

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H05771

研究課題名(和文)病原性原虫のPLAMP生成機構とセルオートノマス免疫系によるその認識機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of protozoan PLAMP generation mechanism recognized by host cell-autonomous immunity

研究代表者

山本 雅裕 (YAMAMOTO, MASAHIRO)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：00444521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 39,200,000円

研究成果の概要(和文)：病原性原虫トキソプラズマに対する宿主生体防御系の解析の中で、細胞内の自己・非自己を決定する細胞自律的免疫系があり、さらに、そのセルオートノマス免疫系が病原体由来のPAMPではなく、自己に由来するが病原体の生活環の中で生じる分子パターン(Pathogen Life-cycle Associated Molecular Pattern = PLAMP)であることを見出した。このPLAMPはPAMPに対して新規概念となりうるが、これに具体性を与えるための実証的な実験が必要である。この研究によって、トキソプラズマの寄生胞膜上のリン脂質がPLAMPの本体であることを見出し、PLAMPの概念を具体化した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はIrgb6やIrgm2がPLAMP依存的なトキソプラズマ感染に対する宿主防御において重要な役割を果たしていることを明らかにしたことから、将来的な治療法の開発に寄与する医学的意義を有するものである。また、PLAMPを基盤とした様々なヒト用や家畜動物用のワクチンが開発されることも医学的な意義がある。さらにトキソプラズマは初感染の妊婦に感染し胎児・新生児が先天性トキソプラズマ症となったり、あるいは、大人でも免疫不全者で致死的な後天性トキソプラズマ症を引き起こすことから、これらの疾患を有する人々にとって新規の治療法・制御法につながる本研究は福音となる。

研究成果の概要(英文)：During the analysis of the host defense system against the pathogenic protozoan Toxoplasma, it was found that the cell-autonomous immune system, which determines self and non-self within cells, recognizes not pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) but molecular patterns associated with the pathogen's life cycle, referred to as Pathogen Life-cycle Associated Molecular Patterns (PLAMPs). This PLAMP concept is novel compared to PAMPs, but empirical experiments are necessary to provide specificity to this concept. This study identified that the phospholipids on the parasitophorous vacuole membrane of Toxoplasma are the essence of PLAMPs, thereby concretizing the concept of PLAMPs.

研究分野：寄生虫学

キーワード：インターフェロン トキソプラズマ PLAMP 寄生胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) トキソプラズマ感染に対する宿主のインターフェロン (IFN- γ) 誘導性免疫応答は、IFN 誘導性 GTPase である IRG タンパク質の寄生胞 (PV) への蓄積とその破壊を通じて行われるが、それら GTPase 群が何を病原体のライフサイクルで生じるパターン (PLAMP) として認識しているのかについてはほとんど解明されていない。本研究では、IRG タンパク質の一つである Irgb6 が特定のホスホリピッドに結合し PLAMP として、PV に最初に蓄積されることが示唆された。Irgb6 欠損マウスでは、他の IRG タンパク質の PV へのターゲティングが低下し、トキソプラズマ感染に対する感受性が高まることが確認された。

(2) 宿主の細胞自律的免疫において、インターフェロン誘導性 GTPases である IRGs に加えて、グアニル酸結合タンパク質 (GBPs) が重要な役割を果たしている。IRGs は調節タンパク質とエフェクタータンパク質に分類されるが、その中で Irgm2 の寄生胞膜 (PVM) への局在メカニズムはほとんど解明されていない。本研究では、Irgm2 が GBPs や Irgb6 のリクルートメントを介して寄生虫の殺傷を制御することを示し、Irgm2 の細胞質でのユビキチン化がこのプロセスに重要であることを明らかにした。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、Irgb6 がトキソプラズマ感染に対する宿主の細胞自律的免疫応答にどのように関与しているかを解明することである。具体的には、Irgb6 が PV にどのようにして蓄積されるのか、そのメカニズムを明らかにし、Irgb6 欠損が他の IRG タンパク質やユビキチンの PV への蓄積に及ぼす影響を調査する。また、Irgb6 欠損マウスを用いて、Irgb6 が *in vivo* でのトキソプラズマ感染に対する宿主防御にどのように寄与しているかを評価する。これにより、Irgb6 が特定のホスホリピッドと結合し、PV にターゲティングされることで、ユビキチンや他の IRG タンパク質の PV への蓄積を促進し、PV の破壊と寄生虫の排除に寄与していることを明らかにすることを目的とする。

(2) また、Irgm2 がトキソプラズマに対する宿主の細胞自律的免疫応答にどのように関与しているかを解明することを目的とする。具体的には、Irgm2 が寄生虫の殺傷を制御するメカニズムを明らかにし、その過程で GBPs や Irgb6 のリクルートメントに関与するかどうかを調査する。Irgm2 欠損マウスを作製し、IFN- γ 刺激後のトキソプラズマ感染における Irgb6 および Gbp1 の PV へのリクルートメントを解析した。その結果、Irgm2 欠損マウスはトキソプラズマ感染に対して高い感受性を示し、Irgb6 および Gbp1 のリクルートメントが低下することが確認された。また、Irgm2 のユビキチン化が GBPs のリクルートメントに重要であることも明らかになった。さらに、Irgm2 の C 末端システイン残基が PVM への局在に重要であり、この局在は p62 およびユビキチンの長期的な蓄積に関与していることが示され、PLAMP の変化によって p62 やユビキチンといった宿主分子群も変化することを示すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて Irgb6 欠損マウスを作製し、そのマウスから初代培養線維芽細胞 (MEFs) を取得した。これらの MEFs を用いて、IFN- γ 刺激後の Irgb6 および他の IRG タンパク質、ユビキチンのトキソプラズマ PV へのリクルートメントを免疫蛍光染色および共焦点顕微鏡で解析した。また、Irgb6 のホスホリピッド結合能を評価するために、リコンビナント Irgb6 タンパク質を用いたプロテイン-リピッドオーバーレイアッセイを実施した。さらに、Irgb6 欠損マウスをトキソプラズマで感染させ、感染後の生存率、原虫数、炎症性サイトカインの産生量を測定し、Irgb6 の *in vivo* での役割を評価した。

(2) 本研究では、CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて Irgm2 欠損マウスを作製し、MEFs を取得した。これらの MEFs を用いて、IFN- γ 刺激後の Irgb6 および Gbp1 のトキソプラズマ PV へのリクルートメントを免疫蛍光染色および共焦点顕微鏡で解析した。さらに、Irgm2 のユビキチン化を評価するために、Irgm2 をフラグタグで標識し、質量分析法を用いてユビキチン化部位を特定した。また、Irgm2 欠損マウスをトキソプラズマで感染させ、感染後の生存

率、原虫数、炎症性サイトカインの産生量を測定し、Irgm2 の in vivo での役割を評価した。

4 . 研究成果

(1) 本研究により、Irgb6 がトキソプラズマ感染に対する宿主の細胞自律的免疫応答において重要な役割を果たしていることが明らかになった。Irgb6 欠損 MEFs では、IFN- γ 刺激後のトキソプラズマ PV への Irgb6、他の IRG タンパク質 (Irga6、Irgb10) GBP タンパク質 (Gbp1、Gbp2、Gbp1-5) ユビキチン、p62 のリクルートメントが著しく低下した。さらに、Irgb6 欠損 MEFs では、PV の破壊が減少し、トキソプラズマの生存率が増加した。これらの結果は、Irgb6 が PV への最初のターゲティングに重要であり、その後のユビキチンおよび他の IRG タンパク質の蓄積を促進することを示している。Irgb6 のリン脂質 (ホスホリピッド) 結合能についての解析では、Irgb6 が特に PI5P およびホスファチジルセリン (PS) に強く結合することが示された。これらのホスホリピッドはトキソプラズマ PV 上に局在しており、Irgb6 がこれらのホスホリピッドと結合することで PV にターゲティングされることが明らかになった。さらに、Irgb6 の C 末端 α ヘリックスにある塩基性アミノ酸残基 K275 および R371 が、ホスホリピッド結合および PV へのターゲティングに必須であることが示された。in vivo での解析では、Irgb6 欠損マウスは野生型マウスに比べてトキソプラズマ感染後の寄生虫負荷が著しく増加し、炎症性サイトカインの産生も増加した。さらに、Irgb6 欠損マウスは感染後 9 日以内に全て死亡したのに対し、野生型マウスは全て生存した。これらの結果は、Irgb6 がトキソプラズマ感染に対する宿主防御において重要な役割を果たしていることを示している。以上をまとめると、本研究は

Irgb6 がトキソプラズマ感染に対する宿主の IFN- γ 誘導性免疫応答において重要な役割を果たしていることを明らかにした。Irgb6 は特定のホスホリピッド (PI5P や PS) を PLAMP として認識して結合し (図 1) PV に最初に蓄積されることで、ユビキチンや他の IRG タンパク質の蓄積を促進し、PV の破壊と寄生虫の排除に寄与している。これにより、Irgb6 はトキソプラズマ感染に対する宿主防御において重要な役割を果たしていることが示された。今後の研究では、Irgb6 が他のホスホリピッドや膜リモデリングを誘導するメカニズムについてさらに解明することが求められる。

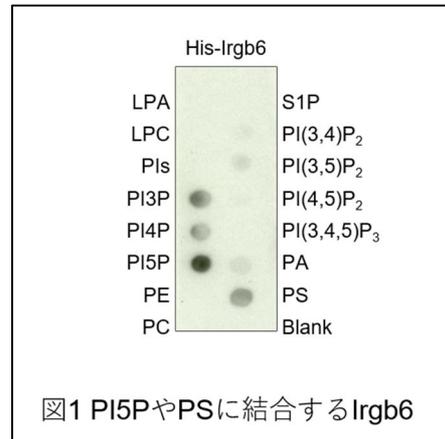


図1 PI5PやPSに結合するIrgb6

(2) 本研究により、Irgm2 がトキソプラズマ感染に対する宿主の細胞自律的免疫応答において重要な役割を果たしていることが明らかになった。具体的には、Irgm2 が PLAMP を認識する Irgb6 および Gbp1 のトキソプラズマ PV へのリクルートメントを介して寄生虫の殺傷を制御することが示された。Irgm2 欠損 MEFs では、IFN- γ 刺激後の Irgb6 および Gbp1 の PV へのリクルートメントが著しく低下し、トキソプラズマの生存率が増加した。これらの結果は、Irgm2 が PV への Irgb6 および Gbp1 の最初のターゲティングに重要であることを示している。Irgm2 のユビキチン化についての解析では、Irgm2 が特定のリシン残基でユビキチン化されることが示された (図 2)、このユビキチン化は Irgm2 の PV への局在には必要ないが、GBPs のリクルートメントには重要であることが判明した。特に、ユビキチン化欠損 Irgm2 変異体を再導入した MEFs では、Gbp1 のリクルートメントが低下し、寄生虫の殺傷活性が回復しなかった。また、Irgm2 の C 末端システイン残基が PVM への局在に重要であり、この局在は p62 およびユビキチンの長期的な蓄積に関与していることが示された。in vivo での解析では、Irgm2 欠損マウスはトキソプラズマ感染後に高い感受性を示し、感染後 5 日目には寄生虫負荷が増加し、全てのマウスが 9 日以内に死亡したのに対し、野生型マウスは全て生存した。これらの結果は、Irgm2 がトキソプラズマ感染に対する宿主防御において重

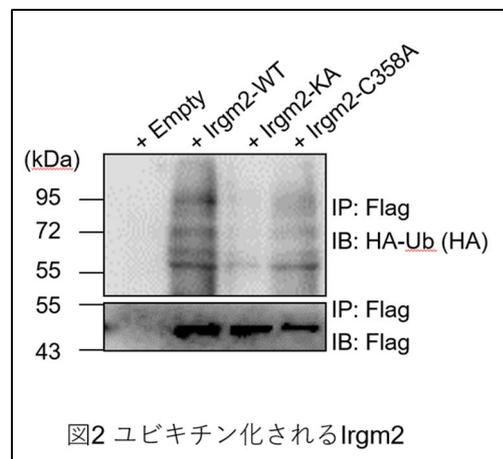


図2 ユビキチン化されるIrgm2

要な役割を果たしていることを示している。Irgm2 は、トキソプラズマ感染に対する宿主の IFN- γ 誘導性免疫応答において、Irgb6 および Gbp1 のリクルートメントを制御することで重要な役割を果たしている。Irgm2 のユビキチン化は GBPs のリクルートメントに必要であり、Irgm2 の C 末端システイン残基は PVM への局在に関与している。今後の研究では、Irgm2 が他のホスホリピッドや膜リモデリングを誘導するメカニズムについてさらに解明することが求められる。総括すると、本研究は Irgm2 が PLAMP 依存的なトキソプラズマ感染に対する宿主防御において重要な役割を果たしていることを明らかにし、将来的な治療法の開発に寄与するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hashizaki Emi, Sasai Miwa, Okuzaki Daisuke, Nishi Tsubasa, Kobayashi Takashi, Iwanaga Shiroh, Yamamoto Masahiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Toxoplasma IWS1 Determines Fitness in Interferon- γ -Activated Host Cells and Mice by Indirectly Regulating ROP18 mRNA Expression	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e0325622
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mbio.03256-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sasai Miwa, Ma Ji Su, Okamoto Masaaki, Nishino Kohei, Nagaoka Hikaru, Takashima Eizo, Pradipta Ariel, Lee Youngae, Kosako Hidetaka, Suh Pann-Ghill, Yamamoto Masahiro	4. 巻 218
2. 論文標題 Uncovering a novel role of PLC γ 4 in selectively mediating TCR signaling in CD8 $^{+}$ but not CD4 $^{+}$ T cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 e20201763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20201763	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Pradipta Ariel, Sasai Miwa, Motani Kou, Ma Ji Su, Lee Youngae, Kosako Hidetaka, Yamamoto Masahiro	4. 巻 4
2. 論文標題 Cell-autonomous Toxoplasma killing program requires Irgm2 but not its microbe vacuolar localization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202000960
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.202000960	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Pradipta Ariel, Bando Hironori, Ma Ji Su, Tanaka Shun, Sasai Miwa, Yamamoto Masahiro	4. 巻 83
2. 論文標題 Plasmodium UIS3 avoids host cell-autonomous exclusion that requires GABARAPs but not LC3 and autophagy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102335 ~ 102335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2021.102335	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Lee Youngae, Yamada Hiroshi, Pradipta Ariel, Ma Ji Su, Okamoto Masaaki, Nagaoka Hikaru, Takashima Eizo, Standley Daron M, Sasai Miwa, Takei Kohji, Yamamoto Masahiro	4. 巻 3
2. 論文標題 Initial phospholipid-dependent Irgb6 targeting to Toxoplasma gondii vacuoles mediates host defense	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e201900549
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.201900549	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 山本雅裕
2. 発表標題 トキソプラズマ原虫に対する宿主セルオートノマス免疫系とその破綻
3. 学会等名 第75回 日本細胞生物学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山本雅裕
2. 発表標題 トキソプラズマ原虫に対する宿主免疫系とその破綻の分子機構
3. 学会等名 九州微生物研究フォーラム2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masahiro Yamamoto
2. 発表標題 Recognition of PLAMP by cell-autonomous immunity is important for anti-Toxoplasma host defense
3. 学会等名 The 20th Awaji International Forum on Infection and Immunity (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本雅裕
2. 発表標題 病原性寄生虫と宿主免疫系の攻防のサイエンス
3. 学会等名 第23回 免疫サマースクール in 大阪 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本雅裕
2. 発表標題 病原性寄生虫トキソプラズマに対する宿主生体防御とその破綻
3. 学会等名 第96回日本感染症学会総会・学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本雅裕
2. 発表標題 インターフェロン誘導性の細胞内病原体トキソプラズマの認識機構について
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計1件

国際研究集会 The 20th Awaji International Forum on Infection and Immunity	開催年 2022年～2022年
--	--------------------

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------