

## オピストコンタ早期分岐系統におけるオートファジー関連遺伝子の網羅的探索

上原 忠晃 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 稲垣 祐司 (筑波大学 生命環境系)

## 背景

オートファジーは細胞内での物質循環に関わる機構であり、これまでに菌類・後生動物を中心に研究が進んできた。現在のオートファジーの研究は菌類、後生動物、陸上植物、一部の病原性原虫などのモデル生物に限定されているが、オートファジー機構は真核生物の広い系統で保存されていると提唱されている (Duszenko *et al.* 2011)。しかし、これまでに系統的に限定された真核系統からのデータに基づき理解されてきたオートファジー機構が、真核生物全体でどれほど普遍的かを検証するには非モデル生物からの知見が不足している。

本研究は、真核生物全体におけるオートファジー機構がどのように進化してきたかを解明することを大目標とし、その第一段階として最もオートファジー研究の進む菌類・後生動物が含まれるオピストコンタにおける早期分岐系統の基盤的知見を拡充し、この系統群におけるオートファジー機構の進化を理解しようと試みた。オピストコンタの早期分岐系統に加え、オピストコンタに近縁と考えられる生物群を研究対象とし、それらの生物種のトランスクリプトーム中にオートファジーにおいて必須のタンパクである ATG8 およびその関連タンパク質をコードする遺伝子があるかを精査した。以上の結果を基にオピストコンタ周辺におけるオートファジーの普遍性を議論する。

## 実験方法

## 1. 解析対象生物の選出およびトランスクリプトームデータ収集

オピストコンタにおける各内部系統、またオピストコンタに近縁な系統である Apusomonadida, Ancyromonadida, Breviatea, Amoebozoa のうち、NCBI の Short Read Archive (SRA) に大規模分子データが登録されている 1~5 種を探索対象とした。解析対象とした生物種は、Torruella *et al.* (2015) で解明されたオピストコンタとその近縁種の系統関係を参考にした。

## 2. ヒトおよび酵母の ATG8 関連タンパク質配列データの収集

KEGG pathway に登録されているヒトおよび酵母の ATG8 関連タンパク質 (ATG8, ATG4, ATG7, ATG3, ATG12, ATG5, ATG10) のアミノ酸配列データを取得した。

## 3. 相同性検索による ATG8 関連タンパク質コード配列の検出

## I. トランスクリプトームデータからの配列の復元

NCBI SRA より取得したトランスクリプトームデータは、FASTX-Toolkit による配列のクオリティコントロール後、Trinity v2.5.1 によってアセンブルし、mRNA 配列の復元をおこなった。

## ii. オーソログ候補の選出

復元した mRNA 配列データに対し、ヒトおよび酵母の ATG8 関連タンパク質配列を問合せ配列とし、TBLASTN によって

ATG8 関連タンパク質コード遺伝子の候補核酸配列選出をおこなった。*E*-value が  $1e^{-10}$  以上のものは候補配列から排除した。

## iii. 候補配列の精査

相同性解析により選出した候補 mRNA (核酸) 配列を EMBOSS Transeq によりアミノ酸配列に翻訳した。それらのアミノ酸配列を問合せ配列として、NCBI Non-redundant protein sequences に対して BLASTP による相同性検索を行い、問合せ配列と対象配列のアライメント、対象配列のアノテーションから、問合せ配列が ATG8 関連タンパクをコードしている配列かを精査した。精査した配列はヒトおよび酵母の ATG8 関連タンパク質配列と MAFFT v7.307 を用いてアライメントし、機能ドメインの保存性などを確認し、最終的にそれらが ATG8 関連タンパク質をコードする配列かを判断した。

## 結果と考察

相同性検索によって抽出した ATG8 関連タンパク質の候補を精査した結果、今回解析した Microsporidia に所属する生物種以外からは ATG8 ホモログ配列が検出された。Apusomonadida, Ancyromonadida, Breviatea において ATG8 が保存されていることから、オートファジーの機構がオピストコンタおよびその近縁系統においても保存されていることが示唆された。

ATG8 以外の ATG8 関連タンパク質に関しては、やはり Microsporidia 以外からは少なくとも 1 種類が検出されていたが、ATG4, ATG12 や ATG10 は生物種によって検出されない場合が多かった。今回の解析はトランスクリプトームを対象におこなったが、オートファジー関連遺伝子は飢餓状態などがトリガーとなる転写制御を受けており (Zhu, Gayathri & Plowey 2014)、探索対象の mRNA が検出できなかった可能性がある。

本研究により、オピストコンタおよびその近縁系統においてオートファジーの機構が保存されていることが示唆された。今後、オピストコンタおよびその近縁系統におけるオートファジー機構の全容を解明するためには、今回探索した以外のオートファジー関連の因子群をトランスクリプトーム配列に加えてゲノム配列中にも探索すべきである。

## 参考文献

- Duszenko *et al.* (2011) *Autophagy* 7:2, 127-158  
 Torruella *et al.* (2015) *Curr. Biol.* 25, 2404-2410  
 Zhu, Gayathri & Plowey (2014) *Autophagy* 10:9, 1622-1636