

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25450419

研究課題名(和文)トキソプラズマ原虫病原性抑制因子の研究

研究課題名(英文)Study of virulence inhibitory factor in *Toxoplasma gondii*

研究代表者

五十嵐 慎 (IGARASHI, Makoto)

帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授

研究者番号：60374766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：トキソプラズマTgDPA分子と病原性の関連性を解読するために以下の主な研究成果を得た。1) TgDPA過剰発現株の作製に成功した。2) TgDPA分子の結晶構造を決定し、進化の過程で酵素活性を失っていることを示唆した。3) TgDPAの有無により病原性が変動することを示した。4) 乳酸脱水素酵素遺伝子(LDH1)の欠失により、TgDPA発現誘導が阻害された。5) TgDPAは原虫の増殖・分化には影響を与えなかった。6) TgDPA分子はシスト形成時の遺伝子発現の変動に関与していた。7) TgDPA関連遺伝子であるTgDERAとの二重ノックアウト株の作製に成功した。

研究成果の概要(英文)：This study has been conducted to elucidate the role of TgDPA molecule as a virulence inhibitory factor in *Toxoplasma gondii*. The findings are summarized below. 1) TgDPA overexpressing strain was successfully produced. 2) The crystal structure of the TgDPA molecule was determined, suggesting that the enzyme activity was lost during evolution. 3) The pathogenicity varied depending on the presence or absence of TgDPA. 4) Induction of TgDPA expression was inhibited by deletion of lactate dehydrogenase gene (LDH1). 5) TgDPA did not affect proliferation / differentiation of protozoa. 6) TgDPA molecule was involved in gene expression fluctuation during cyst formation. 7) We succeeded in producing a double knockout strain with TgDERA, paralog of TgDPA gene.

研究分野：原虫病学

キーワード：トキソプラズマ 病原性 慢性感染 シスト

### 1. 研究開始当初の背景

トキソプラズマ原虫において、急性期虫体(タキゾイト)からシストを形成する慢性感染期の虫体(ブラディゾイト)への分化の際、特異的に発現が誘導されるいくつかの遺伝子が報告されている(Bohne et al., 1995; Cleary et al., 2002; Dzierszinski et al., 2001; Friesen et al., 2008; Holpert et al., 2001; Kim and Boothroyd, 2005; Lekutis et al., 2000; Odberg-Ferragut et al., 1996; Parmley et al., 1995; Séron et al., 2000; Yang and Parmley, 1995; Zhang et al., 2001)。これらの遺伝子は、宿主体内でのブラディゾイトへの分化を含む慢性感染の成立に重要な役割を果たしていると考えられているが、その機能や役割などの詳細は全く明らかにされていない。

申請者らは、ブラディゾイトへの分化にともない発現が誘導される新規分子として *TgDPA* を同定した(Ueno et al. 2009)。*TgDPA* はその構造上 deoxyribose phosphate aldolase と呼ばれる酵素ファミリーに属している。deoxyribose phosphate aldolase は原核生物から哺乳動物までよく保存されており、生物間での相同性はそれぞれ約 40% である。*TgDPA* のアミノ酸配列の相同性は他生物のそれと同様に原核生物および哺乳動物に対しそれぞれ約 40% を示した。しかしながら、活性部位と考えられる数箇所のアミノ酸残基に置換が認められ、また酵素アッセイによりその活性が検出されなかった。このことから、*TgDPA* は進化の過程で酵素活性を失うとともに、他の役割に特化してきた全く新規の役割を担う分子ではないかと考えた。

そこで申請者らは、*TgDPA* の機能を探る目的で、*TgDPA* と相互作用する分子の検索を行い、アクチン脱重合因子 *TgADF* の同定に成功した。さらに、*TgDPA* が *TgADF* を介して、アクチンの脱重合を促進することを明らかにした。(Ueno et al.

2010)。トキソプラズマ原虫は、アクチンを介した虫体の運動により宿主細胞への侵入および宿主細胞からの脱出を行う。このことから慢性感染期の虫体は、シストとして長期間宿主体内に潜伏するために、アクチンの重合を抑制することで静止状態を維持している可能性を考えた。そこで機能を解析する目的で *TgDPA* の遺伝子破壊株 ( $\Delta$ DPA 株) を作製し、マウスを用いた感染実験により生存率を測定したところ、予想に反して、急性期において親株に対し  $\Delta$ DPA 株感染マウスの生存率の著しい低下が認められた。この結果は、急性期において *TgDPA* 分子が病原性を抑制的に制御している可能性を示唆しており、*TgDPA* の欠損により虫体自身が病原性を制御できなくなったものと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、研究の背景より導き出された仮説を実証し、さらに *TgDPA* 分子の役割を検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

研究目標を達成するために、1) *TgDPA* 過剰発現株の作製、2) *TgDPA* 分子の構造解析および酵素活性の検討、3) 原虫のマウス感染試験、4) 各種遺伝子クローニングとその解析、5) 原虫の増殖および分化誘導試験、6) 原虫の遺伝子発現の網羅的解析、7) *TgDPA* 関連遺伝子破壊株の作製などを行なった。

### 4. 研究成果

(1) *TgDPA* 過剰発現株を作製し、感染試験、増殖および分化試験、遺伝子発現の網羅的解析などに用いた。

(2) 組み換え *TgDPA* を作製し、結晶解析によりその構造を決定した。構造上 *TgDPA* 分子は酵素であるデオキシリボースアルドラーゼと非常によく似た二量体

でありながら、酵素活性部位に相当する部分が狭く、基質と相互作用するだけの空間を有していないことが明らかとなった。様々な塩 (Mg、Ca、Mn、Zn) および還元剤である DTT の存在下で酵素活性の測定を試みたが活性は検出されなかった。以上のことは、背景で述べている *TgDPA* は進化の過程で酵素活性を失うとともに、他の役割に特化してきた全く新規の役割を担う分子ではないかという考えを支持している。さらに *TgADF* と結合する部位が予想された。

(3) 原虫のマウス感染モデル系を用いた解析の結果、*TgDPA* 遺伝子の欠損により病原性が強くなる傾向が認められた。また、*TgDPA* 過剰発現株では若干の病原性の低下が観察された。しかしその差異は当初予想していたほど明確ではなく、有意差を得ることはできなかった。

(4) *TgDPA* と原虫細胞内エネルギー産生の関連性を調べる目的で、解糖系に関わる乳酸脱水素酵素遺伝子 (LDH1 および LDH2) を単離し、またこれらに対する抗体の作製、遺伝子破壊株の作製を行なった。LDH1 遺伝子の破壊により、分化誘導時の *TgDPA* の発現誘導が顕著に抑制されており、*TgDPA* を含めたブラディゾイト誘導遺伝子の発現が、原虫細胞内エネルギーと関わっていることが示唆された。

(5) 培養系を用いた原虫の増殖および分化誘導試験を行なった。遺伝子破壊株および過剰発現株はともに親株との差異はなく、*TgDPA* は原虫の増殖およびシスト形成には影響を与えていないことが明らかになった。

(6) 野生株、*DPA* ノックアウト株および *TgDPA* 強制発現株について *in vitro* 培養系で増殖した急性型虫体から RNA を調製し、RNAseq 法による網羅的な発現解析を行った。発現の違いが認められた上位

約 100 遺伝子のうち、10% はシスト形成にともない発現が変動することで知られている遺伝子であり、25% はデータベース上で慢性期虫体に多く発現していることを示唆していた。一方で、病原性因子として知られている遺伝子に関しては、発現の顕著な違いは認められなかった。

以上のことから、*TgDPA* 分子がシスト形成時の遺伝子発現の変動に関与しており、発現パターンが急性期および慢性期虫体のそれにシフトすることが病原性に影響している可能性が示唆された。

(7) *TgDPA* 遺伝子の有無による病原性の差異がより明確に認められることを期待して、*TgDPA* の相同遺伝子 (paralog) である *TgDERA* ノックアウト株および *TgDPA/TgDERA* 二重ノックアウト株を作製した。*TgDERA* は *TgDPA* に対し 53% のアミノ酸配列相同性を有し、*TgDPA* と類似の機能を有すると予想される。また、トキソプラズマゲノム上にその他の相同遺伝子は存在しない。これらノックアウト株は野生株や *TgDPA* ノックアウト株と同等の増殖性を示したことから、両遺伝子が担う機能は原虫の生存及び増殖には関わっていないことが明らかになった。分化誘導後蛍光抗体法を用いてシスト関連たんぱく質発現の解析を試みたところ、上記すべてのノックアウト株において野生株と同様にシスト壁形成が認められたことから、これら分子はシスト形成能には影響は与えていないと考えられた。今後病原性の検討を行う予定である。

## 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 6 件)

Abdelbaset E. Abdelbaset, Barbara A. Fox, Mohamed H. Karram, Mahmoud R. Abd Ellah, David J. Bzik, Makoto Igarashi. Lactate dehydrogenase in *Toxoplasma*

gondii controls virulence, bradyzoite differentiation, and chronic infection. PLoS One. 査読有、12: e0173745 (2017). doi: 10.1371/journal.pone.0173745.

Abdelbaset, A.E., Alhasan, H., Salman, D., Karram, M.H., Ellah Rushdi, M.A., Xuenan, X., Igarashi, M. Evaluation of recombinant antigens in combination and single formula for diagnosis of feline toxoplasmosis. Exp Parasitol. 査読有、172: 1-4 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.11.003>

Bawm, S., Maung, WY., Win, MY., Thu, MJ., Chel, HM., Khaing, TA., Wai, SS., Htun, LL., Myaing, TT., Tiwananthagorn, S., Igarashi, M., Katakura, K. Serological Survey and Factors Associated with Toxoplasma gondii Infection in Domestic Goats in Myanmar. Scientifica. 査読有、Volume 2016 (2016), Article ID 4794318, p4 DOI: 10.1155/2016/4794318.

Tonkin, ML., Halavaty, AS., Ramaswamy, R., Ruan, J., Igarashi, M., Ngo, HM., Boulanger, MJ. Structural and functional divergence of the aldolase fold in Toxoplasma gondii. J. Mol. Biol. 査読有、427, 840-852 (2015) DOI: 10.1016/j.jmb.2014.09.019.

Salman, D., Oohashi, E., Mohamed, AE., Abd El-Mottelib, Ael-R., Okada, T., Igarashi, M. Seroprevalences of Toxoplasma gondii and Neospora caninum in pet rabbits in Japan. J. Vet. Med. Sci. 査読有、76, 855-862 (2014) <http://doi.org/10.1292/jvms.13-0632>

Okada, T., Marmansari, D., Li, Z.M., Adilbish, A., Canko, S., Ueno, A., Shono, H., Furuoka, H., Igarashi, M. A novel dense granule protein, GRA22, is involved in regulating parasite egress in Toxoplasma gondii. Mol. Biochem. Parasitol. 査読有、189, 5-13 (2013) DOI: 10.1016/j.molbiopara.2013.04.005.

[学会発表](計 4件)

Abdelbaset Abdelbaset、五十嵐 慎  
Analysis of the Role of Toxoplasma gondii Lactate dehydrogenase during stage conversion using Knockout techniques.  
第 85 回日本寄生虫学会大会、2016 年 3 月 18

日～3月20日、宮崎市民プラザ(宮崎県・宮崎市)

村田 優穂、高野 量、五十嵐 慎、加藤 健太郎  
トキソプラズマのシスト形成に寄与する因子の探索  
第 85 回日本寄生虫学会大会、2016 年 3 月 18 日～3月20日、宮崎市民プラザ(宮崎県・宮崎市)

Salman Doaa、大橋 英二、Abdelbaset Abdelbaset E、五十嵐 慎  
Prevalence and genetic characterization of Toxoplasma gondii isolate from Tokachi subprefecture in Japan.  
第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9 日～9月12日、北海道大学(北海道・札幌市)

Doaa Salman、Muller Compaore、Suphasawatt Puranaveja、岡田 只土、五十嵐 慎  
Identification and characterization of novel bradyzoite-specific genes in Toxoplasma gondii  
第 156 回日本獣医学会学術集会、2013 年 9 月 20 日～9月22日、岐阜大学(岐阜県・岐阜市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

五十嵐 慎 (IGARASHI, Makoto )  
帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授  
研究者番号：60374766