

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2024年4月9日

採択番号	2023-共同-1				
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性タンパク質と宿主ミトコンドリアの親和性解析				
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	2023年4月1日～2024年3月31日				
目的・趣旨	<p>細胞内小器官の一種であるミトコンドリアは、エネルギーの产生場として働き、様々な真核生物において代謝系を中心に生命活動を支えている。近年の研究では、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の機能も発揮していることが分かつてきた。私たちのグループでは、これまでミトコンドリアを介した抗ウイルス自然免疫に関する一貫した研究を行い、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など)。</p> <p>一方、トキソプラズマに代表される細胞内寄生虫が、哺乳動物へ感染した際の宿主内ミトコンドリアとの関わりについてはこれまでほとんど明らかになっていなかった。そこで本研究では、トキソプラズマ原虫に感染した宿主内で、宿主由来のミトコンドリアがどのような挙動を示すのか? その点を明らかにする研究を行った。特に、トキソプラズマ原虫が感染後に分泌する原虫由来の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、その際の病原性発現との関連性も明らかにしたい。さらに、本研究では原虫側の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も目指した。</p>				
研究経過の概要	<p>私たちの予備実験から、複数種類のトキソプラズマ分泌性タンパク質群が宿主ミトコンドリアと非常に強い親和性を持つことが生化学的な解析により明らかになった(学会発表を参照)。さらに、これらのタンパク質群を個別に培養細胞内で一過性発現させると、宿主由来のミトコンドリアに共局在することも見出した。これらの知見より、本研究では次の研究計画を実施した。</p> <p>(1)宿主ミトコンドリア結合性トキソプラズマタンパク質(TgGRA25)を恒常的に発現させ</p>				

	<p>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を行い、TgGRA25 と相互作用する宿主側のミトコンドリアタンパク質を同定した。それらの特異的抗体を用いて、免疫沈降実験により、TgGRA25 との相互作用を明らかにした。</p> <p>(2) 受入れ研究室の西川義文教授との共同研究により、TgGRA25 の欠損原虫及び遺伝子入れ戻し株を作製した。それら組換え原虫を用いた細胞への感染実験により TgGRA25 の生理的な役割を明らかにした。</p>
研究成果の概要	<p>初めに、特定した宿主ミトコンドリア結合性のトキソプラズマタンパク質(TgGRA25)の安定発現細胞株を用いてプロテオーム解析を行い、宿主ミトコンドリア側の相互作用タンパク質を網羅的に探索した。これまでの細胞分画やプロテアーゼ耐性実験などの実験結果から、TgGRA25 がミトコンドリア外膜に局在することが確認できたため、私たちはミトコンドリアの外膜タンパク質と TgGRA25 との関わりに着目してその相互作用タンパク質を探索した。その結果、免疫沈降法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できたが、外膜タンパク質群の相互作用は極めて限定的であり、タンパク質間相互作用以外の結合要因も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、私たちはリン脂質との結合解析および人工リポソームを用いてその結合様式について解析した。その結果、TgGRA25 が特定のリン脂質(特に PA)と特異的に結合することが明らかになった。この脂質との結合性は、リン脂質の脂肪鎖長や不飽和度の違いにも変動することも明らかになった。PA 合成酵素のうち、ミトコンドリア外膜局在型の PLD6 と TgGRA25 が相互作用することは、免疫沈降実験などからも明らかとなり、ミトコンドリア外膜のリン脂質を介した相互作用様式を知ることができた。</p> <p>一方で、野生型および TgGRA25 欠損原虫を Vero 細胞に感染させ、各 24, 48, 72 時間後におけるトキソプラズマの感染率、増殖率、エグレッション率の比較を検討した。免疫染色による結果では、TgGRA25 欠損による宿主への感染率への影響は有意な差としては見られず、増殖率においても大きな差は見られなかった。しかしながら、これら原虫株を用いたpla-que assayでは、TgGRA25 欠損によりトキソプラズマの増殖が抑制されていることが明らかとなった。さらに、PLD6 高発現細胞では原虫のエグレッション率に有意な変動が見られ、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大いに示唆された。現在、これらの研究成果は原著論文として学術雑誌に投稿中である。</p>
研究成果の発表	<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"> ・錦織充広、伴匡人、西川義文、小柴琢己 「トキソプラズマ原虫と宿主ミトコンドリアの膜リン脂質を介した相互作用」第96回日本生化学会大会（2023年10月31日） ・錦織充広 「膜リン脂質を介したトキソプラズマ原虫・宿主ミトコンドリア間相互作用の解析」2023年度ミトコンドリア・サイエンス・ワークショップ（2023年9月4日） ・錦織充広、伴匡人、西川義文、小柴琢己 「寄生虫由来タンパク質の宿主ミトコンドリア膜リン脂質への結合」令和5年度日本生化学会九州支部例会（2023年6月25日）