

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31日

採択番号	2021-共同-4		
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	
	げん がくなん 玄 学南	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>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) 法によってグリセロリン脂質の一つであるホスファチジルセリン (PtdSer) の局在を検討し、感染力の強い <i>Toxoplasma gondii</i> の RH 株と感染力の低い PLK 株細胞膜で違いのあることを明らかにした (図 1 の金コロイド)。本研究では、単離精製した <i>T. gondii</i> を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 PtdIns(3)P の微細分布の解析を行なった。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。今後はさらに条件検討をすることによりオートファゴソームでの PtdIns(3)P の局在を検討する予定にしている。</p>		

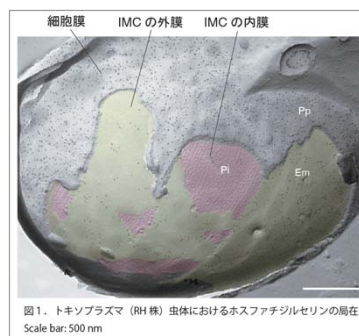


図1. トキソプラズマ (RH株) 虫体におけるホスファチジルセリンの局在
Scale bar: 500 nm

<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、<i>T. gondii</i> においてグリセリン脂質の一つであるホスファチジルセリン(PtdSer)の微細分布を明らかにした(図1)。<i>T. gondii</i>において RH 株および PLK 株ともに、PtdSer は細胞膜、inner membrane complex (IMC)膜の外膜の内葉、外葉ともに存在が確認できたが、いずれの膜においても内葉の方がその密度は高いものであった。しかしながら、IMC の内膜では、PtdSer は外葉には局在するものの、内葉には存在しなかった。RH 株と PLK 株を比較した場合、いずれの膜においても内葉に局在する PtdSer の密度に差は見られなかったものの、外葉では RH 株の方が PLK 株よりも有意に高いものであった。RH 株と PLK 株の宿主細胞への感染性を比べた場合、RH 株の方が高いことが報告されている。このことから、<i>T. gondii</i>の生体膜の PtdSer の発現量がその感染力に影響していることが示唆された。さらに、<i>T. gondii</i>では PtdSer が IMC 膜の内膜では内葉に存在しないことから、IMC の内膜と外膜との間に PtdSer の拡散を妨げる何らかの障壁が存在することが示唆された。</p> <p>また本研究では、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、飢餓状態あるいは薬物処理によりオートファジー誘導を行なった <i>T. gondii</i> においても、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観察することはできなかった。今後はオートファジー誘導を行う条件検討を行い、オートファゴソーム様構造の観察をできるよう予定しており、同時に PI(3)P の微細分布の解析を行う。</p> <div data-bbox="949 712 1452 1355" data-label="Image"> </div>
<p>研究成果の発表</p>	<p>1.小西里可子、向達汐美、福田佳代子、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ホスファチジルセリンの微細局在. 第 95 回 日本生化学大会、名古屋、2022 年 11 月 9 日(予定).</p>