

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：10105

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14577

研究課題名（和文）神経細胞を用いたトキソプラズマのステージ転換を制御する分子機構の解明

研究課題名（英文）Evaluation of molecular mechanism modulating stage conversion of *Toxoplasma gondii* by using primary culter neuron

研究代表者

猪原 史成（Ihara, Fumiaki）

帯広畜産大学・原虫病研究センター・特任研究員

研究者番号：00800773

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）：本研究は、トキソプラズマの潜伏型虫体へのステージ転換が神経細胞などの一部の細胞種で自然に生じることに着目し、治療の困難な慢性感染が起きる仕組みの解明を目指した。初代培養神経細胞においてステージ転換効率を評価する実験系の確立に成功した。この系と作製した4つの遺伝子欠損原虫を組み合わせ解析を行なった結果、標的遺伝子の中にステージ転換に必要な遺伝子は見つからなかった。一方、このうち1つの遺伝子欠損原虫はマウスに対し高い病原性を示したことから、本遺伝子の機能が明らかとなればトキソプラズマ症の病態に関わる新たな分子機構の解明につながることを期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

増殖型虫体から潜伏型虫体へのステージ転換は、トキソプラズマの生存戦略および病態に深く関わる現象であり、その分子機構を明らかにすることはトキソプラズマ研究の中でも中心的課題の1つとなっている。これまで、その簡便さから人為的な刺激を加えて誘導するステージ転換モデルによる研究が数多くなされてきた反面、生体内でのステージ転換の仕組みはほとんど不明なままであった。本研究において、主要な潜伏先細胞である神経細胞を使ったモデルを構築し、ステージ転換能率を定量的に評価可能であることが示された。このことで、より生体内の環境に近いモデルを使ったステージ転換機構の研究の発展につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the stage conversion between tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* that spontaneously occurred in particular cells such as nerve cells, and aimed to elucidate the mechanism of chronic infection with *T. gondii* that formed unremovable tissue cyst in the host's brain. We have succeeded in establishing an experiment to evaluate stage conversion efficiency in primary cultured neurons. A combination analysis of this assay and four gene-deficient parasites prepared showed no responsibility to the stage conversion. On the other hand, one of these deficient parasites was highly virulent to mice. Our results indicate that understanding the function of this gene will provide insight to a new molecular mechanism involved in the pathophysiology of toxoplasmosis.

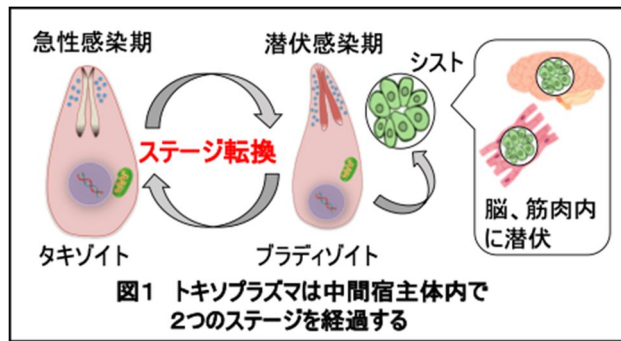
研究分野：分子寄生虫学

キーワード：トキソプラズマ トランスクリプトーム解析 ブラディゾイト 初代培養神経細胞

1. 研究開始当初の背景

トキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*) はアピコンプレクサに属する細胞内寄生生物であり、ヒトを含めたほぼ全ての哺乳類・鳥類を中間宿主とする人獣共通の病原性原虫である。本原虫は世界人口のおよそ3割が感染していると言われ、最も広く蔓延した病原体の1つとなっている。多くの場合、原虫は宿主に重篤な症状を起ささないが不顕性感染として宿主の生涯にわたり寄生し続けることができる。

トキソプラズマは中間宿主体内では**増殖型虫体 (タキゾイト)**、あるいは**潜伏型虫体 (ブラディゾイト)**として存在する。タキゾイトは急性感染期のステージで、宿主細胞に侵入すると寄生体胞を形成しその中で増殖する。最終的には細胞を破壊、ふたたび周囲の細胞に侵入することを繰り返す。タキゾイトは、やがてほとんど増殖を行わないブラディゾイトにステージ転換する。ブラディゾイトは分厚い膜に覆われた嚢胞 (シスト) を主に脳および筋肉内に形成し、宿主の生涯にわたり潜伏感染する (図1)。宿主の免疫能が HIV 感染や臓器移植などによって低下すると、タキゾイトに再分化し、宿主に重篤な症状を与える。このようにタキゾイトからブラディゾイトへのステージ転換はトキソプラズマの生存戦略および病態に深く関わる現象である。タキゾイトに対する治療薬にはピリメサミン、スルファジアジンなどが存在するが、分厚い膜に守られたブラディゾイトに有効な治療薬は存在しない。したがって、本原虫のステージ転換の分子基盤が明らかとなれば、ブラディゾイトやステージ転換を標的とした新たな治療薬の開発につながる事が期待できる。



2. 研究の目的

トキソプラズマは中間宿主体内で増殖型虫体と潜伏型虫体の2つのステージを経過する。潜伏型虫体を内包する嚢胞を主に宿主の神経および筋細胞内に形成することで潜伏感染を維持しているが、本原虫のステージ転換のメカニズムは未だ不明な点が多い。我々はこれまでに、異なる宿主細胞種に感染させた原虫の遺伝子発現量を比較し、主な潜伏先である神経細胞感染時に特異的に発現増加する原虫遺伝子群の同定に成功した。そこで本研究ではこれらの原虫遺伝子の機能解析を通じて、トキソプラズマが宿主体内でステージ転換を行うメカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、これまでに見出した神経細胞感染時に特異的に発現増加する原虫遺伝子群について、(1) 遺伝子欠損原虫の作製 (2) ステージ転換能を評価する *in vitro* 実験系の構築および評価 (3) 各原虫因子の欠損によるマウスに対する病原性への影響の評価を行った。(1)-(3)の結果からひとつの原虫遺伝子(Xと仮称)に注目し、その機能を明らかとするために、(4) X欠損株における原虫増殖等の一般性状の解析、(5) 組換え X タンパク質の作製、(6) 原虫感染細胞の遺伝子発現の変動について順に解析した。

4. 研究成果

1) 遺伝子組換え原虫の作製

選定された6つの原虫因子の機能解析のため、ブラディゾイト特異的な遺伝子(LDH2)の発現に応じて緑色蛍光を発する組換え原虫 (Pru HXGPRT KU80 株) を親株として、それら因子の責任遺伝子を欠損させたノックアウト型原虫を CRISPR/Cas9 システムを用いて作製した。最終的に、6つの標的遺伝子のうち4つの欠損株を得ることに成功した。残り2つについては、遺伝子導入を3度試みても欠損原虫を得られなかったため、以後の解析から除外した。

2) ステージ転換能を評価する *in vitro* 実験系の構築および評価

予備実験により、Pru HXGPRT KU80 株のタキゾイトを初代培養神経細胞およびヒト繊維芽細胞に感染させた場合、感染3日目には神経細胞でのみブラディゾイトの指標となる緑色蛍光を発する虫体を多数認めることを確認している。そこで、神経細胞におけるステージ転換効率を定量的に評価するための実験系を構築した。まず、評価に適した感染日数を設定するために、培養した神経細胞に親株原虫を感染させ、顕微鏡下で毎日観察した。その結果、タキゾイトからブラディゾイトへの移行が完了し、かつブラディゾイトに移行せず増殖したタキゾイトによる神経細胞の破壊が軽度にとまっている感染5日目にステージ転換効率の解析を実施する

こととした。タキゾイトとブラディゾイトの両方で安定的に発現する原虫抗原(Dense granule protein 7)を赤色蛍光抗体で染色し、緑色蛍光を示す寄生胞の占める割合を計測した。しかし、いずれの欠損株においても、ステージ転換能に親株との違いは認められず、今回着目した原虫遺伝子は少なくともステージ転換の必須遺伝子でないことが示された。

3) 各原虫因子の欠損によるマウスに対する病原性への影響の評価

一方、マウスに 10,000 匹の原虫を接種した生存試験において、遺伝子 X 欠損原虫では親株と比べてマウスに対する病原性が高まることが分かった。さらに、原虫接種量を 1,000, 100 匹としても、X 欠損株感染マウスは全頭が感染急性期に死亡した。

小括

潜伏型虫体へのステージ転換機構に何らかの関与が疑われる原虫遺伝子について、4つの遺伝子欠損型原虫を作出したが、残念ながら潜伏型虫体へのステージ転換に必要な遺伝子の発見には至らなかった。その一方で、マウスを用いた生存試験において、遺伝子 X を欠損した原虫では親株と比べてマウスに対する病原性が非常に高まることが示された。そこで、遺伝子 X の機能解析を進めることとした。

4) X 欠損株における原虫増殖等の一般性状の解析

欠損株において病原性が増大したことから、遺伝子 X の欠損により宿主細胞への感染率や原虫増殖速度が亢進していることが予想された。そこで、宿主細胞に親株と X 欠損株を感染させ、原虫感染率、寄生胞内での原虫増殖、エグレス率について比較したが、両者の間で有意な差は認められなかった。

5) 組換え X タンパク質の作製

遺伝子 X は、ゲノムデータベース上で予測された hypothetical なタンパクであり、その性質については全く知られていない。そこで、遺伝子 X の機能解析のために、組換え X タンパク質の作製を試みた。まず、Pru 株由来の cDNA を鋳型として RT-PCR を試みたところ、遺伝子 X の転写産物はイントロンを保持していることが示された。そこで、トキソプラズマの遺伝子型や原虫ステージに着目し、RH 株(型)、Pru 株(型)、VEG 株(型)、Pru 株のタキゾイトおよび高アルカリ培地での培養により誘導したブラディゾイトから cDNA を精製した。それらを鋳型として RT-PCR により成熟 mRNA 長の産物が得られない検討したが、スプライシング後の転写産物は認められなかった。さらに、タンパク X の 5' 断片を大腸菌にクローニングし、発現させたタンパク質をマウスに免疫することで抗血清を作製した。作製した抗血清は、タンパク質 X の 5' 断片を過剰発現させた宿主細胞には反応したものの、原虫ライセートを用いたウェスタンブロットおよび原虫感染細胞における間接免疫抗体法では、本抗体に反応するタンパク質は検出されなかった。

6) 原虫感染細胞の遺伝子発現の変動

最後に、X 欠損株の表現型を調べるために、マウスマクロファージ細胞 (Raw246.7) とマウス胎児繊維芽細胞 (MEF) に原虫を感染させ、遺伝子発現量を網羅的に比較した。変動のあった代謝経路を検索する KEGG 解析を行なったが、遺伝子欠損によって発現増加あるいは低下した経路は認められなかった。

考察)

一般的に、In vitro でのトキソプラズマの培養にはベロ細胞やヒト繊維芽細胞などが用いられる。これらの細胞にタキゾイトを感染させた場合、タキゾイトのまま増殖を繰り返す。ところが、初代培養神経細胞や筋管細胞(筋芽細胞から分化した骨格筋を構成する細胞)にタキゾイトを感染させた場合、自然にブラディゾイトにステージ転換することが報告されている。先行研究により、ブラディゾイト特異的に発現する原虫タンパク質(BAG1, LDH2)や、ステージ転換を制御する転写因子(eIF2, AP2IX-9)などが徐々に明らかとなりつつあり、ステージ転換は関連する遺伝子の発現制御により生じることが示唆されている。このことから、神経細胞感染時に発現変動する原虫遺伝子は、ステージ転換に重要な役割を担っているのではないかと考え、本研究を実施した。我々は以前に、神経細胞、アストロサイト、ミクログリアの3種の初代培養細胞にタキゾイトを感染させ、24時間後の原虫遺伝子の mRNA 発現量を網羅的に比較することで標的遺伝子を選抜した。今回、4つの遺伝子欠損型原虫を作出したが、ブラディゾイトへのステージ転換に必要な遺伝子の発見には至らなかった。このことから、標的遺伝子の選抜方法を見直し、新たな候補遺伝子を検索することが求められる。

一方、X 欠損株において感染急性期の致死率が顕著に増加していた。遺伝子 X については既

知の報告が無かったので、タンパク発現や局在等の基本的な性状を調べることを目的して実験を開始したところ、イントロンを保持した増幅産物のみが cDNA 中に検出された。トキソプラズマにおける非典型的な翻訳制御の例として、TgPMA と TgLCCL の例が報告されている。TgPMA は、タキゾイトからブラディゾイトへの移行過程では、イントロン保持型と成熟 mRNA の両方が RT-PCR によって検出される。しかし、成熟したブラディゾイトではイントロン保持型の割合がほとんどを占める。また、TgLCCL は、タキゾイトとスポロゾイトで発現を認めるが、タキゾイト期にはイントロン保持型として存在しており、翻訳抑制装置として働いていることが示唆されている。

上記の先行研究に加え、今回作製した抗体で内在性のタンパク質 X が検出できなかったことを踏まえると、遺伝子 X はこれまでに検討した条件下ではイントロンを保持した非活性型として翻訳抑制を受けており、未知の条件下においてスプライシングを受け、機能型へと変化する可能性が考えられる。本研究ではマウスに対する病原性に顕著な差を認めたことから、感染急性期のマウスにおいて病理学的・免疫学的に詳細な解析を実行し、X 欠損株感染マウスにおいて異常を認める臓器あるいは細胞種を特定することで、遺伝子 X の機能解明につながる手がかりを得られるものと考えている。今後の研究により、遺伝子 X の翻訳制御の仕組みやその働きが明らかとなれば、トキソプラズマ症の病態に関わる新たな分子学的機構の解明につながることを期待される。

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 2件）

1. 著者名 Fumiaki Ihara, Sachi Tanaka, Ragab M Fereig, Maki Nishimura, Yoshifumi Nishikawa	4. 巻 14
2. 論文標題 Involvement of Toll-like receptor 2 in the cerebral immune response and behavioral changes caused by latent Toxoplasma infection in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PloS One	6. 最初と最後の頁 e0220560
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0220560	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 Fumiaki Ihara, Ragab M Fereig, Yuu Himori, Kyohko Kameyama, Kosuke Umeda, Sachi Tanaka, Rina Ikeda, Masahiro Yamamoto, Yoshifumi Nishikawa	4. 巻 未定
2. 論文標題 Toxoplasma gondii dense granule proteins 7, 14, and 15 are involved in modification and control of the immune response mediated via NF- B pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 in press
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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 猪原 史成、西川義文
2. 発表標題 Toxoplasma gondii dense granule protein 14 は宿主細胞のNF B経路を制御し宿主の免疫応答を調節する
3. 学会等名 第161回日本獣医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 猪原 史成、西川義文
2. 発表標題 Toxoplasma gondii dense granule protein 14 は宿主細胞のNF B経路を制御し宿主の免疫応答を調節する
3. 学会等名 第26回分子寄生虫学ワークショップおよび第15回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 猪原 史成
2. 発表標題 Toxoplasma gondii dense granule protein 14はNF B経路を介した宿主免疫応答の制御に関する
3. 学会等名 第88回日本寄生虫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fumiaki Ihara, Kosuke Umeda, Masahiro Yamamoto, Yoshifumi Nishikawa
2. 発表標題 Toxoplasma gondii conducts NF B pathway of host cells, dense granule protein 14 is a novel member of the orchestra
3. 学会等名 あわじ感染と免疫フォーラム (国際学会)
4. 発表年 2019年

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