

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31年4月15日

採択番号	30 共同-2		
研究部門	感染免疫部門 生体防御学分野	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	西川 義文教授
研究課題名	哺乳動物細胞へのトキソプラズマ感染における宿主・ミトコンドリアの形態 および生理機能への影響		
研究代表者	(ふりがな) 氏名	所属部局等・職名	
	こしば たくみ 小柴 琢己	九州大学 大学院理学研究院・准教授	
研究分担者	まつお なおてる 松尾 尚輝	九州大学 大学院システム生命学府・大学院生	
	やすかわ かい 安川 開	九州大学 大学院システム生命学府・大学院生	
	西川 義文	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授	
研究期間	平成30年 4月 1日 ~ 平成31年 3月31日		
目的・趣旨	<p>細胞内におけるエネルギー産生工場であるミトコンドリアは、真核生物の代謝系を中心に生命機能の維持には不可欠なオルガネラである。近年、ミトコンドリアの新たな役割として抗ウイルス自然免疫におけるプラットフォームとして機能していることが明らかになってきた。私たちの研究グループでは、これまでにミトコンドリアを介した抗ウイルス自然免疫についての一貫した研究を進めおり、その生理的な重要性を世界に先駆けて明らかにしてきた (Sci. Signal 2009, 2011 ; PNAS 2013 ; Nat. Commun. 2014 ; Sci. Rep. 2017)。</p> <p>本研究の目的は、トキソプラズマを始めとした原虫に感染した宿主細胞内でミトコンドリアがどのような振る舞いをするのか、これまでに行ってきたウイルスでの知見とは異なる新たな相互作用に情報を得ることにある。一方で、原虫（感染者）側のミトコンドリアの役割にも着目し、感染前後における原虫側のミトコンドリア機能変化が宿主への病原性に及ぼす影響も理解したいと考えた。そこで、本研究では宿主および感染微生物の両者のミトコンドリアの働きに注目した、それぞれの相関解析を行った。</p>		

受理年月日	受理番号

<p>研究経過の概要</p>	<p>これまでの先行研究 (PLoS Biol. 2014) や、我々の予備知見において、トキソプラズマ感染細胞内において一部のミトコンドリアがタキゾイド周辺に集まり、あたかも特異的な相互作用が行われている様子が顕微鏡像により確認された (未発表データ)。このようなミトコンドリアの観察像がどのような生理的な意義を持つのかを生化学的、及び細胞生物学的な実験を駆使して明らかにすることを研究目的として。具体的に以下のような実験計画を行った。</p> <p>1) 宿主ミトコンドリア-原虫間における物質輸送の解析; 宿主ミトコンドリアから原虫側へ ATP やタンパク質を始めとした物量の輸送や、その逆行輸送が行われているかを細胞分画によりそれぞれを単離調製し、質量分析などから物質の特定を試みた。</p> <p>2) 宿主ミトコンドリア-原虫間の隣接の作用機序解析; 宿主ミトコンドリアと原虫の隣接に関わる両者の責任タンパク質群を同定する。トキソプラズマゲノムの相補遺伝子をクローニングした発現ライブラリー (西川研究室) を哺乳動物細胞にトランスフェクションし、発現細胞内のミトコンドリア形態を免疫染色法にて観察する。また、遺伝子改変トキソプラズマを作製し、両者隣接の作用機序を明らかにすることを試みた。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>トキソプラズマが感染細胞内で分泌する GRA ファミリータンパク質群に注目した。計 17 種類の GRA 遺伝子 (FLAG タグ付加) を培養細胞に導入し、細胞分画と免疫染色法により、発現したそれぞれの GRA タンパク質の細胞内における局在解析を行った。初めに、HEK293 を用いた細胞分画法による実験では、多くの GRA タンパク質がミトコンドリアを含んだ画分に含まれていることが確認できた。そこで、三種類の培養細胞 (Hela、MEF、及び A549 細胞) にこれら GRA 遺伝子を導入し、その細胞内局在を免疫染色法により詳細に調べた。その結果、GRA8、9、16、及び 25 発現細胞においてそれらの局在がミトコンドリアのマーカータンパク質と非常によく一致している像が得られた。特筆すべきは、GRA8 に関して、その発現細胞内における局在箇所の約 7 割以上がミトコンドリアと一致していた。一方、GRA9 及び 25 に関しては、一部の発現タンパク質においてミトコンドリアとの局在が観察されたが、それ以外のタンパク質においてはほぼ細胞質中に存在していた。また、GRA16 においても高い割合でミトコンドリア局在が観察されたが、大部分は核に局在していることが明らかになった。</p> <p>そこで、これら 4 種類の GRA タンパク質がミトコンドリアのどの部分に局在しているのか、その局在様式を詳細に調べるために、次に細胞分画により得られたミトコンドリア画分を高塩濃度 (KCl) の緩衝液で洗浄し、その一部の画分にはプロテアーゼを添加することでミトコンドリア上に蓄積している可能性のあるタンパク質の消化実験を試みた。その結果、4 種類全ての GRA 発現細胞から得られたミトコンドリアでは、GRA タンパク質の存在が確認できなくなったことから、これら 4 種類のタンパク質は全てミトコンドリア外膜上に局在していると考えた。また、高塩濃度の緩衝液で洗浄した場合でも同様に、GRA タンパク質の存在が確認できなくなったことから、これらタンパク質は静電的にミトコンドリア膜や外膜上のタンパク質と相互作用している可能性が示唆された。最後に、これら 4 種類の GRA タンパク質と相互作用する宿主細胞内タンパク質を調べる目的で免疫沈降も行った。予備的な結果では、各種相互作用候補因子を確認できている。</p>

(様式1-3)

受理年月日	受理番号

研究成果の 発表	該当年度は、特になし。
-------------	-------------