

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590502

研究課題名(和文)トリパノソーマ感染宿主細胞におけるオートファジーとアポトーシス制御解析

研究課題名(英文)Studies on host autophagy and apoptosis in Trypanosoma cruzi infected cells

研究代表者

嶋田 淳子(Shimada, Junko)

群馬大学・保健学研究科・教授

研究者番号：20211964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内寄生原虫Trypanosoma cruziは宿主のオートファジー機構で排除されない。原虫感染により、オートファジーの初期過程が活性化され、LC3の局在変化、隔離膜形成が起こることが明らかとなった。しかし、オートリソソーム形成はみられず、成熟したオートファゴソームが形成されないと考えられた。LC3-Atg3までは進行するが、LC3の脂質化のステップが阻害されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Autophagy has emerged as an essential component of the defense system against intracellular pathogens. We demonstrated that Trypanosoma cruzi, an intracellular protozoan parasite, was not eliminated by host autophagic machinery. Puncta of LC3, an autophagy marker, were significantly increased after the infection, indicating that T. cruzi infection activated the early step of host autophagy. However, the degradation of p62, with a known marker in autolysosome formation, and autolysosomes were not observed in the infected cells. These results indicated that T. cruzi infection inhibits host autophagy pathway before the autolysosome formation. Furthermore, autophagosome formation was inhibited at the step of conversion from LC3-Atg3 to LC3- in T. cruzi infected cells.

研究分野：分子寄生虫学

キーワード：オートファジー 南米型トリパノソーマ 宿主-寄生虫相互作用

1. 研究開始当初の背景

Trypanosoma cruzi はシャーガス病の病原体として重要であるが、本原虫感染による宿主側の応答については解明されていない点が多く、病態を理解する上で寄生虫と宿主両者を統合的に解析する基盤研究が必要である。我々は、原虫感染による宿主応答および原虫の生き残り戦略について解析し、宿主-寄生虫相互作用を解明していきたいと考えている。これまで *T. cruzi* 感染に対する宿主細胞側の応答として細胞死という観点から解析を行い、感染細胞ではアポトーシスが抑制されることを見出し、その抑制には宿主アポトーシス抑制因子 **c-FLIP** が機能的にはたらくていることを明らかにした。本研究では、オートファジーの観点から宿主-寄生虫相互作用を解明したいと考えている。

2. 研究の目的

これまでに細胞内病原体が宿主オートファジー機構で排除されることが報告されている。しかし、寄生原虫 *T. cruzi* はこの機構で排除されず、細胞内で分裂・増殖を繰り返し、宿主の排除機構から回避している。そこで、この経路のどのステップでオートファジーが抑制されているかを調べる。また、原虫感染により隔離膜形成、オートファゴソーム形成、オートリソソーム形成が抑制されるかを検討する。また、原虫側のオートファジー関連遺伝子 Atg8 の発現を調べ、原虫 Atg8 と宿主 LC3 との結合について調べる。

3. 研究の方法

ヒト由来線維肉腫細胞 HT1080 細胞に *T. cruzi* を感染させた *in vitro* 感染モデル系を用い、オートファジー関連タンパク質の発現を解析する。オートファジーを引き起こすことが知られている栄養飢餓（グルコースまたはアミノ酸飢餓）、ラパマイシン処理した細胞と原虫感染細胞を比較し、Atg の発現、細胞内局在について解析した。

4. 研究成果

細胞内寄生原虫 *Trypanosoma cruzi* 感染細胞では、病原体排除機構の一つであるオートファジーが抑制されることを見出した。その経路のオートファゴソーム形成過程には、オートファジー関連タンパク質 (Atg) の一つ LC3 の脂質化が重要であり、反応の場である Atg12-Atg5 複合体や実行に関わる Atg3, Atg7 が必須である。そこで、まず Atg5, Atg3, Atg7 の発現解析を行った。

HT1080 細胞に *T. cruzi* を感染させ、経時的に細胞を集めた。Atg5, 3, 7 遺伝子及びタンパク質発現を調べるために、qPCR、ウエスタンブロット法を行った (図 1, 2)。Atg5

遺伝子発現は、感染後 6h で最大 (1.8 倍) となり、感染後 12h 以降は減少した。また、Atg5 タンパク質は感染 12, 24h 後に発現が増加しており、グルコース飢餓刺激によるオートファジー誘導と比較し、発現量が高いことがわかった。Atg7 タンパク質は感染 6h 後から発現が上昇するが、9h 後に減少し始め、24h 後まで発現量が低かった。一方、グルコース飢餓刺激による発現量は常に高いレベルを維持していた。また、Atg3 タンパク質発現は感染後上昇しており、グルコース飢餓刺激と同様の結果となった。

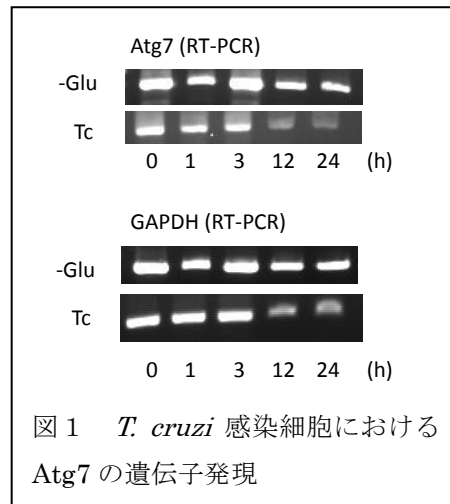


図 1 *T. cruzi* 感染細胞における Atg7 の遺伝子発現

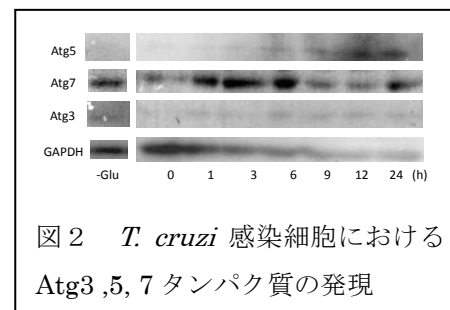


図 2 *T. cruzi* 感染細胞における Atg3, 5, 7 タンパク質の発現

以上の結果から、感染 9h 以降に Atg7 の発現が低下したが、レベルは低いもののタンパク質自体の発現は観察された。その他の Atg タンパク質の発現も検出されたことから、原虫感染により Atg の発現が著しく減少しているのではないと考えられた。

次に、感染宿主細胞ではオートファジーのどのステップが抑制されているかを検討した。まず、HT1080 細胞に原虫を感染させ、経時的にオートファジーのマーカーである LC3 タンパク質の局在変化を観察した。グルコース飢餓細胞、ラパマイシン処理した細胞と同様に、原虫感染後に LC3 の蛍光強度が増加することがわかった。この結果は、感染により LC3 の局在が細胞質から膜上に変化していることを示している (図 3)。すなわち、

T. cruzi 感染により、オートファジー経路の初期過程が活性化されることが示唆された。

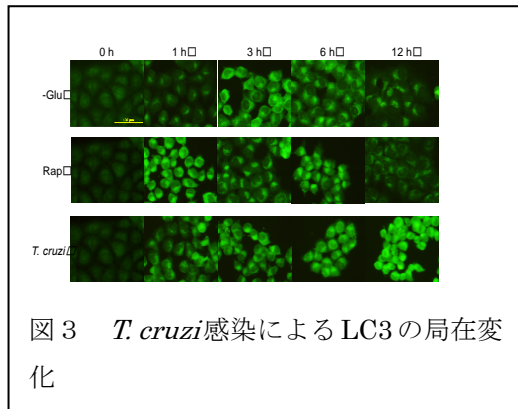


図3 *T. cruzi* 感染による LC3 の局在変化

次に、オートファゴソーム形成について調べた。Syntaxin17(Stx17)はオートファゴソームのマーカーで成熟したオートファゴソームに局在することが知られている。そこで、グルコース飢餓および原虫感染細胞を用い、抗 Stx 抗体で細胞を染色した (図4)。コントロールに比べ、グルコース飢餓細胞、原虫感染細胞ではいずれも LC3 の輝点が多く観察されたが、Stx は感染細胞で蛍光強度が低かった。この結果は、*T. cruzi* 感染細胞では成熟したオートファゴソーム形成が抑制される可能性を示している。

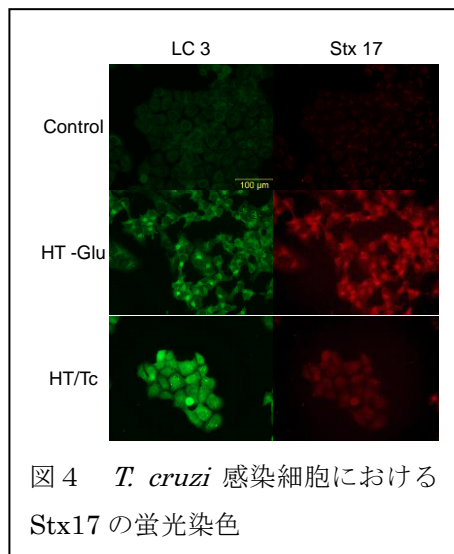


図4 *T. cruzi* 感染細胞における Stx17 の蛍光染色

さらに、オートリソソーム形成について検討した。オートリソソームは酸性を示すオルガネラであるため、Lysotrackerにより検出することが可能である。HT1080 細胞に Lysotracker を添加したところ、アミノ酸飢餓細胞では Lysotracker の蛍光が観察されたが、*T. cruzi* 感染細胞では観察されなかった (図5)。またオートリソソームで分解されることが知られている p62 タンパク質についてウェスタンブロットを行ったところ、感染

細胞では 62 kDa 付近のバンドが経時的に増加し、分解されないことがわかった (図6)。

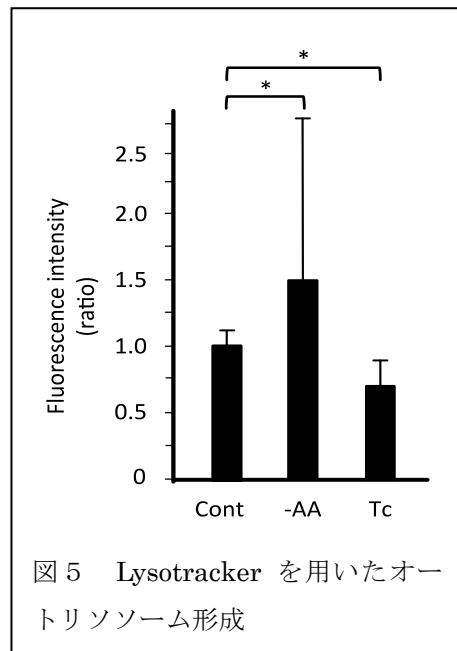


図5 Lysotracker を用いたオートリソソーム形成

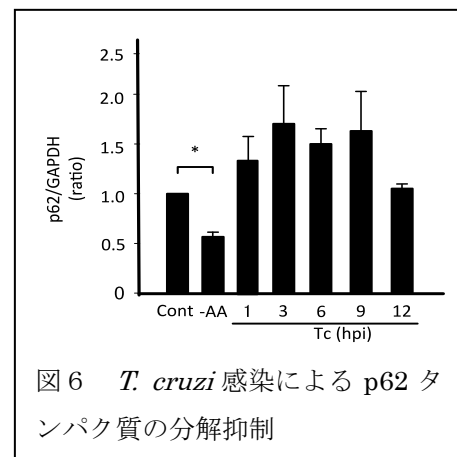


図6 *T. cruzi* 感染による p62 タンパク質の分解抑制

すなわち、*T. cruzi* 感染細胞では形態学的にも機能的にもオートリソソーム形成が抑制されていると考えられた。

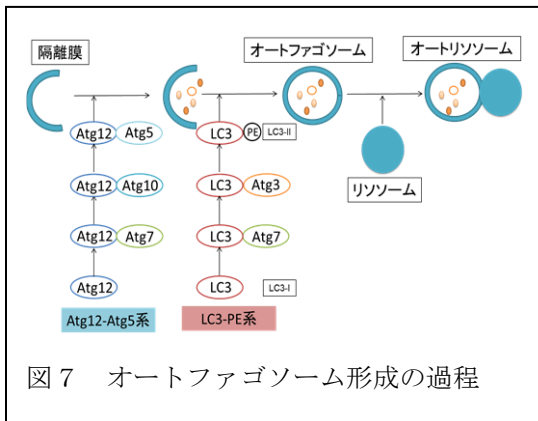
以上の結果から、*T. cruzi* 感染細胞ではオートファジー経路の初期過程が活性化されるが、成熟したオートファゴソームおよびオートリソソーム形成は起きていないことが明らかとなった。

オートファゴソーム形成のどのステップで抑制されているかを詳細に検討するため、LC3 強制発現細胞の樹立を試みた。

LC3 遺伝子全長を GFP の下流に連結したプラスミドを作製し、HT1080 細胞にトランスフェクションし、LC3 高発現細胞 (GFP-LC3) の樹立に成功した。

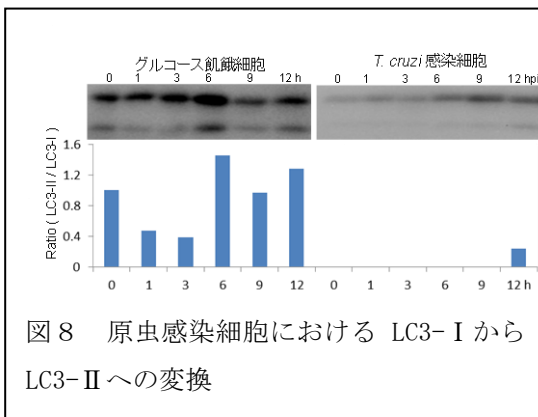
この細胞を用いて、LC3 の局在変化を調べたところ、HT1080 細胞の時と同様に、*T. cruzi* 感染により LC3 の輝点が増加した。

LC3はオートファゴソーム形成の祭、LC3-I からホスファチジルエタノールアミ



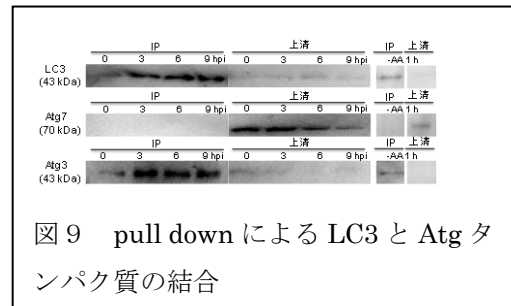
ンが付加したLC3-IIに変換されることが知られている。その過程では、まずLC3のC末端のアミノ酸がAtg4により切断され、その後、Atg7、Atg3と順次結合し、最終的に脂質化されたLC3-IIとなる(図7 LC3-PE系)。この反応系はE1、E2酵素によるユビキチン付加の反応系に似ている。

まず、原虫感染細胞でLC3 I、LC3 IIが検出されるかどうかについてウエスタンブロット法で確認した(図8)。GFP-LC3-Iは43 kDa、GFP-LC3-IIは36 kDa付近にバンドが検出されると推定される。グルコース飢餓細胞では、GFP-LC3-IIのバンドが認められ、刺激6h後以降、発現量が増加していた。一方、*T. cruzi*感染細胞では感染後いずれの時間でもGFP-LC3-IIのバンドがうすく、脂質化したLC3-IIができていないと予想された。

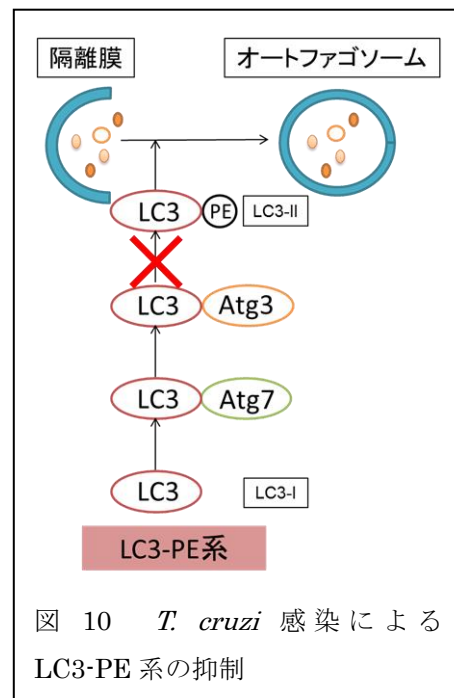


次に、LC3がAtg3およびAtg7と結合しているかどうか調べるため、*T. cruzi*感染後、一定時間ごとに細胞を回収してライセートを作製し、抗GFP抗体を用いてpull downアッセイを行った。その後、ウエスタンブロットで共沈したタンパク質を検出した(図9)。

アミノ酸飢餓細胞および感染細胞を用いた場合、GFP-LC3はpull downアッセイによりいずれも沈殿画分にバンドがみられたが、Atg7は上清画分にバンドが検出された。一方、Atg3は、いずれの場合も沈殿画分にバンドが



みられ、LC3-Atg3ができていると考えられた。LC3-PE系の反応経路では、Atg7からAtg3への変換は反応速度が速い。従って、LC3-Atg7が形成されると速やかにLC3-Atg3に変換してしまうと考えられる。Atg7が沈殿画分に検出されなかった理由は、LC3-Atg3への変換が速いためであると思われる。一方、*T. cruzi*感染細胞で沈殿画分にAtg3が認められたことから、感染細胞ではオートファゴソーム形成過程のLC3-Atg3までは反応が進んでいると考えられた。以上の結果から、原虫感染によりオートファジー経路が活性化され、隔離膜形成は起こるがLC3の脂質化のステップが進まず、オートファゴソーム形成およびオートリソソームがおきていない可能性が示唆された(図10)。



アポトーシス抑制因子であるc-FLIPは、LC3-PE経路を抑制することが報告されている。我々はこれまでに*T. cruzi*感染細胞ではc-FLIPの発現が顕著に増加することを明らかにした。本研究でみられた抑制がc-FLIPの増加によるものかどうかを調べるため、現在、c-FLIPのknock down細胞を構築中である。

さて次に、原虫側のオートファジーについて解析した。*T. cruzi*は生活環の中でその環

境に合わせ様々な形態変化をする。錘鞭毛期 (trypomastigote form) から無鞭毛期 (amastigote form) への形態変化の際には鞭毛が短くなることから、鞭毛に関連したタンパク質の分解を伴うと思われる。このような形態変化における、虫体自身のタンパク質の分解にはオートファジーが関係していると考えられる。

オートファジーの主要な構成要素として Atg8 (Atg8-PE) 共役系と Atg12 (Atg12-Atg5)共役系の2つの機構が存在する。ゲノム解析や BLAST 解析などにより、*T. cruzi* に関するオートファジーにもこれら2つの系が確認できた。しかし、Atg12 共役系に関与する遺伝子はほとんど確認できなかった。これは、*T. cruzi*における Atg12 共役系がほぼ欠損しているか、あるいは酵母等の Atg12 共役系と大幅に異なっていることを示している。一方、Atg8 共役系ではオートファジーの必須遺伝子が *T. cruzi* ゲノム中にすべて確認された。つまり、*T. cruzi* におけるオートファジーには Atg8 共役系が深く関係していると考えられる。

Atg8 には、T.c Atg 8.1 と T.c Atg 8.2 の2つのホモログが存在し、それらは互いに43%の相同性を持つことが明らかになっている。免疫蛍光染色により寄生虫が飢餓状態の間、T.c Atg8.1 がオートファゴソームに存在することが分かったが、T.c Atg 8.2 については認められなかった。また、T.c Atg 8.1 は酵母の Atg8 タンパク質に対して、53%と高い相同性を示す。これらのことから、T.c Atg 8.1 はオートファゴソーム形成のマーカースとしての役割を担っていることが考えられる。

本研究では、*T. cruzi* の形態変化の際におけるオートファジーに着目し、Atg8 のホモログである T.c Atg8.1 の虫体での分布・動態を分子生物学的観点から観察することで *T. cruzi* の形態変化と、T.c Atg8.1 の発育段階特

形態		n	蛍光強度/parasite(平均)	SD	T-test
Epi	cont (PBS)	100	0.32	0.15	9.81E-90
	T.c Atg 8.1	100	7.29	1.91	
Trypo	cont (PBS)	100	0.18	0.17	9.63E-84
	T.c Atg 8.1	100	10.28	3.00	
Ama	cont (PBS)	100	0.29	0.24	3.00E-75
	T.c Atg 8.1	100	61.44	20.48	

表1 *T. cruzi* の各発育段階における T.c Atg8.1 タンパク質の発現比較

異的発現量の関連について解析することを試みた。

まず、原虫T.c Atg8.1の抗体作製をおこなうため、この遺伝子の全長を含む大腸菌発現プラスミドを作製し、委託会社に依頼し、抗体を作製した。各発育段階における *T. cruzi* (epimastigote : 上鞭毛期、trypomastigote :

錘鞭毛期、amastigote : 無鞭毛期) の免疫染色を行い、蛍光強度を比較したところ、表1の結果が得られた。Epimastigote、trypomastigote、amastigoteのすべてでT.c Atg 8.1が発現していることが認められ、それぞれの蛍光強度はepimastigoteが7.29と3形態の中で最も少なく、次いでtrypomastigoteが10.3、そしてamastigoteが61.4と非常に強い数値を示した。この中で特にamastigoteは有意にT.c Atg8.1の発現が高かった(図11)。

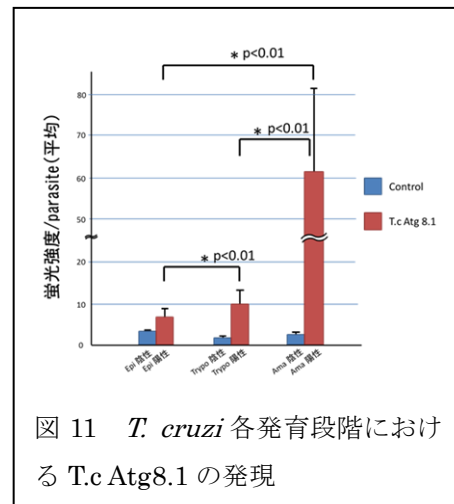


図11 *T. cruzi* 各発育段階における T.c Atg8.1 の発現

感染宿主細胞内のamastigoteの染色では、T.c Atg8.1は原虫の細胞質に局在していた(図12)。

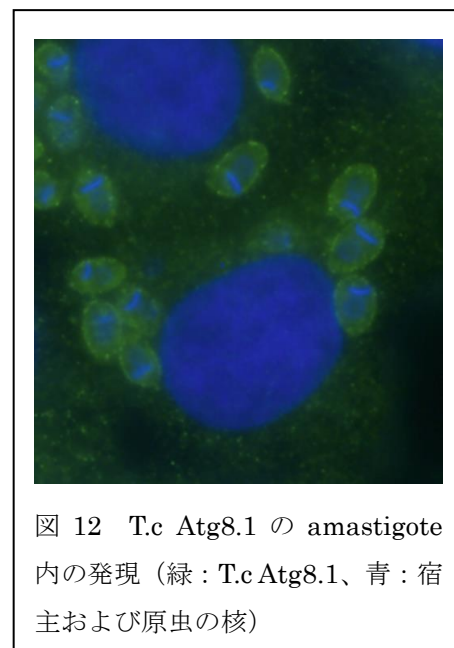


図12 T.c Atg8.1 の amastigote 内の発現 (緑 : T.c Atg8.1、青 : 宿主および原虫の核)

各発育段階におけるTcAtg8.1の発現は、amastigoteが一番高く、おそらく原虫が形態変化をする際に不要となったタンパク質を多く分解しているためではないかと考えられた。Amastigoteでは鞭毛が非常に短くなっており、鞭毛を構成するタンパク質の分解がオー

トファジーにより促進されている可能性がある。原虫におけるオートファジーについてはまだ不明な点が多い。今後、amastigoteでどのようなタンパク質の分解がおこるのかなどについて検討していきたい。現在、ゲノム編集技術を用い、T.c Atg8.1ノックアウト原虫を作製中である。

以上より、本研究では *T. cruzi* 感染により宿主オートファジー経路のオートファゴソーム形成が抑制され、特に LC3 の脂質化のステップが進行しないことを明らかにすることができた。また、原虫におけるオートファジーが発育段階で異なる可能性を見出し、形態変化と関連があると予測した。今後、オートファゴソーム抑制機構について分子レベルで解析を進めたいと考えている。

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 2 件)

① Seto E., Onizuka Y., Nakajima-Shimada J.

Host cytoplasmic processing bodies assembled by *Trypanosoma cruzi* during infection exert anti-parasitic activity
Parasitol. Int., 64 : 540-46 (2015)

② Suto Y., Nakajima-Shimada J., Yamagiwa N., Onizuka Y, Iwasaki G.
Synthesis and biological evaluation of quinones derived from natural product komaroviquinone as anti-*Trypanosoma cruzi* agents

Bioorg. Med. Chem. Lett., 25 : 2967-71 (2015)

[学会発表] (計 10 件)

① 新城翔子、植松亜美、瀬戸絵理、鬼塚陽子、嶋田淳子

Trypanosoma cruzi 感染は宿主オートファジー経路のオートファゴソーム形成過程を阻害する

第 85 回 日本寄生虫学会大会

2016 年 3 月 20 日、宮崎市民プラザ、宮崎

② 鬼塚陽子、高橋千由紀、嶋田淳子

Trypanosoma cruzi 感染における宿主細胞オートファゴソーム形成に関わる Atg タンパク質の発現解析

第 84 回 日本寄生虫学会大会

2015 年 3 月 22 日、杏林大学、東京

③ 鬼塚陽子、植松亜美、新城翔子、瀬戸絵理、嶋田淳子

アメリカトリパノソーマは宿主のオートファジー経路のオートリソソーム形成を抑制する

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 3 日、神戸ポートアイランド、神戸市

④ 高橋千由紀、畑生俊光、嶋田淳子

Trypanosoma cruzi 感染細胞におけるオートファゴソーム形成抑制の解析

第 83 回日本寄生虫学会大会

2014 年 3 月 28 日、愛媛大学、松山市

⑤ 高橋千由紀、畑生俊光、嶋田淳子

Trypanosoma cruzi 感染細胞におけるオートファジーと原虫由来タンパク質との関連性の解析

第 82 回日本寄生虫学会大会

2013 年 3 月 30 日、東京医科歯科大学、東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：新規キノン誘導体およびそれを有効成分とする抗トリパノソーマ剤

発明者：嶋田淳子、岩崎源司、須藤豊

権利者：群馬大学、高崎健康福祉大学

種類：特許

番号：特願 2015-108983

出願年月日：平成 27 年 5 月 28 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嶋田 淳子 (SHIMADA Junko)

群馬大学・保健学研究科・教授

研究者番号：20211964

(2) 研究分担者

畑生 俊光 (HATABU Toshimitsu)

岡山大学・農学部・准教授

研究者番号：60344917