

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 30 年 5 月 10 日

採択番号			
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	トキソプラズマ虫体細胞膜の生体膜マイクロドメインを ナノスケールレベルで可視化する		
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・准教授	
研究分担者	ふじた あきかず 藤田 秋一	鹿児島大学共同獣医学部分子病態学分野・教授	
	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 29 年 4 月 1 日 ~ 平成 30 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	真核生物の細胞膜表面には「ラフト」や「カベオラ」と呼ばれる生体膜マイクロドメインが存在する。これらには種々の膜蛋白質が集積しており、細胞内シグナル活性化や物質輸送を司る重要な構造であることが分かってきた。しかし、原虫細胞膜の生体膜マイクロドメインに関する研究はほぼ皆無であり、その構成脂質成分も不明である。本研究ではトキソプラズマを対象とし、凍結切断レプリカ法ならびに脂質成分特異的標識法を組合せ、電子顕微鏡によるナノスケールレベルでの分子観察を行う。トキソプラズマの生体膜マイクロドメインを破壊すること無く可視化し、さらに構成する脂質成分の特定を目指す。		
研究経過の概要	①生体膜マイクロドメインであるラフト及びカベオラがトキソプラズマの膜表面に存在すかどうか注目して研究を行なった。蛍光抗体法を用いることで、ラフトマーカ分子であるガングリオシド：GM1 及び GM3 が虫体表面に存在するかどうかを検討した。トキソプラズマ RH 株を培養、回収したのちガラスプレート上に貼り付け、固定した。GM1 マーカーであるコレラトキシン 1b または GM3 特異的抗体を用いて。蛍光抗体法によって可視化を試みた。その結果、トキソプラズマ虫体表面においてこれらガングリオシドの存在を確かめることはできなかった。この結果は、哺乳類細胞とは異なり、トキソプラズマ虫体表面にはラフト及びカベオラが無いこと、あるいは哺乳類細胞とは構成要素が異なることを示唆している。現在、より詳細に調べる目的で、下の②に示したように電子顕微鏡を用いて標識・解析を実施している。		

受理年月日	受理番号

② トキソプラズマを材料とし、急速凍結切断レプリカ法により膜レプリカを作製できるかどうかを検証した。トキソプラズマ RH 株を培養、回収したのち、金箔及び銅板ではさみ、液体窒素によって急速凍結した。これを蒸着装置に挿入し、脂質二重膜のうち外側の膜をナイフで削り取り凍結切断を行なった。むき出しになった内側の膜へカーボン蒸着し、膜レプリカを作成した。トキソプラズマ表面抗原分子である SAG1 に対する抗体および金コロイド標識二次抗体を用いて本膜レプリカを標識したところ、原虫膜表面の広範囲にシグナルを認めた。すなわち、今回作製した膜レプリカが、金コロイド標識による分子局在解析に適用可能であることが示された (図 1)。以上より、本年度は本技術の確立と技術習得に専念し、トキソプラズマでも実施可能であることを示すことができた。

研究成果の
概要

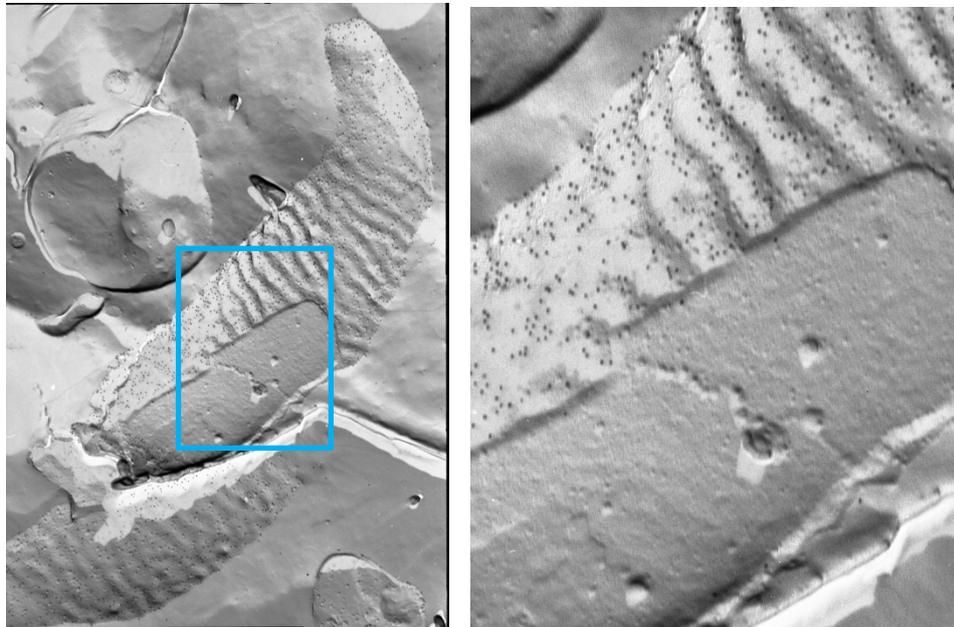


図 1 トキソプラズマ膜レプリカにおける SAG1 の分布。
左の図の青枠を拡大したものが右の図。黒いドットは金コロイドによるシグナルであり、SAG1 が細胞膜表面に存在することを示している。

研究成果の
発表

なし。