

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B））

研究期間：2019～2023

課題番号：19KK0185

研究課題名（和文）フォルニカータ生物群におけるミトコンドリア関連オルガネラの機能進化の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the functional evolution of mitochondrion-related organelles in fornicates

研究代表者

橋本 哲男 (Tetsuo, Hashimoto)

筑波大学・生命環境系・名誉教授

研究者番号：50208451

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,100,000円

研究成果の概要（和文）：フォルニカータは微好気環境に適応した生物群であり、自由生活種・片利共生種・寄生種を含む多様な鞭毛虫から構成されている。いずれも酸素呼吸能を欠く退化型のミトコンドリア、Mitochondrion-related organelles (MRO) を有している。本課題では、配列データに基づく研究しかなされていなかった自由生活2種、*Kipferlia bialata*、*Dysnectes brevis*について、MROを精製してプロテオミクス解析を行った。その結果をフォルニカータに近縁な寄生虫 *Trichomonas vaginalis* における既存データと比較し、MROの機能進化に関する示唆を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フォルニカータ生物群は、退化型のミトコンドリアであるMROを保持するもののみから構成されるため、微好気、嫌気環境に適応した真核生物の代謝とその進化を探るうえでのモデル系となりうる。しかし、一部の寄生虫に関するものを除くと、フォルニカータ生物に関する研究のほとんどは配列データに基づくものであった。今回、MROのプロテオミクス解析により、自由生活種2種において真のMRO局在タンパク質のリストを提示したことにより、MROの機能進化の解明に大きく貢献できた。また、バクテリアとの混合培養系からのMROタンパク質の精製方法論を確立したことは、今後、他の非モデル生物での同様の研究に対して大きな波及効果をもつ。

研究成果の概要（英文）：Fornicates (Fornicata) are a group of organisms adapted to the microaerobic environment and consists of a variety of flagellates, including free-living, commensal, and parasitic species. All of them have degenerate mitochondria, mitochondrion-related organelles (MROs), that lack the ability of oxidative phosphorylation. In this project, we purified MROs and performed proteomic analysis of two free-living species, *Kipferlia bialata* and *Dysnectes brevis*, which have only been studied based on sequence data. The results were compared with existing data in the human parasite *Trichomonas vaginalis*, which is a phylogenetical relative to fornicates, to provide suggestions for the functional evolution of MROs.

研究分野：分子進化学

キーワード：ミトコンドリア関連オルガネラ（MRO） プロテオミクス フォルニカータ 嫌気環境適応 機能進化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

フォルニカータは海底泥や動物の腸管など酸素分圧の低い環境に生育する鞭毛虫のみから構成される生物群である。その系統樹上には自由生活性・片利共生性・寄生性の種が散在しており生育環境や生活様式も多様である。いずれの生物種も微好気・嫌気環境に適応しているため、酸素呼吸を行う典型的なミトコンドリア (Mt) を欠き、退化型の Mt である Mitochondrion-Related Organelles (MRO) を保持している。フォルニカータ生物のなかでも分子生物学的な研究が比較的進んでいる、ヒト寄生虫 *Giardia intestinalis* やサケ寄生虫 *Spironucleus salmonicida* においては、MRO の単離とプロテオミクス解析が行われており (Jedelsky et al. 2011 PLoS one; Jerlstrom-Hultqvist et al. 2013 Nat Comm) それらの機能がある程度推定されている。さらに、フォルニカータに近縁なヒト寄生虫 *Trichomonas vaginalis* も水素を発生して ATP を合成するヒドロゲノソームとよばれる MRO を保持しており、そのプロテオミクス解析が行われている (Schneider et al. 2011 Int J Parasitol)。一方、自由生活性のフォルニカータについては、バクテリア捕食性で単離培養が不可能なため、MRO を単離しプロテオミクス解析を行うことは容易ではなかった。

こうした状況下、研究代表者らによる先行の国際共同研究 (Leger et al. 2017 Nat Ecol Evol) においては、自由生活種・片利共生種を含むフォルニカータ生物 18 種の比較トランスクリプトーム解析を行い、各生物種における MRO タンパク質を予測し、MRO 機能の進化的変遷についての推測を行った。しかしながら、多くの対象生物において RNA のシーケンスデータ量が不十分であり、発現レベルの低い遺伝子が見落とされている可能性を排除できなかった。また、典型的 Mt タンパク質の輸送シグナルに比べ、著しく多様な輸送シグナルをもつと考えられる MRO タンパク質を、配列データのみから予測するのは困難であるため、予測結果の信頼性に疑問がもたれた。さらに、各生物種の MRO タンパク質候補の予測に際し、フォルニカータの祖先段階において分岐した *Trichomonas* の MRO タンパク質のホモログを、各生物種のトランスクリプトームデータから検索するという方法を用いたものの、この方法では、*Trichomonas* の MRO タンパク質以外がその生物の MRO に存在したとしてもそれを検出できないことは明らかであった。

### 2. 研究の目的

こうした問題点を克服して、フォルニカータ生物の MRO 機能の進化過程を精度良く推測し、嫌気環境適応による Mt/MRO 進化を総合的に議論するために、本課題では以下の問いを設定した。

- 問 : 各フォルニカータ生物において MRO に局在するタンパク質は生息環境/系統位置によってどう異なるか。また、MRO タンパク質の喪失と新規獲得の過程はどうなっているか
- 問 : MRO プロテオームの違いをもたらす適応進化の原動力とメカニズムは何か
- 問 : 真核生物において、嫌気環境適応による Mt 機能の縮退進化や MRO 機能の進化にどのような多様性があるのか。普遍的な進化メカニズムは存在するのか

これらを解明してフォルニカータ生物群における MRO 機能の進化の全貌を捉えるために、さまざまな系統位置と生息環境・生活様式をもつ生物種を対象とした解析を行うこととした。まず、各生物種において MRO のプロテオミクス解析を行うための基盤となる、高品質のゲノム・トランスクリプトームデータを得て、各生物種において MRO を単離してプロテオミクス解析を行い、得られた MRO プロテオームのデータをもとに、各生物において真に MRO に局在するタンパク質のレパートリーを明確にし、系統樹のもとでそれらを *Trichomonas*, *Giardia*, *Spironucleus* の既知の MRO プロテオームのデータとともに比較し、MRO 機能の進化過程を解明することとした。

### 3. 研究の方法

**基盤データの整備:** プロテオミクス解析の基盤となる高品質な配列データを得て、信頼度の高い遺伝子アノテーションを行うために、既存のトランスクリプトームデータをはるかに上回る大量のゲノム・トランスクリプトームデータを得て、遺伝子のカバー率とアセンブルの精度を上げた。それをもとに遺伝子アノテーションを行った。

**MRO の精製とプロテオミクス解析:** MRO のマーカーとして Mt/MRO に確実に存在することが分かっているシャペロニン (CPN60) を用い、バクテリアには反応しない抗 CPN60 抗体を作製し、免疫電顕法により MRO への局在を確認し、細胞破碎の条件を厳密に検討した上で、密度勾配超遠心法により MRO を豊富に含む画分を分離し、抗 CPN60 抗体を用いたウエスタンブロットによりそれを検出した。その画分を大量に精製しプロテオミクス解析を行った。

**細胞生物学的解析:** MRO のプロテオームのデータが得られた生物について、予想外のものなどを含め注目すべき MRO タンパク質を選び、それらに対する抗体を作製し、その抗体と抗 CPN60 抗体との共同在を光顕・電顕観察によって確認し、それらのタンパク質が確かに MRO

タンパク質であることを証明した。

分子進化学的解析：実験研究により明らかになった真の MRO タンパク質について、フォルニカータ生物群内での比較解析を行い、MRO 機能の進化過程を推測した。さらに、各 MRO タンパク質について、生物界全体を視野に入れてデータを収集し、アライメント解析・分子系統解析を行った。

#### 4. 研究成果

基盤データの整備：*Aduncisulcus paluster* (自由生活種) および *Dysnectes brevis* (自由生活種) について、ドラフトゲノム解析を行い推定遺伝子のアノテーションを行った。それに際し、先行研究 (Leger et al. 2017 Nat Ecol Evol) よりも高品質なトランスクリプトームデータを得た。*Aduncisulcus* については論文公表済み (雑誌論文項 Yuyama et al.) *Dysnectes* については学会発表を終え (学会発表項 久米他)、現在論文投稿の準備中である。*Kipferlia bialata* (自由生活種) および *Trepomonas* sp. NIES-1444 株 (寄生性の祖先から二次的に自由生活化した種) について、先行研究 (Leger et al. 2017 Nat Ecol Evol) よりも高品質なトランスクリプトームデータを得た。なお、*Kipferlia* のドラフトゲノムについては研究開始前に公表済み (Tanifuji et al. 2018 PLoS one) である。さらに、二次的に自由生活化した種であり *Trepomonas* に近縁な *Hexamita* sp. NIES-1440 株についても高品質なトランスクリプトームデータを得た。これら 3 生物種 *Kipferlia*, *Trepomonas* sp., *Hexamita* sp. のトランスクリプトームデータをまとめて論文公表 (雑誌論文項 Kume et al.) した。

MRO の精製とプロテオミクス解析：バクテリアとの混合培養系から MRO をできる限り精製してプロテオミクス解析を行うための方法論を確立した。まず、回収した細胞を OptiPrep™ にて作製した密度勾配を用いて遠心することにより、バクテリア層とフォルニカータ層を分離した。次に、フォルニカータ細胞を回収し、少量混在するバクテリアを破砕せずにフォルニカータ細胞の細胞膜のみを破砕する条件で細胞を破砕したのちに、バクテリアを除去し MRO を豊富に含む細胞破砕液を得た。これをスクロースにて作製した密度勾配を用いた超遠心に供し 11 の画分に分離した。これら 11 画分に対する抗 CPN60 抗体 (MRO)、抗 rpsB 抗体 (バクテリア)、抗  $\alpha$ -チューブリン抗体 (細胞質) の反応性を確かめるためにウエスタンブロット解析を行い、MRO を豊富に含む画分を特定した。なお、CPN60 が MRO に局在することを、あらかじめ免疫電顕法によって確かめておいた。11 画分のうち MRO 画分、細胞質画分を含む 7 画分および細胞破砕液の合計 8 サンプルをプロテオミクス解析に供した。得られたデータから、7 つの画分それぞれの細胞破砕液に対する iTRAQ ratio を検出された全タンパク質に対して算出した。こうして得られた各タンパク質に対する iTRAQ ratio からなる 7 次元ベクトルをもとに、多変量統計解析の手法を用いて各タンパク質のクラスタリングを行い、CPN60 を含む MRO タンパク質からなると考えられるクラスターを特定した。

上述の方法を確立して、現在までに *Kipferlia bialata* と *Dysnectes brevis* について MRO のプロテオミクス解析を終えた。その結果、*Kipferlia* については約 70 の MRO タンパク質が同定され、これまで配列レベルの解析から予測されていた、ピルビン酸代謝、嫌氣的 ATP 合成、水素産生、NADH 再酸化、鉄・硫黄クラスター合成、グリシン開裂、抗酸化などに関与するタンパク質が真に MRO 局在であることが示された。さらに、これまでの配列レベルの解析からは見いだせなかった 10 程度の代謝関連タンパク質の存在も明らかとなった。*Dysnectes* については約 60 の MRO タンパク質が同定され、これまで予測されていた水素産生、鉄・硫黄クラスター合成、グリシン開裂に関与するタンパク質の MRO 局在が確かめられた。また、これまで定かではなかったピルビン酸代謝に関与するタンパク質の MRO 局在も明らかとなった。さらに、いくつかの代謝関連と考えられるタンパク質も同定されたが、その中にアシル CoA 合成酵素様タンパク質が含まれていた。

細胞生物学的解析：*Kipferlia* において MRO 局在が示されたタンパク質のうち、嫌氣的 ATP 合成の鍵酵素である Succinyl-CoA synthetase (SCS) の  $\alpha$ -サブユニットおよび鉄・硫黄クラスター合成に関与するタンパク質 Nfu1 について、間接蛍光抗体法を用いて解析した結果、これら両タンパク質に対する抗体と抗 CPN60 抗体とが、共同在して細胞内にドット上に検出された。このことから、これらのタンパク質の MRO 局在を細胞生物学的にも示すことができた。現在、他の *Kipferlia* の MRO タンパク質 3 種、*Dysnectes* の MRO タンパク質 3 種についても同様の解析を進めている。

分子進化学的解析：*Kipferlia* と *Dysnectes* の MRO タンパク質として同定されたものを、フォルニカータに近縁な *Trichomonas* の MRO タンパク質と比較すると、*Kipferlia* ではほぼ同様のレパートリーと考えられたが、*Dysnectes* では明らかにそのレパートリーは縮退していた。一方、2 種ともにフォルニカータの寄生虫である *Giardia* や *Spiroplasma* よりも、より多くの MRO タンパク質を保持していた。系統樹上では、*Trichomonas*, *Kipferlia*, *Dysnectes*, *Spiroplasma*, *Giardia* の順に分岐していることから、進化の過程で段階的に MRO タンパク質のレパートリーが縮退していった、すなわち MRO の機能縮退が起こった可能性が示唆された。一方、*Kipferlia* と *Dysnectes* で検出された各 MRO タンパク質について、各遺伝子の起源や進化を明らかにするために、全生物界から (推定) ホモログデータを収集して、アライメント解析・分子系統解析を進めている。現在までに、嫌氣的 ATP 合成に関与するタンパク質群の解析を終了している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Euki Yazaki, Keitaro Kume, Takashi Shiratori, Yana Eglit, Goro Tanifuji, Ryo Harada, Alastair Simpson Alastair G B, Ken-ichoro Ishida, Tetsuo Hashimoto, Yuji Inagaki	4. 巻 287
2. 論文標題 Barthelonids represent a deep-branching metamonad clade with mitochondrion-related organelles predicted to generate no ATP	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences	6. 最初と最後の頁 20201538
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1098/rspb.2020.1538	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Ikuko Yuyama, Keitaro Kume, Takumi Tamura, Yuji Inagaki, Tetsuo Hashimoto	4. 巻 12
2. 論文標題 Draft genome sequence of <i>Aduncisulcus paluster</i> , a free-living microaerophilic eukaryote belonging to Fornicata.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e0053922
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mra.00539-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Keitaro Kume, Tsubasa Gen, Kazutaka Abe, Hiroshi Komatsuzaki, Euki Yazaki, Goro Tanifuji, Ryoma Kamikawa, Yuji Inagaki, Tetsuo Hashimoto	4. 巻 12
2. 論文標題 Transcriptome data sets of free-living diplomonads, <i>Trepomonas</i> sp. and <i>Hexamita</i> sp.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e0050623
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mra.00506-23	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 巖 翼, 久米 慶太郎, 阿部 一貴, 矢崎 裕規, 小松崎 洋志, 谷藤 吾朗, 神川 龍馬, 稲垣 祐司, 橋本 哲男
2. 発表標題 寄生性の祖先から自由生活性に転じたディプロモナス類における自由生活関連タンパク質の探索
3. 学会等名 第92回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 久米 慶太郎, 若島 朋幸, 巖 翼, 岩本 亮介, 井上 貴史, 谷藤 吾朗, 神川 龍馬, 稲垣 祐司, 橋本 哲男
2. 発表標題 ディプロモナス類の寄生虫化に伴う遺伝子レパトリーの変化: 近縁自由生活種とのオルソログ比較解析
3. 学会等名 第93回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 小金丸 利隆, 田村 嘉孝, 星 康貴, 久米 慶太郎, 橋本 哲男, 奈良 武司
2. 発表標題 Giardia intestinalisとその自由生活性近縁種におけるAcetyl-CoA Synthetase (ACS) の比較解析
3. 学会等名 第93回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	久米 慶太郎  (Kume Keitaro)  (70853191)	筑波大学・医学医療系・助教   (12102)	
研究分担者	千葉 洋子  (Chiba Yoko)  (70638981)	国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・上級研究員   (82401)	
研究分担者	神川 龍馬  (Kamikawa Ryoma)  (40627634)	京都大学・農学研究科・准教授   (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	奈良 武司  (Nara Takeshi)  (40276473)	医療創生大学・薬学部・教授     (31603)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
カナダ	Dalhousie University			