

研究題目 トキソプラズマ原虫由来の因子による宿主応答への関与

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）
 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人類の約 30%が既に感染していると言われており日和見感染症を引き起こす病原体であるが、休眠型と呼ばれるシストの状態では脳や筋組織に潜伏し、抗がん剤投与といった免疫不全状態になると再活性化して致死的な脳炎や肺炎を起こすことが知られている胞子虫類の原虫である。トキソプラズマ原虫は、宿主細胞に寄生して宿主細胞の機能を利用することにより初めて生存が可能となり、宿主細胞質内に多くのトキソプラズマ原虫由来の分子を放出することが知られているが、それぞれの原虫由来分子の詳細な役割は未解明な部分が多い。

そこで本研究は、トキソプラズマ原虫が宿主細胞に感染した際に宿主細胞側に放出する分子について、宿主オルガネラ毎に同定することを目的としている。

[1-2]研究の方法・経過

研究方法としては、まず核に移行することが知られているシミアンウイルス 40 (Simian virus ; SV 40) の Large T antigen の核移行シグナル (CACCTTCCTCTTCTTCTTGGG) を TurboID に付加したものの、核から放出されることが知られているヒト免疫不全ウイルスの Rev タンパク質の核放出シグナル (CTGCCTCCCCTGGAGCGCCTGACCCTG) を TurboID に付加したものの、小胞体 (Endoplasmic reticulum; ER) に局在することが知られている宿主チトクロム P450 2C1 の N 末端 1-29 アミノ酸の小胞体局在シグナルを TurboID に付加したものをそれぞれ構築し、ヒト子宮頸がん由来の HeLa 細胞に発現させた。

まず、これらの TurboID が発現しているかを、ウエスタンブロッティング法を用いて確認したところ、3種類の TurboID 全てにおいて発現を確認することができた(図 1)。そこで3種類

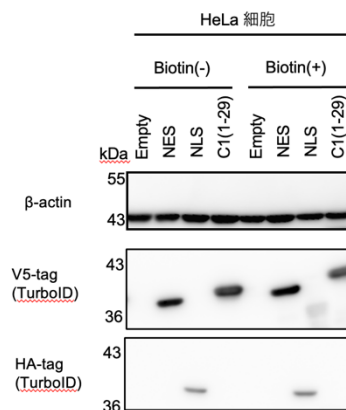


図1 作成した各局在シグナルを付加した Turbo ID の発現確認

HeLa細胞に各構築を発現させ、その発現についてウエスタンブロッティング法を用いて検討した。NES(核放出シグナル)とC1(1-29)(小胞体局在シグナル)にはV5タグを、NLS(核局在シグナル)にはHAタグをそれぞれ付加した。

の TurboID がビオチンリガーゼとして機能しているかを確認するため、ビオチン添加後のビオチン化タンパク質の量について同様にスウェスタンブロッティング法を用いて確認したところ、3種類全ての TurboID 発現細胞において、ビオチン添加後のビオチン化タンパク質の増加を検出することができた(図 2)。最後に、これらの TurboID が目的の細胞内小器官に局在しているかを、共焦点レーザー顕微鏡を用いて確認したところ、3種類の TurboID はそれぞれ目的の細胞内小器官に局在することが確認できた(図 3)。これらの結果から、作成した細胞内小器官に局在する TurboID は機能的であると判断した。

そこで、宿主の細胞内小器官に局在するトキソプラズマ原虫由来の分子を同定するため、それぞれの分子を発現させた HeLa 細胞に、ト

キソプラズマ原虫の強毒株である RH 株を感染させ、細胞溶解液を作成し、メタノール/クロロフォルム沈殿を行ってタンパク質を分離した。その後、トリプシン消化を行い、Tamavidin 2-REV を用いてビオチン化ペプチドを精製し、LC-MS/MS 解析を行う事により、各オルガネラに局在するトキソプラズマ原虫由来の分子を網羅的に同定した。

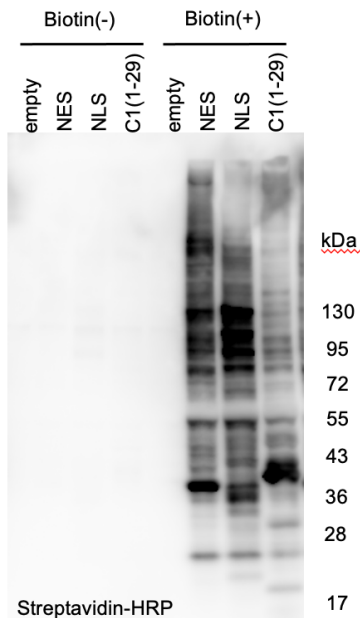


図2 作成した各局在シグナルを付加したTurbo IDのビオチン化の検出

HeLa細胞に各構築を発現させビオチンを添加した際の、ビオチン化タンパク質について、ウエスタンブロッティング法を用いて確認した。ビオチンは細胞回収の一時間前に添加。

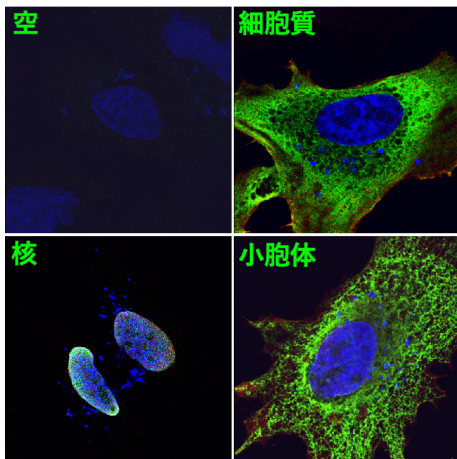


図3 作成した各局在シグナルを付加したTurbo IDの局在確認

HeLa細胞に各構築を発現させビオチンを添加した際の、それぞれの局在について共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。青はDAPI (核)、緑はTurbo ID(各小器官 それぞれのタグ抗体で検出)、赤はビオチンを示している。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果
質量分析を行った結果、宿主側の因子におい

て、それぞれの細胞小器官に局在していることが報告されている分子が得られていたことから、実験系は機能していることが判断できた。その上で、ビオチン化されたトキソプラズマ原虫由来の分子について検討した結果、核に局在する分子としては、GRA16 や GRA24 といった既報の分子が同定されただけでなく、これまで宿主核に移行することが報告されていない分子も同定された。また、小胞体に局在する分子に関しては、膜貫通領域を持つが、これまでに小胞体といった宿主側の細胞内小器官に局在するとは報告されていない分子を複数同定することができた。細胞質に局在する（核放出シグナルを付加）分子に関しては、宿主側の因子が多過ぎて量の少ないトキソプラズマ原虫由来の分子が隠れてしまっており、トキソプラズマ原虫由来の分子で顕著にビオチン化されているものは検出されなかった。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本研究により同定された宿主細胞内小器官に局在するトキソプラズマ原虫由来の分子は、宿主の感染制御機構を阻害したり、トキソプラズマ原虫感染の感染拡大に有利に作用したりする可能性があり、今後の詳細な解析により、トキソプラズマ原虫の病原性の解明につながることを期待される。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

特になし

[3-2]学会発表

Masahiro Yamamoto 「Recognition of PLAMP by cell-autonomous immunity is important for anti-*Toxoplasma* host defense」 The 20th AIFII. (Osaka, Japan, 2022 Sep 7-9). 2022.

[3-3]成果資料等

特になし

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

宿主細胞に放出される分子の多くは宿主の抗病原性機構を阻害する機能を持っていることが多いことから、同定した分子の機能を解析することにより、トキソプラズマ原虫の病原性メカニズムの解明につなげたい。