

平成 22 年度
(2011 年 3 月)

修士論文

トキソプラズマ原虫における AMA1 分子を介した
宿主細胞侵入機構の解明

博士前期課程 畜産衛生学専攻
原虫病研究センター 感染病理学分野

芳賀 香織

目次

| | |
|----------------|----|
| 緒論 | 3 |
| 1. 材料と方法 | 5 |
| 2. 結果 | 14 |
| 3. 考察 | 20 |
| 4. 図表 | 23 |
| 謝辞 | 42 |
| 参考文献 | 43 |

緒論

トキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*) はアピコンプレックス門、孢子虫綱、コクシジウム目、住肉孢子虫科に属する偏性細胞内寄生原虫で、ヒトを含むすべての哺乳類及び鳥類に感染する人畜共通寄生虫の一つである。トキソプラズマに感染しても免疫能が正常な状態ではほとんど症状を示さない。しかし免疫抑制状態の患者ではリンパ節炎や脳炎、網膜脈絡炎などを引き起こし、時には致死的になることもある日和見感染症である。近年高度先進医療のもと、AIDS患者、がん患者及び免疫抑制剤の投与を受けている臓器移植患者等、高度の免疫不全状態の患者が増加しており、これらの患者がトキソプラズマ症を再燃させる機会が増えている。さらに母親が妊娠中に初感染すると、栄養型のタキゾイトが胎盤を経由して胎児に移行する。妊娠初期に感染すると感染胎児の胎内死亡や流産、中後期では死産や先天異常を伴う先天性トキソプラズマ症を引き起こす。感染者数は全世界で 30%といわれており、近年先進国だけでなく発展途上国を含めたグローバルゼーションやグルメ志向による汚染肉の摂取、海外旅行先での感染、ペットのコンパニオンアニマル化などの要因で、マラリアやコレラなど他の国際感染症と同様にトキソプラズマ症は今後増加する可能性は大きく、新興再興感染症としても注目されている[1,2]。

感染源として、最終宿主であるネコが排出するオーシストに汚染された水や食べ物、生ハムなどの生肉や加熱処理不十分の肉に含まれるシストの経口摂取である。摂取された虫体は栄養型のタキゾイトとして腸細胞に侵入し、血液やリンパ液によって体内を移行する。

この宿主侵入機構にはトキソプラズマ先端部に局在するマイクロネームやロブトリーといった分泌器官から放出されるタンパク質が関与している。中でもミ

クロネームタンパク質は宿主細胞侵入過程初期に分泌され、宿主細胞との接着、侵入時における虫体の滑走運動に関与している[3]。マイクロネームタンパク質の一つである MIC2 は、宿主細胞との接着能を持ち、その細胞内領域がアルドレースを介してアクチン・ミオシン複合体と結合することにより、侵入時の動力源として働くことがわかっている[4,5]。これらの報告より、他のマイクロネームタンパク質においてもその細胞内領域と未知の分子が結合することで侵入に関与していると考えられるため、本研究ではその中でも AMA1 (apical membrane antigen-1) に注目した。AMA1 は宿主との接着補助、宿主細胞膜陥入時に形成される Moving Junction の形成補助、侵入後期に関与するロプトリータンパク質の分泌誘導が報告されている。また AMA1 を欠損させた原虫は宿主細胞侵入能力の著しい低下が観察されたことから、AMA1 は宿主細胞の侵入に不可欠な遺伝子である。これらの報告より、AMA1 は侵入機構における重要な因子の一つであると考えられる[6,7]。さらに AMA1 は RON 2 や RON 4 といった、異なる分泌器官から放出されるタンパク質と相互作用すると報告されており、マイクロネームタンパク質の中でも特に興味深い分子である[7,8]。

AMA1 分子の機能の一端を明らかにすることを目的として、AMA1 分子の細胞内領域と結合する分子の同定を Yeast two hybrid system を用いて行った。さらに同定された分子と AMA1 細胞内領域との結合を GST Pull-down assay により確認した。また得られた分子の DNA 解析や局在などの分子解析も行った。これらの研究成果は AMA1 分子を介した侵入機構の解明への新たな知見を付与すると考えられる。

1. 材料と方法

1-1 実験動物と寄生原虫

本実験では下記に示す抗体作製のために CLEA から購入した 6 週齢の雌の ICR/JCL マウス、ウサギ（純系日本白色種）を用いた。実験に際し、帯広畜産大学内の「実験動物委員会」の指導・承認を受けて行った。また、組み換え AMA1 タンパク質は *T. gondii* RH 株由来の cDNA を用いて作製した。*T. gondii* RH 株は非働化した Fetal Bovine Serum (FBS, GIBCO) を加えた Minimum Essential Medium Eagle (SIGMA, 5%FBS) で培養した Vero 細胞に感染させ、維持した。また増殖率の測定で用いた Human Foreskin Fibroblast (HFF)細胞は、HEPES と FBS を加えた Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, GIBCO, 10%FBS)で培養・維持し、実験に使用した。

1-2 cDNA の単離とプラスミド構築

AMA1 の細胞内領域をコードする DNA は *T. gondii* RH 株栄養型 cDNA を鋳型として polymerase chain reaction (PCR)で増幅した。プライマーは、Table1 の①と②を用いた。その後 PCR 産物を精製し、プライマーの付加・BamH I /Xho I で切断し、pSos の BamH I /Sal I に挿入した。これを pSos-AMA1 とする。同じく Yeast two hybrid system に用いる pMyr ベクターはクローニング部位を Fig.1 に示すように改変し、cDNA は *T. gondii* RH 株栄養型 mRNA を鋳型として合成し、MCS 内の Sfi I と I-Sce I の間に組み込んだ。

MIC2、MIC6、MIC8 の細胞内領域をコードする遺伝子 (Fig.4A : 図はアミノ酸配列) と Aldolase、20.m03696 (036) の遺伝子は *T. gondii* RH 株栄養型 cDNA を、A7 (L、3)は Yeast two hybrid system によって同定された A7 の配列を鋳型とした (Fig.4A)。MIC2 は Table1 の③と④、MIC6 は⑤と⑥、MIC8 は⑦と⑧、Aldolase は⑨と⑩のプライマーを用いて増幅した。

また 036 は⑪と⑫、A7-L は⑭と⑯、A7-3 は⑰と⑱のプライマーを用いた。AMA1 は Table1 の①と②を用いて同様に PCR で増幅した。AMA1 と MIC6 は BamH I /Not I のリンカーを付加して pGEX 5x1 ベクターに、MIC2 と MIC8 は Sal I /Not I を付加して pGEX 5x2 ベクター、Aldolase は BamH I /Xho I を付加し pET-32a (+)ベクターにそれぞれ挿入した。036 は Xho I /Not I を付加して pGEX 5x1 と pcDNA6/V5-His、A7 の L と 3 の遺伝子は BamH I /Not I を付加し pGEX 6p2、pcDNA6/V5-His C ベクターに挿入した。プラスミドは陰イオン交換カラム (Plasmid Purification kit, Qiagen Science) で大腸菌 DH5 α から抽出及び精製し、TE (10mM Tris-HCl 1mM EDTA (pH 8.0)) buffer に溶かした後 -20°C で保存した。構築したプラスミドは適切な制限酵素で切断した後アガロースゲル電気泳動法で確認した。DNA 濃度は分光光度計を用いて吸光度 260nm (OD₂₆₀) で測定した。

1-3 GFP を付加した A7 の過剰発現虫体のクローニング

A7 の N 側に位置する 036 遺伝子部分と C 側に位置する 20.m07752 (077) 遺伝子部分は、*T. gondii* RH 株栄養型 cDNA を鋳型とした。A7 の局在確認で使った 036 と 077 を合わせた全長 (GFP-A7long) も同様に増幅させた。プライマーは 036 と GFP-A7long は Table 1 の⑰と⑱、077 は⑲と⑳を用いた。また得られたプラスミドの 036、GFP-A7longDNA 部分を Cycle sequencing 反応によって塩基配列を解析した。Cycle sequencing 反応は BigDye Terminator Cycle Sequencing kit version 3.1 (Applied Biosystems, USA) を用いて行った。また、得られたデータの解析は ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) を用いて行った。プラスミドのヌクレオチド配列は Toxo DB (<http://www.toxodb.org/toxo/>) の *T. gondii* GT1 株のゲノム遺伝子と比較した。036 は GFP-A7long と同じプライマーを使用した。その後の塩基配列解析によって 036 遺伝子部分のみを発現していた。よって GFP-A7long とは区別し、036 としてクローニングに使用した。GFP-A7long は点突然変異部分が異なる 4 種類 (No. 1 ~ 4) のクローンを得、

A7の局在変化実験に用いた。その後PCR産物を精製し、036とGFP-A7longはKpn I/Apa I、077はBamH I/Sal Iでそれぞれ切断した。その後036DNA、GFP-A7longはpEGFP-C1、077DNAはpEGFP-N1にそれぞれ挿入した。クローニングに使用したpBluescript II (pBS)は、クローニング部位を一部改変して使用した (Fig.2)。まずpDFXのGra1プロモーターとGra2ターミネーターをPCRで増幅させ、Xba I/Xho Iで切断し、pBSに挿入した。その後クローニング部位のApa I、Kpn1切断配列を不活性化するためにそれぞれT4 DNA polymeraseで平滑化し、切断サイト同士を結合させた。次にpEGFP-C1、pEGFP-N1に挿入した遺伝子とGFPを含む部位をそれぞれNhe I/BamH I、HindIII/Not Iで切断した。同じようにpBSを036DNA用と077DNA用にそれぞれHindIII/BamH Iで切断した。その後036はNhe I/HindIII、077はNot IとBamH Iを平滑化させ、それぞれ結合させた。作成した二つのプラスミドをエレクトロポレーション法によって、*T. gondii* RH株へ導入した。導入させた虫体をHFF細胞に感染させ、2-3日後にUV照射下で顕微鏡観察した。緑色に発色している虫体を確認した後、ピリメタミンを最終濃度0.1 μ Mになるように添加し、薬剤選択を行った。次に新しいHFF細胞へ再感染させ、数日後血球計算盤で虫体を観察、カウントした。それぞれの虫体を1ウェルあたり1匹、5匹になるように、96ウェルプレートで培養しているHFFに感染させた。その後、036遺伝子、077遺伝子それぞれのプレートで最も発光している虫体を選択し、vero細胞に感染させ維持した。この036遺伝子を含む株をGFP-N、077遺伝子を含む株をC-GFPとし、ドミナントネガティブの効果を探る実験に用いた。

A7の点突然変異部分の局在確認に用いたGFP-A7SMCは*T. gondii* RH株栄養型cDNAを鋳型とし、PCRによって増幅させた。その後PCR産物を精製し、プライマーの付加・Kpn I/Apa Iでそれぞれ切断後pEGFP-N1に挿入し、GFPを付加して改変型pBSに挿入した。このプラスミドをエレクトロポレーション法によって*T. gondii* RH株へ導入した。導入させた虫体をHFF細胞に感染させ、2-3日後にUV照射下で顕微鏡観察した。緑色に発色してい

るのを確認後、下記の間接蛍光抗体法 (IFA) を行った。

これら GFP 付加タンパク質を過剰発現する虫体の対象群として、*T. gondii* RH 株に pDFX を導入・発現させた GFP-RH を用いた。

1-4 組み換えタンパク質の産生

大腸菌での組み換えタンパク質の産生は遺伝子導入した大腸菌 (BL21) を用いて行った。20ml の ampicillin 入り Luria-Bertani (LB) 培地で大腸菌を一晩振盪培養 (37°C、170-190rpm) した後、200ml になるよう LB 培地を追加し、細胞濁度が 0.3-0.5 (OD₆₀₀) となるように振盪培養 (25°C、80-100rpm) した。分光光度計で濁度を測定後、最終濃度が 1mM となるように Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) を加え一晩振盪培養 (25°C、80-100rpm) した。培養液を遠心 (3500rpm、30 分、4°C) して集菌し、5ml の STE buffer (pH 9.5、50mM Tris HCl pH9.5、1mM EDTA pH8.0、150mM NaCl) に懸濁後、終濃度 100μg/ml になるように lysozyme を加え-20°Cで一晩保存した。氷上で溶解後、菌体が半透明になるまでソニケーターで破碎し、遠心 (3500rpm、20 分、4°C) した。上清を取り出し、平衡化した Glutathione Sepharose™ 4B beads (GSH beads、GE Healthcare、PBS で 1 回洗浄) を 500μl 加え、4°C で一晩回転させた。その後遠心 (3500rpm、10 分、4°C) し上清を除いた GSH beads を 1% Triton-X 100 を含む PBS で 4 度洗浄した。5 回目の洗浄は PBS を用い、洗浄後 elution buffer (100mM Tris HCl pH9.5、5mM EDTA pH8.0、200mM NaCl、20mM Reduce Glutathione) を 500μl 加え 4°C で一晩回転させた。回転後軽く遠心し、上清を新しいチューブに移した。GST 融合タンパク質を sodium dodecyl sulfate-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) により確認した。確認後、PBS により 4°C で透析した。精製したタンパク質量を分光光度計によって測定した。この方法により、Pull-down assay 用の AMA1、MIC2、MIC6 と MIC8、抗体作製用に A7-3、036 の組み換えタンパク質を作製し、対照群として *T. gondii* の cDNA を含まない pGEX ベクターのタンパク質 (em-pGEX) も作製した。

pET-32a (+)ベクターに挿入した Aldolase は ProBond™ Purification System (Invitrogen) に基づいてタンパク質発現・精製を行った。精製した組み換えタンパク質量を分光光度計によって測定し、SDS-PAGE 後 Coomassie 染色によって発現の確認をした。

哺乳類細胞を用いた組み換えタンパク質の産生はヒト腎臓由来の細胞株 293T を用いた。293T は DMEM (10% FBS) で維持したものを使用し、カルシウム沈殿法によって pcDNA ベクターを導入した。まず 293T 細胞をプレートに蒔き、70~80%に増殖するまで培養した。増殖後、40 μ g のベクターを 500 μ l になるように滅菌水で希釈し、500 μ l の 0.5M CaCl₂、1ml の HNP buffer (50mM HEPES pH7.1、280mM NaCl、1.6mM PO₄)を加えて 293T 培養液に添加後、37°Cで 5 時間培養した。5 時間後培養液を除いた細胞を PBS で洗い、新しい培養液を加えて 48 時間培養した。その後培養液を除き PBS buffer で洗い、1ml の XB buffer (50mM KCl、20mM HEPES、2mM MgCl₂、0.2mM EDTA (pH 7.5))で細胞を回収した。細胞をソニケーターで破碎し、遠心 (3500rpm、5 分、4°C)した後上清を新しいチューブに移し、分光光度計によってタンパク質量を測定し、Western blotting 解析によってタンパク質の発現を確認した。対照群として *T. gondii* の cDNA を含まない pcDNA ベクターのタンパク質 (em-pcDNA)も作製した。

1-5 ポリクローナル抗 036 抗体・抗 A7 抗体の作製

抗 036 抗体はウサギを用いて作製した。ウサギへの免疫は、ウサギの背部皮下に同量の Freund's complete adjuvant で希釈した組み換え 036 タンパク質を、3~5 ヶ所に分けて計 500 μ g 接種した。2 週間後、同量の Freund's incomplete adjuvant で希釈した組み換えタンパク質を接種した。2 週間後に前回と同様の接種を行い、更にその 1 週間後に血清を採取した。

抗 A7 抗体は ICR マウスを用いて作製した。マウスへの免疫は、マウスの腹部皮下と大腿筋肉内に同量の Freund's complete adjuvant で希釈した組み換え A7-3 タンパク質を計 50 μ g 接種した。2 週間後、同量の Freund's

incomplete adjuvant で希釈した組み換えタンパク質を接種した。そしてその1週間後に血清を採取した。

1-6 ポリクローナル抗 036 抗体・抗 A7 抗体の抗体価の検討

作製したポリクローナル抗体の活性検討のために、V5 タグを付加した 036・077 遺伝子を 293T 細胞に導入してタンパク質を発現させた。その後 Western Blotting 解析を用いて抗 036 抗体・抗 A7 抗体をそれぞれ検出した。尚、ポジティブコントロールとして V5 (Invitrogen) 抗体を用いた。

1-7 Yeast two hybrid system

この実験には CytoTrap® XR Library Construction Kit (Stratagene)を一部変更したマニュアルに基づいて行った。ここでは 25°Cでは成長し、34°Cでは成長できない温度感受性変異株の *cdc25H* 酵母を用いた。まず構築した pSos-AMA1 と *T. gondii* cDNA を含む pMyr cDNA ライブラリーを *cdc25H* 株に導入し、ガラクトース培地上で 23°C、2 日間培養後、34°Cで 10 日間培養した。得られたクローンをさらに 23°Cのグルコース培地・34°Cのグルコース培地とガラクトース培地で 5~7 日間培養した。対照群として AMA1 を含まない pSos ベクターと *T. gondii* cDNA を含む pMyr cDNA ライブラリーを *cdc25H* 株に導入した。培養後それぞれのプレートを比較し、pSos-AMA1 ベクターを用いたクローンにおいて、制限温度である 34°Cにおいてガラクトース培地のほうがグルコース培地よりもコロニー数が多ければ活性があると判断し、プラスミドを回収後シークエンサーを用いて同定した。同定の結果 in frame でタンパク質を発現する個体を選抜し、再度 *cdc25H* 株に導入して活性を確認した後、Pull down assay を行った。

1-8 Pull-down assay

Pull-down assay は G. Lucas Starnes らの方法を一部改変して行った [5]。Aldolase との結合確認では、まず PBS で一回洗浄した GSH beads 20µl と

GST が融合した AMA1/MIC2/MIC6/MIC8/em-pGEX を 10 μ g ずつそれぞれ分けて混合し、100 μ l の PBS 中で 4 $^{\circ}$ C で 2 時間回転させた。2 時間後 XB buffer で洗浄した後上清を取り除き、Aldolase を 20 μ g 添加後 100 μ l の XB buffer 中で一晩 4 $^{\circ}$ C で回転させた。その後 0.5 \times XB buffer で洗浄し、SDS-PAGE sample buffer (62.5mM Tris pH6.8、2% SDS、5% 2-mercaptoethanol、10% glycerol、0.02% bromophenol blue) をビーズと同量の 20 μ l で溶かして Western blotting 解析を行った。

Yeast two hybrid system で同定された A7 との結合確認では、洗浄したビーズ 20 μ l と AMA1/em-pGEX を 1 μ g 混合したサンプルをそれぞれ用意し、上記と同様に回転させた。ビーズの洗浄には XB buffer あるいは RIPA buffer (1mM PMSF、50mM Tris HCl (pH 7.5)、500mM NaCl、1mM EDTA、0.25mM Sodium deoxycholate、0.1% Triton X-100、1% Nonidet P-40) も用いた。その後 293T で発現させた A7 L₁~5/em-pcDNA 250 μ g をそれぞれのサンプルに別々に混合し回転させ、同様に洗浄後 Western blotting 解析を行った。

1-9 Western blotting 解析

SDS-PAGE sample buffer に溶かしたタンパク質を 96 $^{\circ}$ C で 5 分間熱処理後、12% のポリアクリルアミドゲルで分離させた。サイズマーカーは SeeBlue[®] Plus2 Prestained Standard (invitrogen) を使用した。タンパク質を Immobilon-P Transfer Membrane (MILLIPORE) に転写し、その後 3% スキムミルクを含む PBS に浸し固定した。一次抗体は Anti-V5 Antibody (invitrogen)、二次抗体は羊由来の ECL[™] Anti-mouse IgG, Horseradish Peroxidase linked F(ab')₂ fragment (GE Healthcare) をどちらも PBS (3% スキムミルク) で 1,000 倍に希釈して使用した。タンパク質の検出は 0.25mg/ml 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB)、100mM Tris pH7.5、0.05% H₂O₂ を混合した検出液、または ECL を行った。

1-10 間接蛍光抗体法 (Indirect immunofluorescence antibody : IFA)

カバースリップ上の虫体を固定・透過化するために、4% formaldehydeと0.2% Triton×100を含むPBSに15分静置した。15分後にサンプルを1×PBSで3回洗い、ブロッキングするために3%のウシ血清アルブミン (BSA) を含む1×PBSと共に10分、2回静置した。静置後、1×PBSにて3回洗い、A7の局在確認ではポリクローナルマウス抗AMA1、MIC8抗体、ポリクローナルウサギ抗actin、GRA1、tubulin、IMC、MIC10抗体、A7に導入した点突然変異虫体の局在比較ではポリクローナルウサギ抗SAG1抗体を使用し、それぞれ1時間静置した。抗体は全て3% BSAを含む1×PBSを溶媒として、マウスで作成した抗体は500倍、ウサギ抗体は2,000倍に希釈して使用した。A7の染色はA7遺伝子のC末端側に付加したGFPを用いて確認した。1時間静置後3回洗い、それぞれの1次抗体に対応する2次抗体(Alexa flour®594 goat anti-rabbit IgG[H + L]と Alexa flour 594 goat anti-mouse IgG[H + L], Invitrogen) を混合し更に1時間静置した。これらの2次抗体は3%BSAを含む1×PBSを溶媒として1,000倍に希釈して使用した。免疫蛍光解析は蛍光顕微鏡と共焦点レーザー顕微鏡 (Leica TCS SP5, Leica icrosystems) を用いて行った。

1-11 体長測定

体長測定には GFP-RH と Fig.9 の GFP-N、C-GFP を用いた。上記の IFA の方法で固定し、染色は抗 SAG1 抗体を用いた。顕微鏡観察後、虫体全体が観察できる画像を取り込み解析した。虫体の長さ一番太い部分の幅をそれぞれ 120 個体無作為に選び測定、平均値を算出した。

1-12 増殖率の測定

体長測定と同様に GFP-RH、GFP-N、C-GFP を用いた。カバースリップを置いた 10ml シャーレに HFF 細胞を培養させた。翌日 3 種類の虫体を回収し、フィルターで精製・カウントした。感染させる虫体数を合わせて HFF 細胞に感染させ、1 時間後に浮遊虫体を 1×PBS で洗い流した。虫体の回収は感染か

ら 5 時間おきの 25 時間まで、計 5 回行った。カバースリップを取り出し固定液（4% formaldehyde を含む PBS）に 15 分静置した。固定後は上記の IFA の方法で染色、観察した。

カバースリップ全体の虫体を 1 PV あたりの虫体数ごとにカウントし、HFF 細胞内の単独虫体、2 分裂、4 分裂、8 分裂、16 分裂までを測定した。抗 SAG1 抗体で染まった虫体は宿主細胞外に存在するとみなし、カウントには抗 SAG1 抗体で発光せず、GFP の発光を示す虫体のみをカウントした。カウント後 PV あたりの虫体数の平均を算出した。同じ実験を 2 回行い、平均値を用いてグラフ化した。

2. 結果

2-1 Yeast two hybrid system による AMA1 結合分子の検出

cdc25H 株への pSos-AMA1 と pMyr cDNA ライブラリーの導入を数回同じ条件で行った。クローンのコロニー数比較による活性判断とシーケンスの結果、AMA1 と結合する分子候補が数種類得られた。ToxoDB (<http://www.toxodb.org/toxo/home.jsp>) での結果より、異なるコロニーから得られたクローンにおいて推定タンパク質をコードする遺伝子 20.m07752 (077 : バージョンアップにより名前が TGGT1-019080 に変更されている) が幾度も同定された。この遺伝子を含む AMA1 結合分子候補のクローンを再度 Yeast two hybrid system で確認したところ 077 が結合活性を示したことより、これ以後の実験は 077 に注目して実験を進めていった。

今回得られた遺伝子の大部分は 077 の配列であったが、得られた遺伝子の C 末端が DB 配列と異なることと、N 末端側 99 遺伝子配列が 077 の直前に位置する 20.m03696 (036 : バージョンアップにより名前が TGGT1-019090 に変更されている) の C 末端の配列を含んでいた (Fig.3)。このように得られた遺伝子は 036 と 077 をまたいだ形であるため、実際の遺伝子はこの 2 つの遺伝子がつながった全長 1323 アミノ酸をコードする巨大遺伝子の可能性があり、得られたクローンはその一部であると考えられる。よって DB 上の 077 と得られたクローンを区別するため A7 と名づけた。

このタンパク質には染色体構造維持タンパク質 (Structural Maintenance of Chromosomes : SMC) や PH ドメイン構造を含んでいる。SMC ドメインは染色体凝集や分配に関与する微小管結合タンパク質として知られている。トキソプラズマにおいて SMC ドメインを持つ intra-conoid microtubule associated protein 1 (ICMAP) はコーノイドや中心小体で微小管と共局在すると報告されている [10]。PH ドメインは脊椎動物から酵母にわたる広範囲の生物で見つかっており、進化的にかなり前から存在する機能性ドメインと

思われる。また PH ドメイン含有タンパク質には、細胞質に存在しているがある刺激によって膜分画に移行するものが多く、さらに明らかな膜結合配列を持たないにもかかわらず膜分画に存在するものもあるので、機能の一つとして膜結合性があると推測される [11]。

2-2 ミクロネームタンパク質と Aldolase を用いた Pull-down assay

MIC2 と Aldolase が結合し侵入機構に関与しているという報告から、他のミクロネームタンパク質細胞内領域でも Aldolase と結合する可能性もあるため、Pull-down assay を行った。Pull-down assay に用いる *T. gondii* 組み換えタンパク質は、pGEX AMA1/MIC2/MIC6/MIC8 とこれらの対照群として em-pGEX プラスミド DNA を大腸菌 (BL21) に導入し産生させた。この 5 種類の組み換えタンパク質と結合させる Aldolase も同様に大腸菌に導入しタンパク質を産生させた。

Pull-down assay の結果、レーン 6 の input の Aldolase と同じ位置に MIC2 だけでなく全てのミクロネームタンパク質を混合したレーンでも MIC2 に比べると若干薄い Aldolase のバンドが確認された (Fig.4B)。他の論文でもミクロネームタンパク質 (MIC2、MIC6、MIC8、MIC12、MIC16、AMA1) とアルドラーゼの結合確認実験が行われており、MIC2 以外にも MIC6、MIC12、AMA1 でも結合するとの報告がある [12]。しかし今実験では、レーン 1 の em-pGEX においても同様にバンドが検出されたことより、実験の過程で非特異的に結合した Aldolase を完全に除去できなかった可能性が考えられる。また、実験の際に組み換えタンパク質を繰り返し凍結融解したため、Aldolase あるいはミクロネームタンパク質の構造が変化してしまった可能性も考えられる。

また Aldolase との結合には細胞内領域 C 末端に存在する酸性残基 (青文字) とトリプトファン (W) 残基 (赤色文字) が関わっており、MIC2 と MIC6 はほぼ同じ場所に保存されている (Fig.4A) [5,12]。一方 AMA1 の酸性残基は MIC2 とほぼ同位置に存在するが、W 残基は C 末端から 21 番目に存在

する。そしてこの W と 22 番目の F を合わせた「FW モチーフ」は多くのアピコンプレクサ門の AMA1 に高く保存されており、このモチーフを変異させるとアルドレースとの結合だけでなく侵入も阻害されることが報告されている [12,13]。しかし AMA1 とアルドレースの結合が、MIC2 と同様に侵入の動力源として機能するかはまだ解析されておらず、今後も両分子の結合意義を追究する必要がある。

2-3 AMA1 細胞内領域と A7 タンパク質との結合確認

Yeast two-hybrid system で AMA1 と A7 の結合活性が示されたため、次に組み換えタンパク質を用いた Pull down assay を行い、実際に両タンパク質同士が結合しているのか確認した。使用した A7 のタンパク質は、Fig.5A の A7-L を用いて行った。pcDNAA7-L を哺乳細胞に導入し、タンパク質の発現を Western Blotting により確認した。AMA1 は、Aldolase との結合確認で用いた AMA1 細胞内領域のタンパク質を使用した。

RIPA buffer を用いた Pull down assay より、AMA1 細胞内領域と A7 のタンパク質を混合したレーン 2 でのみ A7 のバンドが検出された (Fig.6)。結合に使用した AMA1 と em-pGEX のタンパク質量確認の Coomassie 染色において、em-pGEXの方が AMA1 よりバンドが濃く検出されていることから AMA1 と A7 の結合がさらに確かなものといえる。

2-4 20.m07752 と 20.m03696 のタンパク質連結確認実験

Yeast two-hybrid system で得られた A7 は、遺伝子の大半を 20.m07752 が占め、その N 末端部分に 20.m03696 の遺伝子を含んでいた (Fig.3)。DB 上の遺伝子配列では 2 つ別々の名がついているが、今回得られた A7 分子から、2 つの遺伝子がつながった、巨大な分子である可能性が考えられる。よってこの 2 つの遺伝子がつながっているのか確認するため、それぞれの分子に対する抗体を作製し、RH 株の溶解物を用いて Western Blotting 解析を行った。

まず使用した抗体だが、077 を検出するポリクローナル抗 A7 抗体は、Fig.5A

で示される A7-3 タンパク質を用いて ICR マウスで作製した。pGEXA7-3 を大腸菌で発現させた後、SDS-PAGE で確認 (Fig.5B1) し、マウスに接種した。Western Blotting で抗体価を調べた結果、抗体価の上昇が確認された (Fig.7①)。尚、V5 抗体はポジティブコントロールの抗体として用いた。一方ポリクローナル抗 036 抗体は、Fig.5A の 036 タンパク質を用いて、A7 と同様に大腸菌でタンパク質を発現させた。発現確認を SDS-PAGE で行い (Fig.5B2)、その後ウサギに接種した。抗体価を調べたところ、V5 タグを合わせた想定分子量付近にバンドを確認した (Fig.7②)。

抗体を作製した後、タンパク質の連結確認として Western Blotting 解析を行った。その結果 036、077 のどちらにも同じ位置にバンドが検出された (Fig.8)。DB からの情報では、2 つのタンパク質がつながった分子量は約 145kDa になるが、今回得られた共通のバンドは約 110kDa あたりに検出された。これはタンパク質の成熟過程で短くなった可能性や、内在性のメチオニンからタンパク質転写が始まったことが予想される。

2-5 A7 の局在確認

A7 の局在確認には、C 末端側に GFP を付加した A7 を過剰発現させた虫体 (GFP-A7long) を用いた (Fig.9)。IFAT の結果、A7 は虫体内でドット状に局在している (Fig.10A)。しかし同じくドット状に染まる GRA1 とは異なる局在を示した。そして Inner Membrane Complex(IMC)との共染色において、その虫体と娘細胞の先端部への局在が観察された。しかし虫体先端部以外にもドット状に局在している部分があり、明らかな局在は同定できていない。一方マイクロネームタンパク質の場合、先端部で蛍光を示す A7 と共局在している部分も確認された (Fig.10A)。GRA1 や IMC、マイクロネームタンパク質の他にも、Actin、Tubulin とも A7 と共染色を行ったが、A7 の局在を明らかにする手がかりは得られなかった (data not shown)。

また GFP-A7long の配列に点突然変異を導入させ過剰発現させた虫体を 4 クローン作製し IFA を行った。その結果 No.2 が核以外の細胞質が染まり、他

の3クローン（ここではNo.4を使用した）が示すドット状の局在とは異なっていた（Fig.10B）。この局在の異なるクローン間には7ヶ所のアミノ酸が異なり、これらの変異部分がA7の局在に関係していると考えられる（Fig.10C）。その中でも微小管結合ドメインとして知られるSMCドメインへの変異に着目し、A7の局在に必要な配列の同定を試みた。GFP-A7longのN末端からSMCドメインまでを含む部分を一過性に過剰発現させた虫体を用いて、A7がどのように局在するか確認した。その結果、Fig.10BのNo.4のようにドット状を観察したことから、SMCはA7の局在に必要な配列であると考えられる（Fig.10C）。

2-6 ドミナントネガティブ A7 を用いた野生株との比較実験

A7の036遺伝子が位置するN末端側にGFPを付加したGFP-N、077遺伝子が位置するC末端側にGFPを付加したC-GFPのA7過剰発現株を作製した（Fig.9）。過剰発現によるドミナントネガティブの効果を期待してこれらの株の体長測定と増殖率を調べた。この実験の対象群として、*T. gondii* RH株DNAのN側にGFPを付加したGFP-RHを用いた。

体長測定の結果、長さではコントロールのGFP-RHとほぼ変化は見られなかった（Fig.11）。しかし幅ではC-GFPがコントロールに比べ0.5 μ m細い結果となった。以前の論文より、通常のとキソプラズマは長さ5~7 μ m、幅2~3 μ mと報告されている[2]。よって今回コントロールとして用いたGFP-RHもこの範囲内であるため、GFPを付加したことによる体長の変化ではないと考えられる。

増殖率の比較実験では、GFP-RHとGFP-Nはほぼ同じ増殖率を示したが、C-GFPはこれより低い増殖率を示した（Fig.12）。この実験で得られたGFP-RHの増殖曲線を、すでに報告されている論文[14]のRH株の増殖曲線と比較した結果、ほぼ同じような傾向を示していた。違いとして感染後5~20時間のデータが以前の論文よりもやや低い値を示している。これは宿主細胞に感染させる虫体のカウント時間が長くなったことで、とキソプラズマの活

性が低下したことが原因だと考えられる。

この 2 つの実験から、A7 の C 側に位置する 077 遺伝子がトキソプラズマの細胞周期に関与している可能性が得られた。体長と細胞周期の関係では、酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の *wee1*、*CDC2* 変異株を用いた実験が報告されている [15]。 *Wee1* 変異株は定常状態で G1 期が長く G2 期が短い。よって通常の数になる前に分裂が始まるので細胞が小さい。一方 *CDC2* 変異株は G2 期で停止するため、通常よりも細胞が長くなる。このように細胞周期の変化により体長に差が見られる現象がトキソプラズマでも引き起こされるのではないかと考えられる。

3. 考察

トキソプラズマ原虫の宿主への侵入には、放出されたマイクロネームタンパク質の細胞外領域と宿主細胞との接着が重要であると考えられている。これまでにマイクロネームタンパク質である MIC2 は MIC2AP、MIC6 は MIC1 と MIC4、MIC8 は MIC3 とその細胞外領域で結合して機能すると報告されている[16]。一方、細胞内領域部分の機能は、その大部分が不明であり、唯一 MIC2 と Aldolase の結合が知られている。Aldolase はアクチン・ミオシン複合体と連結し、トキソプラズマの宿主細胞侵入時の動力源として働く。MIC2 の細胞外領域は MIC2AP と結合し、宿主細胞との接着に関与していることから MIC2 は接着と侵入の動力源の 2 つの機能を併せ持っている。このようにマイクロネームタンパク質細胞内領域は細胞膜へのタンパク質固定だけでなく、そのタンパク質特有の機能があるのではないかとと思われる。

本研究で注目した AMA1 は、上記に挙げたタンパク質のように同じマイクロネームタンパク質と結合するという報告は未だない。しかし宿主細胞陥入時に形成される Moving Junction (MJ) において、侵入機構後期に関与するロプトリータンパク質の一種である RON2、RON4 等と結合し、MJ 構成に関与している。また AMA1 欠損虫体を用いた実験では、宿主との不完全接着やロプトリータンパク質の分泌阻害が報告されている。よって MIC2 と同様に、AMA1 細胞内領域でもこれらの働きを補助する機能があるのではないかと考えられ、AMA1 細胞内領域と結合する分子の同定・特徴の解析を試みた。

今回得られた A7 は 2 つの遺伝子 20.m03696 と 20.m07752 をまたがった構造をしていた。そしてその 2 つの分子に対する抗体で Western Blotting 解析を行ったところ、どちらも想定分子量よりも少し短い 110kDa あたりにバンドを形成した。

よってこの 2 つの遺伝子は一つの巨大タンパク質をコードしている可能性がある。また A7 と AMA1 細胞内領域との結合実験において、全長 1323 アミノ

酸のうち 892 番目から 1,323 番目の間に両分子の結合部位があると推測された。今後も A7 の発現部位を狭めた組み換えタンパク質を用いて、さらに結合部位特定実験を進める必要がある。

A7 の局在確認では虫体全体にドット状の局在を示していたが、同じく点在する Dense Granule タンパク質（ここでは Gra1 を使用）とは異なる局在を示した。しかし IMC との共染色によって、A7 は虫体先端部に局在していることが判明した。そしてマイクロネームタンパク質との染色では、A7 と共局在している部分も確認できた。A7 の局在を観察していく中で、ほとんどの虫体が先端部（娘細胞も含む）での強い A7 の蛍光を示した。これより A7 は虫体先端部に局在していると考えられるが、先端部以外にも A7 が局在を示す部分が存在した。そのため虫体先端部のみに A7 が局在するとは断言できず、今後更に A7 の局在を明らかにしていく必要がある。また点突然変異を導入したクローンを用いて A7 の局在確認を行ったところ、ドット状に局在するものと局在が見られないクローンが得られた。二つのクローン間のアミノ酸変異部分は 7 箇所存在し、その中の一つは SMC ドメイン内に存在した。そこで GFP-A7long の N 末端から SMC ドメインまでを含む部分だけを発現し A7 の局在が変化するか調べた。その結果、A7 の局在はドット状を示したことから A7 の局在には SMC ドメインが必要であることが証明された。しかし SMC ドメイン以降の点突然変異部分の配列も同様に A7 の局在に関わっている可能性も考えられるため、今後更に実験を重ねる必要がある。

A7 が局在を示した Apical end（トキソプラズマ頭部）には、コーノイドをはじめとする管状構造の器官が集中している。これらの器官が形成する Apical 複合体は虫体の生存と病原性に必要であり、またコーノイドの伸長・収縮運動が宿主細胞との接着と侵入に関与していることが報告されている[17]。さらに Apical end には、MIC2、AMA1、Centrin、dyein light chain(DLC)のような宿主侵入や細胞分裂、分子の移動といった幅広い機構を補助するタンパク質が数多く局在している[18]。よって Apical end はトキソプラズマが生存するために必要な器官が集合した場所であり、ここに局在を示した A7 も AMA1 と結合

することで侵入機構に関与している可能性が考えられる。本実験結果から両分子の結合に関わる機能として二つ考えられる。まず一つは AMA1 の機能である宿主細胞への接着である。A7 の 036 側に存在する微小管結合機能を持つ SMC ドメインが Apical end に結合し、AMA1 が宿主と接着するのを補助する。二つ目に 077 側の膜結合性を有する PH ドメインが SMC 内のアクチン結合タンパク質と相同性が高い部分と共に、アルドレースのような侵入の動力源として働く可能性がある。これは A7 が Apical end だけでなく虫体の腹部や尻部にも局在を示した個体があることや、MJ 部分に AMA1 が局在しているとの報告から考えられる。また A7 のドミナントネガティブを探る実験では、077 遺伝子を過剰発現させると体長や増殖率の変化が見られた。よって A7 の 077 部分には AMA1 との相互作用あるいは A7 単独の機能として、細胞周期にも関与している可能性が考えられる。

これらの推測を踏まえた上で、今後 IFA を用いた Apical end に局在するタンパク質との局在確認や、侵入途中の虫体で A7 の局在が変化するか確認する必要がある。また組み換えタンパク質ではなくトキソプラズマ原虫の溶解物を用いた結合実験を行うことで、さらに両分子の相互作用の解析とこの相互作用の宿主細胞侵入機構への関与、A7 分子の機能解析を探る必要がある。

4. 図表

| | |
|---|---|
| ① | 5' -TTGGATCCCCGGAGGAGGCTGCTACTTC-3' |
| ② | 5' -TTCTCGAGCTAGTAATCCCCCTCGAC-3' |
| ③ | 5' -AATTCGGATCCTTTGGCGCCGCCG-3' |
| ④ | 5' -TCGACGGCGCCGCCAAAGGATCCG-3' |
| ⑤ | 5' -TTAAGTCGACGAGTTACCACTACTATTTG-3' |
| ⑥ | 5' -TTTTGCGGCCGCTACTCCATCCACATATCA-3' |
| ⑦ | 5' -TTAAGGATCCTTGCATACATGAGAAAGAGT-3' |
| ⑧ | 5' -TTTTGCGGCCGCTTAATCCCATGTTTTGCTA-3' |
| ⑨ | 5' -TTAAGTCGACGTCTTACGCCAGAAACAGA-3' |
| ⑩ | 5' -TTTTGCGGCCGCTTAGGACCAGATACCGCCC-3' |
| ⑪ | 5' -TTTTCTCGAGGCACAGAAGATGGTCGAGGCG-3' |
| ⑫ | 5' -TTTTGCGGCCGCACTCCTCGAACGTCTCCTTGGG-3' |
| ⑬ | 5' -TTGGATCCATGTGTATAATTGCTGAGATTGTG-3' |
| ⑭ | 5' -TTGGATCCATGTTGATGGAGCATGCG-3' |
| ⑮ | 5' -TTTTGCGGCCGCGATGGGACTTTCGGCTTG-3' |
| ⑯ | 5' -TTTTGCGGCCGCTTCGCCGCTTTGGCTGTTT-3' |
| ⑰ | 5' -TTTTGGGCCCGACCGCTGCCGCTGGTAGAGGA-3' |
| ⑱ | 5' -TTTTGGTACCATGGAAGGCACAGACGCTGCG-3' |
| ⑲ | 5' -TTTT???????ATGCTCAAAGCTCCCAAGGAG-3' |
| ⑳ | 5' -TTTTGTCGACACCGCTGCCCGTGGTAGAGGACCG-3' |

Table1 プラスミド構築で使用したプライマー

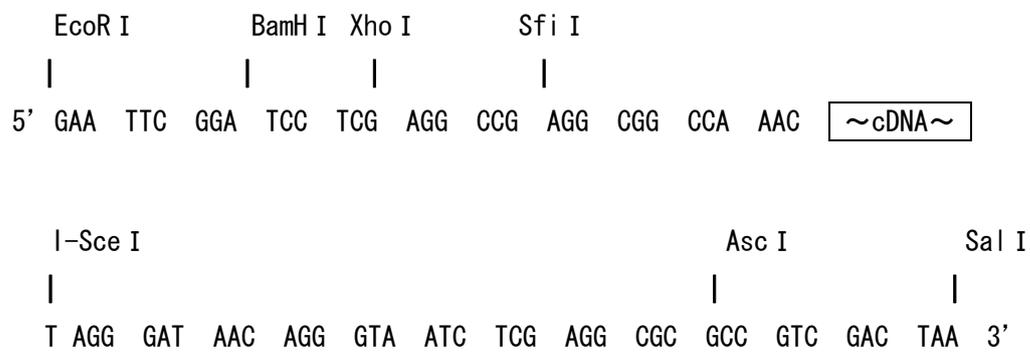
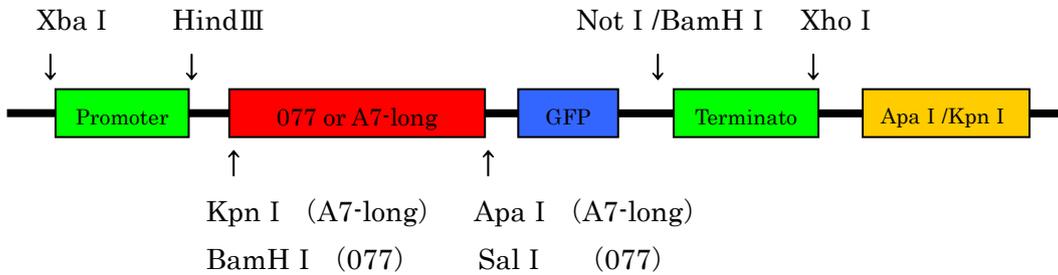


Fig.1 改変型 pMyr の MCS 部分配列

pMyr MCS 内の BamH I /Asc I 間を改変し、Sfi I /I-Sce I 間に *T.gondii*RH 株栄養型の cDNA を挿入した。

pBS① (pEGFP-N1 部分を挿入)



pBS② (pEGFP-C1 部分を挿入)

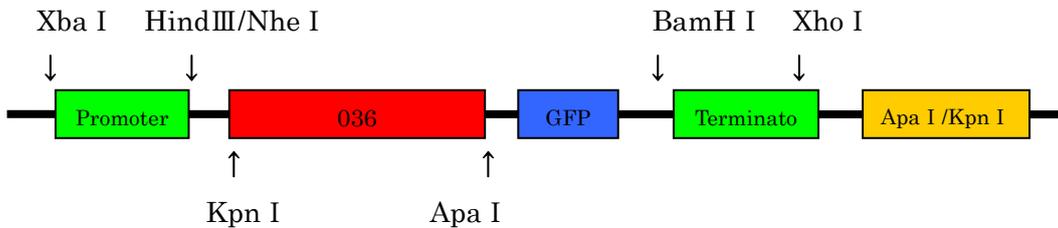


Fig.2 クローニングに使用した改変型 pBS の遺伝子挿入部分

A7 の過剰発現虫体のクローニングには、上記の二種類の改変型プラスミドを用いて行った。まず pDFX の Gra1 プロモーターと Gra2 ターミネーターを PCR で増幅し、Xba I /Xho I で切断し、pBS へ挿入した (黄緑色四角部分)。その後 pBS の Apa I と Kpn I 部分を酵素処理によって平滑化させ、お互いの切断面を結合させ不活化させた (橙色四角部分)。次に 077、A7-long 遺伝子は pEGFP-N1、036 遺伝子は pEGFP-C1 へ挿入した。使用した酵素は、077 は BamH I と Sal I、A7-long と 036 は Kpn I /Apa I で切断、結合させた。この GFP が付加した三種の遺伝子を、077 と A7-long は HindIII/Not I、036 は HindIII/BamH I で切断し、pBS へそれぞれ挿入した。pBS①では Not I と BamH I を酵素処理によって平滑化し、お互いの切断面を結合させた。同様に pBS②の HindIII/Nhe I も切断・結合させ、その後の実験に使用した。

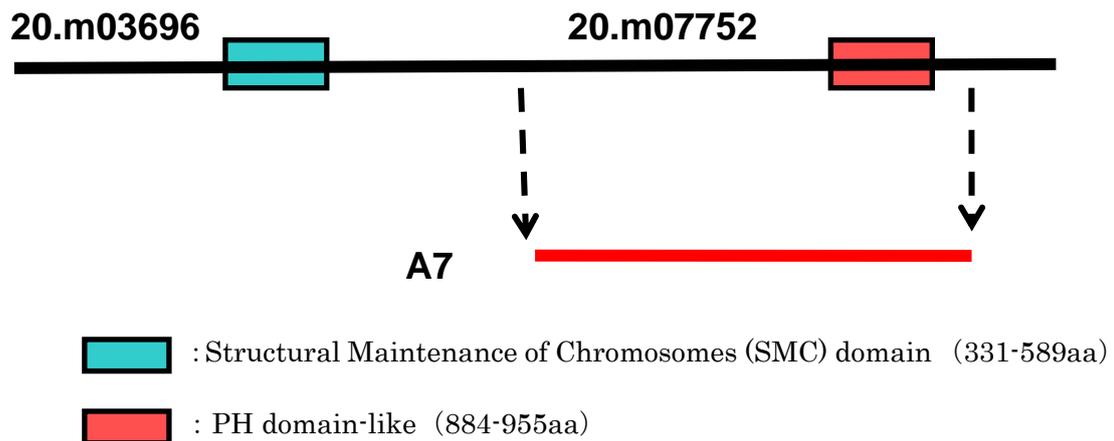


Fig.3 Yeast two hybrid によって同定された遺伝子

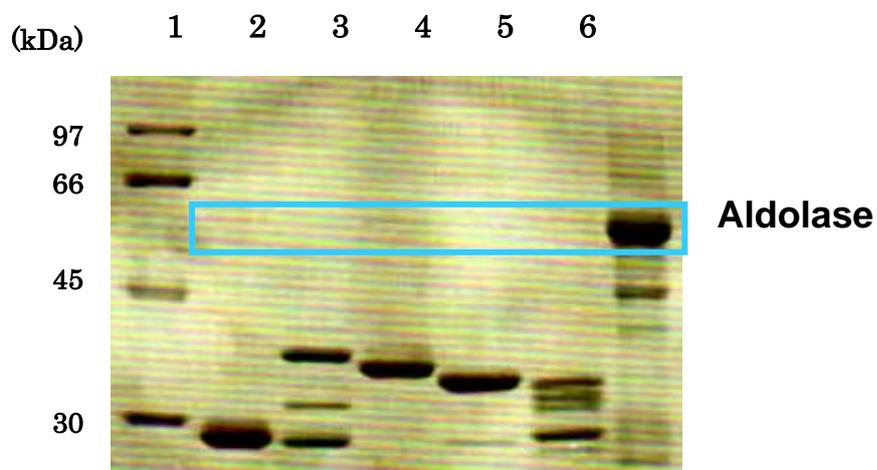
今回得られた遺伝子 A7 (赤線) の解析により、A7 の大部分の遺伝子配列は想定遺伝子の 20.m07752 であるが、A7 の N 末端側 99 遺伝子配列は 20.m07752 の直前に位置する 20.m03696 の配列も含まれていた。よって全長は 20.m03696 と 20.m07752 がつながった遺伝子であり、得られた A7 はこの全長 1,323 アミノ酸 (aa) をコードする巨大遺伝子の一部であると考えられる。またこのタンパク質には染色体構造維持 (SMC) ドメイン (青四角)、PH ドメイン構造 (赤四角) を持つ。

MIC2 SGSGIAGAIAGGVIGGLILLG·AAGGAS^YHY····YLSSSVGSPSAEIEYEADDG·····ATRVVMEEE···KETLVPVDDSD^MW^E
 MIC6 ·GSGHAGA IAGGVIGGLLLLS·AGVA^Y·AAF····MRKSGSGG·GEEIEYERG·······IEAAEA···SEVEVLVDLDSKT^W
 AMA1 ····TAL IAGLAVGGVLLLALLGGG^CYFAKRL·DRNKGVQAAHHEHEFQSDRGARKKRPSDLMQEAEPS^FW^DEAEEN IEQDGE^THVMVEGDY
 MIC8 ·GRYSKGTIALVVVGCVALLGI IAGGI^SYARN····RGGERDDEDLAPPRSTRERR····LSSMGEGFENASWASSVSMIPSAAPPPSGGI^WS

Fig.4 ミクロネームタンパク質と Aldolase を用いた Pull-down assay

A、本研究で用いたミクロネームタンパク質の C 末端配列の比較

下線部は膜貫通領域を示し、チロシン（ Y : ピンク）以降のタンパク質が細胞内領域を示す。本研究ではこの細胞内領域のみを発現する組み換えタンパク質を実験に用いた。青文字が酸性残基、赤文字がトリプトファン（W）残基を示す。緑点線で囲まれた部分がほぼ同位置に保護されている酸性残基とトリプトファン残基である。



B、マイクロネームタンパク質と Aldolase との Pull-down assay

レーン 1 は em-pGEX、レーン 2 は AMA1、レーン 3 は MIC2、レーン 4 は MIC6、レーン 5 は MIC8、レーン 6 は Aldolase (input) を示している。それぞれの想定タンパク質分子量は 26kDa、33kDa、31kDa、30kDa、32kDa である。

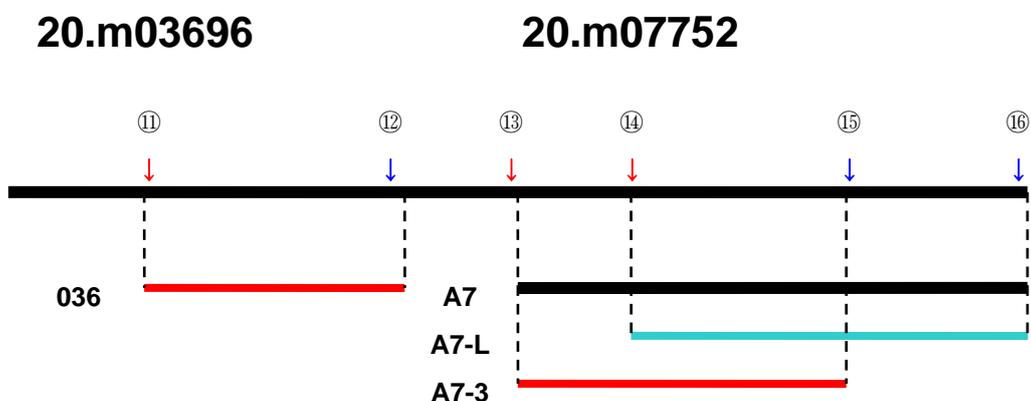
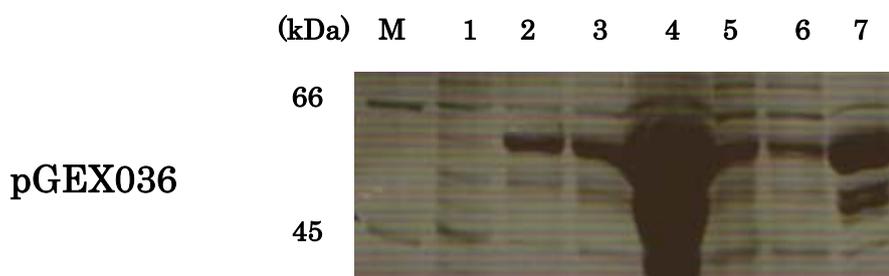
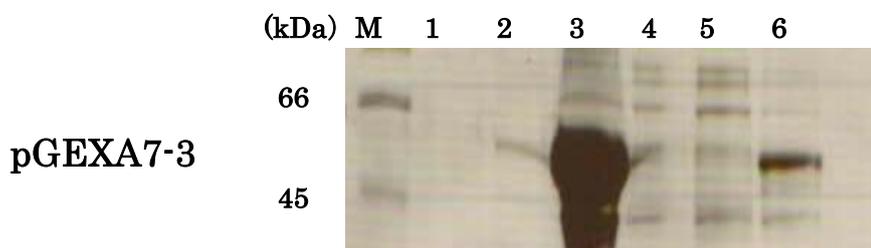


Fig.5 大腸菌と哺乳類細胞を用いた組み換えタンパク質の発現

A、構築したタンパク質の種類

得られた A7 の配列を用いて長さの異なるタンパク質をコードする遺伝子伝子を PCR によって増幅させ、A7-L、A7-3 と名づけた。また抗体作製のために 036、A7 それぞれの遺伝子が重ならない部分を選び、その部分を PCR によって増幅させた（赤線部分）。↓の上の番号は Table1 のプライマー番号と一致している。



B、大腸菌を用いた pGEX036 と pGEXA7-3 タンパク質発現の確認

pGEXA7-3 : レーン 1 と 2 は IPTG 添加前後、レーン 3 と 4 は大腸菌を破碎後遠心した際の沈殿物と上清、レーン 5 は GST ビーズを遠心した際の上清、レーン 6 は精製したタンパク質である。

pGEX036 : レーン 1 と 2 は IPTG 添加前後、レーン 3 は大腸菌破碎前、レーン 4 と 5 は破碎後遠心した際の沈殿物と上清、レーン 6 は GST ビーズを遠心した際の上清、レーン 7 は精製したタンパク質である。

GST の分子量は約 26kDa であり、それを含めたそれぞれの想定分子量は、A7-3 が 57kDa、036 が 59kDa である。

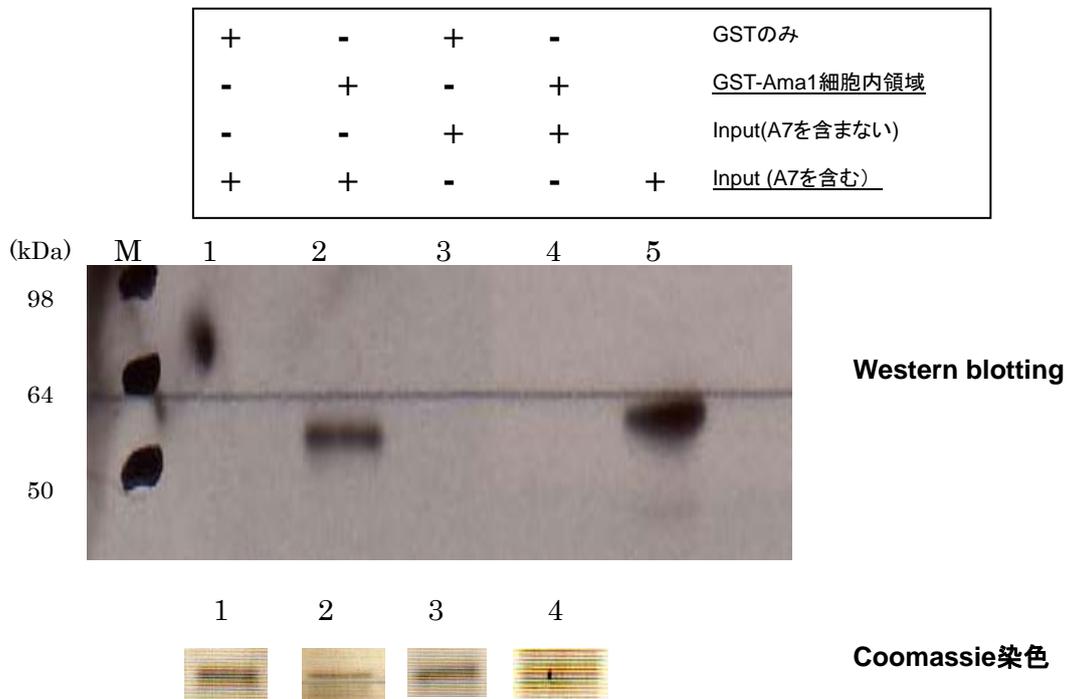


Fig.6 Pull down assay による AMA1 細胞内領域と A7 タンパク質の結合実験

- Western blotting : AMA1 と A7 を混合させたレーン 2 でのみバンドが検出された。
- Coomassie 染色 : レーン 1 と 3 は GST のみ (1 μ g)、レーン 2 と 4 は GST-AMA1 と細胞内領域 (1 μ g) を混合させた。GST のみであるレーン 1 と 3 のバンドがレーン 2 と 4 よりも強く検出されている。

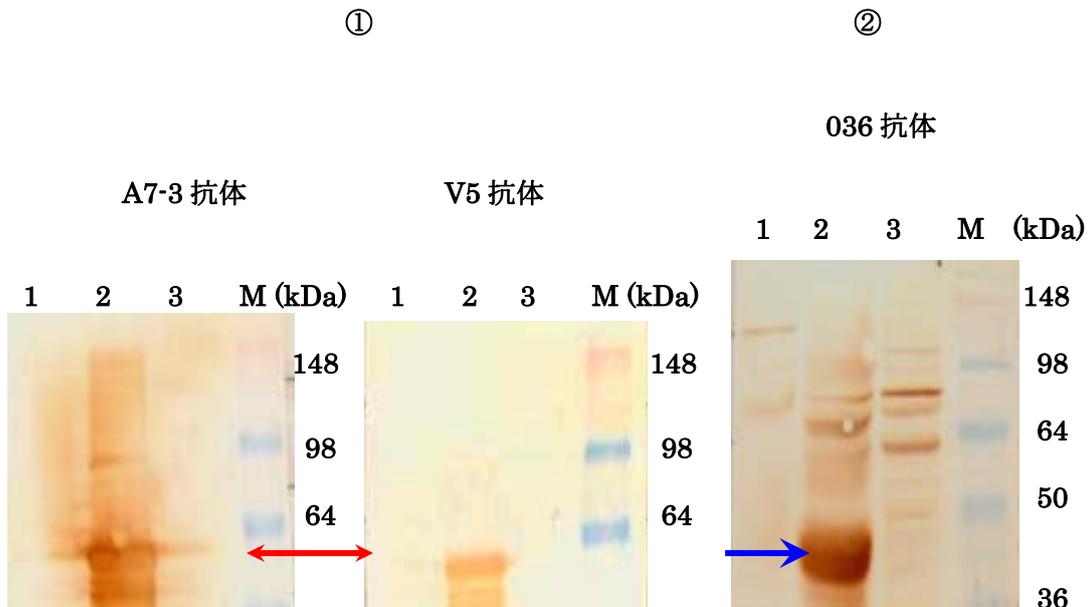


Fig. 7 ポリクローナル抗 A7 抗体・抗 036 抗体の評価

マウス・ウサギそれぞれで A7-3、036 の抗体を作製し、Western Blotting 解析によって抗体価を確認した。それぞれレーン 1 が RH 溶解物、レーン 2 が哺乳類細胞で発現させた pcDNAA7-3 (①)、pcDNA036 (②)、レーン 3 が em-pcDNA である。その結果 A7-3 (赤矢印)、036 (青矢印) が検出された。分子量はそれぞれ 31kDa、33kDa である。量バンドが想定分子量よりも大きな値で検出されているのは、検出時に必要なエピトープが付加されているためと思われる。尚、ポジティブコントロールとして A7 では V5 抗体を用いた。

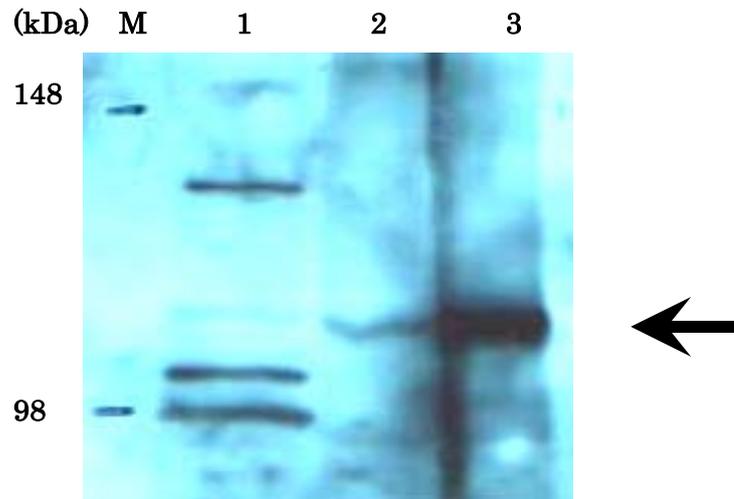


Fig. 8 Western Blotting 法を用いた 20.m07752 と 20.m03696 のタンパク質 連結確認実験

RH 株の溶解物を用いて Western Blotting 解析を行い、それぞれ抗 A7 抗体（レーン 2）、抗 036 抗体（レーン 3）で検出させた。レーン 1 はネガティブコントロールとして em-*pcDNA* を用い、抗 A7 抗体を反応させた。その結果、レーン 2 と 3 で同じ位置にバンドを検出した（矢印部分）。077 と 036 がつながった総分子量は約 145kDa であるが、それよりも低い位置にバンドを検出した。これはタンパク質の成熟過程で短くなったか、内在性のメチオニンからタンパク質が転写された可能性がある。

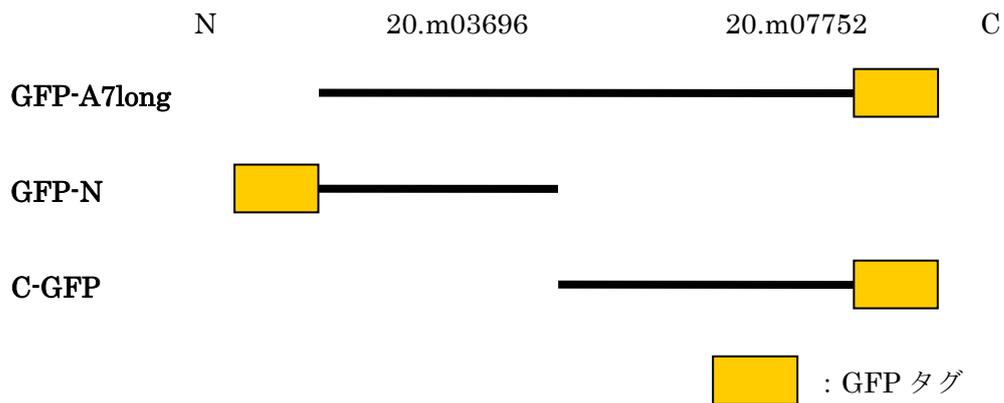


Fig.9 構築した GFP 融合タンパク質の種類

A7 の局在確認には、*T. gondii* RH 株栄養型 cDNA を用いて PCR を行い、pEGFP-N1 に導入した。これをトキソプラズマ虫体内で一過性に過剰発現させ、IFA に使用した (GFP-A7long)。A7 ドミナントネガティブの特徴検索には、N 末または C 末に GFP を付加したタンパク質を使用した。036DNA と 077DNA を PCR で増幅し、改変型 pBS に導入した。その後トキソプラズマで発現させ、GFP の発光が最も強いクローンをそれぞれ選択し、GFP-N と C-GFP を作製した。コントロールとして RH 株に pDFX を導入させた GFP-RH を用いた。

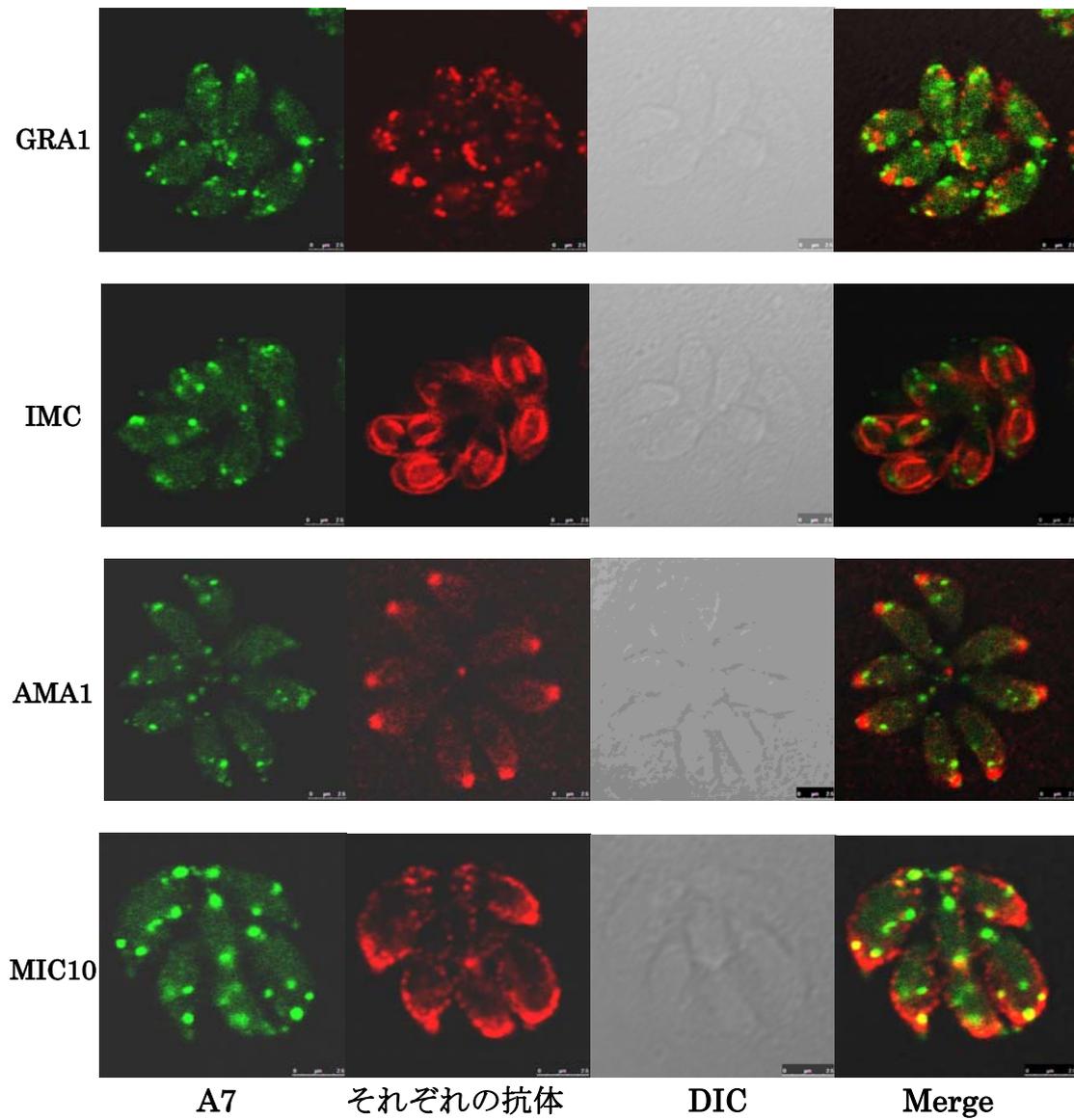
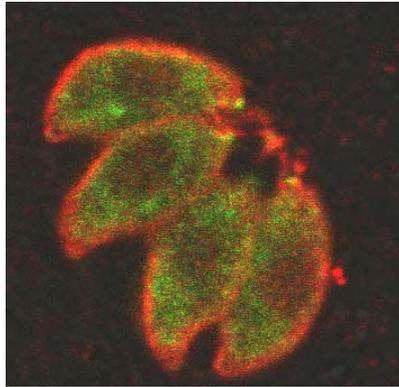


Fig.10 IFAT による A7 の局在確認

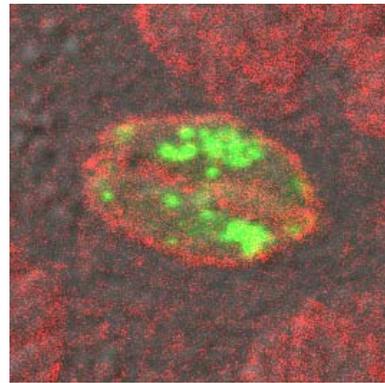
A、様々なタンパク質との同時染色

GFP-A7long を発現している虫体を、それぞれ 7 種の抗体で染色した。

写真は A7-long (緑で染色) と GRA1、IMC、AMA1、MIC10 (すべて赤で染色) との局在を示す。GFP-A7long は虫体全体に点在しているが、同じくドット状の局在を持つ GRA1 とは局在が一致していない。IMC での共染色によって A7 が虫体先端部に局在していることがわかった。一方マイクロネームタンパク質との局在確認では、一部の A7 がマイクロネームタンパク質と共局在を示している虫体も観察された。



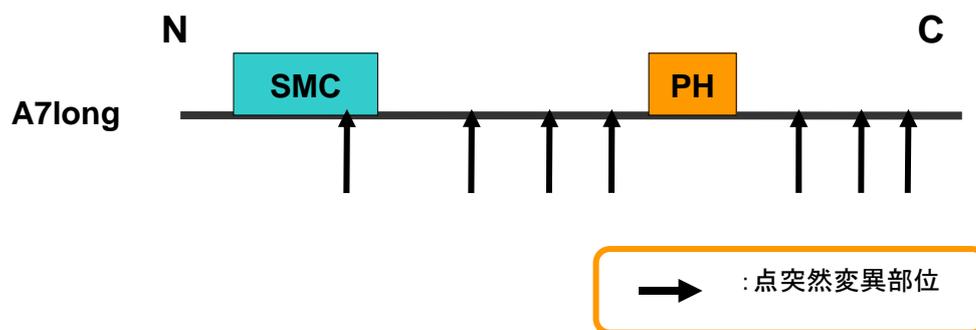
No.2



No.4

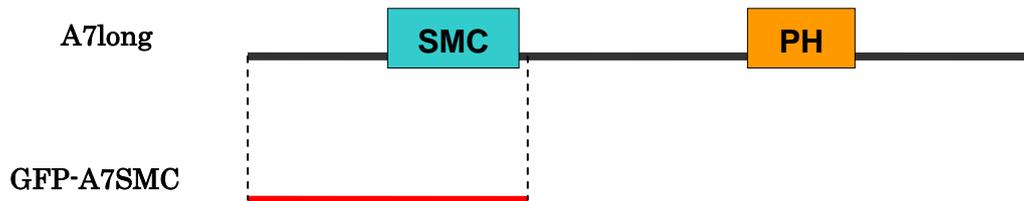
B、点突然変異を導入した虫体の A7 局在の変化

GFP-A7long に点突然変異を導入したクローンを 4 種作製した。そのうち 3 種の A7 の局在は、右に示す No.4 のようにドット状の局在を示していた (緑色蛍光)。しかし No.2 のみ、核を除く虫体全体に局在していた。A7 遺伝子の C 末側に GFP を付加した虫体も同様の結果を示した (data not shown)。なお、赤色蛍光は A7 と共染色した SAG1 を示す。この A7 局在の変化には下記に示す 7 つのアミノ酸置換が関わっていると考えられる。

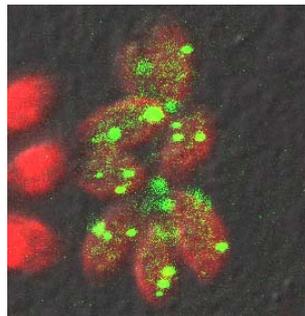


C、局在の異なる2クローン間のアミノ酸の違い

A7の局在確認において、局在の異なるNo.2とNo.4のアミノ酸配列を比較した。矢印で示す部分に点突然変異が存在する。



A7-SMC



D、SMC 部分を発現させた A7 の局在確認

GFP-A7SMC は *T. gondii* RH 株栄養型 cDNA を鋳型とし、036 の N 末端から SMC までの部分を増幅して使用した。IFAT の結果、Fig.9C の No.4 と同様にドット状の局在を確認した。これより SMC 部分は A7 の局在に必要なドメインであることが示唆された。

A. 体長測定結果

| | GFP-RH (Control) | GFP-N | C-GFP |
|--------------------------|------------------|------------------|-----------------|
| length (μm) | 5.59 ± 0.79 | 5) 27 ± 0.71 | 5.49 ± 0.65 |
| width (μm) | 2.23 ± 0.53 | 1.97 ± 0.39 | 1.77 ± 0.31 |

B. 測定に用いた写真

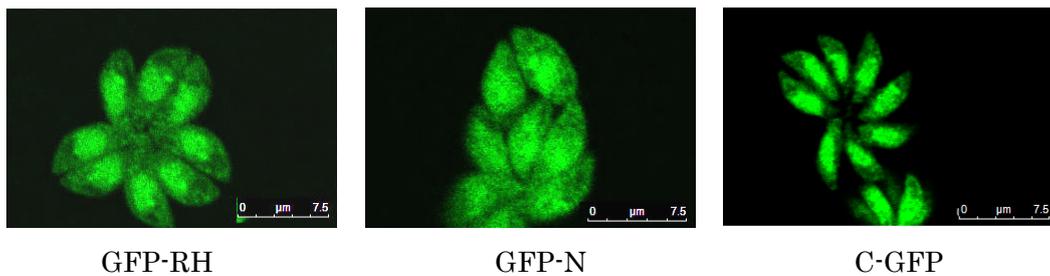


Fig.11 ドミナントネガティブ A7 の体長測定

A7 をそれぞれ 036 タンパク質部分、077 タンパク質部分に分けて過剰発現させた株を用いて、ドミナントネガティブの効果を探った。体長測定のために IFA で虫体全体が観察できる写真 (B) を撮り、各々120 個体測定、平均値を算出した (A)。長さは体長、幅は虫体の最も太い部分を測った。コントロールとして RH 株遺伝子の N 末に GFP を付加した GFP-RH を用いた。

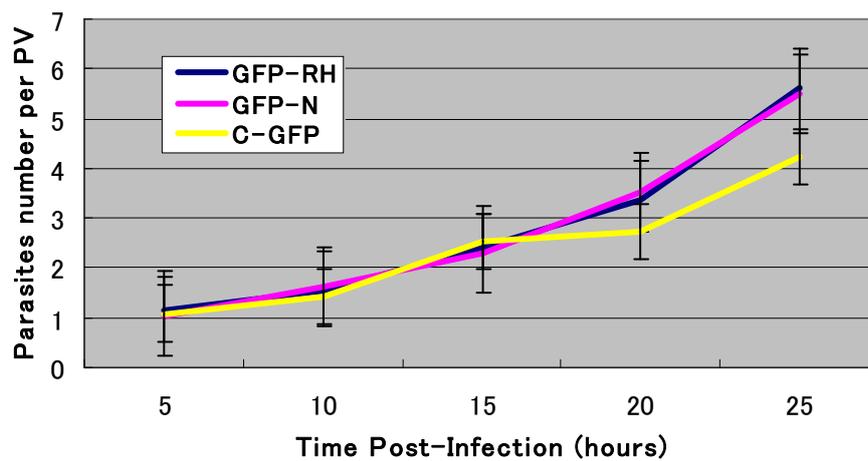


Fig.12 増殖率の変化

3種の株をHFF細胞に感染させ、一時間後に浮遊虫体を除いた。感染後5時間ごとにカバースリップを回収、固定しIFAを行った。細胞外虫体と区別するために抗SAG1抗体で染色し、細胞内にいる抗SAG1抗体で染まらずGFPのみ蛍光している虫体をカウントした。PV内で単独、2分裂、4分裂、8分裂、16分裂までの虫体をカウントし、時間ごとの平均虫体数（1PVあたり）をグラフ化した。

謝辞

本研究を進めるにあたりご指導・ご助言を頂いた感染病理学分野 五十嵐慎先生、高度診断学分野 上野晃生さんには謹んで感謝申し上げます。五十嵐先生には日頃から研究の進み具合を気にかけていただき暖かく見守ってくださいました。また研究以外でも優しい言葉で私を励まし元気づけて下さり、とても心強かったです。上野さんは研究室を離れた後も研究のご助言や相談にのってくださいました。また齋木さんには発表や卒業論文へのアドバイス、同研究室の織田君やシシエンコフには研究室の様々な場面でお世話になりました。その他原虫病研究センターの先生方、研究員の皆さん、事務室の方々にも様々な場面で助けていただきました。この場を借りてお礼と代えさせていただきます。有り難うございました。

参考文献

1. 矢野明彦 2007 日本におけるトキソプラズマ症
1-7 (財)九州大学出版会 福岡
2. 木村哲、喜田宏 2004 人獣共通感染症
329-331 医薬ジャーナル社 大阪
3. **Dominique Soldati, Jean Francois Dubremetz, Maryse Lebrun** 2001
Microneme proteins: structural and functional requirements to
promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite
Toxoplasma gondii
4. **Travis j. Jewett, L. David Sibley** 2003
Aldolase Form a Bridge between Cell Surface Adhesins and the Actin
Cytoskeleton in Apicomplexan Parasites
5. **G. Lucas Starnes, Travis J. Jewett, Vern B. Carruthers, and L. David
Sibley** 2006
Two Separate, Conserved Acidic Amino Acid Domains within the
Toxoplasma gondii MIC2 Cytoplasmic Tail Are Required for Parasite
Survival
6. **Jeffrey Mital, Markus Meissner, Dominique Soldati, and Gary E. Ward**
2005
Conditional Expression of *Toxoplasma gondii* Apical Membrane
Antigen-1 (TgAMA1) Demonstrates That TgAMA1 Plays a Critical Role
in Host Cell Invasion
7. **David L. Alexander, Jeffrey Mital, Gray E. Ward, Peter Bradley, John C.**

Boothroyd 2005

Identification of the Moving Junction Complex of *Toxoplasma gondii*: A Collaboration between Distinct Secretory Organelles

8. **ébastien Besteiro, Adeline Michelin, Joël Poncet, Jean-François Dubremetz, Maryse Lebrun 2009**

Export of a *toxoplasma gondii* Rhoptry Neck Protein Complex at the Host Cell Membrane to Form the Moving Junction during Invasion

9. **Marc-Jan Gubbels, Margaret Lehmann, Mani Muthalagi, Maria E. Jerome, Carrie F. Brooks, Tomasz Szatanek, Jayme Flynn, Ben Parrot, Josh Radke, Boris Striepen, Michael W. White 2008**

Forward Genetic Analysis of the Apicomplexan Cell Division Cycle in *Toxoplasma gondii*

10. **Aoife T. Heaslip, Stephanie C. Ems-McClung, Ke Hu 2009**

TgICMAP1 is a Novel Microtubule Binding Protein in *Toxoplasma gondii*

11. **東原和成 1995 総説 PH ドメイン 新しい機能性ドメインとしての可能性 日薬理誌 106 1-9**

12. **Lilach Sheiner, Joana M. Santos, Natacha Klages, Fabiola Parussini, Noelle Jemmely, Nikolas Friedrich, Gary E. Ward and Dominique Soldati-Favre 2010**

Toxoplasma Gondii transmembrane microneme proteins and their modular design

13. **Moritz Treeck, Sonja Zacherl, Susann Herrmann, Ana Cabrera, Maya Kono, Nicole S. Struck, Klemens Engelberg, Silvia Haase, Friedrich**

Frischknecht, Kota Miura, Tobias Spielmann, Tim W. Gilberger 2009

Functional Analysis of the Leading Malaria Vaccine Candidate AMA-1 Reveals an Essential Role for the Cytoplasmic Domain in the Invasion Process

14. **Peter J. Appleford, Judith E. Smith 1996**

Toxoplasma gondii: the growth characteristics of three virulent strains

15. **Paul Nurse, Pierre Thuriaux 1980**

REGULATORY GENES CONTROLLING MITOSIS IN THE FISSION YEAST *SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE*

16. **Markus Meissner, Matthias Reiss, Nicola Viebig, Vern B. Carruthers, Catherine Toursel, Stanislas Tomavo, James W. Ajioka and Dominique Soldati 2001**

A family of transmembrane microneme proteins of *Toxoplasma gondii* contains EGF-like domains and function as escorters

17. **Naomi S. Morrissette and L. David Sibley 2002**

Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites

18. **Ke Hu, Jeff Johnson, Laurence Florens, Martin Fraunholz, Sapna Suravajjala, Camille Dilullo, John Yates, David S. Roos, John M. Murray 2006**

Cytoskeletal Components of an Invasion Machine-The Apical Complex of *Toxoplasma gondii*