

嫌気性真核微生物 *Dysnectes brevis* の縮退型ミトコンドリアのプロテオーム解析

若島 朋幸 (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)

【背景と目的】

真核生物の系統樹上では、一度獲得したミトコンドリアの機能を二次的に消失する「縮退」が複数の分類群で散見される。ミトコンドリアの機能の縮退は、それぞれの分類群において生活環境への適応の結果生じたと考えられており、これらの縮退型のミトコンドリアはミトコンドリア関連オルガネラ (MRO, Mitochondrion Related Organelles) と総称される。典型的なミトコンドリアから MRO への進化の過程の解明は、現生の真核生物がもつミトコンドリアの機能の解明や真核生物の初期進化の解明の糸口になると期待される。所属研究室では MRO をもつ真核生物の系統の1つである「メタモナス生物群」に着目した研究を行っている。

メタモナス生物群におけるミトコンドリアの縮退は好気・嫌気適応や寄生適応の結果生じたと考えられており、これまでの解析の結果から、TCA 回路や酸化的リン酸化による好氣的 ATP 合成能や、ミトコンドリアゲノムの二次的な消失が起こったと推定されている¹。しかし、メタモナス生物群におけるミトコンドリアの縮退の過程は未だ完全には明らかとなっておらず、その解明には系統樹上の複数の進化段階の生物が持つ MRO の機能の解析と比較が必要である。本研究ではメタモナス生物群に属する自由生活型の好気性従属栄養真核微生物 *Dysnectes brevis* がもつ MRO に注目した。

メタモナス生物群における MRO の機能は、ヒトに感染する病原性寄生生物の *Trichomonas vaginalis* と *Giardia intestinalis* において研究が進んでおり、プロテオーム解析の結果から *T. vaginalis* に比べ *G. intestinalis* は、より機能が縮退した MRO を持つことが明らかとなっている¹。トランスクリプトームデータから本研究の対象生物である *D. brevis* の MRO の機能も推定されているが、MRO に真に局在するタンパク質のリストや嫌氣的 ATP 合成系などの機能は完全には解明されていない¹。そこで、本研究では系統樹上において *T. vaginalis* と *G. intestinalis* の分岐の中間に位置する *D. brevis* の MRO に局在するタンパク質の全貌を明らかにすることで、メタモナス生物群内におけるミトコンドリアの縮退の過程を解明することを目指した。発表では、研究方針の概要と現在までに得られた実験条件検討の結果を紹介したい。

【研究の方針】

所属研究室の先行研究により、*D. brevis* に近縁な自由生活性メタモナス生物の一種である *Kipferlia bialata* の MRO のプロテオーム解析の手法が確立された²。一般的な真核生物における細胞小器官のプロテオーム解析では、対象生物を単離し細胞小器官を精製した上でプロテオームを解析する手法が一般的である。しかし *K. bialata* では、培養液中に対象生物の餌となる細菌が存在している状態であるため、細菌をおおよそ除去した後に対象生物の細胞のみを破碎し、密度勾配遠心によってオルガネラと細菌のタンパク質を複数のフラクションに分けた上でタンパク質の質量分析

を行う必要がある。この手法では、除去できなかった細菌を他のオルガネラと同様に扱うことで、MRO のプロテオーム解析においてひとつの障壁となる対象生物の単離培養系の構築を必要とせずオルガネラに局在するタンパク質を特定することができる²。

本研究では、*K. bialata* の MRO のプロテオーム解析のために確立された先行研究の実験プロトコルをもとに、*K. bialata* と *D. brevis* の細胞の特性の違いに留意しながら実験条件を再検討し、*D. brevis* の MRO のプロテオーム解析を実施する。

【現在までの成果】

これまでに、実験に用いる *D. brevis* の細胞の効率的な大量培養方法の確立、細胞回収実験、そしてウェスタンブロットで用いる一次抗体の作成とその抗体の評価を行った。

大量培養条件の検討では、*D. brevis* の継代培養株から培養を開始して最も早く細胞密度の高い状態の培養液を安定して大量に確保する方法を検討した。その結果、75 mL フラスコと 1,000 mL フラスコを用いた好気培養による効率的な継代培養の方法を確立することができた。

細胞回収実験では、培養液の密度勾配遠心による *D. brevis* の細胞の回収効率を確かめることができた。この操作により、細胞数で比較して培養液中では *D. brevis* の 100 倍程度存在する細菌数を、1 倍以下まで減らせることがわかった。現在、回収した細胞を用いて、対象生物の細胞のみを破碎する条件の検討中である。

さらに、MRO のプロテオーム解析にあたっては、細菌のホモログにクロスリアクトしないウェスタンブロット用の一次抗体を作製する必要がある。分画後のウェスタンブロットにはミトコンドリア局在タンパク質の一種である Cpn60 に対する抗ペプチド抗体を用いる²。同様に、MRO 以外のオルガネラや細菌の分布を調べるために抗 α -Tubulin 抗体、抗バクテリア rpsB 抗体も使用する。これら 3 種類の抗体について *D. brevis* の Total タンパク質と培養液中に存在する細菌の Total タンパク質を用いて、ウェスタンブロットで評価した。さらに、この 3 種類に加え、新たに *D. brevis* の小胞体 (ER) の分布を調べるために、ER 局在が予想されるタンパク質 PDI (Protein Disulfide Isomerase) に対する抗体を現在作製中である。

本発表では、条件検討の実験方法、抗体デザインの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. 岩本亮介. 自由生活性フォルニカータ鞭毛虫 *Kipferlia bialata* のミトコンドリア関連オルガネラのプロテオーム解析. 筑波大学生物科学専攻修士論文. (2021)