

平成 30 年 4 月 16 日現在

機関番号：27103

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07176

研究課題名(和文) 嫌気環境に対する適応進化の初期段階にある退化的ミトコンドリアの機能解明

研究課題名(英文) Illumination of early stages of mitochondrial adaptation to low oxygen

研究代表者

瀧下 清貴 (Takishita, Kiyotaka)

福岡女子大学・国際文理学部・教授

研究者番号：90392951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：RNA-seq解析により、嫌気性自由生活型のストラメノパイル生物 *Cantina marsupialis* が有する退化ミトコンドリアの代謝機能を推定した。その結果、ハイドロジェノソームで機能する酵素が退化ミトコンドリア内で機能していることが示唆された。その一方で好気性ミトコンドリアに普遍的に存在する酵素群が退化ミトコンドリア内で機能していることも示唆された。また、電子伝達系では複合体IIを構成するサブユニットをコードする転写産物のみ検出された。*C. marsupialis*の退化ミトコンドリアでは複合体IIはコハク酸デヒドロゲナーゼとして機能していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The biochemical characteristics of an mitochondrion-related organelles (MROs) in the free-living anaerobic protist *Cantina marsupialis*, which represents an independent lineage in stramenopiles, were inferred based on RNA-seq data. We found transcripts for proteins known to function in one form of MROs, the hydrogenosome. In addition, MROs in *C. marsupialis* were also shown to share several features with canonical mitochondria, including amino acid metabolism and an "incomplete" tricarboxylic acid cycle. Transcripts for all four subunits of complex II (CII) of the electron transport chain were detected, while there was no evidence for the presence of complexes I, III, IV, or F1Fo ATPase. CII in MROs of *C. marsupialis* may function as succinate dehydrogenase rather than as fumarate reductase.

研究分野：原生生物学

キーワード：原生生物

1. 研究開始当初の背景

これまで、ミトソームのような「ミトコンドリアの成れの果てオルガネラ」には多くの研究者が注目し、その機能や進化に関する知見が得られてきているが、その一方でミトコンドリアからの縮退過程における初期段階への理解は大きく立ち遅れていた。この問題を解決するためには、縮退過程の初期段階にあるミトコンドリアを持つ生物を研究対象とすることが必要である。近年、ストラメノパイルと呼ばれる系統群に属し、嫌気性の腸管寄生原虫である *Blastocystis* は、トリコモナスのハイドロジェノソームやランブル鞭毛虫のミトソームとは明らかに異なる退化ミトコンドリアを保持していることが示された。その退化ミトコンドリアにはオルガネラゲノムおよび比較的明瞭なクリステ構造が存在するだけでなく、MRO 内膜をまたいだプロトン密度勾配の形成によって生じる膜電位も確認されており、典型的なミトコンドリアの特徴が認められていた。

2. 研究の目的

申請者らは真核生物の一大グループであるストラメノパイル系統群に属する自由生活型の嫌気性原生生物 *Cantina marspialis* の培養株確立に成功した。*C. marspialis* の細胞内には、比較的明瞭なクリステ構造が確認されるものの、明らかに退化なミトコンドリアが存在していた。そこで本研究では *C. marspialis* の退化ミトコンドリア内で機能すると予想されるタンパク質をコードする遺伝子を網羅的に探索し、その情報を基に当該オルガネラの全代謝系を推定することとした。さらに、典型的なミトコンドリア、および他の嫌気性真核生物が有する様々な縮退段階にある退化ミトコンドリアの機能と比較することで、*C. marspialis* のオルガネラがミトコンドリア縮退過程のどの段階にあるかを分子レベルで検証することとした。

3. 研究の方法

C. marspialis の核ゲノムにコードされ(細胞質で翻訳され)退化ミトコンドリアへ輸送されて機能するタンパク質を同定することによって、*C. marspialis* の MRO 内で働く代謝系を推定した。具体的には大規模発現遺伝子解析 (RNA-Seq) を行った後、相同性検索、分子系統解析および輸送シグナル配列の検出によって探索した。推定された本生物の退化ミトコンドリアの代謝系と、典型的ミトコンドリアおよび既知の嫌気性真核生物が有する退化ミトコンドリアの代謝系とを比較することによって、*C. marspialis* の退化ミトコンドリアは、その進化の過程でどのような機能を消失したのか、あるいは獲得したのかを把握した。さらに、HPLC を用いて *C. marspialis* の退化ミトコンドリア内で機能するキノンの同定も行った。

4. 研究成果

RNA-seq 解析により、*C. marspialis* が有する退化ミトコンドリアの代謝機能を推定した結果、退化ミトコンドリアの一種であるハイドロジェノソームでピルビン酸代謝に関与することが知られているピルビン酸:フェレドキシン酸化還元酵素、鉄ヒドロゲナーゼおよび酢酸:コハク酸 CoA 転移酵素が退化ミトコンドリア内で機能していることが示唆された。さらに、アセチル CoA 合成酵素もその退化ミトコンドリア内に存在することが示唆された。その一方で、アミノ酸代謝、鉄硫黄クラスター生合成(部分的)TCA 回路等、好気性ミトコンドリアに普遍的に存在する酵素群が退化ミトコンドリア内で機能していることも示唆された。また、電子伝達系では複合体 I, III, IV, F1FO-ATP 合成酵素をコードする転写産物は検出されなかったが、複合体 II を構成するサブユニットをコードする転写産物は検出された。HPLC 解析によりキノン分析を行ったところ、ユビキノンが検出された。これまでに多くの嫌気性(あるいは嫌気耐性)真核生物において、電子伝達物質として低酸化還元電位を有するロドキノンが検出されており、複合体 II はフマル酸還元酵素として働くことが報告されている。しかし、今回検出されたユビキノンが有する高い酸化還元電位を考慮すると、*C. marspialis* の退化ミトコンドリアでは、複合体 II はコハク酸デヒドロゲナーゼとして機能していると考えられる。さらに酸素呼吸を行わない退化ミトコンドリアを有する生物では通常存在しないと考えられてきたミトコンドリア特有のリン脂質「カルジオリピン」の合成を行う酵素をコードする遺伝子が *C. marspialis* において検出された。興味深いことに、それは真核生物において 2 タイプ存在することが知られているカルジオリピン合成酵素(pld タイプと cap タイプ)のうち、これまでストラメノパイル生物には存在しないと考えられてきた pld タイプのカルジオリピン合成酵素をコードする遺伝子であった。

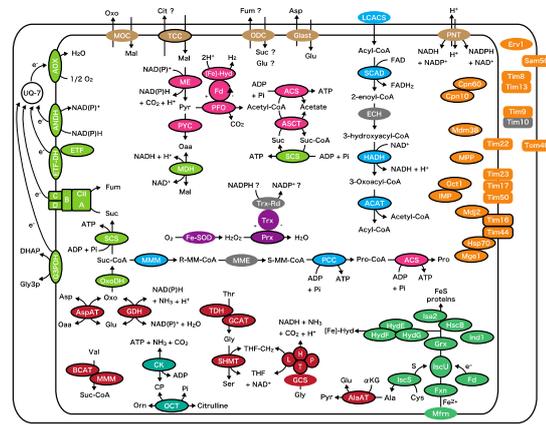


図. *Cantina marspialis* が有する退化オルガネラの代謝マップ

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 13 件)

Fumiya Noguchi, Shigeru Shimamura, Takuro Nakayama, Euki Yazaki, Akinori Yabuki, Tetsuo Hashimoto, Yuji Inagaki, Katsunori Fujikura, Kiyotaka Takishita. Metabolic capacity of mitochondrion related organelles in the free-living anaerobic stramenopile *Cantina marsupialis*. Protist. 査読有. Vol.166. 2015. pp534-550.
doi: 10.1016/j.protis.2015.08.002

Yoshiyuki Ishitani, Kiyotaka Takishita. Molecular evidence for wide vertical distribution of the marine planktonic protist *Larcopyle buetschlii* (Radiolaria) in a semi-closed marginal sea. Journal of Plankton Research. 査読有. Vol.37. 2015. pp851-856.
doi: 10.1093/plankt/fbv065

Naoji Yubuki, Tomas Panek, Akinori Yabuki, Ivan Cepicka, Kiyotaka Takishita, Yuji Inagaki, Brian S. Leander. Morphological identities of two different marine stramenopile environmental sequence clades: *Bicosoeca kenaiensis* (Hilliard 1971) and *Cantina marsupialis* (Larsen and Patterson, 1990) gen. nov., comb. nov. Journal of Eukaryotic Microbiology. 査読有. Vol.62. 2015. pp532-542.
doi:10.1111/jeu.12207

Fumiya Noguchi, Goro Tanifuji, Matthew W Brown, Katsunori Fujikura, Kiyotaka Takishita. Complex evolution of two types of cardiolipin synthase in the eukaryotic lineage stramenopiles. Molecular Phylogenetics and Evolution. 査読有. Vol.101. 2016. pp133-141.
doi:10.1016/j.ympev.2016.05.011

Akinori Yabuki, Goro Tanifuji, Chiho Kusaka, Kiyotaka Takishita, Katsunori Fujikura. Hyper-eccentric structural genes in the mitochondrial genome of the algal parasite *Hemistasia phaeocysticola*. Genome Biology and Evolution. 査読有. Vol.8. 2016. pp2870-2878.
doi:10.1093/gbe/evw207

Sakiko Orui Sakaguchi, Shigeru Shimamura, Yuichi Shimizu, Gen Ogawa, Yuichiro Yamada, Keiko Shimizu, Hiroaki Kasai, Hiroshi Kitazato, Yoshihiro Fujiwara, Katsunori Fujikura, Kiyotaka Takishita. Comparison of morphological and DNA-based techniques for stomach content analyses in juvenile chum salmon *Oncorhynchus keta*: a case study on diet richness of juvenile fishes. Fisheries Science. 査読有. Vol.83. 2017. pp47-56.

doi:10.1007/s12562-016-1040-6

Genki Ozawa, Shigeru Shimamura, Yoshihiro Takaki, Shin-ichi Yokobori, Yasuhiko Ohara, Kiyotaka Takishita, Tadashi Maruyama, Katsunori Fujikura, Takao Yoshida. Updated mitochondrial phylogeny of Pteriomorph and Heterodont Bivalvia, including deep-sea chemosymbiotic *Bathymodiolus* mussels, vesicomid clams and the thyasirid clam *Conchocele* cf. *bisecta*. Marine Genomics. 査読有. Vol.31. 2017. pp43-52.
doi:10.1016/j.margen.2016.09.003

Michelle M Leger, Martin Kolisko, Ryoma Kamikawa, Courtney W Stairs, Keitaro Kume, Ivan Cepicka, Jeffrey D Silberman, Jan O Andersson, Feifei Xu, Akinori Yabuki, Laura Eme, Qianqian Zhang, Kiyotaka Takishita, Yuji Inagaki, Alastair GB Simpson, Tetsuo Hashimoto, Andrew J Roger. Organelles that illuminate the origins of *Trichomonas* hydrogenosomes and *Giardia* mitosomes. Nature Ecology & Evolution. 査読有. Vol.1. 2017. pp0092.
doi:10.1038/s41559-017-0092

Kiyotaka Takishita, Yoshihiro Takaki, Yoshito Chikaraishi, Tetsuro Ikuta, Genki Ozawa, Takao Yoshida, Naohiko Ohkouchi, Katsunori Fujikura. Genomic evidence that methanotrophic endosymbionts likely provide deep-sea *Bathymodiolus* mussels with a sterol intermediate in cholesterol biosynthesis. Genome Biology and Evolution. 査読有. Vol.9. 2017. pp1148-1160.
doi:10.1093/gbe/evx082

Konami Takahashi, Kazunari Sakai, Yuriko Nagano, Sakiko Orui Sakaguchi, Andre O Lima, Vivian H Pellizari, Masato Iwatsuki, Kiyotaka Takishita, Kenichi Nonaka, Katsunori Fujikura, Satoshi, Omura. Cladomarine, a new anti-saprolegniasis isolated from the deep-sea fungus *Penicillium corailigerum* YK-247. Journal of Antibiotics. 査読有. Vol.70. 2017. pp911-914.
doi:10.1038/ja.2017.58

Genki Ozawa, Shigeru Shimamura, Yoshihiro Takaki, Kiyotaka Takishita, Tetsuro Ikuta, James P Barry, Tadashi Maruyama, Katsunori Fujikura, Takao Yoshida. Ancient occasional host switching of maternally transmitted bacterial symbionts of chemosynthetic vesicomid clams. Genome Biology and Evolution. 査読有. Vol.9. 2017. pp2226-2236.
doi:10.1093/gbe/evx166

Sakiko Orui Sakaguchi, Tetsuro Ikuta, Gen Ogawa, Kodai Yamane, Naonobu Shiga, Hiroshi Kitazato, Katsunori Fujikura, Kiyotaka Takishita.

Morphological identity of a taxonomically unassigned cytochrome c oxidase subunit I sequence from stomach contents of juvenile chum salmon determined using polymerase chain reaction. Fisheries Science. 査読有. Vol.83. 2017. pp757-765.
doi:org/10.1007/s12562-017-1106-0

Kiyotaka Takishita, Yoshito Chikaraishi, Goro Tanifuji, Naohiko Ohkouchi, Tetsuo Hashimoto, Katsunori Fujikura, Andrew J Roger. Microbial eukaryotes that lack sterols. Journal of Eukaryotic Microbiology. 査読有. Vol.64. 2017. pp897-900.
doi:10.1111/jeu.12426

〔学会発表〕(計1件)

高橋こなみ, 長野由梨子, 瀧下清貴, 藤倉克則, 横田賢史. 深海由来真菌の分子同定および抗生物質の探索. 日本農芸化学会 2016 年度大会. 2016 年 03 月 29 日. 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市).

〔図書〕(計1件)

Kiyotaka Takishita. Diversity of microbial eukaryotes in deep-sea chemosynthetic ecosystems illuminated by molecular techniques. In: Otsuka S., Suzaki T., Horiguchi T., Suzuki N., Not F. (eds.) Marine Protists: Diversity and dynamics, Springer, Tokyo. 査読有. 2015. pp47-61.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀧下 清貴 (TAKISHITA, Kiyotaka)
福岡女子大学・国際文理学部・教授
研究者番号: 90392951