

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780295

研究課題名(和文)トキソプラズマ原虫のステージ変換を制御する分子機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of mechanisms for controlling stage conversion of *Toxoplasma gondii*

研究代表者

正谷 達膳 (Masatani, Tatsunori)

鹿児島大学・獣医学部・助教

研究者番号：70614072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：トキソプラズマ原虫は宿主体内でシストを形成し、潜伏感染する。この際、増殖型ステージであるタキゾイトとよばれる虫体から、潜伏型ステージであるブラディゾイトにステージ変換する。本研究では、このステージ変換に関わる原虫側の種々の蛋白質のクローニング、性状解析を試みた。一方、ステージ変換が起こる際、宿主側の抗ウイルス応答(インターフェロン誘導性蛋白質、OAS1、Mx1およびISG15など)が亢進していることを見いだした。さらなる解析の結果、トキソプラズマ潜伏感染細胞及び潜伏感染動物ではウイルス感染に対して抵抗性を有することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：*Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), an obligate intracellular protozoa, has ability to differentiate from a rapidly replicating tachyzoite stage (Tz) during acute infection to a dormant bradyzoite stage (Bz) contained in tissue cysts. In this study, We identified, cloned and characterized some genes increased in Bz stage. On the other hand, we found that expression levels of some interferon (IFN) -inducible anti-viral proteins, such as OAS1, Mx1 and ISG15 in Bz-infected cells were higher than those in uninfected and Tz-infected cells. Further analyses suggest that *T.gondii* latent infected animals and cells have resistance to viruses.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：トキソプラズマ ステージ変換 潜伏感染

1. 研究開始当初の背景

トキソプラズマ原虫 (*Toxoplasma gondii*) とは、ネコ科動物を終宿主とし、ヒトを含めた他の動物を中間宿主とする寄生性原虫である。本原虫は妊娠中に感染したヒツジやブタなどの家畜に流産を引き起こす。ヒツジの総数が1億頭と推定される欧州連合においては、本原虫感染症による流産のために毎年100万頭の子ヒツジが失われているとされる。また我が国においても、ブタ・ヒツジなど産業動物のトキソプラズマ原虫感染症は届出伝染病に指定され、発生状況が常時監視されている。一方、ヒトでは特に妊婦が初感染した場合、流・死産や新生児の水頭症・脈絡網膜炎などの先天性感染症を惹き起こす。さらに、トキソプラズマ性脳炎はエイズ患者や免疫抑制剤の投与を受けている患者の主要な死因の一つでもある。したがって、本原虫は畜産を脅かすだけでなく、人獣共通感染症の病原体としても重要である。しかし、いまだにトキソプラズマ原虫感染症に対する安全で有効な治療薬及びワクチンは開発されていないのが現状である。その主な理由として、本原虫の生体内における発育過程が複雑で、その機構がいまだに解明されていないことが挙げられる。

トキソプラズマ原虫は、初めて生体に侵入した時にタキゾイトと呼ばれる急速に増殖する虫体として現れ、急性感染を惹き起こす。約3～4週間経過すると宿主体内ではタキゾイトに対する強力な免疫が成立し、多くのタキゾイトは体内から排除される。しかし、この免疫は完璧なものではなく、必ず一部のタキゾイトは生き残り、ブラディゾイトと呼ばれる緩慢に増殖する虫体にステージ変換し、宿主は慢性感染期に移行する。ブラディゾイトは分厚いシスト膜を被っているために宿主免疫の攻撃から隔離され、宿主が生涯を終るまで体内に潜んで終生寄生する。ブラディゾイトは宿主にほとんどダメージを与えない

とされるが、宿主がエイズや免疫抑制剤の投与を受け免疫不全状態になると、すぐにタキゾイトに変換し宿主を死に至らしめる。したがって、ステージ変換はトキソプラズマ原虫の病原性に大きく関わる重要な機構といえる。タキゾイトからブラディゾイトへのステージ変換の分子機構の解明は、トキソプラズマ原虫研究の中でも中心的課題である。これまで、申請者が所属する研究グループを含め多くの国内外の研究グループが、それぞれのステージにおいて特異的に発現する蛋白質とその機能に関する報告をしてきた(総説: Skariah et al., Parasitol. Res., 2011)。しかし、ステージ変換の分子機構の全容はいまだに明らかになっていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、トキソプラズマ原虫の遺伝子をランダムに破壊し、どの遺伝子がステージ変換に重要であるか同定することを目的とし、スクリーニング用原虫の作出を試みた。また、パイオインフォマティクスも併用することで、ステージ変換関連遺伝子の推定も行い、その機能を分子生物学的手法により解析した。これら実験により最終的に、ステージ変換のメカニズムを分子レベルで解明することを目指した。さらに、トキソプラズマ潜伏感染細胞における遺伝子発現動態を網羅的に解析することで、原虫潜伏感染期特異的に起こる宿主側生命現象を明らかにすることも目的とした。

3. 研究の方法

(1) ランダム遺伝子破壊後の原虫スクリーニングを容易にする目的で、“ブラディゾイトへステージ変換した場合のみ薬剤感受性を有するようになる遺伝子組換えトキソプラズマ”の作出を試みた。

(2) ブラディゾイト期における原虫遺伝子

発現の網羅的解析を以下の手順にて行った。トキソプラズマ ME49 株をヒト線維芽細胞に感染させ、24 時間後から 5 日間、培養液の pH を 8 に維持することでブラディゾイトへ変換させた。Total RNA を抽出したのちこれを用いて次世代シーケンサーによる RNA-Seq を行った。いくつかのブラディゾイト期で有意に発現上昇のみられたいくつかの遺伝子についてクローニングを行い、マウスをもちいてこれらに対する抗血清を作出した。

(3) 上記(2)と同様の手法により、原虫ステージ変換によって変動する宿主側(ヒト)遺伝子の解析を網羅的に行った。その結果、ステージ変換誘導後の原虫感染細胞において抗ウイルス活性をもつ種々の遺伝子発現が上昇していたため、リアルタイム PCR 法によって詳細にこれら遺伝子の発現量を測定するとともに、これら遺伝子発現に重要である宿主転写因子 STAT1 の活性化についても検討した。

4. 研究成果

(1) ブラディゾイト特異的原虫遺伝子である BAG1 のプロモーターの下流に、大腸菌由来薬剤感受性遺伝子であるシトシンデアミナーゼ(CD)遺伝子を挿入したプラスミドを作製した。クローニングを容易にする目的で、薬剤耐性遺伝子である DHFR-TSc3 及び GFP 遺伝子も組み込ませた。これをトキソプラズマ ME49 株に導入し組み込ませることによって、ブラディゾイト特異的薬剤感受性原虫の作出を試みた。現在、当該原虫のクローニング及び増殖を行っている。今後、クローニングが済んだ株に対して CD に作用する 5-フルオロシトシンを様々な濃度で作用させ、スクリーニングに最適な条件を設定するとともに、ランダム変異を与えてブラディゾイト変換必須遺伝子の同定を行う予定である。

(2) トキソプラズマのブラディゾイト特異的遺伝子発現を網羅的に解析した結果、既報のものも含め多くの遺伝子がブラディゾイト期で発現上昇していることが明らかとなった。この中で、原虫の分泌器官であるロブトリーから分泌されると予想された、機能未知の蛋白質である ROP28 に注目し、クローニング及び大腸菌での蛋白質発現を行った。大腸菌で発現させた蛋白質でマウスを免疫し、その血清を一次抗体として Western blot 法で各ステージの ROP28 発現量を解析した結果、ブラディゾイト期特異的な発現を確認することができた(図1)。現在、ROP28 ノックアウト原虫の作出を試みており、その機能解析を詳細に行っていく予定である。

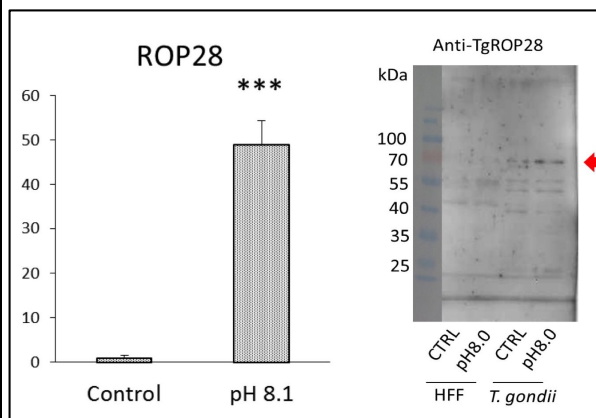


図1 ROP28 の発現量。左はリアルタイム PCR で、右は Western blot にて解析。Control 及び CTRL はタキゾイト、pH8.0 はブラディゾイトステージの虫体である。赤矢印：ROP28 の予想分子量(70kDa)。

(3) トランスクリプトーム解析の結果、ブラディゾイト感染細胞において OAS1、MxA 及び ISG15 といった抗ウイルス蛋白質遺伝子の発現量がタキゾイト感染細胞に比べ大きく上昇していた。これらはウイルスの RNA 複製阻害などに関する蛋白質であり、原虫に直接作用しているとは考えられていない。次にこれらの発現を調節する転写因子の一つである STAT1 に着目し、その活性化の指標である

核内移行及びリン酸化を蛍光免疫染色で検討した。その結果、ブラディゾイト感染細胞およびその隣接した細胞ではSTAT1の核内移行及びリン酸化が認められたのに対し、タキゾイト感染細胞では認められなかった。一方、STAT1の活性化に重要とされるI型、II型及びIII型インターフェロン(IFN)の発現量は両ステージ感染細胞ともほぼ検出限界以下であった。以上の結果から、トキソプラズマは潜伏感染時に、IFNの関与しない未知の機構で宿主を抗ウイルス状態に誘導していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 14 件)

Ketsarin Kamyngkird, Shinuo Cao, Tatsunori Masatani, Paul F. Moumouni, Patrick Vudriko, Ahmed A. Mousa, Mohamad A. Terkawi, Yoshifumi Nishikawa, Ikuo Igarashi, Xuenan Xuan; *Babesia bovis* dihydroorotate dehydrogenase (BboDHODH) is a novel molecular target of drug for bovine babesiosis, *Journal of Veterinary Medical Science*, 76: 323-330 (2014). 査読あり.

Tatsunori Masatani, Masahito Asada, Madoka Ichikawa-Seki, Miho Usui, Mohamad A. Terkawi, Kei Hayashi, Shin-ichiro Kawazu, Xuenan Xuan, Cloning and characterization of a 2-Cys peroxiredoxin from *Babesia gibsoni*, *Journal of Veterinary Medical Science*, 76: 139-143 (2014). 査読あり.

Mohamad A. Terkawi, Jadsada Ratthanophart, Akram Salama, Mahmoud

AbouLaila, Masahito Asada, Akio Ueno, Hend Alhasan, Azirwan Guswanto, Tatsunori Masatani, Naoaki Yokoyama, Yoshifumi Nishikawa, Xuenan Xuan, Ikuo Igarashi; Molecular characterization of a new *Babesia bovis* thrombospondin-related anonymous protein (BbTRAP2), *PLoS ONE*, 8: e83305 (2013). 査読あり.

Shinuo Cao, Ahmed A. Mousa, Gabriel O. Aboge, Ketsarin Kamyngkird, Paul F. Moumouni, Mohamad A. Terkawi, Tatsunori Masatani, Yoshifumi Nishikawa, Hiroshi Suzuki, Shinya Fukumoto, Xuenan Xuan., Prime-boost vaccination with plasmid DNA followed by recombinant vaccinia virus expressing BgGARP induced a partial protective immunity to inhibit *Babesia gibsoni* proliferation in dogs, *Acta Parasitologica*, 58: 619-623 (2013). 査読あり.

Ahmed A. Mousa, Shinuo Cao, Gabriel O. Aboge, Mohamad A. Terkawi, Ahmed E. Kirdasy, Akram Salama, Mabrouk Attia, Mahmoud Aboulaila, Mo Zhou, Ketsarin Kamyngkird, Paul F. Moumouni, Tatsunori Masatani, Sami A. Aziz, Waheed M. Moussa, Bayin Chahan, Shinya Fukumoto, Yoshifumi Nishikawa, Salah S. Ballal, Xuenan Xuan; Molecular characterization and antigenic properties of a novel *Babesia gibsoni* glutamic acid-rich protein (BgGARP), *Experimental Parasitology*, 135: 414-420 (2013). 査読あり.

Shinuo Cao, Shoufa Zhang, Lijun Jia, Shujiang Xue, Longzheng Yu, Ketsarin Kamyngkird, Paul F. Moumouni, Ahmed A. Mousa, Mo Zhou, Yuanming Zhang,

Mohamad A. Terkawi, Tatsunori Masatani, Yoshifumi Nishikawa, Xuenan Xuan; Molecular detection of *Theileria* species in sheep from Northern China, *Journal of Veterinary Medical Science*, 75: 1227-1230 (2013). 査読あり.

Longzheng Yu, Mohamad A. Terkawi, Mary J. Cruz-Flores, Florensia G. Claveria, Gabriel O. Aboge, Junya Yamagishi, Youn-Kyoung Goo, Shinuo Cao, Tatsunori Masatani, Yoshifumi Nishikawa, Xuenan Xuan, Epidemiological survey of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infections of cattle, *Journal of Veterinary Medical Science*, 75: 995-998 (2013). 査読あり.

Shinuo Cao, Yuzi Luo, Gabriel O. Aboge, Mohamad A. Terkawi, Tatsunori Masatani, Hiroshi Suzuki, Ikuo Igarashi, Yoshifumi Nishikawa, Xuenan Xuan; Identification and characterization of an interspersed repeat antigen of *Babesia microti* (BmIRA), *Experimental Parasitology*, 133: 346-352 (2013). 査読あり.

Tatsunori Masatani, Hideo Ooka, Mohamad A. Terkawi, Cao Shinuo, Yuzi Luo, Masahito Asada, Kei Hayashi, Yoshifumi Nishikawa, Xuenan Xuan; Identification, cloning and characterization of BmP41, a common antigenic protein of *Babesia microti*, *Journal of Veterinary Medical Science*, 75: 967-970 (2013). 査読あり.

Tatsunori Masatani, Tomohide Matsuo, Tetsuya Tanaka, Mohamad A. Terkawi, Eung-Goo Lee, Youn-Kyoung Goo, Gabriel O. Aboge, Junya Yamagishi, Kei

Hayashi, Kyohko Kameyama, Shinuo Cao, Yoshifumi Nishikawa, Xuenan Xuan; TgGRA23, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein associated with the parasitophorous vacuole membrane and intravacuolar network, *Parasitology International* 62: 372-379 (2013). 査読あり.

Shinuo Cao, Gabriel O. Aboge, Mohamad A. Terkawi, Mo Zhou, Yuzi Luo, Longzheng Yu, Yan Li, Youn-kyoung Goo, Ketsarin Kamyngkird, Tatsunori Masatani, Hiroshi Suzuki, Ikuo Igarashi, Yoshifumi Nishikawa, Xuenan Xuan, Cloning, characterization and validation of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase of *Babesia gibsoni* as molecular drug target, *Parasitology International*, 62: 87-94 (2013). 査読あり.

Junya Yamagishi, Junichi Watanabe, Youn-Kyoung Goo, Tatsunori Masatani, Yutaka Suzuki, Xuenan Xuan; Characterization of *Toxoplasma gondii* 5' UTR with encyclopedic TSS information, *Journal of Parasitology*, 98: 445-447 (2012). 査読あり.

Yan Li, Mohamad A. Terkawi, Yoshifumi Nishikawa, Gabriel O. Aboge, Yuzi Luo, Hideo Ooka, Youn-Kyoung Goo, Longzheng Yu, Shinuo Cao, Yongfeng Sun, Junya Yamagishi, Tatsunori Masatani, Naoaki Yokoyama, Ikuo Igarashi, Xuenan Xuan; Macrophage induces cross-protective immunity conferred by *Babesia microti* against *Babesia rodhaini* infection in mice, *Infection and Immunity*, 80: 311-320 (2012). 査読あり.

Yuzi Luo, Mohamed A. Terkawi, Honglin

Jia, Gabriel O. Aboge, Youn-Kyoung Goo, Shinuo Cao, Yan Li, Longzheng Yu, Hideo Ooka, Ketsarin Kamyinkird, Tatsunori Masatani, Shoufa Zhang, Yoshifumi Nishikawa, Ikuo Igarashi, Xuenan Xuan; A double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of secreted antigen 1 of *Babesia microti* using hamster model, *Experimental Parasitology*, 130: 178-182 (2012). 査読あり.

〔学会発表〕(計 5 件)

杉 達紀、竹前等、石和玲子、高野量、Recueno Frances、村越ふみ、正谷達膳、堀本泰介、明石博臣、加藤健太郎、誘導下 TgMAPK1 発現原虫を用いたトキソプラズマ細胞分裂制御の解析，第 83 回日本寄生虫学会大会，2014 年 3 月 28 日（愛媛）.

正谷達膳、林 慶、山岸潤也、西川義文、玄 学南，トキソプラズマ潜伏感染時に誘導される抗ウイルス応答の *in vivo* 解析，第 156 回日本獣医学会学会学術集会，2013 年 9 月 21 日（岐阜）.

正谷達膳、山岸潤也、西川義文、玄 学南，*Toxoplasma gondii* ブラディゾイト虫体は宿主の抗ウイルス自然免疫応答を誘導する，第 82 回日本寄生虫学会大会，2013 年 3 月 30 日（東京）

正谷達膳、山岸潤也、西川義文、玄 学南，トキソプラズマ原虫がステージ特異的に誘導する抗ウイルス自然免疫応答，第 154 回日本獣医学会学会学術集会，2012 年 9 月 16 日（岩手）.

正谷達膳、李 應具、具 潤景、山岸潤也、Terkawi M. Alaa、于 龍政、林 慶、亀山響子、西川義文、玄 学南，トキソプラズマ原虫の Dense granule に局在する新

規蛋白質の性状解析，第 153 回日本獣医学会学術集会，2012 年 3 月 28 日（埼玉）.

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：「抗原虫薬のスクリーニング方法及び組換えトキソプラズマ株」

発明者：加藤健太郎、杉達紀、正谷達膳

権利者：同上

種類：特許権

番号：特願 2014-109262

出願年月日：平成 26 年 5 月 27 日

国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://kuris.cc.kagoshima-u.ac.jp/615942.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

正谷 達膳（TATSUNORI, MASATANI）

鹿児島大学・共同獣医学部・特任助教

研究者番号：70614072