

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K16626

研究課題名（和文）T. cruzi 感染刺激による宿主オートリソソーム形成抑制機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of inhibition of host autolysosome formation by stimulation of T. cruzi infection.

研究代表者

鬼塚 陽子 (Onizuka, Yoko)

群馬大学・大学院保健学研究科・助教

研究者番号：30710058

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）：クルーズトリパノソーマ (*Trypanosoma cruzi*) 感染細胞において、オートファジーの初期過程は活性化するが完了せず、原虫は排除されず生き残る。本研究ではオートリソソーム形成に係る SNARE複合体 (stx17, VAMP8, SNAP29) の解析を行った。その結果、オートファゴソーム上に存在するstx17は、感染細胞内で減少し、機能が抑制されている可能性が示唆された。次に、stx17タンパク質と相互作用する原虫側因子を探索するために、プロテオーム解析を行った結果、いくつかの候補因子を同定した。同定された原虫側因子のノックアウト*T. cruzi* を作製し、現在、解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シャーガス病は、感染から数十年経後に慢性期の症状を呈するが、なぜ長期に渡り、患者体内での感染を維持できるか明らかにされておらず、宿主オートファジー抑制機構の解明は、原虫の長期持続感染機構解明の一助になると考えている。また、心疾患や消化管疾患などの慢性期の病態形成の詳しい機構も未だ明らかにされていない。本研究では、宿主オートファジー抑制の可能性を持つ、原虫側因子を同定することができた。今後詳細な研究を進めることにより、病態形成メカニズムの新たな知見が得られ、新しい治療薬候補の開発への応用も期待できる。

研究成果の概要（英文）：In *Trypanosoma cruzi*-infected cells, the initial process of autophagy is activated but not completed and the protozoa survive without being eliminated. In this study, the SNARE complexes (stx17, VAMP8 and SNAP29) involved in autolysosome formation were analyzed. The results suggest that stx17, which is on autophagosomes, was degraded and reduced in *T. cruzi*-infected cells and that its function could be suppressed. Next, to search for protozoan factors that interact with the stx17 protein, a proteomic analysis by mass spectrometry was performed, and several candidate factors were identified. Knockout *T. cruzi* of the identified candidate factors were generated and the derived protozoa are currently being analyzed.

研究分野：分子寄生虫学

キーワード：Trypanosoma cruzi SNARE 複合体 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

細胞内寄生原虫クルーズトリパノソーマ (*Trypanosoma cruzi*, *T. cruzi*) は、中南米で流行しているシャーガス病の原因である。感染者数は約 700 万人おり、感染から十数年後、慢性期に移行した患者の約 30%で心肥大などの症状を起こし、死に至る。この原虫の細胞内分裂増殖機構や病態形成メカニズムは明らかにされておらず、原虫は宿主防御反応に対する回避システムを有し、生き延びていると考えられる。

宿主応答の一つとして細胞内タンパク質分解機構のオートファジーが挙げられ、この機構は小胞体から隔離膜が伸長し、不要物を包み込んだオートファゴソームを形成後、リソソームと融合することでオートリソソームとなり、内容物を加水分解する。これまでに、*T. cruzi* 感染細胞では、宿主オートファジーの初期過程は活性化しているが、オートファジーは完了せず、原虫は増殖・生存することを明らかにした (図 1, Onizuka *et al.* Acta Trop., 2017)。すなわち、原虫がオートリソソーム形成を何らかの方法で抑制すると考え、本研究ではオートリソソーム形成に関わる SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive attachment protein receptor) 複合体 (syntaxin17: stx17, Vesicle-associated membraneprotein 8: VAMP8, Synaptosomal-associated protein of 29 kDa: SNAP29) に焦点をあてた。この膜融合に関わる SNARE 分子は、オートファゴソームに stx17、リソソームに VAMP8 がそれぞれの膜上に結合しており、両者と SNAP29 が複合体を形成することでオートリソソーム形成が完了することが知られている。

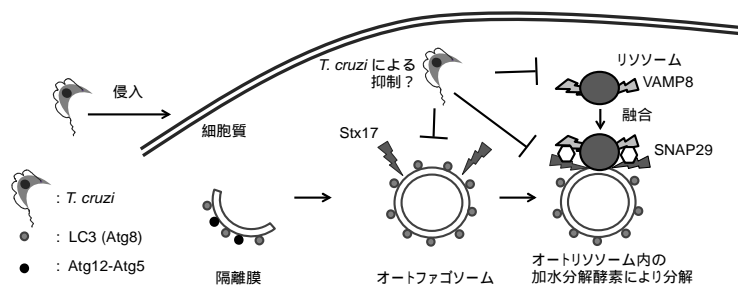


図 1: *T. cruzi* 感染時におけるオートファジーの概略図

2. 研究の目的

本研究の目的は、病原体排除機構の一つ、オートファジーに着目し、原虫による宿主オートリソソーム形成抑制メカニズムを明らかにすることである。オートリソソーム形成に関わる 3 つの SNARE 分子 (Stx17、VAMP8、SNAP29) に焦点をあて、原虫感染によるオートリソソーム抑制機構を解明するために実験を行った。

3. 研究の方法

使用した細胞は HT1080 細胞または HeLa 細胞、原虫感染刺激は *T. cruzi* Tulahuén 株、オートファジー誘導はアミノ酸不含培地 (2 時間, -AA 刺激) を用いて行った。

1) *T. cruzi* 感染細胞における SNARE 複合体の遺伝子およびタンパク質発現量の解析

非感染細胞、-AA 刺激細胞及び *T. cruzi* 感染 9 時間後の細胞から total RNA を抽出し、qPCR 法で遺伝子発現量を測定した。また、同様のタイムコースでタンパク質を抽出し、SDS-PAGE、ウェスタンブロット法を行い、検出されたバンドをデンストメトリーで計測、解析した。

2) *T. cruzi* 感染細胞における SNARE 複合体の局在解析

各 SNARE 複合体の細胞内局在は、FLAG-stx17 HeLa 細胞 (Arasaki *et al.* Nat. Commun., 2017), mCherry-stx17 HT1080 細胞、GFP-VAMP8 HT1080 細胞を樹立し、非感染細胞、-AA 刺激細胞及び *T. cruzi* 感染 9 時間後の細胞に対し、各抗 Tag 抗体を用いた免疫蛍光抗体法にて観察、解析した。SNAP29 は HeLa 細胞を用い、抗 SNAP29 抗体を使用して同様の実験を行った。

3) SNARE 複合体 に作用する原虫側因子の網羅的探索

SNARE 複合体と相互作用する原虫側因子を探索するために、yeast two hybrid (Y2H) 法を行った。bait 側は各 SNARE 複合体 (stx17, VAMP8, SNAP29) を、prey 側は *T. cruzi* 感染 9 時間後の細胞から cDNA ライブラリーを作製し、実験を行った。また、Co-Immunoprecipitation 法を行い、SDS-PAGE による解析後、LC-MS/MS によるプロテオーム解析にて目的タンパク質の同定を行った。

4) 原虫側因子のノックアウト原虫の作製

上記で同定された原虫側候補因子のノックアウト (KO) *T. cruzi* は、CRISPR/Cas9 法を用いて樹立を行った。KO *T. cruzi* の作製は、Lander ら (MBio.,2015) の方法を基に、Cas9/pTREX-n vector を使用し、*T. cruzi* への遺伝子導入はエレクトロポレーション法を用い、実験を行った。

4 . 研究成果

1) *T. cruzi* 感染細胞における SNARE 複合体の遺伝子およびタンパク質発現量の解析

T. cruzi 感染 9 時間後 stx17 及び VAMP8 遺伝子発現量は非感染細胞 (control) と差は認められなかったが、SNAP29 遺伝子発現量は control と比べ増加傾向であった。次に、原虫感染 9 時間後のタンパク質発現量を調べたところ、VAMP8 は control と差はなかったが、stx17, SNAP29 は control より減少傾向であった。このことから、stx17 および SNAP29 は感染刺激により、遺伝子発現量は抑制されないが、タンパク質発現量の抑制、あるいは各タンパク質が分解されていると示唆された。

2) *T. cruzi* 感染細胞における SNARE 複合体の局在解析

T. cruzi 感染 9 時間後における GFP-VAMP8 HeLa 細胞内の VAMP8 の局在を蛍光抗体法で観察したところ、control との差は認められなかった。一方、FLAG-stx17 HeLa 細胞では、一部の感染細胞で stx17 の蛍光強度の減少が観察された。また、オートファゴソームマーカーの LC3 との共局在も感染により減少し、stx17 のオートファゴソームへのリクルートが抑制されていた。そして、感染刺激による SNAP29 の局在は変化しなかった。上記の結果から、*T. cruzi* 感染細胞では、VAMP8 の発現量・局在は変化せず、stx17 は分解され減少し、機能が抑制されていると示唆された。SNAP29 の原虫細胞内での挙動は今後、詳細な解析が必要であると考えられた。

3) SNARE 複合体 に作用する原虫側因子の網羅的探索

1)および 2) の結果を受け SNARE 複合体の一つ stx17 に焦点を当て、stx17 タンパク質と相互作用する原虫側因子探索を行った。初めに、Y2H 法を構築し、4 つの相互作用因子を得たが、宿主側因子のみ検出され、原虫側因子は同定できなかった。これは、cDNA ライブラリーが原虫感染細胞から得られたものであったため、探索が困難であったと考えられた。今後は *T. cruzi* のみの cDNA ライブラリーを構築し、再度探索を行うことも視野に入れる。一方、別のアプローチとして、*T. cruzi* 感染 9 時間後の FLAG-stx17 HeLa 細胞ライセートを用いた Co-Immunoprecipitation 法を行った。SDS-PAGE で比較したところ、-AA 刺激 (オートファジー誘導細胞)とは異なるパターンのバンドが複数検出された。これらのバンドを切り出し、LC-MS/MS によるプロテオーム解析を行い、いくつかの原虫側候補因子が同定された。

4) 原虫側因子のノックアウト原虫の作製

3) の方法によって得られた原虫側候補因子の解析のため、CRISPR/Cas9 法を用いたノックアウト(KO) 原虫の樹立を試みた。複数の sgRNA を設定し、Cas9/pTREX-n vector に組み込み、エレクトロポレーションを行った結果、いくつかの KO 原虫を得た。現在、詳細な解析を行っており、今後はこれらの KO 原虫を用いた感染実験を行い、KO 原虫感染により宿主オートファジーにどのような影響を与えるのか、stx17 への機能抑制が解除され、オートファゴソーム形成、そしてオートリソソームが形成されるのか、さらなる検討をおこなう。

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 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Rodriguez MS, Nitahara Y, Cornejo M, Siliezar K, Grande R, Gonzalez A, Tasaki K, Nakagama Y, Michimuko Y, Onizuka Y, Nakajima-Shimada J, Romero JE, Palacios JR, Arias CE, Mejia W, Kido Y, Cardona Alvarenga R	4. 巻 11
2. 論文標題 Re-emerging threat of Trypanosoma cruzi vector transmission in El Salvador, update from 2018 to 2020.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Infect Dis Poverty.	6. 最初と最後の頁 89
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40249-022-01008-5.	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 Yutaka Suto, Tatiana Ascencio, Tomoya Nobuta, Noriyuki Yamagiwa, Yoko Onizuka, Mayumi Ishii, Kayoko Kanemitsu, Junko Nakajima-Shimada	4. 巻 69
2. 論文標題 Synthesis and Evaluation of Quinone Derivatives for Activity against Trypanosome cruzi	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chem. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 1195-1199
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c21-00732	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

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鬼塚陽子、鈴木万紀子、等々力優海、瀬戸絵理、新崎恒平、多賀谷光男、嶋田淳子
2. 発表標題 クルーズトリパノソマ感染による宿主オートファジー関連SNARE 分子の解析
3. 学会等名 第91回日本寄生虫学会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Ascencio Tatiana G., Onizuka Y, Seto E, Suto Y, Nakajima-Shimada J,
2. 発表標題 IN VITRO AND IN VIVO EFFECTS OF QUINONE DERIVATIVES ON TRYPANOSOMA CRUZI.
3. 学会等名 ICOPA2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 瀬戸絵理、喜名振一郎、川端麗香、鈴木万紀子、鬼塚陽子、 嶋田淳子
2. 発表標題 寄生原虫Trypanosoma cruziは宿主P-body形成を誘導して自然免疫応答を抑制する
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 鬼塚陽子、村田涼子、小倉啓輔、佐藤涼香、タチアナ アセンシオ、小林さやか、齊尾征直、嶋田淳子
2. 発表標題 慢性期Chagas マウスモデルの確立と病態変化の解析
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 村田涼子、矢澤祐典、鬼塚陽子、番場みのり、瀬戸 絵理、嶋田淳子
2. 発表標題 Trypanosoma cruzi 感染マウスにおけるバイオイメージング法による炎症の検出と病態解析
3. 学会等名 第89回日本寄生虫学会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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