

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2026 年 4 月 13 日

採択番号	2025 共同-8		
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分子病態学分野・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	
	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	2025 年 4 月 1 日 ～ 2026 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	遺伝的解析に端を発した研究によって動物細胞において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虫体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。原虫を含め、これまでのオートファジーの研究では蛋白質やそれをコードするDNAやRNAを中心に研究が進められ、機能解明がなされてきた。オートファゴソームの形成には、他のオルガネラと同様に脂質膜が中心的な役割を担っており、その形成に不可欠なATG8タンパク質にリン脂質のホスファチジルエタノールアミン (PtdEtn) が結合することが発端となることが明らかにされている。生体膜を構成する脂質分子は、ホルマリンなど一般的な固定法では固定できないため、観察するには特殊な方法が必要となる。そこで本研究では、申請者らが開発した急速凍結・凍結割断レプリカ標識 (QF-FRL) 法を駆使することで、トキソプラズマのオートファゴソームの微細構造及び脂質分布をナノスケールレベルで可視化し、オートファゴソームでの構成脂質成分を明らかにする。このアプローチで従来とは異なる次元の情報を獲得することにより、原虫におけるオートファゴソームの機能解明に大きく貢献すると確信し、さらには、その成果に基づく新たな創薬に繋がると予想される。		
研究経過の概要	本研究では、膜脂質のリーフレット特異的分布を高分解能で解析可能な quick-freeze freeze-fracture replica labeling (QF-FRL) 法を用いた。ヒト線維芽細胞 (HFF-1) に感染させた <i>T. gondii</i>、およびヒト赤血球に感染させた <i>P. falciparum</i> を試料として、急速凍結・割断後にレプリカを作製し、脂質特異的プローブを用いて電子顕微鏡レベルで局在解析を行った。 PtdSer の検出には GST-MFGE8-C2 ドメイン、PtdEtn には duramycin、GM3 には特異抗体を用いた。これらのプローブに対して金コロイド標識抗体を用いることで、各脂質の膜内分布を定量的に評価した。また、比較対象として宿主細胞のプラズマ膜における脂質分布も同様に解析した。		

研究成果の 概要	本研究により、<i>Toxoplasma gondii</i> の寄生包膜(PV 膜)において、ホスファチジルセリン(PtdSer)、ホスファチジルエタノールアミン(PtdEtn)、および糖脂質 GM3 がいずれも細胞質側リーフレット(PF)と内腔側リーフレット(EF)の両方にほぼ同程度に存在する、すなわち対称的な分布を示すことが明らかとなった。これは、従来の真核細胞膜に見られる強い脂質非対称性とは著しく異なる結果である。 実際に、同一実験系において解析した宿主細胞のプラズマ膜では、PtdSer および PtdEtn は主に細胞質側リーフレットに局在し、GM3 は外側リーフレットに限定されるという典型的な非対称分布が確認された。このことから、PV 膜における脂質対称性は、単なる測定上のアーティファクトではなく、PV 膜特有の性質であることが強く示唆された。 また、PV 膜は宿主細胞膜由来であるにもかかわらず、膜タンパク質(特に膜貫通タンパク質)がほとんど存在せず、intramembrane particles (IMPs)が著しく乏しいことも確認された。このことは、脂質のリーフレット間移動(flip-flop)が通常よりも起こりやすい物理的環境が形成されている可能性を示唆する。 機能的観点からは、本研究で明らかとなった PtdSer および PtdEtn の内腔側リーフレットへの露出が、寄生虫の脱出機構に重要な役割を果たしていると考えられる。<i>T. gondii</i> が分泌する膜孔形成タンパク質 TgPLP1 は、これらのリン脂質に対して特異的な結合能を有しており、PV 内腔側から膜に結合・挿入することで膜破壊を誘導する。本研究の結果は、TgPLP1 が標的とする脂質が PV 膜内腔側に存在することを直接支持するものであり、寄生虫の egress 機構の分子基盤を理解する上で重要な知見である。 さらに、PV 膜における脂質対称性の形成機構についても考察を行った。通常、リン脂質のリーフレット間移動はエネルギー障壁が高く、フリッパーゼやスクランブラーゼといったタンパク質によって制御される。しかしながら、PV 膜ではこれらの膜タンパク質の存在が乏しいこと、また感染初期において宿主細胞内カルシウム濃度の上昇が顕著でないことから、従来型のスクランブラーゼ依存機構は関与しにくいと考えられる。そのため、寄生虫侵入時の膜陥入過程における物理的再編成や、膜曲率変化に伴う受動的な脂質再配置が関与している可能性が示唆された。 以上の結果から、PV 膜は単なる宿主膜の延長ではなく、脂質構造の観点からも高度に再構築された特殊な膜であることが明らかとなった。本研究は、寄生虫と宿主の相互作用における膜脂質の役割を新たな視点から理解する基盤を提供するものであり、今後の創薬標的の探索や寄生虫生物学の発展に寄与することが期待される。
研究成果の 発表	本研究成果は現在、以下の論文として投稿中である。 Konishi R., Masatani T., Asada M., et al. Symmetrical localization of phosphatidylserine, phosphatidylethanolamine and GM3 in cytoplasmic and luminal leaflets of the parasitophorous vacuole membrane of <i>Toxoplasma gondii</i> and <i>Plasmodium falciparum</i>(投稿中)