

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19087

研究課題名(和文) 赤痢アメーバの特殊化ミトコンドリアにおける分裂機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the mitosomal fission mechanism in *Entamoeba histolytica*

研究代表者

牧内 貴志 (MAKIUCHI, Takashi)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：80587709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：代表者は、赤痢アメーバの特殊化したミトコンドリア“マイトソーム”の分裂に関して、ダイナミン関連タンパク質(DRP: Dynamin-Related Protein)を主軸に解析を行った。そして、赤痢アメーバには4種類のDRP(EhDrpA～EhDrpD)が存在すること、EhDrpCとEhDrpDは機能未知であるが核に局在すること、およびEhDrpAとEhDrpBがヘテロ複合体を形成してマイトソームの分裂に機能することを見出した。これは、宿主であるヒトのミトコンドリア分裂DRPが形成するホモ複合体とは、四次構造レベルで明らかに異なる特徴である。

研究成果の概要(英文)： *Entamoeba histolytica* is an anaerobic parasitic protist and possesses mitosomes, one of the most highly divergent mitochondrion-related organelles. Although unique metabolism and protein/metabolite transport machinery have been demonstrated in *Entamoeba* mitosomes, the mechanism of mitosomal fusion and fission remains to be elucidated. In this study, we demonstrate that two dynamin-related proteins (DRPs) are cooperatively involved in the fission of *Entamoeba* mitosomes. Expression of a dominant negative form of EhDrpA and EhDrpB, and alternatively, repression of gene expression of EhDrpA and EhDrpB genes, caused elongation of mitosomes, reflecting inhibition of mitosomal fission. Moreover, EhDrpA and EhDrpB formed an unprecedented hetero-oligomeric complex with an approximate 1:2 to 1:3 ratio, suggesting that the observed elongation of mitosomes is likely caused by the disruption and instability of the complex caused by an imbalance in the two DRPs.

研究分野：分子寄生虫学

キーワード：寄生虫 ナミン 赤痢アメーバ 原虫 ミトコンドリア ミトコンドリア関連オルガネラ マイトソーム ダイ

1. 研究開始当初の背景

赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) は、年間世界人口の約1%が感染しており、約10万人の死亡原因となる医学上重要な寄生原虫である。更に本原虫は、進化生物学を考える上でも重要な生物材料として位置づけられている。その一例が、ミトソームと呼ばれる呼吸鎖を持たない形態的・機能的に高度に変異したミトコンドリア関連オルガネラ (MRO: Mitochondrion-Related Organelle) の存在である。

MROは、嫌気性・微好気性の単細胞真核生物に広く存在するが、*E. histolytica* ミトソームには硫酸活性化経路が局在し、ミトソームへのタンパク質輸送に他真核生物には存在しないサブユニットが用いられている。これらの特徴的なタンパク質群の発現抑制が *E. histolytica* の増殖速度に著しい遅延を引き起こす事実は、ミトコンドリアが *Entamoeba* ミトソームへと進化する過程で、多くの分子基盤の再編成が行なわれたことを明示している。

哺乳類細胞や酵母といったモデル生物において、二重膜オルガネラであるミトコンドリアは、分裂と融合を絶えず繰り返すことで動的にその形態を変化させ、機能維持および娘細胞への分配を行っている。その中核を担っているのが Dynamin superfamily GTPase に属する Drp1、Mfn1/2、Opa1 などのダイナミン関連タンパク質 (DRP: Dynamin-Related Protein) である。この内、Drp1 のミトコンドリア外膜上へのリクルートには、DRP 受容体として機能する Fis1、Mff、MiD49/51 などのパートナー分子が必要である。

E. histolytica が属するアメーボゾア門においては、*Dictyostelium* のミトコンドリア内膜の分裂に、原核生物の FtsZ に相同なタンパク質が例外的に使用されている。また、他門生物である *Trichomonas* の MRO の生合成において、DRP が関与していることが報告されている。*E. histolytica* においては、ゲノム情報に FtsZ 相同タンパク質が存在せず、4種類の DRP (EhDrpA、EhDrpB、EhDrpC、および EhDrpD) が存在することから、ミトソームの分裂・融合にこれらの関与が予想される。しかしながら、実験的な証拠は報告されていない。

2. 研究の目的

E. histolytica におけるミトソームの重要性は、その機能障害と細胞増殖の速度低下との相関から明らかであるが、その分裂メカニズムは明らかとなっていない。本申請では、DRP の解析を主軸に、ミトソームの分裂メカニズムを明らかにすることで、ミトコンドリアとミトソームの生合成機構の進化的な共通点および相違点の解明を目指した。

3. 研究の方法

分子系統学的解析は、*Entamoeba* 属である *Entamoeba dispar* および *Entamoeba invadens* を含む 20 生物種から計 83 種類の

Dynamin-family タンパク質を抽出し、マルチプルアライメントを行った後に、350 アミノ酸座位を用いて最尤系統樹 (LG+G+I モデル) を作製した。EhDRP の局在解析は、各 EhDRP のカルボキシル末端に HA タグが融合したタンパク質 (EhDRP-HA) を発現する *E. histolytica* 株 (EhDRP-HA 株) を用いて免疫蛍光抗体法 (IFA) を行った。また上記 EhDRP-HA の GTPase 活性に重要なリジン残基をアラニン残基に置換したタンパク質 (dnEhDRP-HA) をテトラサイクリン存在下で発現する *E. histolytica* 株 (dnEhDRP-HA 株) において、そのミトソームの形態変化を IFA によって観察した。更に、形態変化の確認がとれた EhDRP に関しては、発現抑制 *E. histolytica* 株 (gsEhDRP 株) の樹立を行い、同様な形態観察を行った。上記の質・量を変化させミトソームの形態変化が確認できた EhDRP に関して、pCold™ I ベクターおよび BL21 Star™ (DE3) コンピテント大腸菌を用いて組換えタンパク質 (rEhDRP) の作製を行った。更に、これらの EhDRP に反応する抗体 (抗 EhDRP 抗体) は、EhDrpA および EhDrpB に特異的な合成ペプチドを抗原に用いて調製した (抗 DrpA および抗 DrpB 抗体)。これらの特異抗体および抗 HA 抗体を用いて免疫沈降 (IP) を行った。ウエスタンブロッティング (WB) は、IP サンプルもしくは各株の細胞溶解液を用いた SDS-PAGE もしくは Blue native-PAGE (BN-PAGE) 後に行った。

4. 研究成果

(1) 分子系統学的解析

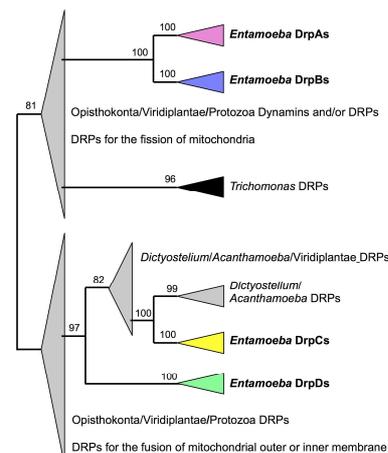


図1. Dynamin-family タンパク質の分子系統樹 (模式図): Opisthokonta: ヒト、マウス、酵母、微孢子虫。Viridiplantae: シロイヌナズナ、クラミドモナス。Protozoa: マラリア原虫、クリプトスポリジウム、ランブル鞭毛虫、トリパノソーマ科原虫、細胞性粘菌、アカントアメーバ。

4種のEhDRPの進化的起源の探索およびこれらの系統関係を明らかにする目的で、最尤系統樹を作製した(図1)。その結果、EhDrpA およびEhDrpBはダイナミンおよび他種生物のミトコンドリア分裂DRPと共に適度なブー

トストラップ確率の支持で単系統を形成した。しかしながら、その内部枝でのブートストラップ確率は低く、その起源は不明である。一方で、EhDrpAおよびEhDrpBは高いブートストラップ確率で単系統性が支持され、おそらくこれらの遺伝子は遺伝子重複によって成立したことが推測できた。EhDrpCおよびEhDrpDは他種生物のミトコンドリア融合DRPを含むクラスターの内部に位置した。そして、EhDrpCは*Entamoeba*種と共にアメーバゾア門に属する*Dictyosyeliium* および*Acanthamoeba*のDRPと高いブートストラップ確率と共に単系統を形成し、これら生物の共通祖先の段階で成立したことが示唆された。一方で、今回の解析結果からは、EhDrpDの起源の推定は困難であった。

(2) EhDRPの局在解析

EhDRP-HA株を用いたIFAを行った結果(図2)、EhDrpA-HAおよびEhDrpB-HAは主に細胞質に、一部がミトソームに局在する像が観察された。一方で、EhDrpC-HAおよびEhDrpD-HAは核に局在する像が観察された。少なからずEhDrpCに関しては、予測プログラムであるcNLS Mapperによって推定の核移行シグナルが検出された。また、これらのEhDRP-HAの局在パターンと、分子系統学的解析による分類はほぼ一致する結果となった。

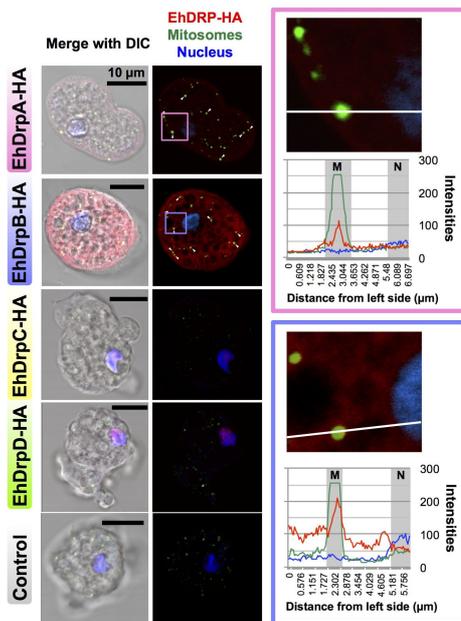


図2. EhDRPの局在解析: 左図の赤・緑・青の蛍光はそれぞれEhDRP-HAの局在・ミトソーム・核を示している。これらの色は右図の蛍光およびグラフ内の色と一致する。Controlは、空ベクター導入株である。右図の蛍光像は、EhDrpA-HA株およびEhDrpB-HA株の蛍光像内の囲みを拡大した像を示している。グラフは、拡大した蛍光像内の白線上に存在する各蛍光強度を示している。

(3) EhDRPの質的变化によるミトソームへの影響

dnEhDRP-HA株をテトラサイクリン存在下で培養した後、IFAを行った(図3)。その結

果、dnEhDrpA-HAおよびdnEhDrpB-HAを発現した細胞において、顕著なミトソームの伸長が観察された。これは、DRP複合体中のGTPase活性の総計が低下し、ミトソームの分裂が完遂できない状態と考えられる。加えて、程度に差はあるものの、全てのdnEhDRP-HA株においてdnEhDRP-HAを発現した際に、増殖阻害が観察された。

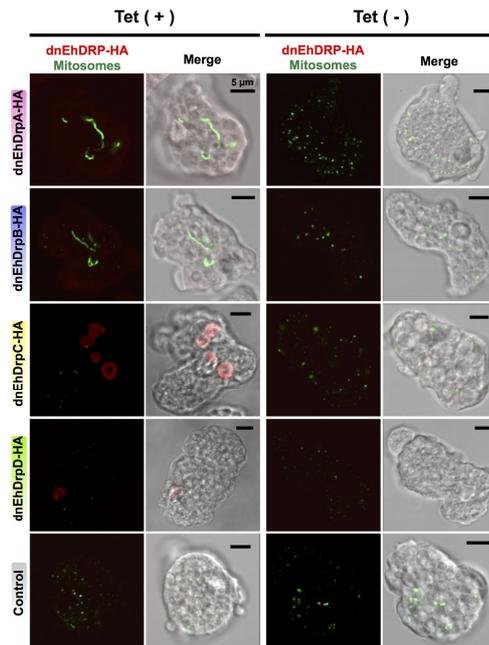


図3. EhDRPの質的变化に伴うミトソームの形態変化: テトラサイクリン添加(終濃度5μg/ml)・非添加で4日間培養した後、IFAを行った。赤および緑の蛍光は、それぞれdnEhDRP-HAおよびミトソームを示している。Controlは、空ベクター導入株である。

(4) EhDRPの量的変化によるミトソームへの影響

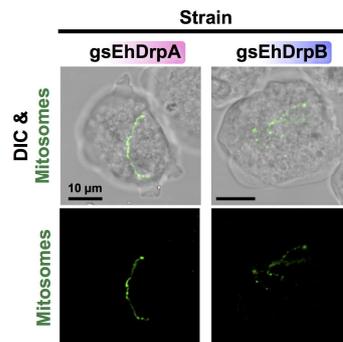


図4. EhDRPの量的変化に伴うミトソームの形態変化: 緑の蛍光は、ミトソームを示している。

ミトソーム局在性で形態変化にも関わるEhDrpA および EhDrpB に関して、gsEhDRP株を樹立し、IFAを行った(図4)。その結果、両発現抑制株において、dnEhDRP-HA株と同様なミトソームの伸長が観察された。また、これらgsEhDRP株はコントロール株と比べ、顕著な増殖速度の遅延が認められた。更に、gsEhDrpA株においてEhDrpBの、gsEhDrpB株においてEhDrpAの発現上昇が

観察された。

(5) マイトソームの分裂に関わるDRP

EhDRPの局在解析および質的・量的変化によるマイトソームへの影響の観察から、EhDrpAおよびEhDrpBがマイトソームの分裂に機能することが強く示唆された。更に、これらEhDRPの質的・量的変化によって増殖阻害が観察されるという事実は、マイトソームの分裂が*E. histolytica*の増殖に重要であることを示唆している。

(6) マイトソーム分裂DRPのパートナー分子の探索

EhDRPをマイトソーム膜上へとリクルートするパートナー分子の探索のために、EhDRP-HA株および抗HA抗体を用いたIPを行った。その結果、SDS-PAGE後の銀染色によって特異バンドは検出できたものの、後述の例外を除き再現性は無く、また質量分析の結果も再現性は得られなかった。そのため、現段階においてEhDRPにパートナー分子が存在するかは不明である。一方で、EhDrpA-HA株において同定の再現性があったタンパク質はEhDrpBであり、EhDrpB-HA株においてはEhDrpAであった。この結果から、EhDrpAおよびEhDrpBが生体内において、相互作用を持っている可能性が示唆された。

(7) EhDrpAおよびEhDrpBによるヘテロ複合体形成

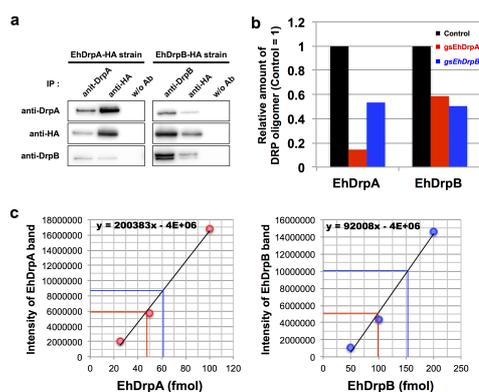


図5. EhDrpAおよびEhDrpBによるヘテロ複合体形成：

(a) EhDRP-HA株を用いたIP；w/o Abは抗体の添加を行わず他のIPサンプルと同様な行程を行ったサンプルを示している。(b) gsEhDRP株中のEhDRP複合体の比較解析；各株から細胞溶解液を調製し、BN-PAGE後、抗EhDRP抗体を用いてWBを行った。グラフは、主要バンドとして検出された約900-kDaのバンドに関して、Control(空ベクター導入株)のバンド強度を1とした時の値を示している。(c) ヘテロ複合体中に含まれるEhDrpAおよびEhDrpBの分子比率；野生株から細胞溶解液を調製し、抗EhDrpA抗体(赤線)および抗EhDrpB抗体(青線)を用いてIPを行った後、WBを行った。このWBの際に、検量線を作製する目的でrEhDrpA(赤点)およびrEhDrpB(青点)の検出も行った。これらのバンド強度から、EhDrpAおよびEhDrpBの分子数を算出した。

EhDrpAおよびEhDrpBの相互作用を検証するために、EhDRP-HA株の細胞溶解液から抗HA抗体および抗EhDRP抗体を用いてEhDRPのIPを行った(図5a)。その結果、EhDrpAおよびEhDrpA-HAを沈降させる条件においてEhDrpBの、EhDrpBおよびEhDrpB-HAを沈降させる条件においてEhDrpAのバンドがWBにおいて検出され、EhDrpAおよびEhDrpBが相互作用を持つことが明らかとなった。また、gsEhDRP株の細胞溶解液を用いたBN-PAGE後に抗EhDrpAおよび抗EhDrpB抗体を用いたWBを行った(図5b)。その結果、約900-kDaのバンドがコントロール株において主要なバンドとして検出されるが、両gsEhDRP株において、そのバンド強度は減少した。これは、約900-kDa複合体の形成にEhDrpAおよびEhDrpBの両タンパク質が必要であることを示している。更に、*E. histolytica*野生株の細胞溶解液から抗EhDRP抗体を用いてIPを行い、rEhDrpBと共にWBを行うことでIPサンプル中のEhDRPの定量を行った(図5c)。その結果、EhDrpAおよびEhDrpBは、1:2~1:3の分子比率で相互作用を持つことが明らかとなった。

(8) 結論および今後の展開

E. histolytica マイトソームの分裂は、EhDrpAおよびEhDrpBの2種類のDRPによるヘテロ複合体によって実行されることが強く示唆された。これは、宿主であるヒトのミトコンドリア分裂DRPによるホモ複合体とは、四次構造レベルで明らかに異なる特徴である。しかしながら、現時点では*E. histolytica*のヘテロDRP複合体の生物学的意義は不明であるため、更なる解析が必要である。更に他の真核生物で知られる翻訳後修飾(リン酸化やSUMO化など)によるDRPの機能調節などの詳細な解析も重要である。少なからず、リン酸基と親和性を持ちSDS-PAGEゲルに加えることでバンドシフトを引き起こすことが可能なPhos-tagを用いた解析によって、EhDrpAおよびEhDrpBがリン酸化を受ける可能性を見出している。

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1件)

Kazama M, Ogiwara S, Makiuchi T, Yoshida K, Nakada-Tsukui K, Nozaki T, Tachibana H, Behavior of DNA-lacking mitochondria in *Entamoeba histolytica* revealed by organelle transplant, *Sci. Rep.*, 2017, 7:44273
doi: 10.1038/srep44273.

[学会発表](計10件)

風間 真、赤痢アメーバにおけるオルガネラ移植法確立と退縮ミトコンドリアの品質管理機構、第49回日本原生生物

学会大会、2016年10月9日、岡山大学 津島キャンパス 一般教育棟 A 棟 (岡山県・岡山市)

牧内 貴志、赤痢アメーバの特殊化ミトコンドリアにおける分裂機構の解析、第85回寄生虫学会大会、2016年3月20日、宮崎市民プラザ(宮崎県・宮崎市)

風間 真、寄生性アメーバにおけるオルガネラの種内及び種間移植実験、第85回寄生虫学会大会、2016年3月20日、宮崎市民プラザ(宮崎県・宮崎市)

風間 真、嫌気性原生動物におけるオルガネラ移植実験、日本動物学会第68回関東支部大会、2016年3月12日、神奈川大学横浜キャンパス(神奈川県・横浜市)

橘 裕司、嫌気性アメーバにおけるオルガネラ移植系の構築、第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会、2015年12月4日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

牧内 貴志、赤痢アメーバの特殊化ミトコンドリアにおける分裂機構の解析、第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会、2015年12月2日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

牧内 貴志、赤痢アメーバのミトコンドリア関連オルガネラ、第48回日本原生生物学会大会、2015年11月7日、国立感染症研究所(東京都・新宿区)

Takashi Makiuchi, Analysis of the fission mechanism of mitosomes in *Entamoeba histolytica*, XVIII Seminar on Amebiasis 2015, Oct., 14, 2015, Campeche (Mexico)

牧内 貴志、The highly divergent mitochondrion-related organelle “mitosome” in *Entamoeba histolytica*, 2nd International Symposium on Matryoshka-type Evolution of Eukaryotic Cells、2015年10月1日、筑波大学大学会館(茨城県・つくば市)

風間 真、マイクロインジェクションによるオルガネラ移植法の確立、第23回分子寄生虫学ワークショップ、第13回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会、2015年9月1日、帯広畜産大学 原虫病研究センター PK ホール(北海道・帯広市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧内 貴志 (MAKIUCHI Takashi)
東海大学・医学部・助教
研究者番号：80587709