

研究題目 SPOTtag 等を用いたトキソプラズマ原虫由来「寄生胞膜」局在分子 の網羅的解析

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 英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

【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全ての温血動物に感染することが可能な細胞内寄生原虫であり、人類の約 30%がすでに感染していると言われており、人に感染しても、正常に免疫機構が機能している場合は症状を示さない日和見感染症であるが、抗がん剤やヒト免疫不全症候群の患者など、免疫機構が正常に機能しない患者ではトキソプラズマ脳症といった重篤な症状を示す場合がある。トキソプラズマ原虫は感染細胞内に寄生胞と呼ばれる特殊な膜小胞体を形成し、その膜構造体内で増殖することにより宿主のもつ分解系を回避して増殖している。しかし、宿主は炎症性サイトカインの一種であるインターフェロンガンマ(Interferon-gamma: IFN- γ)刺激により誘導される分子群を駆使して細胞自律的免疫応答を誘導し、寄生胞膜の破壊や感染細胞内でのトキソプラズマ原虫の増殖を阻止している。

IFN- γ 刺激により誘導される分子は約 1000 種類が報告されているが、その中でも p47 GTPase や p65 GTPase 群がトキソプラズマ原虫感染に対する感染防御機構に関与していることが、遺伝子改変マウスや遺伝子改変細胞を用いた解析により明らかとなっている。しかし、これらの遺伝子群がどのように作用して寄生胞膜の破壊に関与しているのか、詳細な機構は未解明のままである。

そこで本研究では IFN- γ 刺激依存的に寄生胞膜に集積する分子群を網羅的に同定することにより、寄生胞膜の破壊機構の全容解明を目的とした。

[1-2]研究の方法・経過

研究方法としては、宿主側因子と病原体側因子の両方に着目して解析を行った。病原体因子としてはトキソプラズマ原虫から寄生胞膜上に放出されることが知られているデンスグラニューロタンパク質を、宿主側因子としては寄生胞膜上に集積する事が知られているインターフェロン誘導性の分子である GBPs に着目した。トキソプラズマ原虫側の分子に関しては Turbo ID を付加した各遺伝子組換え原虫を作成し、宿主側の因子に関しては SPOT tag を付加した因子を強制発現したマウス繊維芽細胞 (Mouse Embryonic fibroblast; MEF) を作成し、それぞれ IFN- γ 刺激下でトキソプラズマ原虫を感染させた際の、ビオチン化タンパク質と共沈タンパク質について、質量分析装置を用いて網羅的な解析を行った。

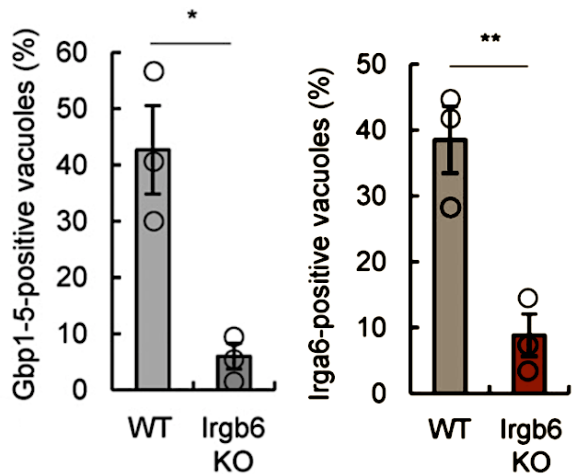
【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

寄生虫側分子と宿主側分子のそれぞれについて解析を行った結果、寄生胞膜上に集積していることが予想される分子を複数同定する事が出来ており、順次、寄生胞膜への集積の顕微鏡下での確認とその役割について解析を進めている。中でもデンスグラニューロタンパク質の Turbo ID を付加したトランスジェニック原虫を用いた解析において、IFN- γ 誘導性の GTPase 群の一つである Irgb6 が非常に強く寄生胞膜に集積していた。Irgb6 は寄生胞膜上に集積する分子であることは既に報告されていたが、この質量分析の結果、Irgb6 はどの分子よりも強く寄生胞膜に迅速に集積していることが考えられた。そこで、Irgb6 の寄生胞膜への集積の詳細なメカニズムについて解析を進めた。

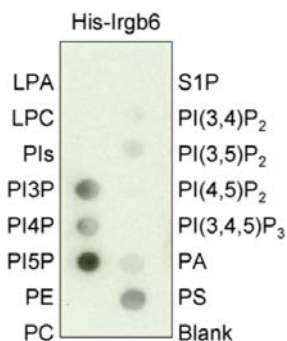
Cas9/CRISPR を用いて Irgb6 欠損細胞ならび

に欠損マウスを作成し、Irgb6 の寄生包膜集積における機能について検討した結果、Irgb6 欠損細胞では寄生包膜に重要な役割を果たしていることが報告されている p65 GTPase 群 (GBPs) と p47 GTPase(Irga6)の寄生包膜への集積が顕著に減少していることが明らかとなった (図 1)。



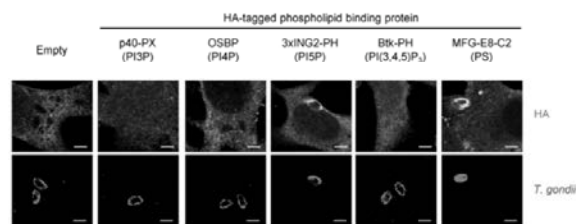
(図 1、Irgb6 欠損細胞における GBPs, Irga6 の寄生包膜への集積) その他の寄生包膜に集積していることが報告されている分子に関しても、Irgb6 欠損細胞では寄生包膜への集積が減少していたことから、Irgb6 は寄生包膜に集積する分子の中で最初に寄生包膜へと集積している分子であることが示唆された。

寄生包膜は元来、感染細胞の細胞膜由来であるにも関わらず、Irgb6 はミトコンドリア膜やゴルジ体膜といった自己膜上には集積せず、寄生包膜を特異的に識別し集積していることから、寄生包膜に特徴的な脂質成分があるのではないかと考え、Irgb6 が結合できる脂質について PIP strip 法を用いて検討した。その結果、Irgb6 は PI3P、PI4P、PI5P と PS に結合することが明らかとなった (図 2)。



(図 2) リコンビナント Irgb6 を用いた PIP strip 解析

Irgb6 が結合するリン脂質が寄生包膜上に局在しているかを検討するために、各リン脂質に結合することが知られている配列に HA タグを付加し、寄生包膜との共局在について検討した結果、PI5P と PS が顕著に寄生包膜上に集積していることが明らかになった(図 3)。



(図 3、寄生包膜上のリン脂質について)

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

これらの結果から、Irgb6 は寄生包膜上に高濃度集積している PI5P と PS に結合することにより、寄生包膜を自己膜と区別し、細胞自律的免疫応答を誘導していることが明らかとなった。本研究成果は、細胞内における自己と非自己の識別メカニズムの一端を証明しており、自己免疫疾患などの疾患原因の究明にも繋がる可能性がある。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

Lee Y, Yamada H, Pradipta A, Ma JS, Okamoto M, Nagaoka H, Takashima E, Standley DM, Sasai M, Takei K, Yamamoto M. Initial phospholipid-

dependent Irgb6 targeting to *Toxoplasma gondii* vacuoles mediates host defense. Life Sci Alliance. 3(1). 2019.

[3-2]学会発表

Masahiro Yamamoto 「Regulation of host defense and inflammation by autophagy related proteins」 S4-3 Th3 48th Annual meeting of the Japanese Society for Immunology 2019 (Act City Hamamatsu, Shizuoka, Japan, December 11-13, 2019)

Masahiro Yamamoto 「 Regulation of cell-autonomous immunity and inflammation by IFN-inducible GTPases」 Symposium 10: Infection and Immunity. KAI international meeting 2019 (Sejong University Convention Center, Seoul, Korea, October 30th-November 1st, 2019)

[3-3]成果資料等

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

今回の研究により、Irgb6 が寄生包膜に最初に結合する分子であることを報告すると共に、Irgb6 が寄生包膜に結合する所以を科学的に証明することができたが、寄生包膜には宿主側因子だけでなく寄生虫側因子も含め、まだまだ多くの分子が集積している事が今回の質量分析装置を用いた解析により明らかとなっており、それらの解析を通じて寄生包膜形成機構の謎などの解明につなげたい。