

平成 29 年 4 月 25 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26840124

研究課題名(和文)ケルコゾア生物における“ミトコンドリア型解糖系”の理解に向けた基礎的研究

研究課題名(英文)Fundamental studies on "mitochondrial glycolytic pathway" in cercozoan organisms

研究代表者

中山 卓郎 (Nakayama, Takuro)

筑波大学・計算科学研究センター・研究員

研究者番号：70583508

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)：本研究では、ケルコゾア生物群における“ミトコンドリア型(Mt型)解糖系”の多様性・特性・進化を把握することを目的として研究を行った。ケルコゾア生物群主要6系統中5系統の生物群について、網羅的な“Mt型解糖系”酵素の探索を行ったところ、既に発見されている“Mt型解糖系”に相同な経路を持つのは2系統のみであることが明らかとなった。このことから、当該代謝経路はケルコゾア生物群の一部系統で遺伝子水平転移を通じて獲得された可能性が高いと考えられる。また本研究では“Mt型”解糖系酵素であるTPI-GAPDH融合タンパク質の抗体作成を試み、良好な特異性を持つ抗体が得られた。

研究成果の概要(英文)：It has been widely accepted that the glycolysis occurs only in the cytosol. In contrast to this view, eukaryotic species in Cercozoa and Stramenopila have been proposed to possess unique glycolytic pathway reside in mitochondria. To gain better understanding about the mitochondrial glycolytic pathway in cercozoans, glycolytic genes in representative species from major cercozoan subgroups were exhaustively searched. A combination of homology searches and phylogenetic analyses showed that glycolytic pathway expected to reside in mitochondria are limited to only a part of the diversity of Cercozoa. The result suggests that the mitochondrial glycolytic pathway is not an ancestral feature of the whole cercozoans but introduced into the lineage after the diversification. In the course of the project, an antibody for a mitochondrial glycolytic enzyme of an cercozoan species has been successfully produced and is expected to be useful to confirm the subcellular localization of the protein.

研究分野：進化細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア型解糖系 原生生物 解糖系

1. 研究開始当初の背景

解糖系は細胞内における全代謝経路の中核を担う。この経路は真核生物・真正細菌・古細菌を問わず、ほぼ全ての生物において保存されていることから、生物の成り立ちを考える上でも非常に重要な経路と言える。解糖系に関する研究は、主に動物や植物などのモデル生物を用いて行われ、その結果が普遍的なものとして扱われているが、近年これまでの知見に当てはまらない特徴を持つ解糖系酵素が原生生物から報告されている。

真核生物細胞における解糖系には 10 の酵素が関与しているが、これら解糖系酵素群の反応は全て細胞質内で進行すると考えられ、このことは普遍的な事実として広く受け入れられている。しかしながら、単細胞真核生物である珪藻にはミトコンドリアに輸送される解糖系酵素が存在する。TPI (triosephosphate isomerase) および GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) は共に解糖系の中盤を担う酵素であるが、単細胞生物である珪藻を含むストラメノパイル生物群はこの TPI と GAPDH が融合したタンパク質を保持している。興味深いことにこの融合タンパク質の N 末端にはミトコンドリア輸送配列が見られ、実際に珪藻細胞のミトコンドリアに特異的に局在することが免疫電子顕微鏡法により証明されている。また研究代表者らのこれまでの研究により、珪藻細胞には TPI-GAPDH 融合タンパク質以外にも、ミトコンドリアに局在すると考えられる解糖系酵素が存在する可能性も示されている。

研究代表者はこれまでの研究の中で、珪藻とは系統的にかけ離れた真核生物グループである、ケルコゾア生物群の一部の種も TPI-GAPDH を持つことを発見した。ケルコゾア生物群は多様な原生生物によって構成される真核生物のグループで、動物や植物の多様性にも匹敵する非常に大きな生物群であることが近年の分子系統解析から明らかとなっている。“ミトコンドリア型”解糖系酵素である TPI-GAPDH がケルコゾア生物から発見されたことは、ミトコンドリアにおいて機能する解糖系が、珪藻を含むストラメノパイル生物のみに限られた例外では無いということを示している。この知見は真核生物全体における解糖系の多様性を理解する上で重要であるが、ケルコゾア生物における“ミトコンドリア型”解糖系の分布・多様性や、実際の細胞内における局在など、基礎的なデータが得られていない状態であった。

2. 研究の目的

前述の背景を踏まえ、本研究ではケルコゾア生物群に見られる“ミトコンドリア型”解糖系について、下記の項目を目的として研究を行った。

(1)ケルコゾア生物における“ミトコンドリア型”解糖系の全容解明

これまでに“ミトコンドリア型”解糖系酵素の探索が行われていないケルコゾア生物に関して、次世代シーケンシングをベースとした“ミトコンドリア型”解糖系酵素遺伝子の網羅的探索を行い、ケルコゾア生物全体における“ミトコンドリア型解糖系”の多様性を解明する。

(2)ケルコゾア生物を用いた“ミトコンドリア型”解糖系酵素の局在確認

*in silico*解析によって“ミトコンドリア型”と推測される解糖系酵素 TPI-GAPDH 融合タンパク質に関して、ケルコゾア生物細胞内における局在を細胞生物学的に確認する。

ミトコンドリア型解糖系は現在の真核生物における代謝経路の常識に一石を投じる新しい概念である。真核生物の一大グループであるストラメノパイル生物群およびケルコゾア生物群に属する種が、ミトコンドリア型と予想される解糖系酵素を保持していることを踏まえると、この経路は真核生物の進化を考える上でも重要であると考えられる。本研究の遂行によりストラメノパイル生物群に加えケルコゾア生物群における多様な“ミトコンドリア型解糖系”の基礎データが拡充され、真核生物全体における当該経路の今後の研究基盤となる知見が補完されると考えた。

3. 研究の方法

ケルコゾア生物群は大きく分けて 6 つの系統的グループに分けられるが、このうち 2 つのグループの代表種においてのみ“ミトコンドリア型”解糖系酵素の網羅的探索が行われている。そのグループの 1 つ「インブリカータ」の代表生物 *Paulinella chromatophora* では“ミトコンドリア型解糖系”TPI-GAPDH が見られる他に、その下流の解糖系酵素にも“ミトコンドリア型”が存在することが明らかとなっている。対して、もう一方のグループ「クロララクネア」の代表種 *Bigelowiella natans* のゲノム情報を用いた網羅的解析においては TPI-GAPDH 融合タ

ンパク質は見つかっていなかった。

本研究ではより詳細なケルコゾア生物群内における”ミトコンドリア型解糖系”の多様性把握に向けて、ケルコゾア生物群主要6系統のうち、前述2グループを除く系統においてRNA-seqを行い、推定される全遺伝子に対する網羅的な探索を行った。

RNA-seqの解析対象として選定したのは主要6系統のうちインブリカータに比較的近縁な系統であるテコフィローサから1種、またインブリカータ・テコフィローサよりも進化的に早期に分岐したと考えられる系統であるグラノフィローサから1種である。それぞれ未記載種であり本報告では便宜的にUnidentified Thecofilosan (以下UT) およびUnidentified Granofilosan (以下UG) とする。UT およびUG について、それぞれバクテリアを餌とした従属栄養培養を行い、RNAを抽出した。RNAサンプルはIllumina HiSeq2000 およびHiSeq2500により解析され、得られたショートリードは*de novo* トランスクリプトームアセンブラであるTrinityによってアセンブルされた。本研究では*Paulinella chromatophora* から既に見ついている”ミトコンドリア型解糖系”タンパク質配列をリファレンスとして使用し、相同性検索および系統解析を用いて2系統の原生生物における解糖系タンパク質配列の探索を行った。また、これに付随して近年公開されたケルコゾア生物のトランスクリプトームデータおよび、ケルコゾア生物に比較的近縁な原生生物の分子データからも”ミトコンドリア型解糖系”タンパク質配列の探索を試みた。

”ミトコンドリア型”と推測される解糖系酵素TPI-GAPDH融合タンパク質に関して、ケルコゾア生物細胞内における局在を確認するため、当該タンパク質の抗体作成を行った。リファレンス配列である*Paulinella chromatophora*のTPI-GAPDHアミノ酸配列の中で、抗原性が良好と判断されたTPI領域の15アミノ酸配列を元にペプチドを合成し、それを抗原とした抗血清をウサギを用いて作成した。得られた抗血清の特性はウェスタンブロット法により確認した。

4. 研究成果

”ミトコンドリア型”解糖系の網羅的探索が未だに行われていないケルコゾア系統のうち、テコフィローサおよびグラノフィローサ生物群に属する未記載ケルコゾア生物UT およびUG についてRNA-seq解析を行い、それぞれのサンプルから24.8 Gbp

(UT)、41.3 Gbp (UG) の塩基配列を得た。トランスクリプトーム*de novo*アセンブリングを経てそれぞれ約84,000 (UT) および約35,000 (UG) のタンパク質コード遺伝子配列が得られた。*Paulinella chromatophora* の”ミトコンドリア型解糖系”タンパク質配列をリファレンスとしてそれぞれの遺伝子カタログから相同性検索により解糖系タンパク質を探索したところ、”ミトコンドリア型解糖系”に特異的に見られるTPI-GAPDHタンパク質遺伝子はテコフィローサ生物であるUTにおいてのみ発見され、グラノフィローサ生物UGからは発見されなかった。一方、グラノフィローサ生物の遺伝子カタログからは細胞質型と考えられる解糖系タンパク質遺伝子は全て検出できたことから、グラノフィローサUGはTPI-GAPDH遺伝子を欠くものと考えられた。次に、ケルコゾア生物に見られる”ミトコンドリア型解糖系”酵素の進化的知見を得るため、ケルコゾアにおける解糖系遺伝子の分子系統解析を行った。この解析においては新たにRNA-seqを行った2種のデータを含め、公共データベースにおいて公開されたケルコゾア生物2種のトランスクリプトームデータが含まれ、主要ケルコゾア6系統のうち、インブリカータ・テコフィローサ・グラノフィローサ・クロラクネア・エンドミクサの5系統が対象となった。その結果、*Paulinella chromatophora* において既に発見されている”ミトコンドリア型解糖系”に相同な経路を持つのは*P. chromatophora* を含むインブリカータおよびテコフィローサ系統のみであることが明らかとなった。インブリカータとテコフィローサはケルコゾア生物の系統内で比較的近縁であり、過去の研究において単系統性が示唆されている。これを踏まえると本解析結果は、①インブリカータおよびテコフィローサの共通祖先において”ミトコンドリア型解糖系”酵素を獲得した可能性を提示するが、②ケルコゾア生物群の共通祖先が既に”ミトコンドリア型解糖系”酵素を保持していたが、他の系統では二次的に失った、という可能性も排除できない。そこで、この2つの仮説を検証するため、ケルコゾア生物群が含まれるスーパーグループ・リザリアの中でケルコゾア生物群に含まれない系統の生物について、”ミトコンドリア型解糖系”の代表的なタンパク質である、TPI-GAPDH遺伝子の探索を行った。その結果、ケルコゾア生物以外のリザリア生物からはTPI-GAPDH遺伝子は認められず、”ミトコンドリア型解糖系”はケルコゾア生物群の

一部系統で獲得された可能性が高い。TPI-GAPDH がケルコゾア生物群においてどのように獲得されたのかをインブリカータ、テコフィローサ、珪藻を含むストラメノパイル生物群に見られる全てのTPI-GAPDH配列を用いて、GAPDHの多重アライメントを作成し、クロラクニオン藻のGAPDH配列を外群として最尤法により系統樹を推定した。置換モデルは座位ごとの進化速度の隔たりを考慮した2つのモデル(LG4XおよびC60)を使用した。この系統解析では大まかな分岐に高い統計的支持は得られなかったが、解析に使用した2つのモデルどちらにおいても、最尤系統樹ではケルコゾア生物群の配列がストラメノパイル生物群の配列の系統の内部から分岐した。このことはケルコゾア生物がストラメノパイル生物群からの遺伝子転移によってTPI-GAPDHを獲得したことを示唆している。

本研究では”ミトコンドリア型”と推測される解糖系酵素 TPI-GAPDH 融合タンパク質に関して、ケルコゾア生物の細胞内局在確認を行なうことを目指し、当該タンパク質の抗体作成も行った。TPI領域の配列を元にしたペプチドを用いてウサギを免疫し、抗血清を得た。*Paulinella chromatophora* の全タンパク質をSDS-PAGEによって分離し、作成した抗血清を用いてウェスタンブロットを行ったところ、予想されるTPI-GAPDHの分子量(65.6 KDa)の位置に強いシグナルが見られた。他のバンドも確認されたが全てマイナーなシグナルであったことから、良好な特異性を持つ抗体が得られたものと判断した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 卓郎 (NAKAYAMA, Takuro)

筑波大学・計算科学研究センター・研究員
研究者番号: 70583508

(2) 研究協力者

矢吹 彬憲 (YABUKI, Akinori)

海洋研究開発機構・海洋生物多様性研究分野・研究員

白鳥 峻志 (SHIRATORI, Takashi)

筑波大学・生命環境科学研究科・研究員