

## 嫌気・微好気性鞭毛虫の系統メタモナスにおける解糖系関連酵素の進化

小林 祐介 (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)

## はじめに

真核生物の中には、嫌気・微好気環境に適応した結果、酸素呼吸を行う典型的なミトコンドリア (Mt) を失っている系統が多数存在する。中でもメタモナスは典型的な Mt を欠く鞭毛虫の大きな系統群であり、いずれの生物も基質レベルのリン酸化により嫌氣的に ATP を合成している。

メタモナスはさらに3つの部分系統群、プレアクソスティラ、パラバサリア (寄生虫 *Trichomonas* 等)、フォルニカータ (寄生虫 *Giardia* 等) に分けられ、名前を挙げた寄生虫においては過去、嫌氣的エネルギー代謝に関する多くの知見が報告されている。

一方で近年、*Trichomonas* や *Giardia* に近縁な自由生活性のメタモナス鞭毛虫が数多く発見され、所属研究室を含む複数の研究室において、それら自由生活性種のゲノム・トランスクリプトームのデータが蓄積されている [1,2]。

これらのデータを用い、自由生活種を含めて嫌氣的エネルギー代謝に関する比較解析を行うことは、嫌気・微好気環境におけるエネルギー代謝の多様性や進化を探るうえで重要である。

そこで本研究では、嫌氣的エネルギー代謝の要となる解糖系に着目し、解糖系を構成する10個の酵素のそれぞれが、メタモナス生物においてどのような進化を遂げたのかを明らかにするために、各酵素のアミノ酸配列データに基づく分子系統解析を行った。

## 対象・方法

[解析対象とした解糖系酵素]

1) Glucokinase (GCK), 2) Glucose-6-phosphate isomerase (GPI), 3) phosphofructokinase (PFK), 4) fructose-bisphosphate aldolase (FBA), 5) triose phosphate isomerase (TPI), 6) glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), 7) phosphoglycerate kinase (PGK), 8) phosphoglycerate mutase (PGAM), 9) enolase (ENO), 10) pyruvate kinase (PK)

・配列データ収集のための検索対象としたアミノ酸配列データベース

・ National Institute for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) の nr-aa

・所属研究室および他研究室から報告された、メタモナス生物のタンパク質コード遺伝子のアミノ酸配列データで nr-aa に未登録のもの、所属研究室分については未発表データを含む

## [データ収集の方法]

所属研究室にてデータベース化されている、メタモナス生物20種の全タンパク質のアミノ酸配列データを対象に、*Trichomonas* および *Giardia* の各酵素の配列データを問い合わせ配列として blastp 検索を行い、E-値  $< 1 \times 10^{-10}$  をみだす配列を選択した (全く同一の重複データおよび著しく短い配列は除外)。nr-aa から生物界全体を網羅して各酵素のホモログを検索するために、NCBI の Taxonomy データベースを参照して、真核生物を32のサブグループ、アーキアを9のサブグループ、バクテリアを43のサブグループに分割した。検索対象を nr-aa データベース内の 32 + 9 + 43 + その他の配列からなるサブグループのそれぞれに限定し

て、*Trichomonas* の各酵素の配列を問い合わせ配列として、Psi-blastp 検索を行い、E-値  $< 1 \times 10^{-10}$  (一部グループは  $< 1 \times 10^{-5}$ ) をみだす配列を選択した。さらにそれらから E-値が最大値、75%点の値、中央値、25%点の値、最小値を示す配列5つ (5点要約値) を選択し、各サブグループにおける当該酵素ホモログ配列の候補とした。メタモナスデータベースから検索した配列と各サブグループを対象に検索した配列を合わせて、分子系統解析用の候補配列データセットとした。

## [アライメントと分子系統解析]

各酵素のデータセットに対し、MAFFT v7.450 を用いてアライメント (-auto オプション) し、trimAl v1.4 を用いてアライメントに曖昧さを伴わない座位を選択 (-gappyout オプション) して、データマトリクスとした。分子系統解析には IQTREE v1.6.5 を用いた [3]。まず、一般的なパソコンにて、最初に modelfinder を用いてモデル選択を行い、BIC 最小の最適モデルを用いて100個のブートストラップデータに対する ultrafast bootstrap オプションでの解析を行い、ブートストラップ合意系統樹を得た。ただし、著しく進化速度の大きい配列や、明らかに誤ってデータに混入したと見られる配列は、アライメントをチェックしたうえで除外した。データマトリクスをもとに、国立遺伝学研究所のスーパーコンピュータを用いて、最尤系統樹の探索を行い、100個のブートストラップデータに対し通常の non-parametric bootstrap 解析を行ってブートストラップ値 (BP 値) を算出しそれらを最尤系統樹上に示した。さらに、内部枝の信頼度に対する別の尺度として TBE 値 [4] も算出した。

## 結果

解析配列数は79から423、解析座位数は218から1586に及んだ。10個の酵素のなかで、真核生物の全てのサブグループが1つにまとまる酵素はなかった。メタモナスについては、最尤系統樹で、パラバサリアの単系統性が復元されたのは PGAM を除く9酵素で、同様にプレアクソスティラは GCK を除く9酵素、フォルニカータは PFK, GAPDH, PGK, ENO, PK の5酵素であった。一方、メタモナスの単系統性はどの酵素についても復元されず、パラバサリア、プレアクソスティラ、フォルニカータのうち1つ~2つの組み合わせが、バクテリアの系統の中に含まれる例が多かった。

## 考察

生物界全体からの網羅的なタクソンサンプリングに留意した解析により、解糖系10酵素それぞれの複雑な進化史の一端が明らかになった。とくに、嫌気・微好気性生物のみからなるメタモナス生物について、バクテリアから水平転移した酵素が用いられていると考えられる例が多く、哺乳類・シロイヌナズナなどの好気性真核モデル生物の解糖系との相違が明確となった。

## 文献

[1] Leger et al. (2017) Nat Ecol Evol 1:0092; [2] Tanifuji et al. (2018) PLoS One 13: e0194487; [3] Nguyen et al (2015) Mol Biol Evol 32:268-274; [4] Lemoine et al. (2018) Nature 556:452-456