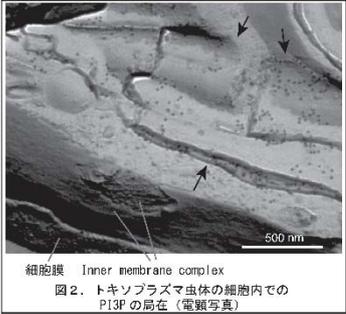


帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和3年5月26日

| | | | |
|---------|---|---|------|
| 採択番号 | 2020-共同-5 | | |
| 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 | 岐阜大学 応用生物科学部 共同獣医学科 人獣共通感染症学 研究室・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 | 2020年4月1日 ~ 2021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・凍結切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・凍結切断レプリカ標識(QF-FRL)法によって脂質ラフト成分である糖脂質の GM3 が <i>Toxoplasma gondii</i> の細胞膜には全く存在せず、inner membrane complex の外葉に局在することを明らかにした(図1の金コロイド,研究成果の1)。本研究では、単離精製した <i>T. 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。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う予定にしている。</p> | | |



| | |
|----------------|--|
| <p>研究成果の概要</p> | <p>我々は脂質の超微局在を明らかにすることが、膜脂質の機能を解明するために必須であると考え、そのための方法開発に注力してきた。その結果、急速凍結・凍結切断レプリカ標識法(QF-FRL: Quick Freezing & Freeze-fracture Labeling)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た。本研究では、この QF-FRL 法を用いることにより、脂質ラフトの主成分である糖脂質の GM1 および GM3 の微細分布を明らかにし、<i>T. gondii</i> における脂質ラフトの機能関与の解明を目指した。本来、哺乳類細胞では、脂質ラフトは細胞膜の外葉に存在するが、<i>T. gondii</i> においては、糖脂質の GM3 は細胞膜に存在せず、細胞内の inner membrane complex (IMC)の外葉に局在することが明らかとなった(図1)。このことは、<i>T. gondii</i> の運動に関与するグライドソームが IMC に局在し、その局在には IMC のラフトドメインが重要な役割を担うことが示唆されており、今回明らかになった、ラフトの主成分である GM3 が細胞膜でなく、IMC の外葉に存在することとよく一致する。一方、ヒト線維芽細胞 HFF-1 に感染した <i>T. gondii</i> においては、もう一つの GM1 は全く局在していなかった。また、HFF-1 細胞の細胞膜においては、GM1 は発現せず、GM3 のみが発現していた。一方、マウス線維芽細胞 MF においては、細胞膜に GM1 と GM3 の両方が発現していた。MF 細胞に感染した <i>T. gondii</i> においては、IMC の外葉には、GM3 が局在すると同時に、少量ながら GM1 も局在することが明らかとなった。これらのことから、哺乳類細胞に感染した <i>T. gondii</i> において、糖脂質 GM1 および GM3 は感染宿主細胞から搾取していることが示唆された。</p> <p>本研究では、単離精製した <i>T. 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>研究成果の発表</p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. Rikako Konishi, Yuna Kurokawa, Yuna Kurokawa, Kanna Tomioku, Tatsunori Masatani, Xuenan Xuan, Akikazu Fujita. Raft microdomains localized in the luminal leaflet of inner membrane complex of living <i>Toxoplasma gondii</i>. <i>Eur. J. Cell Biol.</i> 100, 151149, 2021. 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おける脂質分子の微細局在. 第93回 日本生化学大会、横浜(web 開催)、2020年9月14日. |