝子に転移したこと。二つ目は転移した遺伝子のタンパク質が、初期のミトコンドリア内に輸送されるシステムが構築されたこと。本研究では後者に注目する。真核生物と細胞内共生細菌ウォルバキア(あるいはボルバキアとも呼ぶ、学術名 *Wolbachia*)のタンパク質をモデルとし、生物情報学と実験的解析からミトコンドリアの新しい進化的概念の提唱や実証を行う。共生進化の過程で新しく生まれたミトコンドリアタンパク質の輸送と制御システムに関係する候補タンパク質をウォルバキアから検索し、それらのタンパク質の機能を解析し、このシステムの進化的形成を明らかにする。またウォルバキアを検出するための特異的な抗体を作成する。さらに、哺乳動物細胞へのウォルバキアの感染を試み、細胞内共生のモデル細胞系を構築する。

### 3. 研究の方法

(1) KEGG(<http://www.genome.jp/kegg/>)から[KEGG GENES]を選択し、[Complete genomes]の全生物種から出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を選択した。そこで、[mitochondrial processing peptidase]あるいは[Tim][Tom]と検索し、MPP(MAS1)とMPP(MAS2)、Tim、Tomそれぞれの全アミノ酸配列をテキストファイルにコピーして保存した。また同様に *Wolbachia* を選択し、

その中のオナジショウジョウバエ由来 wRi、wNo、wHa、キロショウジョウバエ由来 wMeI、マレー糸状虫由来 wBm、オンコセルカ糸状虫由来 w0o、ネッタイエカ由来 wPi から種を選択した。[Taxonomy]を選択、Entrez recodes内の[Protein]を選択しウォルバキアのゲノムにコードされている全タンパク質を表示させた。そこで[Send to]の File を選択し、Format を[FASTA]に選択して、ファイルをダウンロードした。そのファイルをテキストファイルにコピーして保存した。この過程をウォルバキア7種それぞれ同様に行った。

学科の端末において BLAST 解析を行った。まず端末に取得した MPP( MPP と MPP)、Tim と Tom のファイルとウォルバキア7種それぞれのファイルをコピーした。

ssh ユーザー名

@jupiter01.edu.bio.kyutech.ac.jp

上記のコマンドで学科の端末にログインし、コピーしたファイルが存在するディレクトリに移動した。ssh とは、学科端末にリモートアクセスするための暗号であり、外部からのアクセスを制限している。また jupiter01 とは学科 CPU の愛称である。

formatdb -i ファイル名 -p T -o T

ファイル同士で BLAST はできないので、上記のコマンドで片方のデータベース化を行った。-i ファイル名でデータベース化するファイルを指定、-p T でアミノ酸配列であることを指定、-o T でインデックスを作成した。blastall -p blastp -d データベース名 -i ファイル名 -o 出力ファイル名

上記のコマンドで BLAST を行った。blastall でファイル内のすべての配列を BLAST 検索するように指定し、-p blastp でアミノ酸配列の BLAST を行うことを指定した。-d データベース名で対象とするデータベースを指定、-i ファイル名で BLAST にかけるファイルを指定、-o 出力ファイル名で BLAST 結果を出力するファイルを作成した。次に出力ファイルを Excel で表示し、E-value 値が  $10^{-4}$  以下のウォルバキアタンパク質に絞った。この操作を / MPP (あるいは Tim、Tom) vs ウォルバキア7種それぞれで行い、類似性の高いウォルバキアタンパク質を絞り込んだ。絞り込んだウォルバキアタンパク質を MPP、Tim あるいは Tom 類似推定タンパク質とした。

上記で絞り込んだ類似推定タンパク質同士で BLAST 解析を行った。Identity が 80%以上かつ E-value 値が 0.0 であるタンパク質同士で分けて、それを 1 つのグループとした。選出した wBm、wMeI、wRi の類似推定タンパク質において、分子間全体の相同性を調べるために、GenomeNet のツールである ClustalW(<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>)を用いて FASTA 解析を行った。Output Format を[CLUSTAL]に設定し、ファイルを選択できるところに比較する配列(MPPとMPPあるいはTim、Tom類似推定タンパク質)を保存したテキストファイルを選択し解析を行っ

た。また結果から、MPP が持つ Gly loop 領域、MPP が持つ活性部位が MPP 類似タンパク質に保存されているか、配列全体から確認した。保存されていた推定類似タンパク質を最終的な MPP、Tim あるいは Tom ホモログ候補タンパク質とした。

MPP についてはこれと類似するようなタンパク質を プロテオバクテリア属でウォルバキアと近縁であるリケッチア *Rickettsia*、同じく プロテオバクテリア属のエリスロバクター *Erythrobacter*、プロテオバクテリア属のビブリオ *Vibrio* から BLAST 解析を用いて探索した。ただし、条件として E-value 値  $10^{-10}$  以下と設定した。MPP と比較的相同性が高かったウォルバキアの MPP ホモログ候補タンパク質が系統的に近縁であるかを調べるために、ヒト *Homo sapiens* と出芽酵母の MPP( MPP、MPP)とウォルバキアの MPP ホモログ候補タンパク質、MPP と類似性が高いタンパク質(リケッチア、エリスロバクター、ビブリオ)で系統樹作製を行った。ClustalW より、対象のタンパク質で系統解析し、Select tree menu から [Rooted phylogenetic tree(UPGMA)]を選択し、系統樹を作成した。

(2) ウォルバキアの膜表面にあるタンパク質 *Wolbachia* surface protein (WSP)精製標品を  $0.2\mu\text{m}$  フィルターでフィルター滅菌し、使用する WSP 精製標品と等量のアジュバント (1 回免疫および 2 回免疫: Freund Complete Adjuvant (以降 FCA)、3 回免疫: PBS(フィルター滅菌したもの)をルアーロック付ディスクポシリンジと三方活栓を用いて混合した。その混合液を WSP 投与条件(1 回免疫: 0.06mg、2 回免疫: 0.03mg、3 回免疫: 0.01mg)だけマウスの腹腔内に投与した。投与したマウスの個体数は 2 匹とした。投与は 2 週間おきに計 3 回行い、採血は 1 回免疫前と 3 回免疫 3 日後、13 日後、28 日後に行った。採血した血液は 37 で 1 時間インキュベート後、4 で一晩静置し、その後 3,000rpm 4 で 10 分遠心して血清を得た。

(3) マウス線維芽細胞へのウォルバキアの細胞内共生を試みるため、ヒメトビウカ由来ウォルバキアが共生しているカイコ卵巣由来細胞 (BmN4/w と示す)と、2 種類のマウス線維芽細胞 (NIH3T3、L929)の共培養を行った。2 種類のマウス線維芽細胞を添加したそれぞれのフラスコに、シリンジと針で細胞破壊処理を行った BmN4/w 細胞を添加した。3% HEPES 含有培地、27 条件下で培養を行い、マウス線維芽細胞の継代を続けた。また、Control としてカイコ卵巣由来細胞 (BmN4)とマウス線維芽細胞の共培養を行った。継代を行う毎に細胞を一部回収し、DNA 抽出を行った。この DNA を鋳型とし、ウォルバキア 16S rRNA 遺伝子、及びカイコのミトコンドリア 16S rRNA 遺伝子に対するプライマーを用いて PCR を行い、アガロースゲル電気泳動により各増

幅 DNA 断片を確認した。さらに、電気泳動で観察された増幅 DNA 断片が、ウォルバキア遺伝子であることを遺伝子配列から確認するために、シーケンスを行った。また、さらにマウス繊維芽細胞へのウォルバキア共生確認を行うために、定量 PCR を用いたウォルバキア増幅確認、抗生物質処理における形態観察及びウォルバキア定量、及びギムザ染色と抗 WSP 抗体を用いた免疫染色法によるウォルバキア共生確認を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 出芽酵母の MPP (MPP、MPP) とウォルバキア 7 種 (wBm, wHa, wMel, wNo, wOo, wPi, wRi) の BLAST による相同性解析を行った。E-value 値  $10^{-4}$  以下という条件下で、まず MPP だけに対して類似性が高かったタンパク質はウォルバキアどの種においても存在しなかった。次に MPP だけに対して類似性が高かったタンパク質はそれぞれ wBm で 4 種類、wHa で 2 種類、wMel で 3 種類、wNo で 4 種類、wPi で 2 種類、wRi で 4 種類、計 19 種類存在した。そして、MPP とウォルバキア 7 種を双方向で BLAST 解析したとき、双方向とも E-value 値が  $10^{-4}$  以下であるウォルバキアタンパク質を MPP と MPP どちらに対しても類似性が高いタンパク質とすると、wBm で 2 種類、wHa で 4 種類、wMel で 5 種類、wNo で 2 種類、wOo で 9 種類、wPi で 4 種類、wRi で 3 種類、計 29 種類、合計 48 種類存在した。しかし、全配列を見比べたところ、全く同じ配列をもつ同一遺伝子が存在していることが分かった。そのため、この 48 種類のタンパク質はデータベース上に登録されてあるタンパク質別でみた合計であることが分かった。そこで同一遺伝子を 1 つに絞ったところ、MPP に対して類似性が高かったタンパク質が wBm で 2 種類、wHa で 1 種類、wMel で 1 種類、wNo で 2 種類、wPi で 1 種類、wRi で 2 種類の計 9 種類、MPP と MPP どちらに対しても類似性が高かったタンパク質は wBm で 1 種類、wHa で 2 種類、wMel で 2 種類、wNo で 1 種類、wOo で 3 種類、wPi で 2 種類、wRi で 1 種類の計 12 種類、合計 21 種類のウォルバキアタンパク質を選出できた。

BLAST 解析から選出した 21 種類のウォルバキアタンパク質を MPP 類似推定タンパク質とし、その 21 種類のタンパク質同士で BLAST 解析した結果、類似性が高いタンパク質同士で分けると 7 種類のタンパク質 (wBm, wHa, wMel, wNo, wOo, wPi, wRi それぞれ 1 種類) × 3 グループに分けることができた。グループ内のタンパク質は Identity が約 80% 以上で E-value 値は 0.0 であった。また、ヒト、出芽酵母の MPP とそれぞれのグループの wBm, wMel, wRi のウォルバキアタンパク質で FASTA 解析し、活性部位や Gly loop 領域があるか確かめた結果、まず 1 つ目のグループのタンパク質に活性部位は保存されておらず、2 つ目のグループのタンパク質には活性部位の

ほとんどが保存されていた。最後に 3 つ目のグループのタンパク質は活性部位が完全に保存されていた。また、Gly loop 領域はどのグループのタンパク質にも保存されていなかった。ヒトと出芽酵母の MPP、ウォルバキア・リケッチア・エリスロバクター・ピブリオの MPP ホモログ候補タンパク質系統樹を作成した結果、MPP においてウォルバキアが最も近いことが分かった。また、MPP と MPP が早い段階で枝分かれしていることが分かった。

Tom 及び Tim に対する BLAST 解析は、アミノ酸配列を断片的に照らし合わせて比較するため、ミトコンドリアからウォルバキアに向けて解析を行うのと、ウォルバキアからミトコンドリアに向けて解析を行うのとでは異なった結果が得られた。ミトコンドリアからウォルバキアに向けて解析を行った結果、E-Value 値が  $0.0 \sim 1.0 \times 10^{-2}$  の条件を満たすタンパク質は存在しなかった。ウォルバキアからミトコンドリアに向けて解析を行った結果、E-Value 値が条件を満たすタンパク質は存在したが、 $9.9 \times 10^{-4}$  を下回るタンパク質は存在しなかった。したがって、E-Value が  $1.0 \times 10^{-3} \sim 1.0 \times 10^{-2}$  であるタンパク質に絞られた。それらのタンパク質から、Identity を  $0 \sim 39\%$ 、 $40 \sim 69\%$ 、 $70 \sim 100\%$  に分類したところ、70% 以上の Identity を示すタンパク質は存在しないことが分かった。したがって、BLAST 解析から得られる類似性の高いタンパク質は、ウォルバキアからミトコンドリアに向けて解析した結果から、E-Value 値が  $1.0 \times 10^{-3} \sim 1.0 \times 10^{-2}$  であり、かつ Identity (%) が  $40 \sim 69\%$  の条件に該当するタンパク質が、統計的に類似性が高いと考え、該当するタンパク質を選出した。選出した結果、89 個のタンパク質が該当していた。しかし、このタンパク質の中には同じアミノ酸配列をもつタンパク質も存在していたため、同じウォルバキアタンパク質に該当するタンパク質に限り、一つのタンパク質として 57 個のタンパク質に絞り直した。57 個のタンパク質の機能と性質を調査した。ミトコンドリアのタンパク質輸送システムに関連していそうな機能を持つタンパク質を選出し、推定類似タンパク質とした。Tim22 には、wRi, wMel から膜貫通タンパク質複合体 (シトクロムオキシダーゼ) が類似していた。Tim54 には wPip から内膜タンパク質が類似しており、Tim17 には wHa, wMel, wRi, wBm から、輸送体や共輸送体が類似していることが分かった。このうち、wBm 以外のタンパク質は、全て同じアミノ酸配列を示していた。wHa から類似性を示したタンパク質は Tim17 だけであったため、wHa の共輸送体を代表のタンパク質とした。Tom40 には、wOo からタンパク質分解ペプチドを推定類似タンパク質として見出した。全てのミトコンドリアタンパク質から選出したかったが、Tim18 と、3 つの Small Tim たちからは輸送

に関連しているようなタンパク質は見当たらず、また、Tim23 においては、E-Value 値を  $2.0 \times 10^{-2}$  という条件まで範囲を広げたところ、wBm から膜タンパク質、wNo から外膜に存在する分泌系タンパク質を発見することが出来た。全 8 種の推定類似タンパク質が選出できた。Clustal W で、推定類似タンパク質と見なした 8 種の推定類似タンパク質を FASTA 解析して相同性を計算した結果、1.81 ~ 14.49 という、全体的に低い数値の結果が得られた。アミノ酸配列の相同な配列が並ぶ箇所が確認でき、類似部分の確認が出来た。

(2) Balb/c Nsea マウス 2 匹は腹腔に WSP 免疫を行い、Western blotting により抗 WSP 抗体の産生の有無を調べた。その結果、腹腔免疫したマウス 1 匹(D)の血清を用いた Western blotting では WSP のバンドを検出できた。また、検出も 1 回目採血から 3 回目採血の血清すべてにおいて確認され、WSP のタンパク量も 5ng、10ng、20ng すべてにおいて検出できた。採血回数の間では検出強度にはほとんど変化は無く、そのどれも 20ng が最も大きい強度を示した。このことから腹腔免疫したマウス 1 匹において抗 WSP 抗体が産生されていることが分かった。

BmN4/w 細胞に感染しているウォルバキアがもつ WSP を抗 WSP 抗体が特異的に認識するかどうかを Western blotting により調べた。その結果、BmN4/w 細胞 (W) において細胞数  $10^6$  個で WSP を検出し、 $10^7$  個においてもわずかではあるが WSP を検出した。また、1 回目採血から 3 回目採血の血清すべてにおいて同様のバンドパターンで検出された。さらに、バンドの分子量も約 25kDa を示し、DNA シーケンスにより計算した WSP の推定分子量約 24kDa と近い分子量を示した。このことから抗 WSP 抗体が培養昆虫細胞内のウォルバキアが持つ WSP を特異的に認識することが分かった。

(3) 形態観察の結果、BmN4/w細胞と共培養したマウス線維芽細胞(NIH3T3/w, L929/wと示す)は、BmN4/w細胞に見られるような細胞同士の接着や、細胞の変色が一部の細胞で観察された。また、PCR・アガロースゲル電気泳動の結果、ウォルバキア16S rRNA遺伝子のPCR産物は継続して検出されたが、カイコのミトコンドリア16S rRNA遺伝子のPCR産物は、2回目継代以降大きく減少していることが確認された。さらに、シーケンスの結果、検出されたPCR産物は、ウォルバキア16S rRNA遺伝子であることが確認された。また、定量PCRを用いたウォルバキア増幅確認の結果、ウォルバキア16S rRNA遺伝子数の増加が確認された。抗生物質処理における形態観察の結果、抗生物質を添加した培地で培養を行った共培養細胞は、正常なマウス線維芽細胞同様の形態変化が見られたのに対し、抗生物質を添加していない培地で培養を続けた共培養細胞は、細胞同士の

の接着や浮遊が多く観察された。また、抗生物質処理におけるウォルバキア定量の結果、抗生物質を添加した培地で培養を行った共培養細胞では、ウォルバキアの遺伝子数が減少していることが確認された。さらに、ギムザ染色によるウォルバキア共生確認の結果、マウス線維芽細胞の細胞質内に赤紫色に染色されたウォルバキアと見られるものが点在していることが確認された。NIH3T3/c 細胞、NIH3T3/w 細胞の免疫蛍光染色の結果、NIH3T3/c 細胞においては、ウォルバキア膜タンパク質であるWSPのシグナルは確認されず、マウス線維芽細胞の核のみで核酸を染色する DAPIのシグナルが確認された。一方、NIH3T3/w 細胞においては、マウス線維芽細胞の細胞質内にWSPとDAPIのシグナルが確認された。さらに、DAPIのシグナルとWSPのシグナルが重なることが確認され、大きさが約  $1 \mu\text{m}$  程の長細い形状であることが確認された。また、L929/c 細胞、L929/w細胞の免疫蛍光染色の結果においても同様に、L929/c細胞においては、WSPのシグナルは確認されず、マウス線維芽細胞の核のみでDAPIのシグナルが確認された。一方、L929/w細胞においては、マウス線維芽細胞の細胞質内にWSPとDAPIのシグナルが確認された。さらに、DAPIのシグナルを囲うようにWSPのシグナルが確認され、大きさが約  $1 \mu\text{m}$  程であることが確認された。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

木本 芙美子、野田 博明、北田 栄、細胞内共生細菌ウォルバキアの哺乳動物培養細胞への共生モデル系構築の試みとその内部共生の解析、第 38 回分子生物学会年会・第 88 回生化学会大会合同大会 BMB2015、2015 年 12 月 3 日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.bio.kyutech.ac.jp/~kitada/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

北田 栄 (KITADA, Sakae)

九州工業大学・情報工学研究院・准教授

研究者番号：20284482