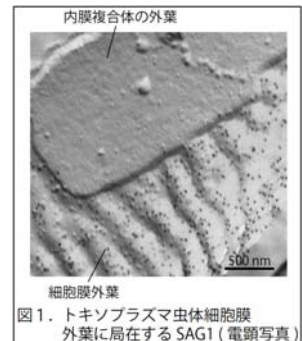
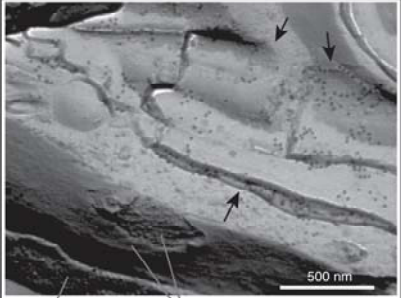
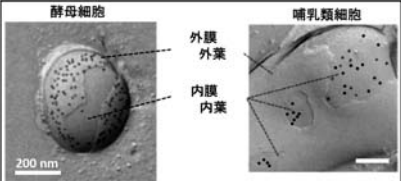


帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和2年5月20日

採択番号	2019-共同-11		
研究部門	感染免疫研究部門	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	トキソプラズマにおけるオートファゴソームの微細構造と構成膜脂質の ナノスケールレベルでの分布解析		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	ふじた あきかず 藤田 秋一	鹿児島大学共同獣医学部・教授	
研究分担者	まさたに たつり 正谷 達膳	鹿児島大学共同獣医学部・准教授	
	玄 学南	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授	
研究期間	2019年4月1日 ～ 2020年3月31日		
目的・趣旨	<p>酵母の遺伝的解析研究によって動物細胞でもオートファジー制御機構の詳細が明らかにされてきた。最近、同じ真核生物であるトキソプラズマについても、ミトコンドリア維持あるいは細胞分裂にオートファジーの関与が示唆されているが、哺乳類細胞など一般生物との違いが多く、その詳細は不明である。本研究では、申請者らが開発した急速凍結・凍結割断レプリカ法および免疫電子顕微鏡技術を駆使し、トキソプラズマのオートファゴソームの微細構造およびそれを形成する脂質膜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行う。その成果に基づき、原虫におけるオートファジーの機能解明を目指す。</p>		
研究経過の概要	<p>申請者らは、急速凍結・凍結割断レプリカ標識(QF-FRL)法によって脂質ラフト成分であるSAG1がトキソプラズマ虫体細胞膜外葉にのみ局在することを予備実験で明らかにしている(図1の金コロイド,研究成果の1)。本研究では原虫のオートファゴソームの構成脂質成分を世界に先駆けて明らかにした。また、生体膜内で動き回る脂質を瞬時に凍結固定する本方法を使えば、生きた細胞の状態での脂質分布を明らかにできるため、正確なデータを獲得することが可能となる。</p> <p>さらに申請者らは QF-FRL 法によって膜脂質を特異的に標識することが可能であることを示し、哺乳類培養細胞の細胞膜外葉の糖脂質 GM1, GM3、内葉のフォスフォイノシチド PI(4,5)P2 および PI(4)P の二次元的分布をナノレベルで解明することに成功した</p>		



<p>研究成果の概要</p>	<p>(藤田秋一ら, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i>, 2009; <i>Nat. Protocol</i>, 2010; 程, 藤田秋一, 大隈良典ら, <i>Nat. Commun.</i> 2014)。本研究の主題である細胞の自食作用(オートファジー)においては、細胞飢餓時での自食作用に関与するオートファゴソームの形成にホスホイノシチドの PI(3)P が必須であることは広く知られている。</p> <p>本研究では、単離精製した <i>Toxoplasma gondii</i> の細胞内における PI(3)P の微細分布を可視化することに成功した(図2)。しかしながら、酵母あるいは哺乳類培養細胞で観察された様な二重膜構造をしたオートファゴソーム(図3)の形成は明確にできなかった。今後は飢餓状態あるいは薬物処理によりオートファジー誘導時での PI(3)P の微細分布の解析を行い、無処置の <i>T. gondii</i> の細胞内構造と比較することにより、PI(3)P 陽性のオートファゴソーム様構造を検索する予定である。</p>	 <p>細胞膜 Inner membrane complex 図2. トキソプラズマ虫体の細胞内でのPI3Pの局在(電顕写真)</p>  <p>酵母細胞 外膜 内膜 哺乳類細胞 図3. オートファゴソームでのPI(3)Pの分布(電顕写真) PI(3)Pの標識が、酵母細胞では外膜にあり、内膜内葉にはない。ところが哺乳類細胞では内膜内葉にあり、外膜にはないことがわかる。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Kurokawa Y, Masatani T, Konishi R, Tomioku K, Xuan X, Fujita A. Nanoscale analysis reveals no domain formation of glycosylphosphatidylinositol-anchored protein SAG1 in the plasma membrane of living <i>Toxoplasma gondii</i>. <i>Histochem Cell Biol.</i> 2019, 152: 365-375. doi: 10.1007/s00418-019-01814-3. 2. 小西里可子、黒川夕奈、富奥甘奈、正谷達膳、藤田秋一、免疫電顕法を用いたヒト細胞感染トキソプラズマ生体膜に置ける脂質分子の微細局在. 第92回 日本生化学大会、横浜、2019年9月18日. 	