

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 14 日現在

機関番号：33910

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850197

研究課題名(和文)トキソプラズマ原虫遺伝子破壊株を用いた宿主寄生機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of the novel dense granule protein in *Toxoplasma gondii*

研究代表者

岡田 只士 (OKADA, Tadashi)

中部大学・生命健康科学部・研究員

研究者番号：30623855

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)：トキソプラズマ原虫は寄生胞を形成しながら宿主細胞へと侵入し、そこで分裂・増殖する。dense granule proteinは虫体より分泌され、寄生胞内部の微細環境を整える働きをしていることから、原虫の宿主寄生機構に重要であると考えられるが、詳細は明らかでない。本研究では新規dense granule protein (GRA22)について、遺伝子破壊株を作製し、表現型を指標に機能解析を行った。その結果GRA22はトキソプラズマ原虫の宿主細胞からの脱出(egress)時機制御に関わるタンパク質であることが見出された。

研究成果の概要(英文)：The intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii* is capable of invading any nucleated cell and replicates within a parasitophorous vacuole (PV). This microenvironment is modified by secretory proteins from organelles named rhoptries and dense granules. In this study, we identified the novel dense granule protein in *Toxoplasma gondii*. To understand the novel dense granule protein function, we performed disruption of this gene by homologous recombination, and analyzed its phenotypes. The knock out strain showed similar growth rate as that of parental strain. The survival rate did not show significant difference between mice infected with knock out and parental strains. However, timing of egress was earlier than that of parental strain. These results suggested that this novel dense granule protein involved in regulating the parasite egress in *T. gondii*.

研究分野：分子生物学 生化学 寄生虫学

キーワード：トキソプラズマ原虫 dense granule protein egress

1. 研究開始当初の背景

(1) トキソプラズマ原虫はアピコンプレクス門に属する人獣共通感染症の病原原虫であり、ヒトに対しては、流産や胎盤感染による先天性トキソプラズマ脳症、免疫抑制下における脳炎などを引き起こす。トキソプラズマ原虫はこれまでに調べられた全ての哺乳類及び鳥類に対して感染性を有しており、様々な種を中間宿主として寄生・増殖する。アピコンプレクス門に属する原虫としては、トキソプラズマ原虫の他にマラリア原虫やクリプトスポリジウム原虫などが知られており、医学・獣医学領域において重要な病原原虫が多数含まれている。これらの原虫は寄生胞を形成しながら宿主細胞へと侵入し、寄生胞内で増殖する。寄生胞は宿主細胞内における原虫の生育環境維持に関わり、生存に必須であると考えられているが、その詳細は明らかでない。トキソプラズマにおいては、寄生胞に局在するタンパク質として、現在までにおよそ 20 種類が報告されている (Laliberte J, Carruthers VB., *Cell Mol Life Sci.* 65, 1900-1915 (2008))。これらのタンパク質は原虫体内の dense granule と呼ばれる分泌器官に貯蔵されており、宿主細胞への侵入に伴い寄生胞内へと放出される。これら一群の dense granule タンパク質は、これまでに行われた寄生胞内における局在や相互作用解析の研究より、あるものは宿主細胞からの栄養取り込みに、また、あるものは寄生胞内の膜様ネットワーク構造構築に関わることなどが示唆されているが、その詳細は明らかでない。

(2) 我々は、以前にトキソプラズマ原虫の細胞周期研究を目的として、トキソプラズマ原虫由来 cyclin Y に対する結合タンパク質の検索を行った。そして cyclin Y と相互作用する新規 dense granule タンパク質を同定した。現在までに、この dense granule タンパク質と cyclin Y との機能的相互作用に関する報告はない。そこで、我々はこの新規 dense granule タンパク質に関し、当該遺伝子の破壊株作成を試み、その作製に成功した。

2. 研究の目的

本研究は、トキソプラズマ原虫の宿主細胞内寄生機構を解明することを目的とする。トキソプラズマ原虫は寄生胞を形成しながら宿主細胞へと侵入し、寄生胞内で増殖する。dense granule タンパク質は虫体より寄生胞内部に分泌される一群のタンパク質であり、寄生胞内部の微細環境を整え、原虫の成育維持に関わることから、原虫の宿主細胞内寄生機構に重要な役割を担っていると考えられる。同定した新規 dense granule タンパク質に関し、作製した遺伝子破壊株を活用して、機能解析を行い、この dense granule タンパク質がトキソプラズマ原虫の宿主細胞内寄

生機構にどのように寄与しているかを明らかにする。本研究の成果により、トキソプラズマ原虫の細胞内宿主寄生機構の一端が明らかとなることが期待できる。最終的には本研究により、得られた知見を活用し、トキソプラズマ原虫の宿主寄生機構を標的とした新規抗原薬剤開発の基盤を形成することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 同定した新規 dense granule タンパク質に関して、当該遺伝子の破壊株を用い、その表現型を指標として、機能解析を行う。具体的には、増殖率や薬剤感受性、病原性、シスト形成能等を検討する。また、電子顕微鏡を用いて、微細構造の変化等も検討する。

(2) 新規 dense granule タンパク質に関して、組換えタンパク質を作製し、生化学的手法で機能解析を行う。具体的には、ポリクローナル抗体を作製し、細胞内局在を解析する。また、タグを融合した組換えタンパク質や作製したポリクローナル抗体を活用し、免疫沈降法などを行い、相互作用するタンパク質を同定する。

4. 研究成果

本研究では、我々が同定した新規 dense granule タンパク質の機能解析を行い、当該タンパク質を GRA22 と命名し、報告を行った。以下に本研究成果について記す。

(1) 当該遺伝子の破壊株とその親株の増殖率を寄生胞内部の平均虫体数を指標として検討した。宿主感染後 24 時間程度までは親株、遺伝子破壊株ともに寄生胞内部の平均虫体数は差がなく、増殖率に差はないと考えられた (図 1)。しかしながら、それ以降は、親株では経時的に寄生胞内部の平均虫体数が増加していったのに対し、遺伝子破壊株では、寄生胞内部の平均虫体数の増加が緩やかになっていった。一方、寄生胞内に一匹のみ虫体が存在する寄生胞の割合を、経時的に計測していったところ、感染後 24 時間程度までは親株、遺伝子破壊株とも同様な速度で、その割合が低下していったが、それ以降、親株では低い割合 (5 ~ 10% 程度) を維持したのに対し、遺伝子破壊株では、その割合が上昇した (20% 程度) (図 2)。これらの結果から、親株及び遺伝子破壊株間において、原虫の増殖率は変わらないが、遺伝子破壊株では親株と比して虫体の宿主細胞からの脱出 (egress) が早く起こっており、egress により細胞外へと放出された虫体が周りの細胞へと再感染していることが考えられた。その結果、親株と比して、遺伝子破壊株では寄生胞内の平均虫体数が少なくなり、寄生胞内に虫体が 1 匹のみ存在する寄生胞の割合が

高くなったと考えた。これを確認すべく、egress が起こった寄生胞の割合を経時的に計測したところ、遺伝子破壊株の方が有意にその割合が高かった（図3）。以上の結果より、同定された新規 dense granule タンパク質はトキソプラズマ原虫の egress 時期の制御に関わるタンパク質であることが明らかとなった。

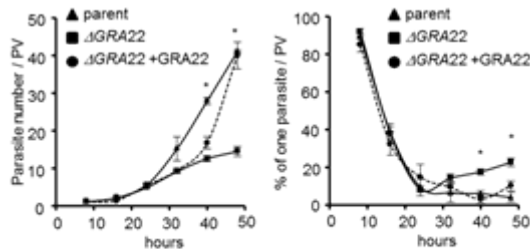


図1 増殖率 図2 虫体が1匹の寄生胞割合

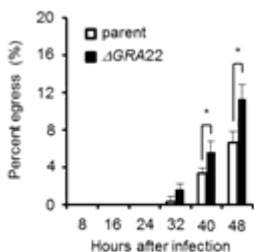


図3 egressした寄生胞の割合

(2) 前項(1)により示された遺伝子破壊株の表現型が当該遺伝子の破壊によりもたらされている物であることを確認するために、遺伝子破壊株に対して相補実験を行った。相補された遺伝子破壊株は、親株と同じような表現型を示し、遺伝子破壊株で認められた表現型異常が、当該遺伝子の破壊によりもたらされていることが確認された（図1、2）。

(3)同定された新規 dense granule タンパク質は既知の dense granule タンパク質と異なり、N 末端にシグナルペプチド配列を有していなかった。また、N 末端には21アミノ酸から構成される10～12回の繰り返し配列を有していた。興味深いことに、トキソプラズマ原虫に近縁なネオスポラ原虫における当該タンパク質のホモログ遺伝子を調べたところ、C 端側は高い相同性を有していたが、この繰り返し配列領域は保存されていなかった。当該タンパク質に関して、さらに詳しく調べるために、繰り返し配列よりC 端側を欠失させたタンパク質を発現するプラスミド（GRA22N）及び繰り返し配列部分のみを欠失させたタンパク質を発現するプラスミド（GRA22ΔTR）を作製し、当該遺伝子の破壊株を用いて、相補実験し、当該タンパク質の N 端側及び C 端側の機能を検討した（図4）。寄生胞内の平均虫体数を指標に検討したところ、繰り返し配列のみを欠失させたタンパ

ク質（GRA22ΔTR）は相補できたが、C 端側を欠失させたタンパク質（GRA22N）では相補できなかった。また、組換えタンパク質の局在を検討したところ、繰り返し配列を欠失させたタンパク質（GRA22ΔTR）では局在に異常が認められた（data not shown）。以上の結果より、当該タンパク質の繰り返し配列領域はタンパク質の局在に関わり、C 末端側は機能に関わっていることが明らかとなった。

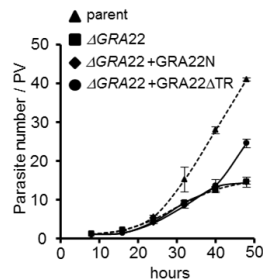


図4 組換えタンパク質による相補実験

(4) 親株及び遺伝子破壊株の寄生胞の構造を電子顕微鏡で詳細に検討した。しかしながら、寄生胞の微細構造に形態的な変化を見出すことはできなかった（図5）。

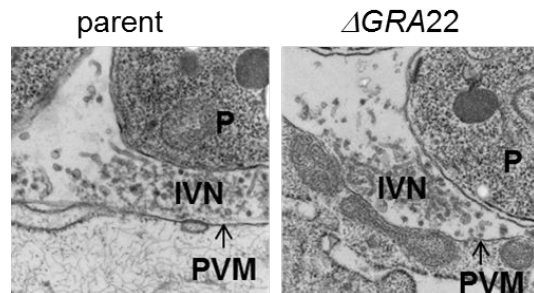


図5 寄生胞の電顕画像

(5) 親株及び遺伝子破壊株をそれぞれマウスに感染させ、病原性や免疫応答性を検討した。しかしながら、病原性に差は認められなかった（図6）。

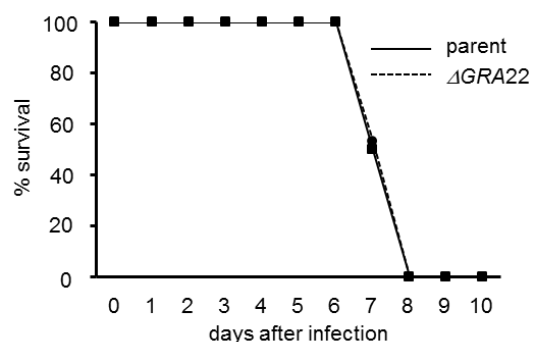


図6 病原性

(6) 当該タンパク質とそれ以外の dense granule タンパク質との相互作用を *in vitro* で検討した。当該タンパク質の発現プラスミド及び V5 タグを付加したそれ以外の dense granule タンパク質を発現するプラスミドをそれぞれ作製し、当該タンパク質と相互作用する dense granule タンパク質を共沈実験により探索した。その結果、GRA6 および GRA15 が当該タンパク質と相互作用していることが示唆された (data not shown)。

(7) GRA6 及び GRA15 の組換えタンパク質を精製し、マウスに免疫してポリクローナル抗体を得た。これらの抗体を使用し、トキソプラズマ原虫感染細胞 lysate より免疫沈降実験を行い、当該タンパク質と GRA6 あるいは GRA15 が *in vivo* で相互作用しているかを検討したが、相互作用は確認できなかった (data not shown)。

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 1 件)

Tadashi Okada, Dini Marmansari, Zeng-mei Li, Altanchimeg Adilbish, Shishenkov Canko, Akio Ueno, Haruhi Shono, Hidefumi Furuoka, Makoto Igarashi, A novel dense granule protein, GRA22, is involved in regulating parasite egress in *Toxoplasma gondii*., Mol Biochem Parasitol., 査読有, 189, 2013, 5-13
DOI: 10.1016/j.molbiopara.2013.04.005.

〔学会発表〕(計 2 件)

岡田只土、トキソプラズマ GRA22 の宿主細胞からの脱出時機制御機構への関与、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 4 日、神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

岡田只土、トキソプラズマ GRA22 は宿主からの脱出時機制御機構に関与する、第 156 回日本獣医学会学術集会、2013 年 9 月 21 日、岐阜大学 (岐阜県・岐阜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 只土 (OKADA, Tadashi)
中部大学・生命健康科学部・研究員
研究者番号: 30623855