

見せてもらおうか、縮退進化したミトコンドリアの性能とやらを

岩本 亮介 (筑波大学 生物学類)

指導教員：橋本 哲男 (筑波大学 生命環境系)

【研究の背景と意義】

真核生物の中には、好気呼吸能や mtDNA、クリステといった典型的な機能と形態を二次的に失ったミトコンドリアをもつ生物が様々な系統群に存在する。このような縮退したミトコンドリアは嫌気適応や寄生適応の結果生じたと考えられており、ミトコンドリア関連オルガネラ (Mitochondrion Related Organelles: MROs) と総称されている。典型的なミトコンドリアから MRO への進化の過程を推定することは、真核生物に普遍的に存在するミトコンドリアの真の姿の理解に重要であり、真核生物の起源や初期進化に迫る糸口にもなりうる。

MRO をもつ真核生物で構成される大系統群としてメタモナス生物群がある。本生物群では、トランスクリプトームデータに基づく大規模な比較解析の結果、MRO の機能の段階的な縮退が起きたことが示唆されている¹。しかしながら、トランスクリプトームデータのみでは真に MRO に局在するタンパク質が不明であり、それ故、メタモナス生物群における MRO の進化史の理解は未だ限定的である。そこで我々は、メタモナス生物群に属する 2 種の自由生活性生物 *Dysnectes brevis* と *Kipterlia bialata* において真に MRO に局在しているタンパク質群を明らかにすることを目的に、これらのもつ MRO のプロテオーム解析に取り組んでいる。これら 2 種は、既に MRO のプロテオーム解析が実現している 2 種の寄生性生物 (*Trichomonas vaginalis*, *Giardia intestinalis*) の分岐の間に位置する為、これら 4 種の共通祖先から最も縮退した MRO をもつ *G. intestinalis* に至るまでの MRO の進化の理解に大きく貢献することが期待される。また、本研究は自由生活性真核生物のもつ MRO を対象とした初のプロテオーム解析の試みであり、本研究の実現はミトコンドリアの多様性と普遍性の更なる理解につながることも期待される。

【研究方針とこれまでの研究成果】

「分けてから壊す」のではなく「壊してから分ける」

これまで各種細胞小器官の精製が実現されてきた対象生物とは異なり、本研究の対象生物である *D. brevis* と *K. bialata* は餌となる複数種の細菌を含む混合培養系で継代培養されている。この点が本プロテオーム解析の実現において大きな障壁となっている。我々は、「対象の真核生物を完全に単離したのちに、破碎し、MRO を精製する」のではなく、「細菌をおおよそ除いた後に対象生物のみを破碎し、その後細菌を完全に除いて MRO を精製する」といった戦略をとることで、単独培養系を構築することなく対象生物の MRO のプロテオーム解析を実現することを目指している。

密度勾配遠心法による対象生物と細菌の分離方法^{2,3}と対象生物の培養方法の改良により、高純度・高密度の真核生物懸濁液の簡易的な取得方法を確認した。これにより、細胞数で比較して培養液中では対象生物の 1000 倍程度存在する細菌を、1~10 倍程度にまで減らすことが可能である。また、PBS や Tris-HCl の等張液の濃度を調べる実験を通して、対象生物の細胞形態が浸透圧

に非常に敏感であることが示唆された。そこで、低張の Tris-HCl 内での細胞の挙動を動画撮影により観察したところ、対象生物が数秒で破裂する様子が確認された。加えて、強い攪拌処理により細胞が均一に破壊されることも示された。上述の戦略による研究の実現には、真核生物の細胞膜のみを破碎し、MRO 及び細菌は破碎しない破碎方法が必要となるが、これらの結果より、その候補として低張液と攪拌を組み合わせた破碎が有力であると考えている。本発表では、現在考案している研究方針の概要を紹介するとともに、対象生物が低張液によって一瞬にして破裂する様子を紹介したい。

細菌のホモログにクロスリアクトしない抗体の作製

本プロテオーム解析の実現には、細胞破碎後の MRO の状態の確認や、密度勾配遠心による MRO 精製時の MRO 画分特定の為、MRO に局在するタンパク質に対する抗体の作製が必要不可欠である。しかしながら、MRO はミトコンドリアとなった細菌の祖先に由来する為、MRO に局在していることが十分に確からしいタンパク質である CPN60 に対してこれまでに作製された抗体³には細菌のもつホモログである GroEL にもクロスリアクトするという問題があった。そこでまず、対象生物の CPN60 と細菌の GroEL のアミノ酸配列を比較し、対象生物に特異的に存在する領域を明らかにした。そして、本領域が CPN60 の分子表面に位置していることが期待された為、本領域と同じ配列の合成ペプチドを抗原として、対象生物特異的に存在する領域に対する抗ペプチド抗体を作製した。作製後、それら抗体をウェスタンブロットによって評価した結果、少なくとも *D. brevis* の CPN60 に対する抗体については培地中の細菌のもつ GroEL とクロスリアクトしないことが示された。本発表において、抗原デザイン経緯の詳細と、作製した抗体の評価結果を紹介する予定である。

【参考文献】

1. Leger, M. M. *et al.* Organelles that illuminate the origins of *Trichomonas* hydrogenosomes and *Giardia* mitosomes. *Nat. Ecol. Evol.* **1**, 0092 (2017).
2. 高林舜. *Kipterlia bialata* の大規模配列データから推測するフォルニカータ生物ミトコンドリアの縮退進化. 筑波大学生物科学専攻修士論文 (2016).
3. 井上貴史. *Dysnectes brevis* のミトコンドリア関連オルガネラ機能の推測とフォルニカータ生物におけるミトコンドリアの縮退過程の解明. 筑波大学生物科学専攻修士論文 (2017).