

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2023年6月6日

採択番号	2022-共同-16		
研究部門	創薬研究部門	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タンパク質の宿主ミトコンドリア機能に対する影響解析		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	にしごり みつひろ 錦織 充広	福岡大学理学部化学科・助教	
研究分担者	こしば たくみ 小柴 琢己	福岡大学理学部化学科・教授	
	ひらた せりな 平田 聖里菜	福岡大学大学院理学研究科・大学院生	
	まき ゆうか 牧 優香	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	2022年4月1日 ～ 2023年3月31日		
目的・趣旨	<p>細胞内小器官の1種であるミトコンドリアはエネルギー産生工場として機能し、真核生物における代謝系などの生命機能の維持に不可欠な役割を果している。近年の研究より、ミトコンドリアは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示されてきた。我々は、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一貫した研究を進め、世界に先駆けてミトコンドリアの生理的な重要性を明らかにしてきた (<i>Nat. Commun.</i> 2014, 2019, 2020; <i>Sci. Rep.</i> 2017; <i>iScience</i> 2019; <i>JBC</i> 2020)。一方、トキソプラズマを始めとする寄生虫が哺乳細胞へ感染した際の宿主ミトコンドリアの役割はほとんど分かっていない。そこで本研究では、トキソプラズマ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挙動を示すかを明らかにすることを目的とする。特にトキソプラズマ原虫由来の分泌性タンパク質群と宿主ミトコンドリアの相互作用に着目し、病原性発現との関連性を明らかにする。また、感染原虫の持つ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ミトコンドリアの機能変化が病原性にどのような影響を及ぼすかについての理解を目指す。</p>		
研究経過の概要	<p>我々のこれまでの予備実験では、一部のトキソプラズマ分泌性タンパク質が宿主ミトコンドリアと強い親和性を持つことが生化学的な実験より明らかになった(未発表データ)。さらに、これらタンパク質を培養細胞内で過剰発現させると、宿主ミトコンドリアに局在することも見出した。これらの知見を基に、本研究では以下の研究計画を実施した。</p> <p>(1)これまでに、宿主ミトコンドリア結合性トキソプラズマタンパク質を恒常的に発現させたヒト培養細胞を用いた網羅的な相互作用タンパク質探索により、これらの原虫タンパク質と相互作用する宿主ミトコンドリアのタンパク質を複数種、同定している。そこで、抗体を用いた免疫沈降実験や遺伝子導入実験等を用いて、これらのタンパク質間の相互作用の</p>		

	<p>検証実験を試みた。</p> <p>(2)これまでのホスト研究室の西川義文教授との共同研究(2021年度、小柴琢己教授)では、宿主ミトコンドリア結合性トキソプラズマタンパク質の遺伝子改変原虫の作成に成功している。そこで遺伝子改変原虫を感染させた細胞を用いて、免疫染色による感染の確認や原虫の感染率・増殖能への影響評価などを実施した。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>まず、ミトコンドリア結合性トキソプラズマタンパク質の安定発現細胞を用いたプロテオーム解析情報に基づき、宿主ミトコンドリア側の相互作用タンパク質を探索した。これまでの細胞分画およびプロテアーゼ耐性実験の結果から、トキソプラズマタンパク質がミトコンドリア外膜に結合することが示されたため、特にミトコンドリア外膜タンパク質に着目して相互作用タンパク質を探索した。免疫沈降による検証実験では、ミトコンドリア外膜貫通型タンパク質および一部の MICOS 複合体構成タンパク質との相互作用が確認されたが、外膜タンパク質の相互作用は限定的であり、タンパク質間相互作用以外の結合要因が存在する可能性が示唆された。</p> <p>そこで、さらなる相互作用因子の探索のため、脂質アレイおよびリポソームを用いた結合試験により膜リン脂質とトキソプラズマタンパク質との相互作用について解析した。その結果、トキソプラズマタンパク質が特定のリン脂質と特異的に結合することが明らかとなった。さらに、この結合性はリン脂質の脂肪鎖長や不飽和度の違いにより変動することも示された。また、上記リン脂質の合成酵素のうち、ミトコンドリア外膜局在型のサブタイプとトキソプラズマタンパク質が相互作用することが免疫染色および免疫沈降の結果から明らかとなり、ミトコンドリア外膜のリン脂質を介した相互作用が存在することが予想された。</p> <p>一方、野生型およびタンパク質改変型トキソプラズマ原虫を Vero 細胞に感染させ、それぞれ 24, 48, 72 時間後におけるトキソプラズマ原虫の感染率、増殖率、エグレッション率の比較を行った。免疫染色により少なくとも 200 個以上のトキソプラズマ原虫をカウントし(N=4)、上記の値を算出したが、有意な差は見出されず、比較的期間での細胞感染では大きな影響は無いと考えられた。一方、プラークアッセイにより長期間での感染の影響を調べた結果、タンパク質改変型トキソプラズマ原虫では増殖が抑制されていることが明らかとなった。また、ミトコンドリア外膜局在型のリン脂質合成酵素の高発現細胞ではトキソプラズマ原虫のエグレッション率に変動があり、宿主ミトコンドリアが膜リン脂質を介して原虫へ影響を及ぼす可能性が示唆された。</p> <p>以上の内容については現在、論文にまとめて投稿中である。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>本共同研究の研究成果について、下記の学会、ワークショップにて発表を行った。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 錦織 充広: Analysis for the localization of <i>Toxoplasma gondii</i> secretory proteins to the host mitochondria., 第 28 回分子寄生虫学ワークショップ 第 18 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会(2022年8月)</li> <li>・ 錦織充広, 牧 優香, 西 翔平, 西川義文, 小柴琢己: 病原性寄生虫・トキソプラズマの分泌タンパク質と宿主ミトコンドリアの相互作用解析, 令和 4 年度日本生化学会九州支部例会(WEB 開催) (2022年6月)</li> <li>・ 錦織充広, 牧 優香, 西 翔平, 西川義文, 小柴琢己: トキソプラズマ原虫分泌タンパク質の宿主ミトコンドリア膜への局在化の解析, 第 91 回日本寄生虫学会大会(2022年5月)</li> </ul>