

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19116

研究課題名(和文)トキソプラズマ新規GRAsの同定とその宿主「乗っ取り」機構の解析

研究課題名(英文)Identification of novel Toxoplasma GRA proteins

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：宿主オルガネラを超速心により細かく画分し、それぞれに存在するトキソプラズマ由来新規分子を同定し、それらがデングラニクル由来であるかを検討した。また、GRAs分泌阻害変異株であるASP5欠損原虫を使用して、GRAsが宿主細胞内シグナル伝達経路と遺伝子発現に与える影響をグローバルに探索した。以上の情報を元に選択的に当該GRAsが影響を及ぼすと考えられる細胞内シグナル伝達経路をルシフェラーゼアッセイにより検討した。その結果、抗トキソプラズマ因子であるGate-16に結合する病原性候補因子TgGIFの単離に成功した。

研究成果の概要(英文)：We purified host organelles of Toxoplasma-infected cells by ultracentrifugation and searched novel Toxoplasma-derived molecules and tested whether the effectors are derived from dense granules. Moreover, we searched GRA-dependent modulation of host cell signaling pathways by using ASP5-KO Toxoplasma and analyzed the effect of GRA-dependent suppression and activation of host cell signaling pathways comprehensively and globally by luciferase assay. As a result, we succeeded to identify a novel virulence effector candidate protein called TgGIF, which potentially disrupts host Gate-16-dependent host cell-autonomous immune response to Toxoplasma. We will continue to study the virulent role of TgGIF in Toxoplasma immunoparasitology.

研究分野：寄生虫学

キーワード：トキソプラズマ デングラニクル エフェクター機構

### 1. 研究開始当初の背景

トキソプラズマはネコから放出されたオーシストや中間宿主の筋肉または脳内に存在するシストが経口的に宿主に摂取された後に腸管から体内に侵入し全身性に感染が拡大していくことは古くから知られていた。原虫の感染がどのようにして効率的に局所から全身へと広がっていくかについては不明な点が多かったが、近年、生体では血液中に未感染状態で存在するのではなく、CD11b や CD11c 陽性である自然免疫細胞に主に感染しており、これによって原虫が宿主免疫系による認識から免れているという「トロイの木馬」説が米国グループにより提唱された (*Blood*, 2005 年)。また米国グループにより腸管から脾臓へと移動する際に使われている CD11b 陽性細胞は、好中球であることが報告された (*PNAS*, 2013 年)。

私はトキソプラズマのデンスグラニュールから放出される GRA タンパク質群 (GRAs) の一つである GRA6 が宿主細胞において転写因子である NFAT4 を活性化し、それにより Cxcl2 や Ccl2 といったケモカインの遺伝子発現が誘導され、ケモカインにより好中球が感染局所へと誘引されることを示した。この研究の中で、GRA6 欠損トキソプラズマは感染局所から全身性への感染拡大が野生型原虫に比べて遅延し、また野生型原虫であっても NFAT4 欠損マウスでは感染拡大が遅れることから、トキソプラズマは GRA6 によって宿主転写因子 NFAT4 を活性化し好中球を呼び寄せ感染拡大に利用しているという、GRA6 による宿主免疫系の「乗っ取り」機構を私は明らかにした (Ma JS, et al. *J Exp Med*. 2014 年)。

### 2. 研究の目的

GRAs はトキソプラズマが感染宿主細胞内で形成する寄生胞内に放出された後に、GRA6 のように寄生胞内に留まり宿主細胞質に一部分を露出し宿主細胞内シグナル伝達経路に影響を与えるものの他に、宿主細胞核に局在するものが報告されているが、その全容はほとんどわかっていなかった。また GRA6 欠損原虫でも遅延しながらも感染拡大し、「トロイの木馬」現象は観測されることから、GRA6 以外の GRAs もしくは原虫分子の関与が示唆された。そこで、私は本研究において、トキソプラズマの病原性発揮における GRAs の役割を寄生虫学および免疫学的観点から検討し、「トロイの木馬」現象を含むトキソプラズマ症発症の分子機序を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

ASP5 はトキソプラズマ自身のゴルジ体に存在するアミノ酸部位特異的プロテアーゼであり、多くの GRAs が ASP5 に切断されることで成熟し、デンスグラニュールへと細胞内輸送される。申請者が所属する研究室では、ASP5 欠損原虫では GRAs のほとんどが原虫内部に留まり機能できないことを確かめている (*PLoS Pathogens*, 2015 年)。トキソプラズマから宿主細胞内に分泌され、宿主細胞内シグナル伝達を介してマウスにおける病原性発揮に関与する新規 GRAs を探索するため、宿主の特定のオルガネラに蓄積したタンパク質を検討した。まず、未感染細胞及び野生型または ASP5 欠損トキソプ

ラズマを感染後 1 時間後、2 時間後、6 時間後の細胞を破碎し、核画分を分取、さらに上精を超速心分離することにより小胞体画分、ゴルジ体画分、ミトコンドリア画分に分離した。それぞれの画分のタンパク質を精製し iTRAQ 法で時間ごとに異なる標識 (113-117:4-plex 標識) し、感染細胞内の特定オルガネラごとにタンパク質量が増加するトキソプラズマ由来分子群を質量分析することにより定量的かつ網羅的に同定した。ここで未感染細胞に比べて野生型トキソプラズマ感染細胞で増加している原虫由来分子は、原虫から分泌される宿主オルガネラへ分泌されるタンパク質であると分かる。その中で ASP5 欠損原虫感染群で増加しないものは GRAs 候補分子であると考えられた。実際に GRAs であることを確認するために、C 末端部位に Flag タグを付けるべく内在性遺伝子座にノックインし、原虫内でデンスグラニールに局在することと感染細胞内において寄生胞内微小ナノチューブまたは宿主の各オルガネラに局在することを免疫染色法および免疫電子顕微鏡法で検討し、機能解析を行った。

#### 4 . 研究成果

網羅的に新規のエフェクター分子を探索する過程で、Gate-16 抑制性因子 (*Toxoplasma gondii* Gate-16 Inhibitory Factor = TgGIF) を同定した。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。また、高病原性トキソプラズマにおいて TgGIF を欠損させると、その病原性が著しく低下することから TgGIF はトキソプラズマの病原性にも極めて重要であることが示唆された。

私が発見したトキソプラズマ宿主因子 Gate-16 に対する寄生虫学的研究であり極めて独自性が高く、既にその候補因子である TgGIF を分離しており先行的である。さらに TgGIF がトキソプラズマの病原性を作用するエフェクター分子であり、さらに酵素活性を持っていることから、TgGIF を標的とした新規トキソプラズマ症治療戦略が創造される可能性が高いと考えられ、今後は TgGIF の Gate-16 への作用機序について詳細を明らかにしていきたい。

#### 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 1 件)

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.* (2017) 18:899-910.

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )