

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15135

研究課題名(和文) 宿主分子Gate-16を標的とする新規トキソプラズマ病原性因子TgGIFの解析

研究課題名(英文) Role of TgGIF in suppression of anti-Toxoplasma immune response

研究代表者

馬 知秀 (Ma, Jisu)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：90755266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：トキソプラズマ原虫はヒトや動物において致死的なトキソプラズマ症を引き起こす人畜共通病原体の一つである。感染細胞においては寄生胞と呼ばれる膜構造体を形成するが、宿主免疫はこれに対してインターフェロンを産生し、インターフェロン誘導性GTPaseを蓄積させることによって寄生胞を破壊し生体防御をしている。一方、病原性の高いトキソプラズマはインターフェロン誘導性GTPase依存的な免疫応答を抑制できる様々な機構を持っているが、インターフェロン誘導性GTPaseの数が多いことからそれぞれについて病原性因子が存在するのではなく、今回の研究でGate-16と呼ばれる因子を標的していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トキソプラズマはエイズや抗がん剤投与下にある免疫不全者で致死的なトキソプラズマ症を引き起こす病原体である。また妊婦が初感染した場合にも、胎児に垂直感染し、重篤な先天性トキソプラズマ症を引き起こす。トキソプラズマ原虫はヒトを含む全ての恒温動物に感染する病原体であり、感染細胞内では寄生胞と呼ばれる膜の構造体を作り出し、その中で増殖する。我々宿主の免疫系は、インターフェロンと呼ばれる免疫物質を作り出し、それにより誘導される酵素が寄生胞に蓄積することで破壊する。今回の研究では、トキソプラズマがTgGIFと呼ばれる病原性分子を放出して、インターフェロン誘導性酵素を負に制御していることを発見した。

研究成果の概要(英文)：Toxoplasma gondii is one of the zoonotic pathogens causing fatal toxoplasmosis in humans and animals. In infected cells, a membrane structure called a parasite is formed, but host immunity produces interferon against this, and the interferon-induced GTPase is accumulated to destroy the parasite and protect the body. On the other hand, highly pathogenic T. gondii has various mechanisms that can suppress the interferon-induced GTPase-dependent immune response, but due to the large number of interferon-induced GTPases, there is no virulence factor for each. This study found that it targets a factor called Gate-16.

研究分野：寄生虫免疫学

キーワード：トキソプラズマ インターフェロン TgGIF

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

トキソプラズマは孢子虫類に属する原虫で、ヒトや家畜などの幅広い温血動物に感染する日和見病原体である。しかし感染宿主が免疫不全状態になると致死的な脳炎、肺炎や心筋炎を主症状とするトキソプラズマ症を引き起こす。日本においては、トキソプラズマのシストに汚染した家畜の肉を生食あるいは加熱不十分で食することにより、妊婦が初感染し胎児・新生児に先天性トキソプラズマ症を引き起こす重要な病原体である。

トキソプラズマは感染宿主の細胞内でのみ増殖可能な偏性寄生性病原体である。トキソプラズマに対する宿主免疫応答では炎症性サイトカインの一つであるインターフェロン $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 依存的な宿主免疫系が極めて重要であり、我々が所属する研究グループではIFN- $\gamma$  依存的に誘導されるGTPaseがトキソプラズマの殺傷に決定的に寄与することを見出している (Yamamoto et al. *Immunity*, 2012年)。またごく最近、我々はインターフェロン誘導性GTPaseが機能するためにはオートファジー関連分子の一つであるGate-16が必須であることを見出した (Sasai et al. *Nature Immunology*, 2017年)。

トキソプラズマには低病原性原虫と高病原性原虫が存在する。宿主免疫系の解析で用いられるのは低病原性原虫であるが、高病原性トキソプラズマも存在し、健常人であってもトキソプラズマ症を発症することが近年報告されてきている。高病原性トキソプラズマが宿主細胞への感染に際して様々なエフェクター分子を放出し、宿主の免疫系から逃避あるいは宿主免疫系を乗っ取る病原性メカニズムを有することを我々は報告してきた (Yamamoto et al. *J Exp Med*, 2011; Ma et al. *J Exp Med*, 2014年)。このエフェクター分子の主体となるのが、アピコンプレックス門原虫に特異的なオルガネラであるロプトリーとデンスグラニュールに含まれるタンパク質群である。ロプトリー由来のROP5、ROP17やROP18やデンスグラニュール由来のGRA7がインターフェロン誘導性GTPaseに直接作用してIFN- $\gamma$  依存性宿主免疫応答を抑制することは知られているが、インターフェロン誘導性GTPaseが正常に作用するためのカギとなるGate-16を標的とするエフェクター分子については、その作用の合理性がある(すなわち、Gate-16だけを不活性化すればインターフェロン誘導性GTPaseによる抗トキソプラズマ応答をほぼ完全に抑制できる)にもかかわらず、全く知られていなかった。

## 2. 研究の目的

我々は、網羅的に新規のエフェクター分子を探索する過程で、TgGIF (= *Toxoplasma gondii* Gate-16 Inhibitory Factor) を同定した。しかし、TgGIFの抗トキソプラズマ免疫に対する機構はよく分かっていない。そこで、TgGIFの寄生虫免疫学的な意義について明らかにすることを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

TgGIFを哺乳動物細胞発現ベクターにクローニングし、哺乳動物細胞であるHEK293細胞で発現することにした。Gate-16に対する機能を調べる目的で、FlagタグのついたGate-16とHAタグの付いたTgGIFを共発現させ、Flagタグでウェスタンブロットを行い、タンパク質量を検討した。さらに、TgGIFはキナーゼ活性を持っていることから、リン酸化酵素活性を持たない点変異体 (TgGIF 酵素活性なし) を作製し、Gate-16の発現量が増減についてウェスタンブロット法で検討した。

生体レベルでのTgGIFの役割を調べる目的でTgGIF欠損トキソプラズマ原虫を相同組換え法で作製した。C57BL/6マウスに野生型原虫およびTgGIF欠損トキソプラズマ原虫を感染させ、経時的な生存率の変化について検討した。

## 4. 研究成果

### (結果)

GIFをGate-16とともに哺乳動物細胞で過剰発現させるとGate-16を分解することが分かった。またTgGIFには酵素活性があり、アミノ酸点変異により酵素活性を失わせたTgGIFではGate-16分解活性がなくなることが分かった。このことから、TgGIFのリン酸化酵素活性依存的にGate-16が分解されることを見出した(次ページ図1)。Gate-16はトキソプラズマ免疫応答に必須のインターフェロン誘導性GTPaseの細胞内局在の維持に極めて重要な役割を果たす。TgGIFはGate-16を分解することから、TgGIFが存在するために強毒型のトキソプラズマ原虫は病原性が高いことが考えられた。しかし、感染細胞内でのTgGIFのより詳細な作用機序や生体レベルにおけるTgGIFを介した病原性発現

のメカニズムについては不明な点が多い。そこでTgGIF欠損トキソプラズマ及び野生型原虫をマウスに感染させ、マウスの経時的な生存率の変化を測定した。その結果、TgGIF欠損トキソプラズマは病原性がマウス生体で極めて低かった。このことから、TgGIFは生体レベルでの病原性に極めて重要な役割を果たすことが示唆された。

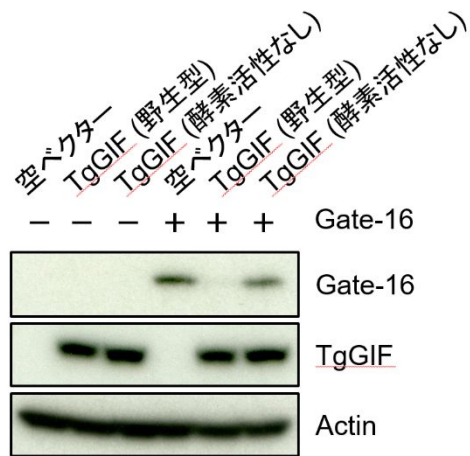
次に、TgGIFの細胞レベルでの役割について検討するために、インターフェロン誘導性GTPase依存的な免疫応答を検討した。MEF及びBMMFに野生型及びTgGIF欠損原虫を感染させ、IFN- $\gamma$ 誘導性GTPaseであるIRGA6, IRGB6及びGBP1, GBP2, GBP1-5のトキソプラズマへの動員について共焦点顕微鏡を用いた免疫染色法で検討したところ、各インターフェロン誘導性GTPaseのトキソプラズマ原虫寄生胞膜への動員率の低下が認められた。

TgGIFはGate-16を標的とすることから、インターフェロン誘導性GTPaseの細胞内局在が変化することが考えられ、野生型原虫感染後にIFN- $\gamma$ 刺激した際のインターフェロン誘導性GTPaseの局在が細胞内凝集体にあるかを、共焦点顕微鏡及び超解像度顕微鏡 (SIM) で検討した。SIM観察の結果、TgGIF感染細胞においては、インターフェロン誘導性GTPaseの凝集体の形成が見られるようになったことから、それが野生型原虫感染による高病原性を引き起こす機序の一つであることが示唆された。

IFN- $\gamma$ 刺激による1細胞当たりの原虫数の低下および感染率を測定し、TgGIFの作用が増殖抑制なのか、それとも殺傷にあるのかを検討し、TgGIFの酵素活性が必要であるかどうかについてもTgGIF 変異導入原虫を用いて検討したところ、TgGIFはインターフェロン依存的な殺傷反応に影響を与えていることが分かった。

#### (考察)

以上の実験結果を考察すると、TgGIFはGate-16を標的としてリン酸化酵素依存的に分解することにより、Gate-16を介したインターフェロン誘導性GTPase依存的な免疫応答を負に制御している可能性が示唆された。今後、TgGIFのGate-16分解機序について、Gate-16とTgGIFが直接的な結合により分解されるのか、あるいは間接的にファクターXを介して、Gate-16を分解しているのか、生化学的な分子メカニズムなどを明らかにする予定である。またGate-16を標的とするトキソプラズマ原虫の病原性メカニズムはこれまでに全く報告されておらず、新規の病原性機構として、さらに寄生虫免疫学的解析を進めることにより、トキソプラズマ原虫の宿主免疫応答の抑制機構の全容を明らかにしたい。



**図1 TgGIFの酵素活性依存的な Gate-16 タンパク質減少を示すウェスタンブロットの図。**  
野生型 TgGIF を過剰発現させると、Gate-16 のバンドが消失するが、酵素活性なし TgGIF では認められ

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Bando Hironori, Lee Youngae, Sakaguchi Naoya, Pradipta Ariel, Ma Ji Su, Tanaka Shun, Cai Yihong, Liu Jianfa, Shen Jilong, Nishikawa Yoshifumi, Sasai Miwa, Yamamoto Masahiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Inducible Nitric Oxide Synthase Is a Key Host Factor for Toxoplasma GRA15-Dependent Disruption of the Gamma Interferon-Induced Antiparasitic Human Response	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mBio.01738-18	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 Bando Hironori, Sakaguchi Naoya, Lee Youngae, Pradipta Ariel, Ma Ji Su, Tanaka Shun, Lai De-Hua, Liu Jianfa, Lun Zhao-Rong, Nishikawa Yoshifumi, Sasai Miwa, Yamamoto Masahiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Toxoplasma Effector TgIST Targets Host ID01 to Antagonize the IFN- $\gamma$ -Induced Anti-parasitic Response in Human Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 2073
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2018.02073	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----