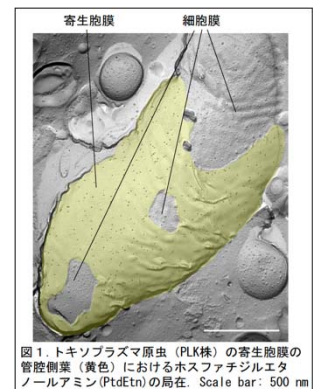


帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2024 年 4 月 22 日

採択番号	2023-共同-3		
研究部門	国際連携協力部門	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 たつのり 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	2023 年 4 月 1 日 ～ 2024 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	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。		
研究経過の概要	申請者らは、急速凍結・凍結切断レプリカ標識 (QF-FRL) 法によってグリセロリン脂質であるホスファチジルエタノールアミン (PtdEtn, 図2金コロイド) とホスファチジルセリン (PtdSer) の寄生胞膜での局在を検討し、<i>Toxoplasma gondii</i> 原虫の宿主細胞からの脱出機構における PtdSer および PtdEtn の役割を検討した。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。		



研究成果の 概 要	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、宿主細胞内の <i>Toxoplasma gondii</i> 原虫の寄生胞膜におけるグリセロリン脂質であるホスファチジルセリン (PtdSer, 図1) およびホスファチジルエタノールアミン (PtdEtn, 図2) の微細分布を明らかにした。細胞膜を含む生体膜では、PtdSer および PtdEtn は通常、細胞質側のリーフレット(内葉, P-face) に主に局在する。ところがヒト線維芽細胞 (HFF-1) 内に寄生する <i>T. gondii</i> 原虫の寄生胞膜では、PtdSer および PtdEtn は内葉と外葉(管腔側リーフレット, E-face) の両方にほぼ同じ密度で局在することがわかった。<i>T. gondii</i> 原虫は寄生膜と宿主細胞の細胞膜を破り、宿主細胞から脱出する。その後、再度、細胞に寄生して増殖を繰り返す。以前の報告では、<i>T. gondii</i> 原虫は、この脱出時に perforin-like protein1 (TgPLP1)を分泌し、寄生胞膜と宿主細胞膜の破壊に役立てることが考えられている¹⁾。さらに、TgPLP1 は生体膜の細胞質側の脂質に親和性を持つことを明らかにし、生体膜の破壊に寄与していることが示唆されている。本研究で明らかとなった、前述の PtdSer および PtdEtn が管腔側のリーフレット(E-face)に豊富に存在することは、TgPLP1 が選択的に PtdSer あるいは PtdEtn に結合することにより、寄生胞膜の破壊に関係することが強く示唆された(投稿準備中)。 1) Guerra, A.J. et al. Structural basis of <i>Toxoplasma gondii</i> perforin-like protein 1 membrane interaction and activity during egress. PLOS Pathogens, 14, e1007476, 2018
研究成果の 発 表	Rikako Konishi, Kayoko Fukuda, Sayuri Kuriyama, Tatsunori Masatani, Xuenan Xuan, Akikazu Fujita, Unique asymmetric distribution of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in <i>Toxoplasma gondii</i> revealed by nanoscale analysis, <i>Histochem. Cell Biol.</i> 160, 279-291, 2023. doi: 10.1007/s00418-023-02218-0.

