

平成30年6月25日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14591

研究課題名(和文)好気性真核生物から嫌気性真核生物への進化におけるスナップショットと多様性の解明

研究課題名(英文)Early steps prerequisite for evolution from aerobic eukaryotes to anaerobes

研究代表者

神川 龍馬(Kamikawa, Ryoma)

京都大学・地球環境学堂・助教

研究者番号：40627634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、好気でも嫌気でも生育可能な真核微生物を用いて、真核生物における好気から嫌気への適応進化の初期段階の解明を目的として研究を行った。ミトコンドリアに局在するタンパク質はトランスクリプトーム解析と細胞内局在解析から網羅的に同定し、好気環境と嫌気環境下では、エネルギー合成に関与する遺伝子が大きく異なることが判明した。分子系統解析から、嫌気エネルギー合成遺伝子は水平移動によって獲得したと考えられる。本研究から、好気から嫌気へのミトコンドリア適応進化に重要な初期イベントとして、嫌気用エネルギー合成遺伝子の獲得と、好気・嫌気における遺伝子発現制御が重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to unveil early stages of adaptive evolution of eukaryotes to anaerobiosis, using a eukaryote that is capable of thriving in both aerobic and anaerobic conditions. Mitochondria-targeting proteins were identified by transcriptome analyses followed by localization studies. Comparative transcriptome analyses revealed that mitochondrial energy producing pathways are drastically different between aerobic and anaerobic conditions. Molecular phylogenetic analyses suggested those genes encoding the mitochondrial anaerobic energy production had been acquired by lateral transfers. On the basis of findings in this study, important steps for early stages of evolutionary adaptation to anaerobiosis in eukaryotes were suggested to be acquisition of genes for mitochondrial anaerobic energy production and transcriptional regulation of those genes in different oxygen concentrations.

研究分野：真核微生物とそれらがもつオルガネラの進化・多様性

キーワード：ミトコンドリア 嫌気 原生生物 酸素

1. 研究開始当初の背景

真核生物は必要なエネルギー (ATP) の大部分をミトコンドリアが酸素依存的に生産しているため、基本的に好気環境下においてのみ生育が可能である。しかし腸内寄生性真核生物ランブル鞭毛虫など寄生虫の一部は例外的に、嫌気環境でのみ生育することが古くから知られていた。近年、寄生性真核生物のみならず、細菌を捕食する自由生活性の嫌気性真核生物が発見されており、その生育環境は多岐にわたる。真核生物の共通祖先はすでにミトコンドリアによる酸素依存的 ATP 合成を行っていたという説が現在では有力視されており、現存する寄生性真核生物は二次的に嫌気的になったと考えられている。そのような嫌気性真核生物は、様々な系統群に存在し、これまでその嫌气的 ATP 生産経路が生化学的解析やゲノム解析によって詳細に調べられてきた。そして分子系統解析によって、その嫌气的 ATP 生産経路を担う遺伝子の多くはバクテリアからの遺伝子水平伝播によって獲得されたものであることが分かっている。しかし、これまで研究されてきた生物の多くはすでに完全に嫌気環境に適応した生物であり、嫌気環境に適応しつつあるような中間的な生物はカビや緑藻など数種のみしか知られていなかった。真核生物における嫌気環境適応初期において必要とされた細胞内代謝系進化の詳細やその多様性は不明であった。

2. 研究の目的

申請者はこれまでに真核生物ケルコゾアの一種 KY003 株を単離・株化した。KY003 株は好気環境および嫌気環境のいずれにおいても良好な増殖を示すことが分かっている。つまり、KY003 株の有する「好気および嫌気環境での生育」はまさに好気環境と嫌気環境という両極端な環境に適応した特異な性質であると同時に、好気環境から嫌気環境に適応しつつある進化的中間段階であるとも考えられる。そこで本研究では、好気環境と嫌気環境で培養した KY003 細胞が有する好気および嫌気環境下での ATP 生産機構についてトランスクリプトームや細胞内局在解析から解明し、好気から嫌気への真核生物適応進化のスナップショットを切り出すことを試みる。また、KY003 株だけではなく、好気でも嫌気でも生育可能な新奇培養株の確立を行い、好気および嫌気で生存可能な真核生物の多様性・それらの有する代謝経路の多様性解明の足掛かりとすることを目的とした。

3. 研究の方法

A. 好気および嫌気条件での ATP 生産経路の同定とその進化の解明

嫌気性から好気性への進化過程における分

子機構を明らかとするため、KY003 株における嫌気培養と好気培養での代謝経路を詳細に調べることを試みた。そのため、本計画のための実験は以下の2つを計画した。

[a1 網羅的発現遺伝子解析 (トランスクリプトーム解析)]

好気環境および嫌気環境で生存可能な KY003 株は、両環境下で効率的にエネルギー源である ATP を産生する代謝経路を有していると考えられた。すなわち、好気環境では通常の好気性真核生物が行うようなミトコンドリアにおける電子伝達系を介した酸素依存的 ATP 合成を行っていると予想される。その一方嫌気環境では、酸素非依存的 ATP 合成を行っていると考えるのが妥当であった。そこで発現している遺伝子を次世代シーケンサー Illumina HiSeq2000 により網羅的に検出した。この時、嫌気条件で培養した細胞から得た RNA と好気条件で培養した細胞から得た RNA それぞれに対し実験を行うことにより、それぞれの条件で培養した細胞内での代謝経路を推定した。両条件で推定される代謝経路を比較することで、好気条件から嫌気条件へと環境が変遷した際、KY003 株がどのように代謝経路を変化させ、生存しているのかを明らかとすることを試みた。好気培養で通常ミトコンドリアゲノム遺伝子が同定された場合、全ミトコンドリアゲノム配列を決定するため、得られた遺伝子断片情報を基に PCR やサンガーシーケンス法、小規模な次世代シーケンス解析を行った。ミトコンドリアゲノム上に同定された遺伝子の転写産物をリアルタイム PCR で定量した。

[a2 網羅的単一遺伝子系統解析]

嫌気環境下特異的に発現する ATP 産生関連遺伝子は、通常の好気性真核生物は有していないと予想された。すなわち、a1 にて同定される嫌气的 ATP 合成遺伝子は、KY003 株が嫌気環境中で生存可能となる前に新たに獲得した遺伝子であろうと考えられた。そこでトランスクリプトーム解析で予想した経路に関与する遺伝子の起源を調べるため、詳細かつ頑健な分子系統樹を推定した。これにより、好気性から嫌気性に進化する際、どのような分子機構がどのような分子進化に基づいて獲得されたのかについて、その進化的背景を推定した。

B. 好気および嫌気条件での ATP 生産経路の局在

通常の好気性真核生物はミトコンドリア内で酸素を利用した ATP 合成経路によりエネルギーを得ている。しかし嫌气的な真核生物は、同様にミトコンドリア内で嫌气的な ATP 合成経路を活性化させることでエネルギーを得ている種と、細胞質で嫌气的 ATP 合成を行っている種が存在する。そのため、嫌気環境へ適応する初期に ATP 合成の場がどちらにあっ

たのかは不明であった。そこで嫌気生物への進化の中間段階とも考えることが可能な KY003 株における ATP 合成経路の局在を調べた。そのための実験として以下の 2 つを計画した。

[b1 細胞内局在の同定]

KY003 の細胞がどのような構造を有しているかを調べるため、透過型電子顕微鏡観察を行った。特に、好気性の際に ATP 合成の場となると予想されるミトコンドリアが存在するかどうか、そして存在する場合は嫌気培養した際にどうなるのか、に着目して観察を行った。ATP 合成系に参与するタンパク質に GFP タグをつけたものを酵母細胞内で発現させた。GFP シグナルが細胞内のどこに局在するか蛍光顕微鏡下で観察した。

[b2 in silico 解析による細胞内局在推定]

ミトコンドリアに局在するタンパク質のほとんどはその N 末端領域にミトコンドリア局在シグナルが存在し、膜電位を輸送に利用している関係から正の電荷を帯びていることやアルギニンなどのアミノ酸が有意に多いといった特徴を有している。これらの特徴を有したミトコンドリア局在シグナルを検出する TargetP などのプログラムを用いることで、ミトコンドリアに局在するのかが細胞質で機能するのかが推定することが可能である。

C. 好気および嫌気条件下で生育可能な新奇真核生物の単離・培養

これまで好気性および嫌気性環境での生存が可能な真核生物の研究は稀有であり、そのような生物の多様性はわかっていない。そこで本研究では、KY003 株を単離した際に用いた培地と培養法を応用し、新奇培養株を確立する。得られた培養株の系統学的位置を細胞観察および SSU rRNA 遺伝子の分子系統解析から明らかとすることを試みた。これにより、好気および嫌気環境で生存可能な生物群がどのような系統群に位置し、どれほど多様性があるのかを明らかとすることを試みた。

4. 研究成果

(1) 好気および嫌気で増殖可能な真核生物のミトコンドリアゲノム

研究代表者が単離株化した嫌気でも好気でも増殖可能な真核生物は、光学顕微鏡による形態観察および 18S rRNA 遺伝子分子系統解析の結果、*Brevimastigomonas* 属に属することが判明したが、該当する記載種は見いだせなかった。本種の透過型電子顕微鏡観察からは典型的なミトコンドリア構造は確認されなかった。その一方、2 重膜に囲まれた球状のオルガネラが好気および嫌気培養細胞から観察された。これらがミトコンドリアまたはミトコンドリア由来オルガネラである

と考えられた。観察されたミトコンドリア様オルガネラは、好気条件と嫌気条件で形態が変化することは無かった。本種のミトコンドリアゲノムを解析した結果、約 26.5 kb ほどの環状ゲノムの配列決定に成功した。本ゲノムは電子伝達系複合体 I、III、IV および V の遺伝子をコードしていたが、特に複合体 III および IV の遺伝子である *cytb* と *cox1* 配列の進化速度が極めて上昇していた。この結果から、本種は電子伝達系による ATP 合成能は有するものの、複合体 III および IV の機能性には疑問が残る。また、ケルコゾア生物を含めた他の多くのミトコンドリアゲノムはリボソームタンパク質遺伝子をコードしていることが分かっているが、本種のミトコンドリアゲノムはリボソームタンパク質遺伝子を欠いており、縮退進化を辿っていることが強く示唆された。

(2) ミトコンドリアゲノム遺伝子の発現解析

ミトコンドリアゲノムにコードされる電子伝達系は酸素を最終電子受容体として利用しているため、好気環境と嫌気環境においてどのように遺伝子発現が変動しているのか調べた。その結果、全ての遺伝子が、好気環境と比較して、嫌気環境下で mRNA レベルでの発現が低下していた。このことは、酸素の有無を感知し、酸素の存在下ではミトコンドリアゲノムにコードされた電子伝達系の機能に依存し、また嫌気環境では電子伝達系の機能を抑制していると考えられる。すなわち、嫌気環境下では別の ATP 合成経路に強く依存していることが示唆された。

(3) 嫌気環境における ATP 合成経路

嫌気環境における ATP 合成経路を同定するため、嫌気環境下で培養した *Brevimastigomonas* sp. 細胞のトランスクリプトーム解析を行った。得られた転写産物配列から、嫌気環境下で ATP 合成経路として機能するピルビン酸：フェレドキシン酸化還元酵素 (PFO) やピルビン酸：NADPH 酸化還元酵素、ピルビン酸：ギ酸リアーゼ (PFL)、ヒドロゲナーゼ、酢酸：スクシニル CoA 転移酵素 (ASCT) などが同定された。これらの遺伝子は好気性のケルコゾア生物は有しておらず、遺伝子水平転移によって獲得されたと考えられる。また分子系統解析の結果、嫌気性真核生物の配列と単系統群になることから、嫌気性真核生物からの遺伝子水平転移により獲得されたと考えることが妥当である。また、通常の好気性ミトコンドリアで機能する TCA 回路や脂肪酸酸化、解糖系などの酵素をコードする遺伝子もトランスクリプトーム解析から同定された。嫌気と好気での比較トランスクリプトーム解析により、嫌気環境下で ATP 合成に関与すると推定される遺伝子は、好気環境で発現が有意に低下しており、酸素の有無によって、核コード遺伝子も発現制御

を行っていることが示された。

(4) ミトコンドリアタンパク質の同定と進化

嫌気環境下で ATP 合成に關与するタンパク質の細胞内局在を調べるため、GFP タグを C 末に付加した PFO やヒドロゲナーゼ、PFL、ASCT の N 末配列を酵母細胞内で発現させた結果、調べたすべての配列が酵母のミトコンドリアに局在することが分かった。すなわち、嫌気環境での ATP 合成は、好気環境と同様にミトコンドリアであることが強く示唆された。すなわち、好気から嫌気への初期進化の段階で、細胞質ではなく、嫌氣的な ATP 合成はミトコンドリアで行われることが示唆された。

(5) 好気でも嫌気でも増殖可能な真核生物の多様性

海岸底泥や淡水湖底泥など、様々な環境から得られたサンプルを嫌気培養した。粗培養で増殖してきた細胞を好気状態に移し、嫌気でも好気でも増殖可能かどうか調べた。しかし、好気条件で再び増殖する細胞は観察できなかった。*Brevimastixigomonas* sp. KY003 株が単離された本方法では、現在のところ KY003 株以外に培養株は得られていない。ただし、カナダの共同研究者が一株確立しており、現在その解析を共同で行っている。その一方で、嫌気環境でのみ生育する株は複数確立することができた。SSU rRNA 遺伝子の解析および光学顕微鏡観察の結果、メタモナスの一種やヘテロロボースの一種と判明した。好気でも嫌気でも増殖可能な進化の中間段階を反映したような真核生物は非常に稀有であることが示唆される。

(6) ミトコンドリアにおける嫌気環境適応進化

ミトコンドリアは好気環境に適応した代謝系や ATP 合成経路を有している。そこに嫌気環境下でも ATP 合成が行える遺伝子を水平転移によって獲得し、嫌気環境下での生育が可能となる。すなわち、好気環境から嫌気環境に適応する非常に初期の段階において、ミトコンドリアのプロテオームは増大する。さらに、酸素濃度によって適した遺伝子発現を行うことが必要となる。その後、嫌気環境への適応が進むにつれて、好気環境に適した代謝系や ATP 合成経路は失われていき、最終的に嫌気環境下での ATP 合成経路が残る。また、寄生性などの特定の生活様式をもつ生物では、さらにミトコンドリアプロテオームの縮退が進み、ATP 合成すら行わなくなる。最終的にはミトコンドリアそのものが消える。本研究の成果を加えたミトコンドリアの進化過程として、上述のようなシナリオが提案される。

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 17 件)

1. Tanifuji G, Takabayashi S, Kume K, Takagi M, Nakayama T, Ryoma Kamikawa, Inagaki Y, Hashimoto T. 2018. The draft genome of *Kipferlia bialata* reveals that a gain of function conversely contributed to reductive evolution in Metamonada parasites. PLoS One 13(3): e0194487 doi: 10.1371/journal.pone.0194487

2. Brown MW, Heiss AA, Ryoma Kamikawa, Inagaki Y, Yabuki A, Tice AK, Shiratori T, Ishida KI, Hashimoto T, Simpson AGB, Roger AJ. 2018. Phylogenomics places orphan protistan lineages in a novel eukaryotic super-group. Genome Biol Evol 10(2) 427-433. doi: 10.1093/gbe/evy014

3. Yang J, Harding T, Ryoma Kamikawa, Simpson AGB, Roger AJ. 2017. Mitochondrial genome evolution and a novel RNA editing system in deep-branching heteroloboseids. Genome Biol Evol 9 (5) 1161-1174 doi: 10.1093/gbe/evx086

4. Leger MM, Kolisko M, Ryoma Kamikawa, Stairs CW, Kume K, Čepicka I, Silberman JD, Andersson JO, Xu F, Yabuki A, Eme L, Zhang Q, Takishita K, Inagaki Y, Simpson AGB, Hashimoto T, Roger AJ. 2017. Organelles that illuminate the origins of *Trichomonas* hydrogenosomes and *Giardia* mitosomes. Nature Ecol Evol 1:0092 doi: 10.1038/s41559-017-0092

5. Roger AJ, Muñoz-Gómez SA, Ryoma Kamikawa. 2017. The origin and diversification of mitochondria. Curr Biol 27 (21) R1177-R1192. doi: 10.1016/j.cub.2017.09.015

6. Gawlyruck R, Ryoma Kamikawa, Stairs CW, Silberman JD, Brown MW, Roger AJ. 2016. The earliest stages of mitochondrial adaptation to low oxygen revealed in a novel rhizarian. Curr Biol 26(20): 2729-2738 doi: 10.1016/j.cub.2016.08.025.

7. Ryoma Kamikawa, Shiratori T, Ishida K, Miyashita H, Roger AJ. 2016. Group II intron-mediated *trans*-splicing in the gene-rich mitochondrial genome of an enigmatic eukaryote *Diphyllleia rotans*. Genome Biol Evol 8(2):458-466. doi: 10.1093/gbe/evw011.

8. Nishimura Y, Tanifuji G, Ryoma Kamikawa, Yabuki A, Hashimoto T, Inagaki Y. 2016. Mitochondrial genome of *Palpitomonas bilix*: Derived genome structure and ancestral system for cytochrome c maturation. *Genome Biol Evol* 8 (10) 3090-3098.
Doi: 10.1093/gbe/evw217

〔学会発表〕(計 31 件)

1. 神川龍馬. イントロダクション：現存真核生物の多様性. 第 19 回進化学会シンポジウム 2017 年

2. 井上貴史、谷藤吾朗、神川龍馬、久米慶太郎、稲垣祐司、橋本哲男. *Giardia* に近縁な自由生活性鞭毛虫 *Dysnectes brevis* の MRO 機能の推測. 第 86 回日本寄生虫学会 2017 年

3. 松野佑成、石井健一郎、宮下英明、神川龍馬. 新奇ケルコゾア生物 *Brevimastigomonas* sp. KY003 株の持つ新たなミトコンドリア様オルガネラ. 第 30 回日本微生物生態学会. 2015 年

4. Ryoma Kamikawa. The dynamics of mitochondrial metabolism .in a cercozoan capable of growth in aerobic and low-oxygen conditions. 2nd International Symposium Matryoshka-type Evolution of Eukaryotic Cells 2015 年

5. Ryoma Kamikawa. The dynamics of mitochondrial metabolism .in a cercozoan capable of growth in aerobic and low-oxygen conditions. VIIICOP-ISOP joint meeting 2015 年

6. Ryoma Kamikawa. Two cercozoans from low-oxygen environments reveal the early stages of mitochondrial adaptation to anaerobiosis. Integrated Microbial Biodiversity Program meeting, Canadian Institute for Advanced Research 2015 年

6 . 研究組織

(1)研究代表者

神川 龍馬 (KAMIKAWA, Ryoma)

京都大学・大学院地球環境学堂・助教

研究者番号：40627634

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()