

令和 6 年 9 月 11 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03149

研究課題名（和文）トキソプラズマ、ネオスポラの潜伏からの活性化を司る分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）The molecular mechanisms of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* reactivation from latency.

研究代表者

高島 康弘 (Takashima, Yasuhiro)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：2033352

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,200,000 円

研究成果の概要（和文）：トキソプラズマの潜伏状態からの活性化を誘導は、潜伏型虫体周辺の微小環境におけるナトリウム、カリウムならびにカルシウムイオン濃度が一定条件に合致したときに生じることを明らかにした。またこの条件は宿主細胞外のイオン濃度とほぼ同等であり、宿主細胞内で形成されたシストが細胞外に放出されることが再活性化の引き金になることが示唆された。事実、宿主細胞内のシストを物理的に細胞外にとりだすと再活性化がおこった。またこれら一連の反応には原虫が持つカルシウムチャンネルが必要であることも示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人獣共通感染症であるトキソプラズマは、感染したからと言って直ちに発症することはまれである。いっぽう、免疫不全などにより潜伏中の虫体が再活性化すると脳炎などの重篤な障害につながることもある。これまで潜伏から再活性化に至るメカニズムは不明であったが、本研究でこれが明らかとなった。このため人、あるいは家畜に潜伏感染している本原虫の再活性化を防ぐための基盤となる知見が得られたと言える。

研究成果の概要（英文）：The study revealed that activation of *Toxoplasma gondii* from the latent state is induced when the concentrations of sodium, potassium, and calcium ions in the microenvironment around the latent worms meet certain conditions. These conditions were similar to those outside the host cell, suggesting that cysts formed inside the host cell are released outside the cell to trigger reactivation. In fact, reactivation occurred when cysts inside the host cell were physically removed from the cell. The results also indicated that the protozoan calcium channels are necessary for these reactions.

Translated with DeepL.com (free version)

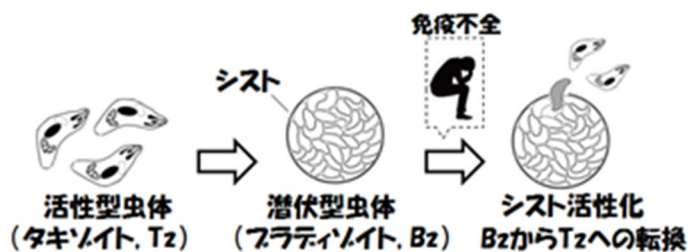
研究分野：獣医学

キーワード：トキソプラズマ ネオスポラ 潜伏

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトや動物がトキソプラズマに感染すると、一過性に活性型虫体(タキゾイト, Tz)が体内で増殖するが発症することは稀である。通常、活性型虫体は免疫系により速やかに排除され、生き残ったわずかな虫体が脳や筋肉にシストを形成して無症状のまま生涯にわたって潜伏感染する。シスト内部には数百から千程度の潜伏型虫体(ブラディゾイト, Bz)が含まれている。しかし宿主が免疫不全状態に陥ったときなど



に、シスト内部の虫体が再び活性型虫体へとステージ転換し、シストを脱出して周辺臓器で増殖を始めることで炎症性の疾患を誘発する(右上図)。例えば AIDS 発症にともなう致死性のトキソプラズマ脳炎などが代表的な例である。またウシやヒツジなどの反芻家畜動物に無症状のまま潜伏感染しているネオスポラのシストは、妊娠を契機に活性化し、胎子を障害し繁殖障害につながる。このように活性型虫体と潜伏型虫体の間で起こるこれらの原虫のステージ転換は医学・獣医学上きわめて重要な現象であり世界中で精力的に研究が行われてきた。トキソプラズマでは Tz と Bz のそれぞれで特異的発現を制御している転写因子なども徐々に明らかにされつつある[Radke et al., 2013. Proc Natl Acad Sci U S A. など]。このように活性型虫体と潜伏型虫体を行き来する過程で、虫体内部の遺伝子発現調節がどのような分子メカニズムにより制御されているのかについては解明されつつある(シグナル伝達を担うタンパク質のリン酸化など、おおむね一般的な細胞生物学の範疇である)。対照的に、シスト活性化に向かうシグナル伝達系が駆動し始める理由については全く分かっていない。すなわち、免疫抑制状態や妊娠期にシスト活性化の直接的引き金となっている宿主側因子(物質)および、原虫がその「引き金」を認識する分子機構は全く未知のままである。

2. 研究の目的

申請者らはトキソプラズマのシストが宿主細胞の細胞質に感染していることに着目し[Sims et al., Br J Exp Pathol. 1989]、偏性細胞内寄生性の本原虫のシストが何らかの理由で宿主細胞外に放出されることが活性化のきっかけであるという仮説を立てた。予備実験として、感染マウスの脳神経細胞から取り出したシストを細胞外液あるいは細胞内液を模したイオン組成の液体中で培養したところ、細胞外液を模した液中では「宿主細胞から取り出したシスト」が直ちに活性化した。対照的に細胞内液を模した液中では、シストは再活性化しないまま長期間生存した。さらに様々な組成の液中で実験を繰り返し、シスト周辺環境のナトリウムとカリウムのイオン勾配が特定条件(細胞外液と同じ条件)になるとシストが活性化することを見出した(投稿中・右図)。上記のような in vitro レベルの成果にもとづき、本研究ではトキソプラズマ症・ネオスポラ症発症のきっかけになる因子を宿主生体組織内で同定するとともに、その因子を認識する原虫側の機構を解明する。

3. 研究の方法

活性期と潜伏期において異なった色の蛍光タンパクを発現する組換え原虫を用い、様々な条件下で蛍光色を指標に潜伏からの再活性化の有無を検証する。これにより以下の点を明らかにする。

(1) シスト活性化の分子メカニズム解明

宿主細胞内から取り出し精製したシストを細胞外液あるいは細胞内液を模したイオン組成の液体中で培養する。仮説通り、細胞外液を模した液中で「宿主細胞から取り出したシスト」を培養するだけで活性化が始まることを確認する。続いて細胞内液を模した液中ではこれが起こらないことを確認。

(2) シスト活性化誘導因子(電解質条件)の同定

シスト活性化を誘導するイオン組成条件を特定する。具体的には、 Na^+ / K^+ 比率、 Ca^{2+} の必要性、ならびに他の諸条件(pH, 温度, 酸素分圧)を厳密に確定する。

4. 研究成果

本研究では、宿主細胞から採取した *T. gondii* の Bz を含むシストを、さまざまなイオン組成を含む溶液中で培養したところ細胞外環境を模倣したイオン組成の溶液中で Bz から Tz へのス

ステージ転換およびシストからの虫体の放出が起こった。この時に必要な条件は、

しかし、細胞内環境を模倣した溶液では、嚢胞形成は起こらなかった。また、細胞外環境を模倣した特定の Na^+/K^+ 比と Ca^{2+} の存在が、再活性化の引き金に必要であることもわかった。具体的には、カリウム優位の環境では再活性化はほとんど起こらないが、 Na^+/K^+ 比が細胞外液と同程度の緩衝液中では頻繁に起こる。また再活性化を誘導できる Na^+/K^+ 比であっても Ca^{2+} のキレーターである EGTA を添加したり、 Ca^{2+} を欠く条件下では再活性化は起こらなかった。さらに細胞内カルシウム特異的キレーターである BAPTA-AM もまた再活性化を阻害した。これらの結果は、再活性化が起こるためには Ca^{2+} の虫体細胞内への流入が必要であることを示している。また、アクチン重合阻害剤であるサイトカラシン D もシストからの虫体脱出を阻害した。

さらにシスト内部の虫体が Bz から Tz へステージ転換するタイミングを明らかにするため、Tz ステージで特異的に緑色蛍光タンパク質を発現する遺伝子改変 *T. gondii* 株を構築した。この組換え虫体がシストから再活性化する過程を観察したところ、シストからの内部虫体脱出の前に緑色蛍光が検出された。このことは、Bz から Tz へのステージ転換がシスト崩壊前に起こることを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nikolai D. Shamaev, Eduard A. Shuralev, Oleg V. Nikitin, Malik N. Mukminov, Yuriy N. Davidyuk, Alexander N. Belyaev, Guzel Sh. Isaeva, Vasil B. Ziatdinov, Nail I. Khammadov, Regina F. Safina, Gaysha R. Salmanova, Guzel M. Akhmedova, Kamil S. Khaertynov, Taizo Saito, Katsuya Kitoh, Yasuhiro Takashima	4. 巻 11
2. 論文標題 Prevalence of <i>Toxoplasma gondii</i> infection among small mammals in Tatarstan, Russian Federation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-01582-y	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 Taizo Saito, Yuko Kitamura, Eiji Tanaka, Itsuki Ishigami, Yuji Taniguchi, Junji Moribe, Katsuya Kitoh, Yasuhiro Takashima	4. 巻 10
2. 論文標題 Spatial distribution of anti- <i>Toxoplasma gondii</i> antibody-positive wild boars in Gifu Prefecture, Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-96758-x	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 Taizo Saito, Tatsunori Masatani, Katsuya Kitoh, Yasuhiro Takashima	4. 巻 51
2. 論文標題 Releasing latent <i>Toxoplasma gondii</i> cysts from host cells to the extracellular environment induces excystation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int. J. Parasitol.	6. 最初と最後の頁 999-1006
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijpara.2021.04.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石田碧、Nikolai shamaev、越本知大、篠原明男、名倉悟郎、高島康弘
2. 発表標題 強毒株1型 <i>Toxoplasma gondii</i> に対するヨーロッパモリネズミの耐性
3. 学会等名 第92回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2023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
研究 分担 者	山本 雅裕 (Yamamoto Masahiro) (00444521)	大阪大学・微生物病研究所・教授 (14401)	

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