

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04726

研究課題名(和文)トキソプラズマにおけるチーティングオルガネラ形成機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism for the formation of cheating organelle of *Toxoplasma gondii*

研究代表者

永宗 喜三郎 (Nagamune, Kisaburo)

国立感染症研究所・寄生動物部・室長

研究者番号：90314418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：トキソプラズマは宿主細胞に侵入した後、宿主のミトコンドリアを原虫が増殖している寄生胞近辺に引き寄せるとい現象が知られている。この現象を引き起こす候補タンパク質遺伝子を7つリストアップし、強制発現株によるオルガネラのリクルート能力の評価を行った。その結果、4つの遺伝子をリクルート現象関連遺伝子として同定できた。そこで引き続きこれらの遺伝子群のノックアウト株の作成を試みたところ、4遺伝子のうち3遺伝子は原虫の生存に必須でありノックアウトできなかった。残りの遺伝子についてはノックアウト株が得られ、このノックアウト株は宿主ミトコンドリアのリクルート能力が有意に減少していた。

研究成果の概要(英文)：It is known that *Toxoplasma gondii* can recruit the host mitochondria to its parasitophorous vacuole. First of this study, I identified 7 candidates responsible for this phenomenon, and evaluate the ability for the recruitment using with overexpressors. As a result, I could identify four genes responsible for the mitochondrial recruitment of *T. gondii*. I further tried to knock-out these genes. However, I could not knock-out three of them because they might be essential. I established knock-out mutant of remaining gene. This mutant decreased the recruitment ability of the host mitochondria.

研究分野：分子寄生虫学、原生生物学

キーワード：原虫 オルガネラ リクルート

1. 研究開始当初の背景

トキソプラズマは宿主細胞に侵入した後、宿主細胞機能を様々に修飾することが知られている。中でも特に形態学的に顕著な変化として、宿主のミトコンドリアや ER を原虫が増殖している寄生胞近辺に引き寄せる(リクルートする)という現象が昔からよく知られている。この現象を引き起こす因子として、原虫が宿主細胞に侵入する際に、原虫の侵入とは独立して宿主細胞に注入される一群のタンパク質、ロプトリータンパク質群(ROPs)の関与が強く疑われ、実際以前そのうちのひとつである、ROP2 がミトコンドリアのリクルートの原因であるという報告もなされていた(*J. Cell Biol.* (2001))。しかし近年、ROP2 およびそのパラログである ROP2a、ROP2b、ROP8 の 3 遺伝子をノックアウトした解析結果から、ミトコンドリアのリクルートへの ROP2 の関与は否定された(*Int. J. Parasitol.* (2010))。さらに最近ではロプトリータンパク質群とは別のオルガネラから分泌されるタンパク質である Mitochondria Association Factor 1 (MAF1) がミトコンドリアのリクルート因子として同定された(*PLoS Biol.* (2014))。しかしながら MAF1 はミトコンドリアリクルート能の強いタイプ I 株と同能力の弱いタイプ II 株との表現型の違いを説明する責任遺伝子として同定された経緯を反映し、同遺伝子のノックアウト株でも少ないながらもリクルートは起こる。この結果は、複数のリクルート因子の存在を示唆するものと考えられる。またリクルートされたミトコンドリアが本来のミトコンドリアとしての機能を有しているのか、機能的な修飾の有無、さらに根本的に一体何のためにリクルートされているのか、といった問いに対する答えは全く用意されていない。さらに、ER においてはリクルート因子の同定すらできておらず、当然前述の問いに対する解析も全く手つかずのままである。そこで本研究では、ポストゲノム的な分子寄生虫学的アプローチを駆使して、ミトコンドリアや ER、あるいは核に輸送される原虫側タンパク質を網羅的に同定し、同定されたタンパク質をコードする遺伝子の過剰発現、あるいはノックアウト原虫株を作製することで、それら原虫側タンパク質の機能を解析する。

2. 研究の目的

申請者は本研究の申請時点ですでに定量的かつ高感度な MS 解析手法である iTRAQ 法を用いて、宿主ミトコンドリアに輸送されたと考えられるタンパク質候補リストを作成済みであった。本研究では(1)このリストに挙げられた候補遺伝子をタグ付きで強制発現させることにより候補遺伝子のミトコンドリアへの局在を確認し、さらに(2)候補遺伝子の強制発現原虫および最近トキソプラズマにおいても適用可能となった CHRISPR/CAS9 系 (*mBio* (2014), *PLoS*

ONE (2014)) を用いたノックアウト原虫の作製を行い機能の同定を行う。ノックアウトできない必須遺伝子についてはテトラサイクリンを用いた発現制御系か、あるいは Destabilizing Domain(dd) の付与により Shield-1 の有無で発現をコントロールできるコンディショナルノックアウトの系(*Nat. Methods* (2007))を用いて機能を解析する。

3. 研究の方法

すでに作成済みの宿主ミトコンドリアに輸送されたと考えられるタンパク質候補を別アッセイにより確認・再スクリーニングした。すなわち、これらのタンパク質が実際に宿主ミトコンドリアに局在することを、myc タグを融合させた遺伝子を原虫に強制発現させ、ミトコンドリアのマーカーである Mitotracker と共染色することにより確認した。スクリーニングの結果選別できたタンパク質の機能を、過剰発現原虫およびノックアウト原虫を作製することにより行った。ノックアウトには前述の通り、最近トキソプラズマにおいても適用可能となった CHRISPR/CAS9 系を用いて行った。ノックアウト株の得られなかった遺伝子は原虫にとっての必須遺伝子であると考えられるのでテトラサイクリンを用いた発現制御系を用いることとした。

4. 研究成果

候補タンパク質遺伝子にタグを付けて強制発現させることでミトコンドリアへの輸送を確認したところ、7つのタンパク質が寄生胞膜に局在し、宿主ミトコンドリアとの相互作用が示唆された。一方、このスクリーニングの過程で、強制発現させる遺伝子によってリクルートされるミトコンドリアの数が増加することがわかった。つまり、タグ融合遺伝子の強制発現により原虫のミトコンドリアリクルート能力を亢進させる遺伝子群の存在が示唆された。これらの遺伝子群はミトコンドリアリクルート因子の有力候補となるので、強制発現株によるオルガネラのリクルート能力の評価を行った。その結果、前述の7つの遺伝子のうち、3つが統計学的な有意差を持って、1つが有意差はないものの明らかにリクルート能力が亢進していた。そこで引き続きこれらの遺伝子群のノックアウト株の作成を試みた。試みた4遺伝子のうち、3遺伝子はノックアウトできず、過去の報告とも合わせ、これらの遺伝子は原虫の生存に必須である可能性が示唆された。現在、テトラサイクリン発現調節系を用いたノックダウン株を作成中である。もう一つの遺伝子についてはノックアウト株が得られた。このノックアウト株は宿主ミトコンドリアのリクルート能力が有意に減少していた。現在、マウスに対する病原性や宿主 ER のリクルート能力の変化など、様々な表現型を解析中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 12 件)

(1) Rahman, M., Alauddin, M., Hossain, K.M., Islam, M.H., Kitoh, K., Nagamune, K., Takashima, Y. "Prevalence and dynamics of antibodies against *Toxoplasma gondii* in kids born from naturally infected goats." *Parasitol. Int.* 2015, 64 (5), 389-391

(2) Bhat, H.B., Ishitsuka, R., Inaba, T., Murate, M., Abe, M., Makino, A., Kohyama-Koganeya, A., Nagao, K., Kurahashi, A., Kishimoto, T., Tahara, M., Yamano, A., Nagamune, K., Hirabayashi, Y., Jyuni, N., Umeda, M., Fujimori, F., Nishibori, K., Yamaji-Hasegawa, A., Greimel, P., Kobayashi, T. "Evaluation of aegerolysins as novel tools to detect and visualize ceramide phosphoethanolamine, a major sphingolipid in invertebrates." *FASEB J.* 2015, 29 (9), 3920-34

(3) Matsubara, R., Aonuma, H., Kojima, M., Tahara, M., Andrabi, S.B., Sakakibara, H., Nagamune, K. "Plant Hormone Salicylic Acid Produced by a Malaria Parasite Controls Host Immunity and Cerebral Malaria Outcome." *PLoS ONE* 2015, 10 (10), e0140559

(4) Ybañez, R.H., Leesombun, A., Nishimura, M., Matsubara, R., Kojima, M., Sakakibara, H., Nagamune, K., Nishikawa, Y. "*In vitro* and *in vivo* effects of the phytohormone inhibitor fluridone against *Neospora caninum* infection." *Parasitol. Int.* 2016, 65 (4), 319-322

(5) Tahara, M., Andrabi, S.B., Matsubara, R., Aonuma, H., Nagamune, K. "A host cell membrane microdomain is a critical factor for organelle discharge by *Toxoplasma gondii*." *Parasitol. Int.* 2016, 65 (5), 378-388

(6) Ihara, F., Nishimura, M., Muroi, Y., Mahmoud, M.E., Yokoyama, N., Nagamune, K., Nishikawa, Y. "*Toxoplasma gondii* Infection in Mice Impairs Long-Term Fear Memory Consolidation Through Dysfunction of the Cortex and Amygdala." *Infect Immun.* 2016, 84 (10), 2861-2870

(7) Sakamoto, H., Suzuki, S., Nagamune, K., Kita, K., Matsuzaki, M. "Investigation into the Physiological Significance of the Phytohormone Abscisic Acid in *Perkinsus*

marinus, an Oyster Parasite Harboring a Non-Photosynthetic Plastid." *J. Eukaryot. Microbiol.* 2016, 64 (4), 440-446

(8) Andrab, S.B.A., Tahara, M., Matsubara, R., Toyama, T., Aonuma, H., Sakakibara, H., Suematsu, M., Tanabe, K., Nozaki, T., Nagamune, K. "Plant hormone cytokinins control cell cycle progression and plastid replication in apicomplexan parasites." *Parasitol. Int.* 2017, 67 (1), 47-58

(9) Shuralev, E.A., Shamaev, N.D., Mukminov, M.N., Nagamune, K., Taniguchi, Y., Saito, T., Kitoh, K., Arleevskaya, M., Fedotova, A.Y., Abdulmanova, D.R., Aleksandrova, N.M., Efimova, M.A., Yarullin, A.I., Valeeva, A.R., Khaertynov, K.S., Takashima, Y. "*Toxoplasma gondii* seroprevalence in goats, cats and humans in Russia." *Parasitol. Int.* 2018, 67 (2), 112-114

(10) Takemae, H., Kobayashi, K., Sugi, T., Han, Y., Gong, H., Ishiwa, A., Recuenco, F. C., Murakoshi, F., Takano, R., Murata, Y., Nagamune, K., Horimoto, T., Akashi, H., Kato, K. "*Toxoplasma gondii* RON4 binds to heparan sulfate on the host cell surface." *Parasitol. Int.* 2018, 67 (2), 123-130

(11) Kamikawa, R., Yazaki, E., Tahara, M., Sakura, T., Matsuo, E., Nagamune, K., Hashimoto, T., Inagaki, Y. "Fates of Evolutionarily Distinct, Plastid-type Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase Genes in Kareniacean Dinoflagellates." *J. Eukaryot. Microbiol.* 2018 *in press*

(12) Taniguchi, Y., Appiah-Kwarteng, C., Murakami, M., Fukumoto, J., Nagamune, K., Matsuo, T., Masatani, T., Kanuka, H., Hoshina, T., Kitoh, K., Takashima, Y. "Atypical virulence in a type III *Toxoplasma gondii* strain isolated in Japan." *Parasitol. Int.* *in press*

[学会発表](計 33 件)

招待講演等

(1) **BEST Presentation Award 受賞**

松原立真、佐倉孝哉、永宗喜三郎 "トキソプラズマの IP₃・リアノジンレセプター様タンパク質の探索" 第 48 回日本原生生物学会大会 2015 年 11 月、東京

(2) **ワークショップ**

永宗喜三郎、山野安規徳、福本隼平、喜屋武向子、正谷達膳、松尾智英、松井利博、村上麻美、高島康弘、佐倉孝哉、松原立真 “日本におけるトキソプラズマの分子系統と病原性” 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会 2015 年 12 月、神戸

(3) ワークショップ

高島康弘、川原史也、永宗喜三郎、戸田なつき、鬼頭克也 “実験感染ニワトリにおける抗トキソプラズマ抗体の産生状況” 第 85 回日本寄生虫学会大会 2016 年 3 月、宮崎

(4) ワークショップ

喜屋武向子、高良武俊、岡野祥、永宗喜三郎 “沖縄県におけるトキソプラズマ感染実態調査と感染要因の推定” 第 85 回日本寄生虫学会大会 2016 年 3 月、宮崎

(5) 国際シンポジウム

永宗喜三郎 “Plant hormones and apicomplexan parasites” 第 89 回日本細菌学会総会 2016 年 3 月、大阪

(6) 寄生虫分科会若手ゼミナール

猪原史成、西村麻紀、室井善景、Mahmoud Motamed、横山直明、永宗喜三郎、西川義文 “トキソプラズマ感染によるマウスの恐怖記憶固定の傷害は脳皮質および扁桃核における機能異常が引き起こす” 第 159 回日本獣医学会学術集会、2016 年 9 月、神奈川県藤沢市

(7) 寄生虫分科会シンポジウム

永宗喜三郎 “アピコンプレクサと植物ホルモン” 第 159 回日本獣医学会学術集会、2016 年 9 月、神奈川県藤沢市

(8) ワークショップ

福本隼平、佐倉孝哉、松原立真、田原美智留、永宗喜三郎 “トキソプラズマにおける宿主ミトコンドリアリクルート機構の解明” 第 50 回日本原生生物学会、第 1 回日本共生生物学会合同大会 2017 年 11 月、つくば市

(9) 福本隼平、佐倉孝哉、松原立真、田原美智留、永宗喜三郎 “トキソプラズマにおける宿主オルガネラリクルート機構の解析にむけて” 第 23 回分子寄生虫学ワークショップ・第 13 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会、2015 年 8 月、帯広

(10) 永宗喜三郎、山野安規徳、福本隼平、喜屋武向子、正谷達膳、松尾智英、松井利博、村上麻美、高島康弘、佐倉孝哉、松原立真 “日本におけるトキソプラズマの分子系統と病原性の解析” 第 23 回分子寄生虫学ワークショップ・第 13 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会、2015 年 8 月、帯

広

(11) 福本隼平、佐倉孝哉、松原立真、田原美智留、永宗喜三郎 “トキソプラズマにおける宿主オルガネラリクルート機構の解析にむけて” 第 48 回日本原生生物学会大会 2015 年 11 月、東京

(12) 永宗喜三郎、山野安規徳、福本隼平、喜屋武向子、正谷達膳、松尾智英、松井利博、村上麻美、高島康弘、佐倉孝哉、松原立真 “日本におけるトキソプラズマの分子系統と病原性” 第 85 回日本寄生虫学会大会 2016 年 3 月、宮崎

(13) 松原立真、佐倉孝哉、福本隼平、田原美智留、山岸潤也、永宗喜三郎 “トキソプラズマにおける IP₃ 受容体の探索” 第 85 回日本寄生虫学会大会 2016 年 3 月、宮崎

(14) 福本隼平、佐倉孝哉、永宗喜三郎 “トキソプラズマにおける宿主オルガネラリクルート機構の解析にむけて” 第 85 回日本寄生虫学会大会 2016 年 3 月、宮崎

(15) 菊地正、清水少一、安達英輔、古賀道子、永宗喜三郎、鯉淵智彦 “トキソプラズマ集団感染例” 第 27 回日本臨床寄生虫学会 2016 年 6 月、金沢

(16) 佐倉孝哉、田原美智留、別所知明、八木田健司、永宗喜三郎 “食中毒原因原虫 *Sarcocystis fayeri* の滑走運動および細胞内侵入性” 第 24 回分子寄生虫学ワークショップ・第 14 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会、2016 年 8 月、帯広

(17) 福本隼平、山野安規徳、竹内史比古、松原立真、喜屋武向子、正谷達膳、松尾智英、松井利博、村上麻美、高島康弘、永宗喜三郎 “日本におけるトキソプラズマのタイピングと病原性” 第 24 回分子寄生虫学ワークショップ・第 14 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会、2016 年 8 月、帯広

(18) 福本隼平、山野安規徳、佐倉孝哉、松原立真、永宗喜三郎 “日本におけるトキソプラズマの分子系統と病原性” 第 49 回日本原生生物学会大会、2016 年 10 月、岡山

(19) 福本隼平、山野安規徳、松原立真、竹内史比古、喜屋武向子、正谷達膳、松尾智英、村上麻美、高島康弘、永宗喜三郎 “日本におけるトキソプラズマのタイピングと病原性” 第 86 回日本寄生虫学会大会、2017 年 5 月、札幌

(20) 北園和泉、平井智浩、永宗喜三郎、野崎智義、中野由美子 “熱帯熱マラリア原虫の赤内期における新しい輸送経路の解析” 第

25 回分子寄生虫学ワークショップ・第 14 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会、2017 年 8 月、帯広

(21) 荒木球沙、川合覚、小林宏尚、片岡紀代、永宗喜三郎、野崎智義、案浦健 “肝内型マラリア原虫における核増殖メカニズムの解明” 第 50 回日本原生生物学会、第 1 回日本共生生物学会合同大会、2017 年 11 月、つくば市

(22) 福本隼平、佐倉孝哉、松原立真、田原美智留、松崎素道、永宗喜三郎 “トキソプラズマにおける宿主ミトコンドリアリクルート機構の解明” 第 87 回日本寄生虫学会大会、2018 年 3 月、東京

(23) 松崎素道、福本隼平、喜屋武向子、正谷達膳、松尾智英、村上麻美、高島康弘、西川義文、永宗喜三郎 “トキソプラズマ日本分離株のゲノムワイド SNP 解析” 第 87 回日本寄生虫学会大会、2018 年 3 月、東京

(24) 荒木球沙、川合覚、小林宏尚、片岡紀代、角田宗一郎、永宗喜三郎、野崎智義、久枝一、案浦健 “肝内型マラリア原虫における核増殖メカニズムの解明” 第 87 回日本寄生虫学会大会、2018 年 3 月、東京

(25) 森嶋康之、永宗喜三郎、杉山 広、山崎 浩 “ナショナルデータベース (NDB Japan) を用いた日本国内の寄生虫症発生動向の解析” 第 87 回日本寄生虫学会大会、2018 年 3 月、東京

(26) 永宗喜三郎、森嶋康之 “レセプト情報解析から見えてきた日本におけるトキソプラズマ症の実態” 第 87 回日本寄生虫学会大会、2018 年 3 月、東京

(27) Nagamune, K., Yamano, A., Fukumoto, J., Tahara, M., and Matsubara, R. “Molecular genotyping of *Toxoplasma gondii* isolated in Japan.” 13th International Congress on Toxoplasmosis and *Toxoplasma gondii* Research, Gettysburg, PA, June 2015

(28) Matsubara, R. and Nagamune, K. “Functional analysis of Apicomplexa-producing plant hormone.” Molecular Parasitology Meeting XXVI, Woods Hole, MA, USA, September 2015

(29) Fukumoto, J., Sakura, T., Matsubara, R., Nagamune, K. “Investigation for the Understanding of the Mechanism of Host Organelle Recruitment by *Toxoplasma gondii*.” 2nd International Symposium and 4th Annual Research Meeting on

Matryoshka-type Evolution of Eukaryotic Cells, September 2015, Tsukuba

(30) Matsubara, R., Sakura, T., Nagamune, K. “Searching for IP₃ and Ryanodine receptor like proteins of *Toxoplasma gondii*.” 2nd International Symposium and 4th Annual Research Meeting on Matryoshka-type Evolution of Eukaryotic Cells, September 2015, Tsukuba

(31) Ihara, F., Nishimura, M., Mahmoud, M.E., Muroi, Y., Yokoyama, N., Nagamune, K., Nishikawa, Y. “*Toxoplasma gondii* infection in mouse impairs long-term fear memory consolidation and downregulates Arc expression.” 2nd International Symposium and 4th Annual Research Meeting on Matryoshka-type Evolution of Eukaryotic Cells, September 2015, Tsukuba

(32) Fukumoto, J., Sakura, T., Matsubara, R., Nagamune, K. “Elucidating the mechanism of host mitochondrial recruitment of *Toxoplasma gondii*.” The 13th International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis, September 2016, Kyoto

(33) Nagamune, K., Fukumoto, J., Yamano, A., Tahara, M., Matsubara, R. “The molecular genotyping and dissection of Japanese *Toxoplasma gondii* reveals an unidentified strategy for successful survival of the parasite.” 14th The *Toxoplasma gondii* research community biennial meeting, Tomar, Portugal, May 2017

〔図書〕(計 5 件)

(1) 松原立真、永宗喜三郎 「アピコンプレクサ生物におけるカルシウム・シグナリングと植物ホルモン」化学療法の領域 2016, 32: 117-126

(2) 松原立真、永宗喜三郎 「アピコンプレクサ類のもつ植物様オルガネラと植物ホルモン -オルガネラ進化学から考える感染症対策」遺伝 2016, 70:99-104

(3) 永宗喜三郎 「お肉とネコの寄生虫、トキソプラズマってナニモノ？」衛生の友 2016, 59: 2

(4) 永宗喜三郎 「トキソプラズマ感染症診断法」小児内科 2017, 49: 564-567

(5) 福本隼平、永宗喜三郎 「トキソプラズマが宿主細胞のオルガネラを引き寄せめる

〔産業財産権〕

出願状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永宗 喜三郎 (NAGAMUNE, Kisaburo)
国立感染症研究所・寄生動物部・室長
研究者番号：90314418

(2) 研究分担者

案浦 健 (ANNNOURA, Takeshi)
国立感染症研究所・寄生動物部・主任研究
官
研究者番号：90407239