

受理年月日	受理番号

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 27 年 5 月 26 日

採択番号	26 共同-3		
研究部門	生体防御学	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	玄 学南
研究課題名	トキソプラズマ潜伏感染が誘導する抗ウイルス自然免疫応答の分子基盤の解明		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	まさたに たつのり 正谷 達瞻	鹿児島大学共同獣医学部附属 越境性動物疾病制御研究センター 特任助教	
研究分担者			
	げん がくなん 玄 学南	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授	
研究期間	平成 26 年 4 月 1 日 ~ 平成 27 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	トキソプラズマは、ヒトを含めた多くの哺乳類に感染する人獣共通感染原虫である。同原虫は宿主体内で急性感染期のタキゾイトから潜伏感染期のブラディゾイトへとステージ変換し、休眠状態となって終生寄生する。申請者らは、ブラディゾイト潜伏感染細胞では強い抗ウイルス活性を持つ種々の自然免疫関連蛋白質遺伝子 (OAS1 および ISG15 など、I 型インターフェロン (IFN) に誘導されるもの) が強く発現していることを見いだしている。本研究では、トキソプラズマ潜伏感染が宿主の抗ウイルス自然免疫応答を亢進させる分子機構と意義を明らかにする目的で、マウス宿主宿主抗ウイルス自然免疫系に作用する原虫由来分泌蛋白質の探索や、原虫感染マウスモデルへの種々のウイルス接種攻撃試験を行った。		
研究経過の概要	<p>①宿主抗ウイルス自然免疫を発動する原虫因子を探索する目的で、研究分担者である帯広畜産大学・玄学南教授らによって作成された、トキソプラズマ各ステージの総遺伝子発現量データベースより、分泌器官であるロプトリー、デンスグラニュール、マイクロネーム由来因子のうちブラディゾイトで発現が上昇している遺伝子を抽出した。これらを哺乳類発現ベクターに組み込み、発現プラスミドを作出した。これと STAT1 結合領域である ISRE の下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだレポータープラスミドを 293T 細胞に導入し、自然免疫誘導能を評価した。</p> <p>②トキソプラズマ潜伏感染マウスに RNA ウイルスである日本脳炎ウイルスに引き続き、DNA ウイルスである単純ヘルペスウイルスを致死量脳内接種し、ウイルス接種後のマウスの生残率を検討した。</p>		

受理年月日	受理番号

<p>研究成果の概要</p>	<p>①トキソプラズマ各ステージの総遺伝子発現量データベースより、2種類のロプトリー蛋白質及び2種類のデンスグラニュール蛋白質ならびに6種類のマイクロネーム蛋白質が、タキゾイト期よりもブラディゾイト期で強く発現上昇していることが分かった。これらのうちロプトリー蛋白質及びデンスグラニュール蛋白質については、発現系を用いたレポーターアッセイの結果 ISRE 活性に影響を与えなかった。マイクロネーム蛋白質についてはクローニングを継続中である。</p> <p>②トキソプラズマ潜伏感染マウス（5週齢 C57BL6、トキソプラズマ PLK 株 1000 個を腹腔投与後 30 日のもの）に単純ヘルペスウイルスを脳内接種した。その結果、PLK 株を感染させていないマウスのウイルス接種後生残率は 20%以下であったのに対し、あらかじめ PLK 株を感染させたマウスの生残率は 70%以上であった（図 1）。すなわち、トキソプラズマ潜伏感染が誘導する自然免疫誘導は RNA ウイルスだけでなく DNA ウイルスにも効果があることが確認された。</p> <div data-bbox="683 808 1497 1413"> <table border="1"> <caption>図1. 単純ヘルペスウイルス(HSV-1 F株)攻撃後のマウス生残率</caption> <thead> <tr> <th>ウイルス攻撃後日数</th> <th>PLK潜伏感染マウス (n=8) 生残率 (%)</th> <th>PLK非潜伏感染マウス (n=15) 生残率 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>100</td><td>100</td></tr> <tr><td>2</td><td>100</td><td>100</td></tr> <tr><td>3</td><td>100</td><td>100</td></tr> <tr><td>4</td><td>100</td><td>100</td></tr> <tr><td>5</td><td>100</td><td>28</td></tr> <tr><td>6</td><td>88</td><td>28</td></tr> <tr><td>7</td><td>75</td><td>22</td></tr> <tr><td>8</td><td>75</td><td>15</td></tr> <tr><td>9</td><td>75</td><td>15</td></tr> <tr><td>10</td><td>75</td><td>15</td></tr> <tr><td>11</td><td>75</td><td>15</td></tr> <tr><td>12</td><td>75</td><td>15</td></tr> <tr><td>13</td><td>75</td><td>15</td></tr> <tr><td>14</td><td>75</td><td>15</td></tr> </tbody> </table> <p>図1. 単純ヘルペスウイルス(HSV-1 F株)攻撃後のマウス生残率 <i>T. gondii</i> PLK株を4週齢 C57/BL6(♀)に1000個腹腔投与し、30日後にマウス脳内にHSV-1を脳内接種した。陰性対照として、PLK株を接種していないマウスにもHSV-1を接種した。</p> </div>	ウイルス攻撃後日数	PLK潜伏感染マウス (n=8) 生残率 (%)	PLK非潜伏感染マウス (n=15) 生残率 (%)	1	100	100	2	100	100	3	100	100	4	100	100	5	100	28	6	88	28	7	75	22	8	75	15	9	75	15	10	75	15	11	75	15	12	75	15	13	75	15	14	75	15
ウイルス攻撃後日数	PLK潜伏感染マウス (n=8) 生残率 (%)	PLK非潜伏感染マウス (n=15) 生残率 (%)																																												
1	100	100																																												
2	100	100																																												
3	100	100																																												
4	100	100																																												
5	100	28																																												
6	88	28																																												
7	75	22																																												
8	75	15																																												
9	75	15																																												
10	75	15																																												
11	75	15																																												
12	75	15																																												
13	75	15																																												
14	75	15																																												
<p>研究成果の発表</p>	<p>学会発表</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) <u>Masatani T, Yamagishi J, Xuan X.</u> Anti-viral innate immune responses induced by infection with bradyzoites. 13th International Congress of Parasitology (ICOPAXIII), Mexico, Aug. 2014 2) <u>正谷達膳、山岸潤也、玄学南</u> 「トキソプラズマ潜伏感染が誘導する宿主抗ウイルス自然免疫応答とその意義」 第157回日本獣医学会学術集会（札幌）2014年9月 3) <u>正谷達膳、山岸潤也、玄学南</u> 「細胞内寄生原虫トキソプラズマが誘導する自然免疫応答とその抗ウイルス効果」第62回日本ウイルス学会学術集会（横浜）2014年11月 																																													