研究題目 トキソプラズマ原虫内でのユビキチン化による病原性の研究

研究組織

研究代表者：笹井 美和（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：山本 雅裕（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感染宿主細胞内に様々な病原性因子を放出することにより宿主の感染防御機構を阻害し、感染を成立させていることが近年報告されているが、トキソプラズマ原虫の持つ病原性因子の機能は未解明な部分が多い。

トキソプラズマ原虫の持つ感染成立機構及び病原性機構の全容を解明する目的で、CRISPR/Cas9 システムを用いた *in vivo* Screening を行い、トキソプラズマ原虫の持つ感染成立機構及び病原性機構に関与する分子の同定を網羅的に行った。その結果、新規病原性因子として遺伝子 A を同定したが、遺伝子 A がどのように作用することによりトキソプラズマ原虫の病原性に関与しているのかは全く未解明であった。遺伝子 A の機能を予測すべく、遺伝子 A のドメイン検索を行ったところ、遺伝子 A はヒトではユビキチンと結合するドメインとして報告されている Josephin ドメインを持ち、またこのドメインを持つ分子は脱ユビキチン化酵素として機能することが知られていることから、遺伝子 A もユビキ

チン化に関連した機能があることが暗示された。そこで、野生型トキソプラズマ原虫と遺伝子 A を欠損したトキソプラズマ原虫のユビキチン化タンパク質の変化について、網羅的に同定することを本研究の目的とした。

[1-2]研究の方法・経過

遺伝子 A によりユビキチン化または脱ユビキチン化されているトキソプラズマ原虫のタンパク質を網羅的に同定するため、2020 年に報告された UbiFast 法を用いて、LC-MS/MS 解析を行い、野生型並びに遺伝子 A 欠損トキソプラズマ原虫でのユビキチン化タンパク質を網羅的に同定し、ユビキチン化部位ならびにユビキチン化量について定量した。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

解析の結果、野生型トキソプラズマ原虫に比べて遺伝子 A 欠損トキソプラズマ原虫で顕著にユビキチン化に変化があった分子が複数同定され、同定された分子の中での顕著に遺伝子 A 欠損トキソプラズマ原虫でユビキチン化が増加している分子として、遺伝子 B が同定された。

遺伝子 A のヒトのホモログ分子の中には酵素活性を持つ部位が既に報告されており、その酵素活性部位がトキソプラズマ原虫の遺伝子 A に保存されていたことから、トキソプラズマ原虫の遺伝子 A の酵素活性部位に変異を入れ

た遺伝子 A 酵素活性欠損トキソプラズマ原虫を作成し、病原性と遺伝子 B のユビキチン化量について検討した。その結果、遺伝子 A 酵素活性欠損トキソプラズマ原虫は、酵素活性が欠損しただけで病原性を喪失したことから、遺伝子 A の酵素活性が病原性の発動に重要な役割をしていることが明らかとなった。また、遺伝子 A の酵素活性欠損トキソプラズマ原虫では遺伝子 B のユビキチン化量が顕著に増加していたことから、遺伝子 A の酵素活性は遺伝子 B の脱ユビキチン化に関与していることが強く示唆された。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

今回の解析により、トキソプラズマ原虫の遺伝子 A は遺伝子 B を脱ユビキチン化している可能性が強く示唆された。遺伝子 B はトキソプラズマ原虫の体内のマイクロチューブールの形態維持に関与していることが報告されているが、病原性に関与しているかについては全くの未解明である。In vivo での CRISPR/Cas9 システムを用いたスクリーニングにより得られた今回の候補遺伝子は、in vitro での増殖には必須ではないことから、遺伝子 A ならびに遺伝子 B の新規の機能の可能性だけでなく、病原性を示す新規メカニズムである可能性が高い。これまでに報告のない病原性機構の解明は、新たな感染制御の創薬基盤となることも期待される。

[3] 主な発表論文等

[3-1]論文発表

なし

[3-2]学会発表

- 端崎恵巳、橘優太、笹井美和、山本雅裕. 『トキソプラズマ新規抗宿主免疫因子の同定と機能解析』. 第 93 回 日本寄生虫学会合同大会、順天堂大学本郷キャンパス、3 月 10 日、2024 年
- 端崎恵巳、橘優太、笹井美和、山本雅裕. 『トキソプラズマ新規抗宿主免疫病原性因子の同定と解析』. 第 78 回日本寄生虫学会西日

本支部大会、愛媛大学 南加記念ホール、9 月 14 日、2023.

[3-3]成果資料等

【4】今後の課題等

本研究により、トキソプラズマ原虫の新規生体防御機構の一端を見出すことができたが、これまでに報告のない病原性機構の解明はどこから着手していくのか難題が山積している。遺伝子 A ならびに遺伝子 B が欠損しているトキソプラズマ原虫は野生型マウスでは病原性が低下したが、インターフェロンガンマ受容体欠損マウスでは病原性が回復していたことから、この二つの遺伝子は宿主のインターフェロンガンマを介した抗病原性機構を回避するところで機能していることが暗示される。インターフェロンガンマによる抗トキソプラズマ応答の作用機序をつぶさに解析していくことにより、新規病原性機構の解明を目指したい。