

研究題目 寄生胞膜に特異的に集積するタンパク質群の網羅的な同定

研究組織

研究代表者：山本雅裕（大阪大学微生物病研究所）

共同研究者：小迫秀尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：笹井美和（大阪大学微生物病研究所）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

トキソプラズマ原虫は、感染細胞の細胞質に寄生胞と呼ばれる特殊な膜構造体を形成し、その中で増殖する細胞内寄生病原体である。一方、宿主はその寄生胞膜を破壊することによりトキソプラズマ原虫の増殖の場を奪い感染を制御していることが知られているが、寄生胞に集積するトキソプラズマのタンパク質群や寄生胞膜の破壊に関与する宿主タンパク質群の全容は良く分かっていない。トキソプラズマ原虫の寄生胞膜上には、トキソプラズマ原虫から放出されるGRAタンパク質と呼ばれるタンパク質群が局在していることが知られており、これらのGRAタンパク質を指標にしてGRAに結合するタンパク質またはGRAの近傍に存在するタンパク質群を質量分析装置で解析を行うことにより寄生胞膜上に局在する分子を網羅的に同定する。また、寄生胞膜はインターフェロン- γ 刺激依存的に宿主によりその膜が破壊されることが知られており、膜破壊に関与している分子であるインターフェロン誘導GTPaseを同定している。インターフェロン- γ 刺激依存的に寄生胞膜上に局在する宿主タンパク質群を同定するために、GBP結合分子及び近傍に存在する分子を質量分析装置により

網羅的に同定することにより、GBP依存的な寄生胞膜破壊機構に関与する宿主タンパク質及びそれを阻害するトキソプラズマ原虫由来のタンパク質を探索し、宿主と病原体の相互作用を解析する。

[1-2]研究の方法・経過

トキソプラズマ原虫感染の際に感染細胞内に形成される寄生胞膜上に集積する分子を網羅的に解析するため、トキソプラズマ感染後のトキソプラズマ寄生胞に集積することが既に知られているインターフェロン誘導GTPaseのN末端領域にビオチンリガーゼであるTurboIDを付加し、発現させた細胞にトキソプラズマを4時間感染させ、その後細胞を回収してビオチン化されている分子について解析を行った。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

その結果、300-800 μ gのタンパク量から2000種類以上のビオチン化タンパク質を同定することができたが、その多くはインターフェロン誘導GTPaseそのものに結合する分子であり、寄生胞膜上で特異的に結合している分子では可能性は低かった。問題は感染させるトキソプラズマ由来の分子の量によるが、現在以上の効率・数で感染さ

せるのは現実的ではなく、また感染時間の延長は細胞死を誘導してしまうため不可能であった。そこで、トキソプラズマ側から寄生胞膜へと放出されることが報告されている GRA17 に TurboID を付加し、GRA17 に相互作用を示す宿主分子の探索を行った。しかし、得られた分子のほとんどがトキソプラズマ由来の分子であり、得られた宿主因子は偽陽性と思われる分子だけだった。この結果は、GRA17 の TurboID が付加されている部分は寄生胞膜の内腔側に局在してしまっている可能性が高く、その結果トポロジーが異なることから宿主因子がビオチン化されなかったと思われる。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本共同研究によって TurboID によりビオチン化される分子群のトポロジーが極めて重要であることが分かった。TurboID による融合タンパク質を使用してビオチン化タンパク質を同定する際には、その局在だけではなく、ビオチンリガーゼが発現している向きを厳密に決定し、同定したいものと一致したトポロジーのものを選別する必要があることが分かった。

【3】 主な発表論文等

[3-1] 論文発表

特になし。

[3-2] 学会発表

特になし。

[3-3] 成果資料等

特になし。

【4】 今後の課題等

現在、宿主細胞質側に C 末端部位が出ているトキソプラズマの別の GRA タンパク質と TurboID を融合した分子を持つ遺伝子組換えトキソプラズマを作成しており、出来次第、ビオチン化反応と再度質量分析を行い、本研究目的を達成したい。