

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07472

研究課題名(和文)トキソプラズマ感染成立に必須なリクルートソームの全貌の解明

研究課題名(英文) Analysis of the "recruitsome", which is important for the establishment of Toxoplasma infection.

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新たなリクルート因子候補として新たに6つの遺伝子を同定した。これらのうちの幾つかは原虫の増殖に必須であることが示唆されたので、CRISPR/CAS9系を用いたノックアウト原虫の作製が不可能である可能性が高いものと思われた。実際に先行して2つの遺伝子をCRISPR/CAS9系および古典的な相同組み換えの系の2つの方法を用いたノックアウトを試みたが、いずれの方法を用いてもノックアウト株は確立できなかった。現在、Auxin inducible degron (AID)を用いたコンディショナルノックアウトの系を用いて機能解析を継続中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トキソプラズマが宿主のオルガネラをリクルートしているという事実は形態学的によく知られた事実であるが、そのリクルートを行う機序や、何故リクルートするのかについてはほとんど何も分かっていない。本研究で得られた成果は、トキソプラズマがどのように宿主の細胞小器官を移動させているのか、また感染細胞内でエネルギーや必要な栄養分をどのようにして入手しているのかという感染の一番基本的な部分の理解につながるものと思われる。また、これらの知見は将来的には有効な抗アピコンプレクス門原虫薬開発への足がかりとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified several candidate genes for the host mitochondrial recruitment, and now, we are investigating the function of these gene products.

研究分野：分子寄生虫学

キーワード：トキソプラズマ 細胞内寄生 ミトコンドリア

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ていた。一方で最近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 1b (MAF1b)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 MAF1b 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。事実申請者はプロテオミクス的手法を用いて第2のミトコンドリア・リクルート因子である ROP39の同定に成功した(Fukumoto et al. (2021))。

2. 研究の目的

申請者は前述のプロテオミクス解析により、さらに2つのタンパク質をリクルート因子候補として同定している(第87回日本寄生虫学会等にて発表)。さらにこれら2つのタンパク質は、既知の2つとは異なり原虫の増殖に必須であることがゲノム編集技術を用いた網羅的な解析により示唆されている(Cell (2016))。すなわち新たな2つのタンパク質は既知の2種よりもより宿主オルガネラリクルートという生命現象にとって本質的な機能を担っている可能性が考えられる。そこで本研究は、宿主オルガネラリクルート因子として既知の MAF1b および ROP39 にさらに2つのタンパク質を加えた4種類のタンパク質の機能を解析することで、トキソプラズマによるミトコンドリアおよび小胞体のリクルート機構の分子メカニズムを解明することを目指す。

3. 研究の方法

本研究ではまず、2つの新たなリクルート因子候補が実際にリクルートに関与していることを、リバースジェネティクス的手法を用いて明らかにする。これらの遺伝子は原虫の増殖に必須であることが示唆されているので、CRISPR/CAS9系(mBio (2014), PLoS ONE (2014))を用いたノックアウト原虫の作製が不可能である可能性が高い。そこでこれらの遺伝子がノックアウトできなかった場合は、特定の条件下で遺伝子の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。調べる表現型としては、まずはミトコンドリアおよび小胞体のリクルート活性の変化、そして *in vitro* および *in vivo* における増殖能の変化を想定している。同じミトコンドリアのリクルート因子である MAF1b と ROP39 を比較しても、MAF1b は ROP39 と比べリクルート活性は強いものの原虫の増殖には影響が見られず、逆に ROP39 はリクルート活性こそ MAF1b に劣るものの原虫の増殖能力に大きく影響を与えていた。この理由は現時点では明らかではないが、トキソプラズマの宿主ミトコンドリアリクルート因子は増殖能への影響の有無により少なくとも2つのクラスに分類が可能であることが示された。そこで今回新たに同定した2つのタンパク質は原虫の増殖能力に影響を与えるかどうかを検討する。

4. 研究成果

前述の通り、2つの新規リクルート候補遺伝子は原虫の増殖に必須である可能性が示唆されたため、CRISPR/CAS9系(mBio (2014), PLoS ONE (2014))を用いたノックアウト原虫の作製が

不可能である可能性が高いものと思われた。実際に CRISPR/CAS9 系および古典的な相同組み換えの系の2つの方法を用いてノックアウトを試みたところ、いずれの方法でもノックアウト株は確立できなかったため、これらの遺伝子は原虫の生存、増殖に必須である可能性が強く示唆された。現在、Auxin inducible degron (AID)を用いたコンディショナルノックアウトの系を用いて機能解析を継続中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Kurotaki Daisuke, Kikuchi Kenta, Cui Kairong, Kawase Wataru, Saeki Keita, Fukumoto Junpei, Nishiyama Akira, Nagamune Kisaburo, Zhao Keji, Ozato Keiko, Rocha Pedro P., Tamura Tomohiko	4. 巻 119
2. 論文標題 Chromatin structure undergoes global and local reorganization during murine dendritic cell development and activation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2207009119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2207009119	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 該当する

1. 著者名 Yoshimura Michinobu, Shimizu Kanako, Nakura Yukiko, Kawahara Kazumi, Katano Harutaka, Motooka Daisuke, Takeuchi Makoto, Nagamune Kisaburo, Imamura Yoshiaki, Nakamura Shota, Yasukawa Kiyoshi, Hasegawa Hideki, Yoshida Yoshio, Yanagihara Itaru	4. 巻 48
2. 論文標題 A fatal case of hemophagocytic lymphohistiocytosis associated with gestational psittacosis without symptoms of pneumonia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology Research	6. 最初と最後の頁 3325 ~ 3330
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jog.15429	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 永宗喜三郎	4. 巻 43
2. 論文標題 トキソプラズマ症	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Infectious Agents Surveillance Report	6. 最初と最後の頁 49-50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 永宗喜三郎、森嶋康之	4. 巻 43
2. 論文標題 レセプトデータを用いた日本国内におけるトキソプラズマ症発生動向の推定	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Infectious Agents Surveillance Report	6. 最初と最後の頁 51-52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 村田理恵、神門幸大、前野 愛、鈴木 淳、横山敬子、新開敬行、貞升健志、舘山優乃、西野孝洋、永宗喜三郎	4. 巻 43
2. 論文標題 トキソプラズマ等の寄生原虫が原因と推定されたクジラ肉の喫食による都内有症事例	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Infectious Agents Surveillance Report	6. 最初と最後の頁 54-56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 永宗喜三郎、森嶋康之	4. 巻 43
2. 論文標題 レセプトデータを用いた日本国内におけるトキソプラズマ症発生動向の推定	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Infectious Agents Surveillance Report	6. 最初と最後の頁 3-4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 村田理恵、神門幸大、前野 愛、鈴木 淳、横山敬子、新開敬行、貞升健志、舘山優乃、西野孝洋、永宗喜三郎	4. 巻 43
2. 論文標題 トキソプラズマ等の寄生原虫が原因と推定されたクジラ肉の喫食による都内有症事例	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Infectious Agents Surveillance Report	6. 最初と最後の頁 6-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Fukumoto Junpei, Yamano Akinori, Matsuzaki Motomichi, Kyan Hisako, Masatani Tatsunori, Matsuo Tomohide, Matsui Toshihiro, Murakami Mami, Takashima Yasuhiro, Matsubara Ryuma, Tahara Michiru, Sakura Takaya, Takeuchi Fumihiko, Nagamune Kisaburo	4. 巻 15
2. 論文標題 Molecular and biological analysis revealed genetic diversity and high virulence strain of <i>Toxoplasma gondii</i> in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0227749
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0227749	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 Taku Izumi, Hirai Tomohiro, Makiuchi Takashi, Shinzawa Naoaki, Iwanaga Shiroh, Annoura Takeshi, Nagamune Kisaburo, Nozaki Tomoyoshi, Saito-Nakano Yumiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Rab5b-Associated Arf1 GTPase Regulates Export of N-Myristoylated Adenylate Kinase 2 From the Endoplasmic Reticulum in Plasmodium falciparum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 610200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2020.610200	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 -

[学会発表] 計10件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 川原 史也、山元 佳、兼重 昌夫、松崎 素道、丸山 治彦、永宗 喜三郎
2. 発表標題 日本の先天性トキソプラズマ症患者由来原虫のマウスに対する病原性の解析
3. 学会等名 第91回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川原 史也、山元 佳、兼重 昌夫、松崎 素道、丸山 治彦、永宗 喜三郎
2. 発表標題 日本の先天性トキソプラズマ症患者由来原虫のマウスに対する病原性の解析
3. 学会等名 第55回日本原生生物学会大会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川原 史也、山元 佳、兼重 昌夫、松崎 素道、丸山 治彦、永宗 喜三郎
2. 発表標題 日本の先天性トキソプラズマ症患者由来原虫のマウスに対する病原性の解析
3. 学会等名 第81回日本寄生虫学会東日本支部会、日本共生生物学会第6回大会合同大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡辺祐策、川原史也、松崎素道、宇根有美、永宗喜三郎
2. 発表標題 沖縄県の動物園においてパルマワラビーの集団死を引き起こしたトキソプラズマの遺伝型
3. 学会等名 第92回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 多久和泉、平井智浩、牧内貴志、新澤直明、岩永史朗、案浦健、永宗喜三郎、野崎智義、中野由美子
2. 発表標題 熱帯熱マラリア原虫Rab5bの結合タンパク質はN-ミリスチル化adenylate kinase 2を小胞体から選別輸送する
3. 学会等名 第90回日本寄生虫学会第32回日本臨床寄生虫学会合同大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松崎 素道、川原 史也、永宗 喜三郎
2. 発表標題 トキソプラズマ日本分離株の遺伝的多様性と分子疫学
3. 学会等名 第90回日本寄生虫学会第32回日本臨床寄生虫学会合同大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村田理恵、神門幸大、前野 愛、鈴木 淳、横山敬子、貞升健志、永宗喜三郎
2. 発表標題 クジラ肉の喫食による有症事例
3. 学会等名 第90回日本寄生虫学会第32回日本臨床寄生虫学会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川原 史也、山元 佳、兼重 昌夫、松崎 素道、丸山 治彦、永宗 喜三郎
2. 発表標題 日本の先天性トキソプラズマ症患者由来原虫の分離と解析
3. 学会等名 第90回日本寄生虫学会第32回日本臨床寄生虫学会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 1.高橋 勉、岡田 隆宏、川原 史也、永宗喜三郎、大國 典子、菅 里加、武田 考平、宇賀田典美、藤本 亜弓、伊藤 俊輔、岡田 祐介、高橋 史匡、松田真一朗、池尻 文良、井上 政弥、三宅 隆明、鈴木 律朗、大橋 典男、黒田 誠、安藤 秀二、鈴宮 淳司、三島 清司
2. 発表標題 末梢血好中球内に封入体を認めた同種移植後トキソプラズマ症の一例
3. 学会等名 第42回日本造血細胞移植学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 2.谷口裕二、小倉淳、嶺井隆平、永宗喜三郎、松崎素道、福本隼平、鬼頭克也、高島康弘
2. 発表標題 ロングリードシーケンサーを用いたToxoplasma gondii日本分離株の病原性遺伝子解析
3. 学会等名 第89回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 矢崎 裕規、新倉 保、猪飼 桂、矢吹 彬憲、永宗 喜三郎、松崎 素道、白鳥 峻志、島野 智之、小林 富美恵	4. 発行年 2023年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 452
3. 書名 原生生物学事典	

1. 著者名 永宗 喜三郎、脇 司、常盤 俊大、島野智之	4. 発行年 2020年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 168
3. 書名 寄生虫のはなし	

〔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0件

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
---------	---------