

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670201

研究課題名(和文)トキソプラズマROP16を使ったES・iPS細胞未分化維持システムの開発

研究課題名(英文)Development of the in vitro maintenance system for undifferentiated stem cells using Toxoplasma ROP16

研究代表者

山本 雅裕 (Yamamoto, Masahiro)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：00444521

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)：本研究ではトキソプラズマから分離した病原性因子であるROP16が多能性胚性幹細胞(ES細胞)の未分化維持に寄与するか、また、ES細胞の分化誘導させるための転写因子群を活性化できる新規の病原性因子の分離を行った。まず、ROP16の過剰発現によってStat3の活性化が起こり、その強さは通常ES細胞未分化維持のために加える必要があるLIFよりも数十倍強い活性を有することを見出した。また、新規の病原性因子としてはGRA6がNFAT4を強く活性化することを見出した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we tested whether a Toxoplasma-derived virulence factor ROP16 is capable of sustaining the undifferentiated state of embryonic stem cells (ES cells). Furthermore, we searched novel Toxoplasma-derived factors that can potentiate the differentiation of ES cells. Then, we found that overexpression of ROP16 activated Stat3, which is essential for the maintenance of the undifferentiation of ES cells, more strongly than LIF. In addition, we succeeded to isolate GRA6 as a novel activator of host NFAT4.

研究分野：寄生虫学

キーワード：トキソプラズマ 病原性因子 転写因子 エフェクター機構

## 1. 研究開始当初の背景

どのような細胞にも分化可能な胚性幹細胞(ES細胞)と誘導性多能性幹細胞(iPS細胞)は、再生医学という観点からこれからの医療に革命的な進歩をもたらすツールとして、日本のみならず世界的にも大変注目が集まっている。その前段階としてマウスを使った動物実験は必須であり、そのためにマウス由来の胚性幹細胞(ES細胞)iPS細胞を様々な細胞系譜に分化させる技術が国内外で精力的に研究されている。これらのES・iPS細胞研究の根幹は、言うまでもなく「ES細胞・iPS細胞を未分化に保つこと」であるが、現在ES細胞・iPS細胞の未分化を維持するためには、Leukemia inhibitory factor (LIF)と呼ばれる分化抑制因子を培養液に添加する必要がある。しかしES・iPS細胞の培養に使用できるグレードのLIFは大変高価であり(これが1系統のノックアウトマウスを作製するのに数百万円もの費用がかかる一因になっている)また研究者が自ら調整することは非常な労力と技術的な困難が伴うことから、このことがこれからES・iPS細胞研究を開始しようとする若手研究者及び分野外の研究者が参入する際の障壁となる。

## 2. 研究の目的

LIFがES・iPS細胞の分化を阻害するのは、その受容体の下流にある転写因子であるStat3を活性化され、その結果分化全能性を維持するのに必須の転写因子群であるNanog、Klf4、Oct3/4やSox2が誘導されるからである。従って、Stat3をLIF非存在下でES・iPS細胞で時空間的に自由自在に活性化できる技術を開発することができれば、高価なLIFを使用しなくてもそれらの細胞の未分化状態を維持できると考えられた。

我々は以前に*in vitro*アッセイ系においてLIFの添加よりも強くStat3の活性化を誘導できるトキソプラズマ由来のエフェクター分子ROP16を同定したことから(Yamamoto

M, et al. *J Exp Med.*, 2009)、この研究においてROP16をES細胞・iPS細胞に薬剤で発現させコントロールすることにより、LIF非存在下でそれらの細胞の未分化能を維持可能な系の開発を行い、寄生虫学研究で得られた細胞内シグナル伝達の知見を再生医学研究へ応用することを試み、さらにES細胞を分化誘導させるための必要な宿主転写因子を活性化させることができる新規原虫因子の探索を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) トキソプラズマ由来 ROP16 のドキシサイクリン誘導性発現ベクターの開発

ROP16の発現ベクターを293T細胞に強制発現させることによって、Stat3の活性化が誘導されるかどうかを検討した。ES・iPS細胞にROP16を常時過剰発現させることはStat3が常に活性化してしまい、その後の分化を行う研究に不都合である。従って、まずROP16の発現を薬剤により自在にON/OFFできる系の構築を試みる。応募者はこれまでに哺乳動物細胞選択用のピューロマイシン遺伝子とドキシサイクリン応答性転写調節因子(rtTA)とrtTA依存のプロモーター下に任意のタンパク質を発現可能なレトロウイルスベクターの作製に成功していることから、(Yamamoto M, et al. *Immunity.*, 2012)この系に哺乳動物でStat3のリン酸化が誘導可能なROP16のcDNAを組み込んだレトロウイルスベクターを作製し、マウス胚性線維芽細胞(MEF)に遺伝子導入後ピューロマイシン耐性となるMEFを選択しドキシサイクリンによりROP16が発現するかどうかをウェスタンブロット法で検討した。またドキシサイクリン依存的にStat3の活性化が起こるかどうかをStat3のチロシン残基(pTyr705-Stat3)を検出する特異的抗体を使ってウェスタンブロット法で検討し、さらにStat3依存性な遺伝子発現の有無についてStat3依存のプロモーターを有するルシフェラーゼ発現ベクター

ーを導入し、ROP16 依存的にルシフェラーゼ発光が認められるかどうかを検討した。

## (2) 宿主転写因子を強く活性化する原虫来分子の探索

トキソプラズマ原虫の濃縮顆粒由来のタンパク質群( GRA1, GRA2, GRA3, GRA4, GRA5, GRA6, GRA7, GRA8, GRA9, GRA10, GRA12, GRA14, GRA15 ) を作製し、293T 細胞に発現させた。次に、NF B, ISRE, SRF, C/EBP, SRE, NFAT, TPU, CRE, GAS, UPRE, TARE, IFN- , DR1, DR3, DR4, DR5, LILRE, Egr1, GRE 依存的なプロモーターを有するルシフェラーゼレポーターを pRL-TK4 ベクターと GRA 発現ベクターと共に 293T 細胞にリポフェクタミン 2000 で導入し、48 時間後に回収した。さらに細胞を溶解した後にルシフェリンを混ぜ、ルシフェラーゼ発光を測定し、それぞれの転写因子の活性化を評価した。

## 4. 研究成果

(1) 本研究で用いるエフェクター分子はトキソプラズマが感染時に宿主細胞内に放出する ROP16 であり、ROP16 は Stat3 に結合してチロシン残基をリン酸化することで活性化を引き起こす。以前に哺乳動物細胞で寄生虫由来の ROP16 を過剰発現させるだけで Stat3 のリン酸化(活性化)が非常に強く活性化することを見出し、その際に Stat3 の活性化を同様に誘導可能な LIF の添加よりも強力であることを示したことから、ROP16 と LIF のどちらが Stat3 活性能が高いかを検討した。その結果、ROP16 の過剰発現による Stat3 の活性能は LIF の添加による Stat3 の活性化よりも 20 倍ほど高いことを見出した(図 1)。このことにより、ROP16 を ES 細胞に発現させることによって ES 細胞の未分化能を維持できるのではないかと考え、ROP16 の条件特異的な発現系を作製することを試みた。ROP16 をレトロ

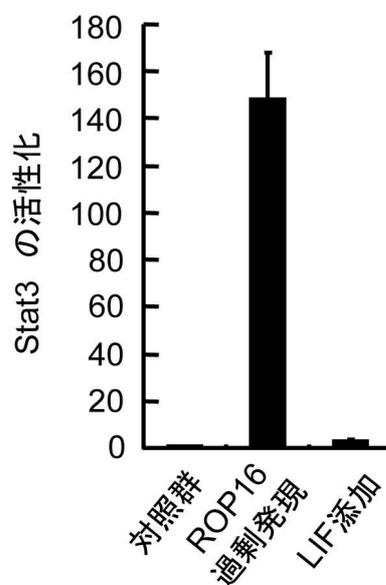


図 1 ROP16 強制発現と LIF 添加比較

OK\_puro ベクターに組み込み、MEF において ROP16 がドキシサイクリン依存的に発現するかどうかを検討したが、ROP16 の発現は認められなかった。次に、ブラストシジン耐性による誘導性発現系を検討するために、レトロ OK\_Bsr ベクターに ROP16 を導入し、ブラストシジン耐性 MEF 細胞を樹立したが、ドキシサイクリンによる ROP16 の発現及び Stat3 の活性化は認められなかった。

(2) 次に作製した各 GRA タンパク質発現ベクターを 293T 細胞に遺伝子導入することによって各タンパク質が発現するかどうかを

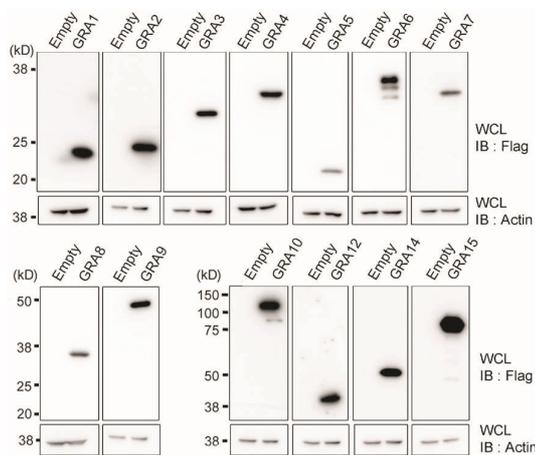


図 2 各 GRA ベクターの発現チェック

ウェスタンブロット法にて検討した。その結果、図2に示すとおりすべての GRA 発現ベクターについて予想通りの分子量のタンパク質を発現していたことから、各転写因子依存的なプロモーターを有するルシフェラーゼレポータープラスミドと共に共発現を行った。その結果、図3に示すとおり GRA15 が NF- $\kappa$ B 依存的レポーターを強く活性化すること、また GRA6 が NFAT 依存的レポーターを強く活性化することを見出した。

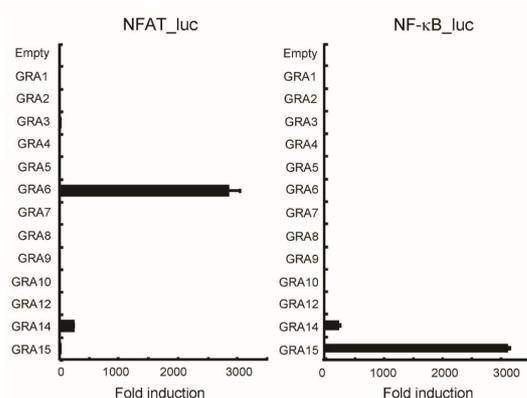


図3 GRA 依存な転写因子の活性化

以上のことから、GRA15 および GRA6 を使った NF- $\kappa$ B 及び NFAT を介する ES 細胞の分化・増殖制御の可能性が示唆された。

#### 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 15 件)

Meunier E, Wallet P, Dreier RF, Costanzo S, Anton L, Rühl S, Dussurgey S, Dick MS, Kistner A, Rigard M, Degrandi D, Pfeffer K, Yamamoto M, Henry T, Broz P. Guanylate-binding proteins promote activation of the AIM2 inflammasome during infection with *Francisella novicida*. *Nat Immunol.* (2015) 16:476-484. doi: 10.1038/ni.3119. (査読・有)

Man SM, Karki R, Malireddi RK, Neale G, Vogel P, Yamamoto M, Lamkanfi M, Kanneganti TD. The transcription factor IRF1 and guanylate-binding proteins target activation of the AIM2 inflammasome by *Francisella* infection.

*Nat Immunol.* (2015) 16:467-475. doi:

10.1038/ni.3118. (査読・有)

Ma JS, Sasai M, Ohshima J, Lee Y, Bando H, Takeda K, Yamamoto M. Selective and strain-specific NFAT4 activation by the *Toxoplasma gondii* polymorphic dense granule protein GRA6. *J Exp Med.* (2014) 211:2013-32. doi: 10.1084/jem.20131272. (査読・有)

Pilla DM, Hagar JA, Haldar AK, Mason AK, Degrandi D, Pfeffer K, Ernst RK, Yamamoto M, Miao EA, Coers J. Guanylate binding proteins promote caspase-11-dependent pyroptosis in response to cytoplasmic LPS. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2014) 111:6046-51. doi: 10.1073/pnas.1321700111. (査読・有)

Meunier E, Dick MS, Dreier RF, Schürmann N, Kenzelmann Broz D, Warming S, Roose-Girma M, Bumann D, Kayagaki N, Takeda K, Yamamoto M, Broz P. Caspase-11 activation requires lysis of pathogen-containing vacuoles by IFN-induced GTPases. *Nature.* (2014)509:366-70. doi: 10.1038/nature13157. (査読・有)

Ohshima J, Lee Y, Sasai M, Saitoh T, Ma JS, Kamiyama N, Matsuura Y, Pann-Ghill S, Hayashi M, Ebisu S, Takeda K, Akira S, Yamamoto M. Role of the mouse and human autophagy proteins in IFN- $\gamma$ -induced cell-autonomous responses against *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* (2014) 192: 3328-3335. doi: 10.4049/jimmunol.1302822. (査読・有)

Haldar AK, Piro AS, Pilla DM, Yamamoto M, Coers J. The E2-Like Conjugation Enzyme Atg3 Promotes Binding of IRG and Gbp Proteins to Chlamydia- and *Toxoplasma*-Containing Vacuoles and Host Resistance. *PLoS One.* (2014) 9:e86684. doi: 10.1371/journal.pone.0086684. (査読・有)

Ono C, Ninomiya A, Yamamoto S, Abe T, Wen X, Fukuhara T, Sasai M, Yamamoto M, Saitoh T, Satoh T, Kawai T, Ishii KJ, Akira S,

Okamoto T, Matsuura Y. Innate immune response induced by baculovirus attenuates transgene expression in mammalian cells. *J Virol.* (2014) 88:2157-2167. doi: 10.1128/JVI.03055-13. (査読・有)

Kimura T, Katoh H, Kayama H, Saiga H, Okuyama M, Okamoto T, Umemoto E, Matsuura Y, **Yamamoto M**, Takeda K. Ifit1 inhibits Japanese encephalitis virus replication through binding to 5' capped 2'-O unmethylated RNA. *J Virol.* (2013) 87:9997-10003. doi: 10.1128/JVI.00883-13. (査読・有)

Sasai M, **Yamamoto M**. Pathogen Recognition Receptors: Ligands and Signaling Pathways by Toll-like Receptors. *Int Rev Immunol.* (2013) 32:116-33. doi: 10.3109/08830185.2013.774391. (査読・有)

Kemp LE, **Yamamoto M**, Soldati-Favre D. Subversion of host cellular functions by the apicomplexan parasites. *FEMS Microbiol Rev.* (2013) 37:607-31. doi: 10.1111/1574-6976.12013. (査読・有)

Satoh T, Kidoya H, Naito H, **Yamamoto M**, Takemura N, Nakagawa K, Yoshioka Y, Morii E, Takakura N, Takeuchi O, Akira S. Critical role of Trib1 for the differentiation of adipose tissue-resident macrophages maintaining metabolic homeostasis. *Nature.* (2013) 495:524-8. doi: 10.1038/nature11930. (査読・有)

Lundberg AM, Ketelhuth DF, Johansson ME, Gerdes N, Liu S, **Yamamoto M**, Akira S, Hansson GK. Toll-like receptor 3 and 4 signalling through the TRIF and TRAM adaptors in hematopoietic cells promotes atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* (2013) 99:364-73. doi: 10.1093/cvr/cvt033. (査読・有)

Kamiyama N, **Yamamoto M**, Saiga H, Ma JS, Ohshima J, Machimura S, Sasai M, Kimura T, Ueda Y, Kayama H, Takeda K. CREBH Determines the Severity of Sulpyrine-Induced

Fatal Shock. *PLoS One.* (2013) 8:e55800doi: 10.1371/journal.pone.0055800. (査読・有)

Kusu T, Kayama H, Kinoshita M, Jeon SG, Ueda Y, Goto Y, Okumura R, Saiga H, Kurakawa T, Ikeda K, Maeda Y, Nishimura J, Arima Y, Atarashi K, Honda K, Murakami M, Kunisawa J, Kiyono H, Okumura M, **Yamamoto M**, Takeda K. Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 7 Controls Th17 Cell Responses through Regulation of Luminal ATP in the Small Intestine. *J Immunol.* (2013) 190:774-783. doi: 10.4049/jimmunol.1103067. (査読・有)

〔学会発表〕(計 10 件)

**山本雅裕**、大嶋淳、Lee Youngae、笹井美和 「インターフェロン- $\gamma$ 誘導性 GTPase によるトキソプラズマ原虫殺傷機構について」第 87 回日本生化学会大会 シンポジウム (京都国際会議場、京都、平成 26 年 10 月 15 日)

**Yamamoto M** 「NFAT4 activation by the *Toxoplasma gondii* polymorphic effector protein GRA6 maximizes the parasite virulence in a strain-specific manner」The 13<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity (Nara Prefectural New Public Hall, Nara, Japan, September 23<sup>th</sup>-26<sup>th</sup>, 2014)

**山本雅裕** 「トキソプラズマ原虫の免疫寄生虫学」第 16 回免疫サマースクール 2014 in 小豆島 (リゾートホテルオリビアン小豆島、香川、平成 26 年 7 月 28 日-31 日)

**山本雅裕** 「トキソプラズマ原虫と宿主の免疫学的攻防」平成 26 年度 遺伝子病制御研究所研究集会 (北海道大学遺伝子病制御研究所、北海道、平成 26 年 7 月 3 日-4 日)

**Yamamoto M**, Ma JS, Ohshima J, Sasai M. 「Activation of host NFAT by a *Toxoplasma gondii* polymorphic dense granule protein plays an important role in virulence mediated by the local infection」WHIP 2014 18<sup>th</sup> Annual Woods Hole ImmunoParasitology Conference (Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA, USA, April 27-30, 2014)

**山本雅裕**、大嶋淳、馬知秀、笹井美和、李英愛 「IFN- $\gamma$  依存的抗トキソプラズマ応答におけるオートファジー蛋白質の役割」第 82 回日本寄生虫学会大会 (愛媛大学 城北キャンパス、愛媛、平成 26 年 3 月 27 日—28 日、2014)

Ohshima J, Lee Y, Ma JS, Sasai M, **Yamamoto M**. 「Role of the mouse and human

autophagy proteins in IFN- $\gamma$ -induced cell-autonomous responses against *Toxoplasma gondii*」第7回寄生虫感染免疫研究会（ベストウエスタンホテル高山、岐阜、平成26年3月6-7日、2014）

**Yamamoto M** 「Selective and Strain-specific NFAT4 activation by a *Toxoplasma gondii* polymorphic Dense Granule Protein GRA6」International Symposium TCUID2013 Toward Comprehensive Understanding of Immune Dynamism (Suita, Osaka, Japan, November 18-20, 2013)

**Yamamoto M** 「A protozoan parasite *Toxoplasma gondii* manipulates host cell functions by effector molecules」The XIVth International Congress of Protistology, Symposium 7 (Vancouver, Canada, July 28-Aug 2, 2013)

**Yamamoto M** 「*Immunological interface between host and a protozoan parasite Toxoplasma gondii*」FORUM GRADUATE SCHOOLS INFECTION & IMMUNITY BIOLOGIE-MEDECINE (Geneva, Switzerland, June 28, 2013)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/lab/imp/ara/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本 雅裕 (YAMAMOTO, Masahiro)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：00444521

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし