

研究題目 トキソプラズマ原虫の宿主細胞からの脱出に関する研究

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

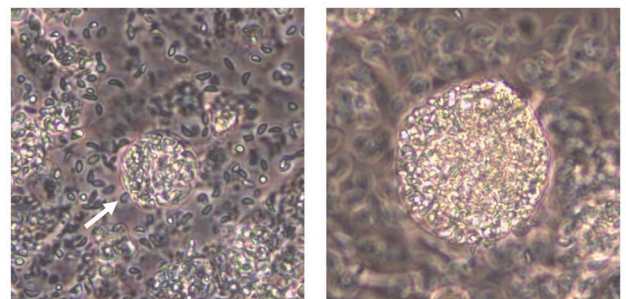
[1-1]本研究の目的・概要

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胞子虫類原虫である。この原虫は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。トキソプラズマ原虫は宿主の細胞に感染し、宿主の代謝システムなどを利用して宿主細胞内で増殖するだけでなく、様々な因子を宿主側に放出して能動的に次の感染細胞へ移動したり、宿主の感染防御機構を制御したりして感染を拡大しているが、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ならびに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ならびに病原性機構に関与する分子について網羅的な解析を行った。その結果、これまでに報告されていないトキソプラズマ原虫の感染成立機構及び病原性機構に関与する分子を複数同定することができた。

その中でも本研究は遺伝子 X に着目して解析を進めている。遺伝子 X を欠損したトキソプラズマ原虫は、野生型原虫に比べてマウスに対して、病原性が著しく低下したことから、遺伝子 X はトキソプラズマ原虫の生体感染において病原性因子の一つであることが明らかとなった。また、培養細胞を用いた解析の結果、野生型原虫はある程度細胞内で増殖すると能動

的に感染細胞から脱出してバラバラになり、次の細胞へと感染を拡大していくが、遺伝子 X を欠損したトキソプラズマ原虫は下図の様に寄生胞内で増殖を繰り返し、寄生胞が物理的に耐えられなくなった結果、感染細胞を破壊してようやく増えていくことが明らかとなった。このことから、遺伝子 X はトキソプラズマ原虫が能動的に感染細胞から脱出する過程に関与していることが暗示されたが、遺伝子 X の機能については全くの不明であった。



そこで、本研究は、遺伝子 X の機能を明らかにする目的で、遺伝子 X に結合する原虫分子について、免疫沈降—質量分析法を用いて解析を行った。

[1-2]研究の方法・経過

本研究は、トキソプラズマ原虫の虫体内での現象を明らかにする目的のため、培養細胞等を用いることは不可能である。そこでまず、トキソプラズマ原虫内の遺伝子 X の C 末端領域に Spot-tag を挿入した遺伝子改変原虫を作成した。Spot-tag を付加した遺伝子 X が遺伝子改変原虫内で機能的に発現しているかを確認するため、ウェスタンブロット法による発現確認を行ったところ、抗 Spot 抗体を用いて、遺伝子 X の

予測サイズにバンドを検出することができた。そこでこの遺伝子改変原虫を精製し、原虫内で遺伝子 X と結合する分子を Spot-tag に対する nanobody を用いた免疫沈降—質量分析法を用いて解析を行なった。その結果、複数の原虫分子が単離され、中にはトキソプラズマ原虫が寄生胞から脱出するのに必須だと言われている分子 Y も含まれていた。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

今回の共同研究により、これまで遺伝子 X との結合が報告されていなかった複数の分子を同定することができ、中でも非常に結合が強いと判断された 5 分子について着目して解析を進めた。5 分子のうち、4 分子に関しては、これまでトキソプラズマ原虫の脱出に関与していると報告がなかったが、1 分子(Y 分子)に関しては、トキソプラズマ原虫の寄生胞からの脱出に必須の因子であることが報告されていたことから、4 分子に関しては 4 重欠損の遺伝子改変トキソプラズマ原虫を、報告のあった Y 分子に関しては単独の遺伝子改変トキソプラズマ原虫をそれぞれ作成し、マウス生体感染における病原性について検討した。その結果、4 重欠損させた遺伝子改変原虫を感染させた場合は、病原性は高いままであるが、既に脱出に関与していると報告のある Y 分子のみを欠損させた遺伝子改変原虫では、顕著に病原性が低下した。この結果から、遺伝子 X はこれまで報告されていた寄生胞破壊に関与する Y 分子と共同で寄生胞からの脱出に関与していることが強く示唆された。

そこで、寄生胞破壊の機能が報告されている Y 分子と機能未知の X 分子それぞれの精製タンパク質を、小麦胚芽無細胞蛋白質合成技術を用いて作製し、分子 X と分子 Y の相互作用について試験管内で確認した。その結果、精製タンパク質を用いても、分子 X と分子 Y は相互作用を示すことが証明された。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本研究により、これまで報告されていなかった分子 X がトキソプラズマ原虫の寄生胞からの脱出機構に必須の分子であることが明らかとなった。分子 X がどのような作用機序で寄生胞からの脱出に寄与しているのかは現在解析

中であるが、既知の分子 Y との関係を詳細に調べることにより、脱出阻害薬の開発に寄与し得ると考えられる。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

現在投稿中

[3-2]学会発表

(国際学会)

Tachibana Y, Yamamoto M. *In vivo* CRISPR screen identifies a novel microneme protein essential for *Toxoplasma* egress and virulence. The 17th International Congress on Toxoplasmosis. Berlin, Germany, 2024.

(国内学会)

橘優汰、山本雅裕. トキソプラズマの脱出を規定する新規マイクロネームタンパク質の同定. 第 93 回日本寄生虫学会大会. 東京. 2024.

橘優汰、山本雅裕. 2 種のマイクロネームタンパク質による協調がトキソプラズマによる膜破壊を促進する. 第 94 回日本寄生虫学会大会. 大阪. 2025.

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

既知である Y 分子はパーフォリン様のタンパク質であり、寄生胞膜の脂質二重層の宿主側の膜に集積して穴を形成することが報告されているが、X 分子がこの機構に関与しているのか、また、関与しているのであればどのように関与しているのか全くの未解明である。さらに、トキソプラズマ原虫が感染細胞から脱出するには、寄生胞膜からの脱出のみならず、宿主の細胞膜からの脱出も必要である。宿主細胞膜からの脱出に X 分子や Y 分子が関与しているかについては、全くの未解明である。これらの点を解明することにより、トキソプラズマ原虫の脱出機構の全容解明に繋げたい。