

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2022年5月23日

採択番号	2021-共同-2		
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	西川 義文
研究課題名	トキソプラズマ分泌性タンパク質群の宿主ミトコンドリアとの相互作用解析		
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	福岡大学 理学部化学科・教授	
研究分担者	にしごり みつひろ 錦織 充広	福岡大学 理学部化学科・助教	
	にし しょうへい 西 翔平	福岡大学 大学院理学研究科・大学院生	
	にしかわ よしふみ 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	2021年4月1日 ～ 2022年3月31日		
目的・趣旨	<p>細胞内におけるエネルギーの産生場であるミトコンドリアは、真核生物の代謝系や品質管理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奇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が着目されている。これまで代表者は、ミトコンドリアを介した抗ウイルス自然免疫について一貫した研究を進め、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 (<i>Sci. Signal.</i> 2009, 2011; <i>PNAS</i> 2013; <i>Nat. Commun.</i> 2014, 2019, 2020; <i>Sci. Rep.</i> 2017; <i>iScience</i> 2019, 2020; <i>JBC</i> 2020)。</p> <p>本研究の目的は、トキソプラズマ原虫に感染した宿主内でのミトコンドリアがどのような影響を受け、またその際のタンパク質を通じた新たな相互作用に関しての学術的知見を得ることにあり、これまでに行ってきた抗ウイルス自然免疫研究との共通点や相違点を発掘することにある。そこで本研究期間では、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のミトコンドリアへの局在に関する生化学的及び細胞生物学的な解析を主に行った。</p>		

<p>研究経過の概要</p>	<p>海外の研究チームによる研究結果では、タイプ I 型のトキソプラズマに感染した細胞内において一部の宿主ミトコンドリアがタキゾイド周辺に集まり、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ている (PLoS Biol. 2014)。その生理的な意義を解明するために、本研究では以下のような実験を行った。</p> <p>1) 西川研究室にて作製されたトキソプラズマゲノムの相補遺伝子 (GRA ファミリー) をクローニングした発現ライブラリー (FLAG タグ付加) を哺乳動物細胞 (HeLa) に遺伝子導入し、それら発現細胞内のミトコンドリア形態を免疫染色法 (抗 COX IV) にて観察した。</p> <p>2) 上記、プラスミドを哺乳動物細胞 (HEK293) にもトランスフェクションし、発現細胞よりミトコンドリア分画を行い、ミトコンドリア画分をウエスタンブロット法 (抗 FLAG) により解析した。</p> <p>3) 上記の実験により、ミトコンドリアへの局在が示された GRA タンパク質の安定発現株 (HEK293) を樹立した。その際にはタグとして、Myc タグを用いた。</p> <p>4) 樹立した安定発現株を用いて、免疫沈降実験を行い、GRA タンパク質と相互作用する因子を網羅的に探索した。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>西川研究室にて作製された計 17 種類の GRA 遺伝子 (FLAG タグ付加) を HeLa 細胞に導入し、免疫染色法により、発現した各 GRA タンパク質の細胞内局在解析を行った。その結果、GRA8 及び GRA25 において綺麗なミトコンドリアへの局在が確認できた。</p> <p>次に、GRA8 及び GRA25 の発現プラスミドをそれぞれ HEK293 細胞へトランスフェクションし、その後に細胞からミトコンドリア分画を行い、得られたミトコンドリア画分をウエスタンブロット法 (抗 FLAG) により解析した。その結果、GRA25 においては非常に高い割合でミトコンドリア画分に局在していることが明らかになった一方で、GRA8 は発現量がそれほど多くはなく検出されたタンパク質も比較的その多くが細胞質中に存在していた。以上の結果から、トキソプラズマの GRA25 は宿主内ミトコンドリアと高い親和性を示すことが示唆された。そこで、GRA25 の詳細なミトコンドリア局在様式を調べるために、このタンパク質に Myc を付加した組換え体の安定発現株を HEK293 細胞にて樹立した。樹立した安定発現株は、GRA25 を発現している以外は特に大きな細胞への影響は見られずに、成長速度もコントロール細胞と大差はなかった。次に、この安定発現株を用いて GRA25 と相互作用する宿主細胞内タンパク質を調べた。実験方法としては、免疫沈降法を用いて行い、細胞抽出液に抗 Myc 抗体を添加し、Protein G アガロース樹脂にて共免疫沈降を確認した。その結果、複数のミトコンドリア外膜タンパク質が沈殿していることがプロテオーム解析により明らかになった。現在は、GRA25 を欠損した組換え原虫を作製中であり、今後はその表現型解析も含めて研究を進める予定である。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>該当年度は、特になし。</p>