

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659191

研究課題名(和文)トキソプラズマにおける宿主オルガネラリクルート因子の同定

研究課題名(英文)Identification of recruitment factor of Toxoplasma gondii for the host organelle

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) 3,000,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：トキソプラズマのどのタンパク質が宿主オルガネラのリクルートに関わっているのかを解明するために、定量可能な質量分析法であるiTRAQを用いて宿主ミトコンドリアに特異的に結合するトキソプラズマ由来タンパク質の網羅的な同定を試みた。原虫感染細胞から精製したミトコンドリアと、非感染細胞と原虫の混合試料から精製したミトコンドリアをiTRAQにより比較した結果、28種類のタンパク質を最終的なリクルート因子候補タンパク質として同定した。

研究成果の概要(英文)：To identify the recruitment factor of Toxoplasma gondii for the host organelle, we carried out the iTRAQ method. The mitochondria samples from the infected and non-infected host cells were compared, and we could identify 28 of candidate proteins as mitochondria recruitment factor.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学(含衛生動物学)

キーワード：トキソプラズマ ミトコンドリア 輸送

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の関与が強く疑われ、実際以前そのうちの一つである、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))。しかし最近、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))。

2. 研究の目的

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結合性タンパク質を網羅的に同定することで、ミトコンドリアおよびERをリクルートするタンパク質(オルガネラ・リクルートメントファクター)の同定を試みる。

3. 研究の方法

ロプトリータンパク質を含めた原虫由来のどのタンパク質が宿主オルガネラのリクルートに関わっているのかを解明するために、定量可能な質量分析法であるiTRAQ法を用いて宿主ミトコンドリアに特異的に結合するトキソプラズマ由来タンパク質の網羅的な同定を試みた。原虫を感染後3時間、12時間、24時間経過した細胞から精製したミトコンドリアと、非感染細胞と原虫の混合試料から精製したミトコンドリアをiTRAQ法により比較した。

4. 研究成果

感染細胞ミトコンドリアで非感染細胞の1.5倍以上の存在量を示し、かつ、シグナル配列などのドメイン構造や相同性検索、また各種の既報のプロテオーム解析の結果を参照することで、リクルート因子候補タンパク質として118種類のタンパク質を同定することができた。さらに、ミトコンドリアのリクルートは感染後1~2時間ですでに起きていることが報告されているので、申請者はこのうち感染3時間後にすでに存在量に違いがみられ

た28種類のタンパク質を最終的なリクルート因子候補タンパク質として同定した。

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 8件)

1) Toyama, T., Tahara, M., Nagamune, K., Arimitsu, K., Hamashima, Y., Palacpac, N.M.Q., Kawaide, H., Horii, T., and Tanabe, K. "Gibberellin Biosynthetic Inhibitors Make Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum* Cells Swell and Rupture to Death." PLoS ONE 2012, 7(3), e32246

2) Kawahara, F., Zhang, G., Suzuki, T., Iwata, A., Nagamune, K., and Nunoya, T. "Characterization of *Eimeria brunetti* isolated from a poultry farm in Japan." J. Vet. Med. Sci. 2014, 76 (1), 25-9

3) Matsuo, K., Kamai, R., Uetsu, H., Goto, H., Takashima, Y., and Nagamune, K. "Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cattle, horses, pigs and chickens in Japan." Parasitol. Int. 2014, 63 (4), 638-639

4) 泉山信司、八木田健司、永宗喜三郎 「生水と原虫症(生水のリスク)」 公衆衛生 2012, 76: 50-53

5) 永宗喜三郎 「アピコンプレクス門原虫が産生する植物ホルモン様物質とその作用」 日生研たより 2012, 58: 24-28

6) 福土路花、松原立真、永宗喜三郎 「*Toxoplasma gondii* ~三日月に恋してる~」 原生動物園 2012, 3: 3-7

7) 喜屋武向子、松原立真、永宗喜三郎 「トキソプラズマ症と沖縄県におけるトキソプラズマの流行状況について」 防菌防黴 2013, 41: 19-28

8) 永宗喜三郎 「トキソプラズマ症」 IDWR 感染症発生動向調査 感染症週報 2013, 15: 20-25

[学会発表](計 42件)

1) サイエンスカフェ

永宗喜三郎 「あなたの知らない寄生虫のセカイ ~トキソ、マラリア、マトリョーシカ~」 第63回バイオeカフェ 2012年9月、つくば

2) シンポジウム

松原立真、永宗喜三郎 “アピコンプレクサ生物の植物ホルモンとその生理機能” 第45回日本原生動物学会大会 2012年11月、兵庫県姫路市

3) シンポジウム

永宗喜三郎、福士路花 “アピコンプレクサ生物の滑走運動とカルシウム・シグナリング” 第45回日本原生動物学会大会 2012年11月、兵庫県姫路市

4) 講演

永宗喜三郎 “トキソプラズマ” 希少感染症診断技術研修会 国立感染症研究所、2013年2月

5) ワークショップ

田原美智留、Syed Bilal Ahmad Andrabi、青沼宏佳、木下タロウ、永宗喜三郎 “トキソプラズマ感染における宿主細胞膜マイクロドメインの役割” 第82回日本寄生虫学会大会 2013年3月、東京

6) ワークショップ

永宗喜三郎、喜屋武向子、山本徳栄、山野安規徳、Asis Khan、L. David Sibley “本邦におけるトキソプラズマ分離株の分子タイピング” 第82回日本寄生虫学会大会 2013年3月、東京

7) ワークショップ

松尾恵梨子、神川龍馬、矢崎裕規、田原美智留、佐倉孝哉、永宗喜三郎、稲垣祐司 “*Karenia* 属渦鞭毛藻における進化的起源の異なる葉緑体型 GAPDH の進化と細胞内局在” 第15回日本進化学会 2013年8月、つくば

8) ワークショップ

永宗喜三郎 “寄生・共生におけるゾンビ化機構の分子生物学的解析” 第36回日本分子生物学会 2013年12月、神戸

9) ワークショップ

田原美智留、Syed Bilal Ahmad Andrabi、青沼宏佳、木下タロウ、永宗喜三郎 “トキソプラズマによる宿主細胞ゾンビ化タンパク質群(ロプトリー蛋白質群)注入における宿主細胞膜マイクロドメインの役割” 第36回日本分子生物学会 2013年12月、神戸

10) 永宗喜三郎、 “アピコンプレクス門原虫が産生する植物ホルモンの意義” 第1回マトリョーシカ型生物学研究会、2012年7月、東京

11) 福士路花、青沼宏佳、田原美智留、Syed Bilal Ahmad Andrabi、永宗喜三郎 “細胞外トキソプラズマにおける未知の酸性オル

ガネラについて” 第1回マトリョーシカ型生物学研究会、2012年7月、東京

12) 田原美智留、Syed Bilal Ahmad Andrabi、青沼宏佳、木下タロウ、永宗喜三郎 “宿主アンカーがトキソプラズマ感染に及ぼす影響” 第1回マトリョーシカ型生物学研究会、2012年7月、東京

13) 福士路花、青沼宏佳、田原美智留、Syed Bilal Ahmad Andrabi、永宗喜三郎 “細胞外トキソプラズマにおける未知の酸性オルガネラについて” 第20回分子寄生虫学ワークショップ 2012年8月、神戸

14) 田原美智留、Syed Bilal Ahmad Andrabi、青沼宏佳、木下タロウ、永宗喜三郎 “宿主マイクロドメインがトキソプラズマ感染に及ぼす影響” 第20回分子寄生虫学ワークショップ 2012年8月、神戸

15) 田原美智留、Syed Bilal Ahmad Andrabi、青沼宏佳、木下タロウ、永宗喜三郎 “宿主細胞膜マイクロドメインがトキソプラズマ感染に与える影響” 第72回日本寄生虫学会東日本支部会・第10回分子寄生虫学・マラリアフォーラム合同大会 2012年10月、前橋

16) 松原立真、永宗喜三郎 “マラリア原虫が持つ植物ホルモンの網羅的検出と機能解析” 第1回日本細胞共生学会若手の会 2012年11月、下田

17) 田原美智留、Syed Bilal Ahmad Andrabi、青沼宏佳、木下タロウ、永宗喜三郎 “宿主細胞膜マイクロドメインがトキソプラズマ感染に及ぼす影響” 第1回日本細胞共生学会若手の会 2012年11月、下田

18) 松原立真、川原史也、小嶋美紀子、田原美智留、Syed Bilal Ahmad Andrabi、福士路花、山野安規徳、榊原均、永宗喜三郎 “マラリア原虫における植物ホルモンの網羅的検出と機能解析” 第82回日本寄生虫学会大会 2013年3月、東京

19) 山本徳栄、近 真理奈、増田純一郎、小山雅也、斉藤利和、Asis Khan、L. David Sibley、森嶋康之、山野安規徳、永宗喜三郎 “埼玉県のネコにおける *Toxoplasma gondii* の保有状況調査” 第82回日本寄生虫学会大会 2013年3月、東京

20) 福士路花、青沼宏佳、田原美智留、Syed Bilal Ahmad Andrabi、永宗喜三郎 “細胞外トキソプラズマ特異的なイオン貯蔵オルガネラ” 第82回日本寄生虫学会大会 2013年3月、東京

- 21) 坂本寛和、畑昌幸、永宗喜三郎、北潔、松崎素道 “貝類寄生虫パーキンサスにおける二次共生葉緑体の機能” 第2回マトリョーシカ型生物学研究会 2013年7月、京都
- 22) 松尾恵梨子、神川龍馬、矢崎裕規、田原美智留、佐倉孝哉、永宗喜三郎、稲垣祐司 “Karenia 属渦鞭毛藻類における進化起源の異なる葉緑体型 GAPDH の細胞内局在” 第2回マトリョーシカ型生物学研究会 2013年7月、京都
- 23) 山野安規徳、永宗喜三郎 “シストにも有効な抗トキソプラズマ薬シード候補の探索” 第21回分子寄生虫学ワークショップ 2013年8月、神戸
- 24) 福士路花、矢幡一英、佐倉孝哉、金子修、永宗喜三郎 “トキソプラズマやマラリアが持つ植物液胞様オルガネラ” 第21回分子寄生虫学ワークショップ 2013年8月、神戸
- 25) 坂本寛和、永宗喜三郎、北 潔、松崎素道 “アブシジン酸合成阻害剤フルリドンは貝類寄生虫 Perkinsus marinus の増殖を阻害する” 第77回日本植物学会 2013年9月、札幌
- 26) 松原立真、小嶋美紀子、田原美智留、Syed Bilal Ahmad Andrabi、福士路花、川原史也、山野安規徳、榊原均、永宗喜三郎 “寄生性原虫が産生する植物ホルモンの機能解析” 第2回日本細胞共生学会若手の会 2013年9月、京都
- 27) 福士路花、矢幡一英、佐倉孝哉、田原美智留、松原立真、金子修、永宗喜三郎 “細胞外ステージのトキソプラズマが持つ植物液胞様オルガネラ” 第11回分子寄生虫学・マラリアフォーラム 2013年10月、長崎
- 28) 福士路花、矢幡一英、佐倉孝哉、田原美智留、松原立真、金子修、永宗喜三郎 “細胞外ステージのトキソプラズマが持つ植物液胞様オルガネラの構造と機能” 第46回日本原生動物学会大会 2013年11月、広島県東広島市
- 29) 松原立真、小嶋美紀子、田原美智留、Syed Bilal Ahmad Andrabi、福士路花、川原史也、山野安規徳、榊原均、永宗喜三郎 “寄生性原虫が産生する植物ホルモンの機能解析” 第46回日本原生動物学会大会 2013年11月、広島県東広島市
- 30) 松原立真、永宗喜三郎 “Functional analysis of Plasmodium-producing salicylic acid” 第7回寄生虫感染免疫研究会 2014年3月、岐阜県高山市
- 31) 田原美智留、福士路花、佐倉孝哉、松原立真、山野安規徳、山岸潤也、永宗喜三郎 “Toxoplasma gondii をモデルとしたプリマキン作用機序の解明” 第83回日本寄生虫学会大会 2013年3月、松山
- 32) 松原立真、小嶋美紀子、田原美智留、Syed Bilal Ahmad Andrabi、福士路花、川原史也、山野安規徳、佐倉孝哉、榊原均、永宗喜三郎 “寄生性原虫が産生するサリチル酸の機能解析” 第83回日本寄生虫学会大会 2013年3月、松山
- 33) 坂本寛和、鈴木重雄、永宗喜三郎、北 潔、松崎素道 “色素体を持つ貝類寄生虫パーキンサスにおける植物ホルモンアブシジン酸の重要性の検討” 第83回日本寄生虫学会大会 2013年3月、松山
- 34) 佐倉孝哉、田原美智留、松原立真、山野安規徳、永宗喜三郎 “Toxoplasma gondii トキソプラズマにおける IP₃ およびリアノジン受容体様機能分子の探索” 第83回日本寄生虫学会大会 2013年3月、松山
- 35) 永宗喜三郎、佐倉孝哉、田原美智留、別所知明、松原立真、山野安規徳、泉山信司、八木田健司 “食中毒起因原虫 Sarcocystis fayeri の滑走運動能および細胞内侵入能” 第83回日本寄生虫学会大会 2013年3月、松山
- 36) **Symposium**
Nagamune, K., Andrabi, S.B.A., and Matsubara, R. “Apicomplexan parasites and plant hormones” Protist 2012, July 2012, Oslo, Norway
- 37) **Symposium**
Nagamune, K. “Extracellular Maturation in Toxoplasma gondii of Plant-like Vacuoles, Essential Organelles of Apicomplexan Parasites.” International Symposium on Matryoshka-type Evolution of Eukaryotic Cells, July 2013, Kyoto
- 38) **Presentation Prize 受賞**
Sakamoto, H., Nagamune, K., Kita, K. and Matsuzaki, M. “Characterization of secondary plastid membrane transporter homologs in Perkinsus marinus.” International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis, August 2013, Halifax, Canada
- 39) Nagamune, K., Tahara, M., Andrabi, S.B.A., Aonuma, H., and Kinoshita, T. “The effect of host GPI to Toxoplasma gondii infection.” Molecular Parasitology Meeting XXIII, Woods Hole, MA,

USA, September 2012

40) Fkshi, M., Aonuma, H., Matsubara, R., Tahara, M., Andrabi, S.B.A., and Nagamune, K. " The acidic organelle in extracellular *Toxoplasma gondii*." Molecular Parasitology Meeting XXIII, Woods Hole, MA, USA, September 2012

41) Fkshi, M., Sakura, T., Tahara, M., Aonuma, H., Matsubara, R., Andrabi, S.B.A., and Nagamune, K. " The Acidic organelle in extracellular *Toxoplasma gondii*." 12th International Congress on Toxoplasmosis, Oxford, UK, June 2013

42) Tahara, M., Fkshi, M., Sakura, T., Matsubara, R., Yamano, A., Yamagishi, J., and Nagamune, K. " Primaquine-resistance in *Toxoplasma gondii* is associated with the mutations in chloroquine resistance transporter (CRT), which are different from chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*." Molecular Parasitology Meeting XXIV, Woods Hole, MA, USA, September 2013

〔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://www.kisanagamune.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永宗喜三郎(国立感染症研究所)

研究者番号: 90314418