

Kipferlia bialata におけるミトコンドリア関連オルガネラ候補タンパク質の局在解析

岸田 雄真 (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)

【本研究の背景と目的】

真核生物がもつ典型的なミトコンドリアは、酸素を利用して生体エネルギーである ATP を合成する細胞小器官として知られている。しかし真核生物の中には、ミトコンドリアの機能が縮退し、好氣的な代謝経路などを消失した細胞小器官をもつ系統も存在している。これをミトコンドリア関連オルガネラ (Mitochondrion Related Organelles; MRO) と呼ぶ。真核生物の生物群の一つであり、微好気・嫌気環境に生育するメタモナス生物群では、2 次的に喪失した一種を除き全ての種が MRO をもつことが知られている。これまでの研究で、これらメタモナス生物群のトランスクリプトーム解析の結果から、メタモナス生物群において MRO の機能が種によって多様化していることが示唆されている¹。

メタモナス生物群の二種の寄生虫、*Trichomonas vaginalis* と *Giardia intestinalis* では、いずれも医学的重要性から研究が進んでおり、MRO におけるプロテオーム解析が実施されている。その結果から、*T. vaginalis* では水素生成経路や嫌氣的 ATP 合成系など、比較的多くの機能を残しているのに対して²、*G. intestinalis* では進化の過程で MRO の機能の大半を喪失しており、嫌氣的 ATP 合成系さえも残っていないとされている³。しかし、他の多くのメタモナス生物では、ゲノムあるいはトランスクリプトームのデータが報告されているだけで、それらの MRO タンパク質が配列情報から予測されているに過ぎない。MRO の機能の進化史を解明するためには、メタモナス生物群のそれぞれの種が持つ MRO の機能、すなわち、MRO に真に局在するタンパク質のレパートリーを実験的に調べる必要がある。

そこで本研究では、メタモナス生物群に属し、*T. vaginalis* の分岐と *G. intestinalis* の分岐の中間から分岐する自由生活種である *Kipferlia bialata* において、MRO タンパク質候補である、嫌氣的 ATP 合成に関与するタンパク質が MRO に局在するか否かを実験的に明らかにすることを目的とした。本研究では *K. bialata* の MRO 候補タンパク質として、まず、嫌氣的 ATP 合成系に関わる酵素である succinyl CoA synthetase の α サブユニット (SCS α) を選択した。SCS α を対象に間接的免疫蛍光アッセイ (IFA) を用い、所属研究室において既に MRO への局在が実験的に確認されているシャペロニン 60 (CPN60) をコントロールとして局在の有無を確認することとした。SCS は acetate: succinate CoA transferase (ASCT) とともにアセチル CoA を酢酸へと変換する過程で ATP を合成する酵素であり、MRO における ATP 合成系の存在を裏付ける酵素ともいえる。

【方法】

K. bialata の SCS α の局在を IFA にて調べるために、リコンビナント SCS α に対する抗体を作製する作業を行った。

所属研究室で得られた *K. bialata* のゲノム配列から、SCS α をコードする領域を相同性検索により取得した。その配列を PCR 増幅後、pET151/D-TOPO ベクターにライゲーションし、SCS α の N 末側に His tag を付したタンパク質を発現させるためのプラスミドとした。そのプラスミドを精製後、タンパク質発現用の大腸

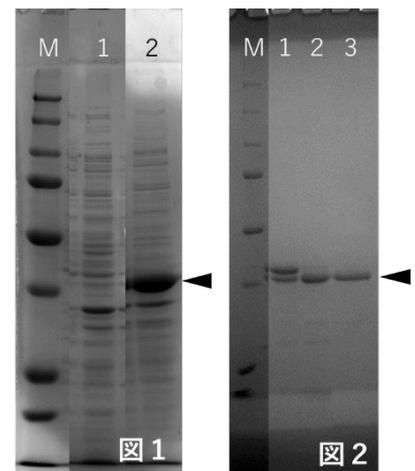
菌 BL21 Star™ (DE3) に形質転換した。プラスミドを取り込んだ大腸菌に対し発現誘導物質である 0.5 mM IPTG を添加して 37°C で培養し、ソニケーションによる細胞破碎・遠心後、上清および不溶性画分を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) に供し SCS α の発現を確認した。この大腸菌を 500 mL の LB 培地で大量に培養し、目的のタンパク質を含む不溶性画分のタンパク質を回収した。次に、目的である SCS α のみを回収するため固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (IMAC) による His tag 精製を行った。さらに、His tag を TEV プロテアーゼ処理により切断し、目的の SCS α タンパク質を得た。

【結果】

SCS α は IPTG 添加後 3 時間で約 37 kDa の不溶性のタンパク質として大量に発現した (図 1 矢頭)。また、TEV プロテアーゼによる酵素処理後のサンプルを His tag 精製し、SDS-PAGE に供したところ、wash 後の溶出液に処理前よりも分子量が小さくなった目的のタンパク質を確認できた (図 2 矢頭)。

図 1. タンパク質発現解析。M: マーカー、1: IPTG 無、2: IPTG 有。

図 2. TEV プロテアーゼ処理。M: マーカー、1: 酵素処理 0 時間、2: 酵素処理 24 時間、3: His tag 精製後



【今後の予定】

所属研究室の共同研究先にて、精製した SCS α をマウスの体内にインジェクションし *K. bialata* の SCS α に対する一次抗体 (抗血清) を作製する予定である。また、*K. bialata* の MRO 候補タンパク質として SCS の β サブユニット (SCS β)、さらに嫌氣的 ATP 合成系に関わる酵素 acetyl-CoA synthetase 2 (ACS2) についても現在一次抗体作製のためのタンパク質精製を行っている。これらの候補タンパク質についても局在解析を進める予定である。

【参考文献】

- Leger, M. M. *et al.* Organelles that illuminate the origins of *Trichomonas* hydrogenosomes and *Giardia* mitosomes. **1**, 0092 (2017).
- Schneider, R. E. *et al.* The *Trichomonas vaginalis* hydrogenosome proteome is highly reduced relative to mitochondria, yet complex compared with mitosomes. *Int. J. Parasitol.* **41**, 1421–1434 (2011).
- Dolez, P. *et al.* The minimal proteome in the reduced mitochondrion of the parasitic protist *Giardia intestinalis*. **6**, 15–21 (2011).