

令和元年5月27日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19556

研究課題名(和文)トキソプラズマ原虫を使った細胞内「膜」識別に関する免疫新原理の探索

研究課題名(英文)Elucidation of novel mechanism to discriminate intracellular membranes using Toxoplasma gondii

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) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：感染症を引き起こす病原体の多くは、感染した宿主の細胞内で膜構造体を作り増殖することが知られている。宿主の免疫系は病原体を包む膜構造体と、宿主自身の核や小胞体、ゴルジ体あるいは細胞膜を識別し、病原体を包む膜だけを破壊することで病原体を殺傷し、感染症を発病することを抑えているが、宿主免疫系が病原体を包む膜だけをどのような機序で識別しているのかについては不明な点が多かった。今回の研究で、我々は病原体を包む膜が宿主免疫系によってユビキチン化され、さらに、そのユビキチン化にPVM1と呼ばれる宿主タンパク質が関与していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は挑戦的な内容であったが、そこで明らかとなった事実は、免疫学的観点から考えるとサルモネラ、トキソプラズマ、ノロウイルスなど膜構造体を創り出す様々な細胞内寄生性の病原体に対する宿主免疫応答の理解の第一歩となったという点で、学術的意義が高かった。今後、本研究を発展することによって、サルモネラ症を含む細菌性の食中毒、トキソプラズマ症やノロウイルスによる下痢症などの感染症に対する新規の治療戦略につながる可能性があり、社会的にも極めて意義深いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Various intracellular pathogens are included in membraneous structures called pathogen-containing vacuoles in the infected cells. Host immune system discriminates membranes of pathogen-containing vacuoles and those of self organelles such as nucleus, endoplasmic reticulum, golgi apparatus and cell membranes to kill the intracellular pathogens, eventually inhibiting the growth in hosts. Molecular mechanisms for the discrimination have been very unclear, however, we have identified PVM1 that is highly ubiquitinated in response to host immune responses to pathogen infection, suggesting that PVM1 may play a role in discrimination of self and non-self inside infected cells.

研究分野：免疫学

キーワード：細胞内膜 ユビキチン インターフェロン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

病原性微生物は宿主細胞に感染し、増殖する過程で宿主に疾患を起こす。細胞内寄生性微生物の一つであるトキソプラズマ原虫は宿主細胞内で増殖する際に、「寄生胞」という独特の構造体を作り出す。そして、寄生胞の中で宿主細胞からの栄養分を奪い取り増殖する。一方、宿主は免疫系を作動させ寄生胞膜を破壊しトキソプラズマ原虫を細胞質で消化し排除する。それに対して、トキソプラズマ原虫は病原性因子を放出し様々な方法で寄生胞膜を保護することによって、宿主免疫系の作動を阻害している。このような、寄生胞を巡ってトキソプラズマ原虫と宿主の間には免疫学的な攻防が繰り返されていることが、最近の我々や欧米グループの精力的な研究によって徐々に明らかになってきている。

宿主自然免疫系がトキソプラズマ原虫の寄生胞を破壊する時に使用する宿主タンパク質である GBP や IRG は寄生胞膜に蓄積し、その構造を変化させ、最終的に寄生胞膜は消失する。自己・非自己の識別が基本概念である免疫学的視点からこの現象を考えると、核、小胞体、ゴルジ体や細胞膜など宿主細胞は多くの生体膜からなるオルガネラを有しているにも関わらず、宿主自然免疫系 (GBP や IRG) は寄生胞膜のみを「非自己」として識別している点が重要であるが、その分子機序は全く不明である。さらに寄生胞膜は宿主の細胞膜に由来することから元々は「自己」であったと考えられるが、細胞膜から寄生胞膜に変化する際に「自己」から「非自己」に変化したと考えられ、細胞内の「膜」の「自己」と「非自己」の境界があり、GBP や IRG はその変化を識別していると考えられる。しかも、真核生物であるトキソプラズマ原虫とは系統学的に何の関係も持たないサルモネラ菌やシトロバクター菌 (細菌) などの原核生物が宿主細胞内に感染した際に形成する病原体含有膜も GBP や IRG の標的であり、トキソプラズマ原虫とそれらの細菌の間で共有する分子は存在しないことから、GBP や IRG による細胞内膜の自己・非自己の識別は病原体側の因子によって決定されているのではなく、おそらく宿主側の因子により決定されている可能性が高いものの、その分子機序・作動原理については全く不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、寄生虫学的観点から寄生胞膜形成過程がよく解析されているトキソプラズマ原虫をモデルとして、「細胞内膜に存在する自己・非自己識別」の作動原理を探索し、様々な細胞内寄生性病原微生物に対する免疫現象へと一般化することを目的とした。

3. 研究の方法

我々はインターフェロン- γ 刺激後にトキソプラズマ原虫の寄生胞膜上でユビキチン及び p62 が蓄積することを示した。p62 の蓄積は p62 の C 末端部位にあるユビキチン結合領域に依存していることから、ユビキチンがまず寄生胞膜上に蓄積することが重要である。ユビキチンは解析からポリユビキチン鎖であることから、ユビキチンが結合する基質が存在するものと考えられるが、その実態は不明である。サルモネラ菌が細胞内に感染した際に細胞内でオートファジーにより分解される際にもサルモネラ菌含有膜がユビキチン化されるが、その標的については未だ不明である。従って、寄生胞を含めて、病原体含有膜のユビキチン化は非自己化の一つの指標となることから、ユビキチン鎖が結合する基質を同定することは、細胞内膜の自己・非自己識別の作動原理の解明の第一歩となると考えた。そこで上記の研究目的を達成するために、寄生胞膜上のユビキチンの標的基質及び GBP/IRG の標的分子の同定とその機能解析を行った。

4. 研究成果

トキソプラズマの寄生胞に動員される宿主因子を探索した結果、PVM1 を同定した。PVM1 はインターフェロン - γ 刺激によって誘導されるタンパク質であり、トキソプラズマ原虫感染後に速やかに寄生胞に動員されることが分かった。PVM1 をゲノム編集法で遺伝子欠損したマウス線維芽細胞を作製し、インターフェロン- γ 刺激後のトキソプラズマ原虫の寄生胞膜のユビキチン化を検討したところ、ユビキチン化が著しく低下していることを見出した。さらに p62 の動員についても検討した結果、PVM1 欠損マウス線維芽細胞では p62 の動員率も野生型細胞と比較して著しく低下していた。次に PVM1 欠損細胞に PVM1 を強制発現させ、トキソプラズマ原虫感染後のユビキチン化を検討した。その結果、PVM1 強制発現の PVM1 欠損細胞ではユビキチン化が回復したところから、PVM1 はトキソプラズマ原虫の寄生胞のユビキチン化に関与することが示唆された。PVM1 を免疫沈降し、ユビキチン抗体でウェスタンブロットを行ったところ、ユビキチン化を示唆するスミアが高分子量域に認められた。このことから、PVM1 自身がユビキチン化されていることが示唆され、PVM1 はユビキチンの基質であることが示唆され、PVM1 が細胞内膜の非自己化に関与する分子であることが考えられた。現在、トキソプラズマ原虫のみならずサルモネラ含有膜にも PVM1 が蓄積するかどうかを検討中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 17 件)

Orimo T, Sasaki I, Hemmi H, Ozasa T, Fukuda-Ohta Y, Ohta T, Morinaka M, Kitauchi M, Yamaguchi T, Sato Y, Tanaka T, Hoshino K, Katayama KI, Fukuda S, Miyake K, **Yamamoto M**,

Satoh T, Furukawa K, Kuroda E, Ishii KJ, Takeda K, Kaisho T. Cholera toxin B induces interleukine-1 β production from resident peritoneal macrophages through pyrin as well as NLRP3 inflammasome. *Int Immunol*. 査読有, 2019 印刷中
doi: 10.1093/intimm/dxz004.

Briard B, Karki R, Malireddi RKS, Bhattacharya A, Place DE, Mavuluri J, Peters JL, Vogel P, **Yamamoto M**, Kanneganti TD. Fungal ligands released by innate immune effectors promote inflammasome activation during *Aspergillus fumigatus* infection. *Nat Microbiol*. 査読有, 2019, Vol.4, No.2, pp.316-327.
doi: 10.1038/s41564-018-0298-0.

Kim JK, Kim YS, Lee HM, Jin HS, Neupane C, Kim S, Lee SH, Min JJ, **Sasai M**, Jeong JH, Choe SK, Kim JM, **Yamamoto M**, Choy HE, Park JB, Jo EK. GABAergic signaling linked to autophagy enhances host protection against intracellular bacterial infections. *Nat Commun*. 査読有, 2018 Vol. 9, No. 1, pp. 4184.
doi: 10.1038/s41467-018-06487-5.

Bando H, Lee Y, Sakaguchi N, Pradipta A, Ma JS, Tanaka S, Cai Y, Liu J, Shen J, Nishikawa Y, **Sasai M**, **Yamamoto M**. Inducible Nitric Oxide Synthase Is a Key Host Factor for *Toxoplasma* GRA15-Dependent Disruption of the Gamma Interferon-Induced Antiparasitic Human Response. *MBio*. 査読有, 2018, Vol. 9, No. 5.
doi: 10.1128/mBio.01738-18.

Bando H, Sakaguchi N, Lee Y, Pradipta A, Ma JS, Tanaka S, Lai DH, Liu J, Lun ZR, Nishikawa Y, **Sasai M**, **Yamamoto M**. *Toxoplasma* Effector TgIST Targets Host IDO1 to Antagonize the IFN- γ -Induced Anti-parasitic Response in Human Cells. *Front Immunol*. 査読有, 2018 Vol. 9, pp. 2073.
doi: 10.3389/fimmu.2018.02073.

Ingram JP, Tursi S, Zhang T, Guo W, Yin C, A Wynosky-Dolfi M, van der Heijden J, Cai KQ, **Yamamoto M**, Finlay BB, Brodsky IE, Grivennikov SI, Tükel Ç, Balachandran S. A Nonpyroptotic IFN- γ -Triggered Cell Death Mechanism in Nonphagocytic Cells Promotes *Salmonella* Clearance In Vivo. *J Immunol*. 査読有, 2018, Vol. 200, No. 10, pp.3626-3634.
doi: 10.4049/jimmunol.1701386.

Liu BC, Sarhan J, Panda A, Muendlein HI, Ilyukha V, Coers J, **Yamamoto M**, Isberg RR, Poltorak A. Constitutive Interferon Maintains GBP Expression Required for Release of Bacterial Components Upstream of Pyroptosis and Anti-DNA Responses. *Cell Rep*. 査読有, 2018 Vol. 24, No. 1, pp.155-168.e5.
doi: 10.1016/j.celrep.2018.06.012.

Balakrishnan A, Karki R, Berwin B, **Yamamoto M**, Kanneganti TD. Guanylate binding proteins facilitate caspase-11-dependent pyroptosis in response to type 3 secretion system-negative *Pseudomonas aeruginosa*. *Cell Death Discov*. 査読有, 2018, Vol. 5, pp. 3.
doi: 10.1038/s41420-018-0068-z.

Ogawa M, Matsuda R, Takada N, Tomokiyo M, Yamamoto S, Shizukusihi S, Yamaji T, Yoshikawa Y, Yoshida M, Tanida I, Koike M, Murai M, Morita H, Takeyama H, Ryo A, Guan JL, **Yamamoto M**, Inoue JI, Yanagawa T, Fukuda M, Kawabe H, Ohnishi M. Molecular mechanisms of *Streptococcus pneumoniae*-targeted autophagy via pneumolysin, Golgi-resident Rab41, and Nedd4-1-mediated K63-linked ubiquitination. *Cell Microbiol*. 査読有, 2018 Vol. 20, pp. e12846.
doi: 10.1111/cmi.12846.

Sasai M, Pradipta A, **Yamamoto M**. Host immune responses to *Toxoplasma gondii*. *Int Immunol*. 査読有, 2018, Vol. 30, pp. 113-119.
doi: 10.1093/intimm/dxy004.

Santos JC, Dick MS, Lagrange B, Degrandi D, Pfeffer K, **Yamamoto M**, Meunier E, Pelczar P, Henry T, Broz P. LPS targets host guanylate-binding proteins to the bacterial outer membrane for non-canonical inflammasome activation. *EMBO J*. 査読有, 2018, Vol. 37, No. 6.
doi: 10.15252/embj.201798089.

Finethy R, Luoma S, Orench-Rivera N, Feeley EM, Haldar AK, **Yamamoto M**, Kanneganti TD, Kuehn MJ, Coers J. Inflammasome Activation by Bacterial Outer Membrane Vesicles Requires Guanylate Binding Proteins. *MBio*. 査読有, 2017 Vol. 8, No. 5.
doi: 10.1128/mBio.01188-17.

Wallet P, Benaoudia S, Mosnier A, Lagrange B, Martin A, Lindgren H, Golovliov I, Michal F, Basso P, Djebali S, Provost A, Allatif O, Meunier E, Broz P, **Yamamoto M**, Py BF, Faudry E, Sjöstedt A, Henry T. IFN- γ extends the immune functions of Guanylate Binding Proteins to inflammasome-independent antibacterial activities during *Francisella novicida* infection. *PLoS Pathog*. 査読有, 2017 Vol. 13, No. 10, pp. e1006630.
doi: 10.1371/journal.ppat.1006630.

Chida T, Ito M, Nakashima K, Kanegae Y, Aoshima T, Takabayashi S, Kawata K, Nakagawa Y, **Yamamoto M**, Shimano H, Matsuura T, Kobayashi Y, Suda T, Suzuki T. Critical role of

CREBH-mediated induction of TGF- β 2 by HCV infection in fibrogenic responses in hepatic stellate cells. *Hepatology*. 査読有, 2017, Vol. 66, No. 5, pp. 1430-1443.

doi: 10.1002/hep.29319.

Zwack EE, Feeley E, Burton AR, Hu B, **Yamamoto M**, Kanneganti TD, Bliska JB, Coers J, Brodsky IE. Guanylate Binding Proteins regulate inflammasome activation in response to hyper-injected *Yersinia* translocon components. *Infect Immun*. 査読有, 2017, Vol. 85, No. 10. doi: 10.1128/IAI.00778-16.

Biering SB, Choi J, Halstrom RA, Brown HM, Beatty WL, Lee S, McCune BT, Dominici E, Williams LE, Orchard RC, Wilen CB, **Yamamoto M**, Coers J, Taylor GA, Hwang S. Viral Replication Complexes Are Targeted by LC3-Guided Interferon-Inducible GTPases. *Cell Host Microbe*. 査読有, 2017 Vol. 22, pp. 74-85.e7.

doi: 10.1016/j.chom.2017.06.005.

Sasai M, Sakaguchi N, Ma JS, Nakamura S, Kawabata T, Bando H, Lee Y, Saitoh T, Akira S, Iwasaki A, Standley DM, Yoshimori T, **Yamamoto M**. Essential role for GABARAP autophagy proteins in interferon-inducible GTPase-mediated host defense. *Nat Immunol*. 査読有, 2017, Vol. 18, pp. 899-910.

doi: 10.1038/ni.3767.

[学会発表](計 17 件)

山本雅裕「トキソプラズマの寄生虫免疫学から導かれた意外な創薬ターゲット」新興・再興感染症制御プロジェクト 合同シンポジウム (国立感染症研究所、新宿区、東京、2019年3月18日)

山本雅裕「病原性寄生虫トキソプラズマと宿主免疫の攻防」第1回 日本医学会連合 Rising Star リトリート (かずさアカデミアパーク、木更津、千葉、2019年3月4~5日)

Masahiro Yamamoto「LC3 and GABARAP subfamilies of mouse ATG8 differentially down-regulate innate immunity」Autophagy: From Model Systems to Therapeutic Opportunities, KEYSTONE SYMPOSIA (Eldorado Hotel, Santa Fe, New Mexico, USA, 2019年2月17-21日)

Masahiro Yamamoto「Targeted disruption of IFN- γ -induced IDO1-dependent anti-parasitic response in human cells by Toxoplasma effector TgIST」The 3rd Asian Congress of Protistology & 10th Asian Conference of Ciliate Biology & 2nd International Symposium on Biodiversity and Evolution of Protozoa (San-Yat Sen University, Guangzhou, China, November 24-26, 2018)

山本雅裕「トキソプラズマの宿主免疫返り討ち戦法について」第26回分子寄生虫学ワークショップ/第16回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会 特別企画・免疫 (道後温泉花ゆづき、松山、愛媛、2018年9月19日—22日)

Masahiro Yamamoto「Role of cell-intrinsic and innate immunity by interferon-inducible GTPases」The 10th Japanese-German Immunology Workshop. Session 3: Uniqueness in the Development and Function of Innate Immunity. (Hotel Ludvig der Bayer, Ettal, Germany, September 6th-9th, 2018)

Masahiro Yamamoto「Host cell-intrinsic host defense and counter defenses against Toxoplasma」ICOPA2018 Biology and interaction of host/cell and Toxoplasma gondii infection (Exco, Daegu, Korea, August 19-24, 2018)

山本雅裕「IFN γ による宿主免疫系におけるオートファジー関連分子群の非標準的役割」日本インターフェロン・サイトカイン学会 シンポジウム2「共生と病原微生物研究の最前線」S2-2 (秋葉原コンベンションホール、秋葉原、東京、2018年7月26日-27日)

山本雅裕「感染防御免疫系における ATG8 ファミリー分子群の役割」千里ライフサイエンスセミナー M2 オートファジーと疾患 (千里ライフサイエンスセンター 山村雄一記念ライフホール、豊中、大阪、2018年6月26日)

Masahiro Yamamoto「Essential role of ATG proteins in cell-autonomous innate immunity to vacuolar pathogens」15th International Conference on Innate Immunity, Aegean Conferences (Avra Imperial Hotel, Crete, Greece, June 18-23, 2018)

Masahiro Yamamoto「Role of Atg8 in the regulation of NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis」Australia-Japan Meeting on Cell Death (Ichijo Hall, Yayoi Auditorium, The University of Tokyo, Tokyo, Japan, May 22-23, 2018)

山本雅裕「肝臓機マラリア原虫の文化に重要な宿主因子の探索」第70回日本衛星動物学会大会 大会シンポジウム 蚊とマダニ - 病原体とベクターの生物学- (帯広畜産大学、帯広、北海道、5月12-13日, 2018)

Masahiro Yamamoto「A family member of phospholipase C is required for CD8 T cell-mediated anti-Toxoplasma host defense」WHIP 2018 22th Annual Woods Hole ImmunoParasitology Conference (Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA, USA,

April 15-18, 2018)

Masahiro Yamamoto 「Suppression of human IFN- γ -mediated anti-parasitic cell-autonomous immunity by a Toxoplasma effector」 Cells vs Pathogens: Intrinsic Defenses and Counterdefenses Keystone Symposia (Hyatt Regency Monterey, Monterey, California, USA, March 23-26, 2018)

山本雅裕 「抗トキソプラズマ宿主免疫が明らかにした ATG 分子群のオートファジー非依存的役割」2017 年度 生命科学系学会合同年次大会 (神戸、兵庫県、2017 年 12 月 6 日)

Masahiro Yamamoto 「Immunoparasitology of Toxoplasma gondii」 Keynote lecture-5 ICE on IMERI The 2nd International Conference and Exhibition on Indonesian Medical Education and Research Institute (Jakarta, Indonesia, November 7th-9th, 2017)

Masahiro Yamamoto 「A mechanism of interferon- γ -induced anti-Toxoplasma gondii host defense」 The 7th International Symposium on Parasitology (Jiujiang City, Jiangxi Province, China, 13-17 October, 2017)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://immpara.biken.osaka-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：笹井 美和

ローマ字氏名：(Sasai, Miwa)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。