

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2008

課題番号：19041008

研究課題名（和文） トキソプラズマ原虫と宿主間での脂質代謝ネットワークの解明

研究課題名（英文） Study of lipid metabolism network between *Toxoplasma* and hosts

研究代表者

西川 義文 (NISHIKAWA YOSHIFUMI)

帯広畜産大学・原虫病研究センター・准教授

研究者番号：90431395

研究成果の概要：

本研究計画は、人獣共通感染症を引き起こすトキソプラズマにおける、原虫-宿主間での脂質代謝ネットワークの解明を目指したものである。本研究で、トキソプラズマは利己的に宿主脂質代謝を制御し、増殖ステージに応じてコレステロール資源を使い分けていることが明らかとなった。さらに、非感染細胞での過剰な脂質の蓄積は宿主細胞死を誘導することを見出した。本結果は、トキソプラズマの生存戦略の一つとして宿主脂質代謝の制御が関与していることを示している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,600,000	0	2,600,000
2008 年度	1,900,000	0	1,900,000
年度			
年度			
年度			
総計	4,500,000	0	4,500,000

研究分野：原虫病免疫病態生化学

科研費の分科・細目：

キーワード：トキソプラズマ、脂質代謝、コレステロール、アポトーシス、プロテオーム、抗原虫薬

1. 研究開始当初の背景

トキソプラズマ原虫 (*Toxoplasma gondii*) によって引き起こされるトキソプラズマ症は、世界的な広がりを見せる重要な人獣共通感染症である。ヒトでは妊婦が感染した場合、流産・死産や先天性トキソプラズマ症を引き起こすほか、エイズ患者や免疫抑制剤の投与を

受けている患者にトキソプラズマ性脳炎を起こすことが知られている。トキソプラズマ原虫は様々な有核哺乳動物細胞に能動的に侵入し、本原虫に特徴的な寄生胞を形成する。本原虫が寄生胞を形成する理由として、宿主の免疫機構からの逃避と宿主細胞から栄養物質の強奪があり、原虫自身の生存のために

宿主の応答機構を巧みに制御している。研究代表者はトキソプラズマ原虫の複雑な生物学の一端を解明するためにその脂質代謝機構に注目し、本原虫が形成する脂肪滴の役割について研究を展開してきた。トキソプラズマ原虫は、原虫自身の生存の為に脂肪滴を生合成し、エネルギー源としてトリアシルグリセロールやコレステロールエステルを蓄積する。これまでに、トキソプラズマ原虫の脂肪滴形成に重要な役割を果たすアシル CoA:ジアシルグリセロールアシル転移酵素 (TgDGAT) とアシル CoA:コレステロールアシル転移酵素 (TgACAT) を明らかにした。更に、TgACAT は、宿主細胞が LDL 受容体依存的に取り込んだコレステロールを本原虫が強奪しエネルギー源とするステップで重要な酵素であることを見出した。しかしながら、原虫と宿主間での脂質代謝ネットワークについてはあまり解明されていないため、統合的な研究展開が必要であると考えた。本研究では、この脂質代謝ネットワークを解明するために、トキソプラズマ原虫と宿主との相互作用を解析し、「寄生体感染と脂質代謝」という新しい研究分野を創造することを目指した。

2. 研究の目的

脂質代謝は様々な生物に存在する重要な代謝機構であり、運動エネルギーの供給に必須の反応である。現在、各種原虫における原虫独自の脂質代謝機構についての解析が始まっているが、原虫と宿主間でどのように脂質代謝が関係し連携しているかについては未だ十分に解明されていない。本研究では、細胞内寄生原虫の代表的なモデル原虫であるトキソプラズマ原虫の脂質代謝機構の持つ生物学および生理学的意義と宿主への相互作用を解明することを目指す。トキソプラズマ原虫は様々な有核哺乳動物細胞に能動的に侵入し、本原虫に特徴的な寄生胞を形成して、宿主細胞から栄養物質 (コレステロール等) を強奪し、原虫自身の生存のために宿主の応答機構を巧みに制御している。従って、本原虫の脂質代謝機構の解析は、「原虫-宿主間の脂質代謝ネットワークの理解」という新しい概念を創造することに繋がると考える。

3. 研究の方法

プロテオミクスと完全長 cDNA データベースを駆使し、トキソプラズマ原虫と宿主間での脂質代謝ネットワークの分子レベルでの解明と、脂質代謝関連遺伝子欠損マウスを用いた本ネットワークの統合的な理解を目指すために以下の計画で研究を実施した。

(1) トキソプラズマ感染による宿主細胞の脂

質代謝の制御

LDL、酸化 LDL、各種薬剤存在化でトキソプラズマと正常マクロファージ及び LDL 受容体欠損マクロファージを培養し、感染初期と後期でトキソプラズマの増殖を測定する。原虫増殖は、原虫特異的に取り込まれるトリチウム標識ウラシルを使用し、トリチウム取込み能を測定することで判定する。

トキソプラズマ感染、非感染マクロファージから RNA を抽出し、cDNA を作製する。脂質代謝関連遺伝子に対し特異的プライマーを設計し、半定量的 RT-PCR により標的遺伝子の発現変動を解析する。

(2) 脂質代謝阻害剤の抗トキソプラズマ作用

脂質代謝制御に関与する薬剤をトキソプラズマ感染マウスに 1 週間連日投与し、マウスの生存率を計測する。

(3) トキソプラズマの可溶性タンパク質ライブラリーとプロテオーム解析によるトキソプラズマ由来脂質代謝関連因子の同定

トキソプラズマ感染細胞由来培養上清あるいはトキソプラズマタンパク質をマクロファージ細胞株 J774 に反応させ、フローサイトメーターを用いて LDL 受容体の発現を解析する。

トキソプラズマ感染細胞由来培養上清あるいはトキソプラズマタンパク質をマクロファージ細胞株 J774 に反応させ、脂肪滴の染色を実施後、顕微鏡観察を行う。

トキソプラズマの可溶性タンパク質をデータベースより選択し、大腸菌発現系を用いて組換えタンパク質を作製する。タンパク質の精製、エンドトキシン除去、フィルター滅菌後に細胞培養に使用する。

精製トキソプラズマにカルシウムイオンフォアを作用させ分泌タンパク質を回収する。2次元電気泳動で展開後、タンパク質染色し、カルシウムイオンフォア依存的に発現が増強されるスポットを選択し、MALDI-TOF-MS により部分アミノ酸配列を決定する。トキソプラズマのゲノムデータベースを基にタンパク質を同定する。

(4) 宿主脂質代謝破綻による宿主細胞死の誘導

トキソプラズマ感染 J774 にて TUNEL 法によりアポトーシスの検出を行う。GFP 発現トキソプラズマを使用することで、感染細胞と非感染細胞を蛍光顕微鏡で区別する。

トキソプラズマ感染 J774 の RNA を回収し、cDNA を作製する。アポトーシス関連遺伝子に対し特異的プライマーを設計し、半定量的 RT-PCR により標的遺伝子の発現変動を解析する。

トキソプラズマ感染 J774 の培養上清あるいはトキソプラズマ感染マウスの腹水を回収し、一酸化窒素、IFN- γ 、IL-6、TNF- α 等の産生をELISAにより測定する。

トキソプラズマ感染 J774 から脂質を抽出し、細胞内トリアシルグリセロールを測定キットにより定量する。

トキソプラズマの完全長 cDNA ライブラリーを作製し、トキソプラズマゲノムデータベースを利用した *in silico* 解析を行う。選択した候補分子について、大腸菌発現系による組換えタンパク質を作製し、アポトーシス促進/誘導活性を測定する。

候補分子について、野生型タンパク質の過剰発現トキソプラズマ株、ドミナントネガティブ変異体株を作製し、安定な形質転換体を作製する。得られた株について、アポトーシス促進/誘導活性を測定する。

研究進展の対応策として、プロテオーム解析と完全長 cDNA データベースからの解析の2つの方法を採用している。プロテオーム解析は、その専門家である李應具博士（国立大学法人帯広畜産大学・原虫病研究センター）の研究支援により実施する。cDNA データベースの解析については、研究協力者である渡辺純一博士（東京大学医科学研究所）と共同で行う。従って、リスクの軽減を図るとともに、効率的に研究を進めることが可能となる。

4. 研究成果

(1) トキソプラズマ感染による宿主細胞の脂質代謝の制御

トキソプラズマは自身でコレステロールを合成することができないため、宿主細胞からコレステロールを取込み細胞膜合成に利用しなければならない。ここでは、トキソプラズマが宿主細胞（マクロファージ）のコレステロール代謝をどのように制御しているのかについて解析した。細胞内のコレステロール量は、メバロン酸経路によるコレステロールの合成と LDL 受容体やスカベンジャー受容体による細胞外からのコレステロールの取り込みにより制御されている。従って、この2つの経路について着目した。

LDL 存在化でトキソプラズマとマクロファージを培養すると、感染40時間でLDL依存的に原虫の増殖が促進された。しかしながら、感染20時間では原虫増殖に差は認められなかった。LDL 受容体欠損マクロファージにおけるトキソプラズマの増殖を比較したところ、正常マクロファージの場合に比べ原虫増殖が抑制され、感染40時間での差が顕著であった。病原体感染は宿主に様々なストレスと及ぼすことが推測されるため、トキソプラズマ感染が誘導する酸化反応を検証したところ、LDL の酸化を示唆する結果が得られ

た。そこで、酸化 LDL 存在化でトキソプラズマとマクロファージを培養したところ、感染20時間と40時間で原虫増殖の促進が認められた。さらに、トキソプラズマ感染による宿主細胞内のコレステロール量を測定したところ、感染40時間で正常マクロファージ内コレステロール量の増加が確認された。これらの結果より、マクロファージに発現する LDL 受容体やスカベンジャー受容体による細胞外からのコレステロールの取り込みが、トキソプラズマの増殖に利用されていることを見出した。しかしながら、感染初期（20時間）では、細胞外からのコレステロールの取り込み以外の経路が、原虫増殖に関与している可能性が示唆された。

そこで、メバロン酸経路によるコレステロールの合成の関与に着目した。トキソプラズマと20時間共培養したマクロファージからRNAを抽出し、cDNAを作製した。半定量的RT-PCRにより、脂質代謝関連遺伝子群の発現の変化を解析した。その結果、メバロン酸経路に重要な HMG-CoA 還元酵素の発現量が、トキソプラズマ感染により増加していた。HMG-CoA 還元酵素阻害剤（Lovastatin、Compactin）を前処理した正常マクロファージでは、トキソプラズマの増殖が抑制された。この抑制は、LDL 受容体欠損マクロファージでも認められたことから、メバロン酸経路による宿主コレステロール合成もトキソプラズマの増殖に重要である可能性が示された。しかし、HMG-CoA 還元酵素の作用点より下流には、コレステロール合成だけではなく、ドリコールやユビキノン合成に流れる経路も存在する。そこで各経路に特異的な遺伝子に着目し半定量的 RT-PCR で解析したところ、コレステロール合成系に作用するスクアレン合成酵素の活性化が認められ、他の経路の活性化は見られなかった。さらに、スクアレン合成酵素阻害剤（Zaragozic acid A）を正常マクロファージ及びLDL受容体欠損マクロファージに前処理したところ、トキソプラズマの増殖が抑制された。これらの結果より、感染初期におけるメバロン酸経路による宿主コレステロールの合成の誘導は、原虫増殖に必要であることが示された。

以上より、トキソプラズマが増殖ステージに依存して宿主のコレステロール代謝を調節すると同時に利用していることが明らかとなった。

(2) 脂質代謝阻害剤の抗トキソプラズマ作用

宿主脂質代謝の制御がトキソプラズマ感染をコントロールできるかについて検証した。宿主細胞のコレステロール吸収を阻害する Am80 は、*in vitro* の実験系でトキソプラズマの増殖を抑制した。次に、Am80 をトキシ

プラズマ感染マウスに8日間連日投与し、マウスの生存率を計測した。Am80の投与は生存率に影響を与えなかったが、生存期間の延長を示すことができた。つまり、Am80はトキソプラズマの急性感染をコントロールできる可能性が示唆された。

(3) トキソプラズマの可溶性タンパク質ライブラリーとプロテオーム解析によるトキソプラズマ由来脂質代謝関連因子の同定

トキソプラズマ感染細胞由来培養上清は、宿主細胞のLDL受容体の発現を増強させることを見出した。この結果は、トキソプラズマが脂質代謝制御に関与する分子を産生していることを示唆している。そこで、トキソプラズマ由来のタンパク質に注目し、トキソプラズマの可溶性タンパク質ライブラリーによるスクリーニングを実施した。また、トキソプラズマからのタンパク質分泌は細胞内カルシウム濃度の上昇が関与していることから、カルシウムイオンフォア刺激による分泌タンパク質の同定をプロテオーム解析にて行った。その結果、原虫の分泌小器官から生産される3種類の候補分子を同定した(TgSPATR, TgROP9, TgGRA7)。これら候補分子は、LDL受容体の発現を上昇させる、原虫の脂肪滴(脂質を蓄積する細胞器官)に局在する等の特徴を有していた。従って、これらの分子の作用により、宿主脂質代謝が制御されている可能性が示唆された。

(4) 宿主脂質代謝破綻による宿主細胞死の誘導

トキソプラズマ感染によりマクロファージ細胞株 J774 にてアポトーシスが誘導された。そこでより詳細にこの現象を解析したところ、トキソプラズマ感染細胞はアポトーシス抵抗性、非感染細胞はアポトーシス感受性である結果が得られた。非感染細胞のアポトーシスは、感染初期(20時間)と後期(40時間)で異なるメカニズムで誘導されていた。

感染初期では IFN- γ によりアポトーシスが誘導された。半定量的 RT-PCR 解析により、アポトーシス誘導における一酸化窒素合成系の関与が示唆された。IFN- γ の作用は一酸化窒素の産生を促し、一酸化窒素合成阻害剤により *in vitro* 及び *in vivo* においてトキソプラズマ感染が誘導するアポトーシスが抑制された。この結果は、免疫反応、特に IFN- γ 産生 T 細胞や NK 細胞等が非感染抗原提示細胞にアポトーシスを誘導し、炎症反応の抑制あるいは原虫特異的免疫反応の抑制に関与していることが示唆された。

一方、感染後期でのアポトーシスはトリアシルグリセロールの過剰な蓄積が起因していた。感染後期では宿主細胞のトリアシルグ

リセロールを主成分とする脂肪滴形成が促進され、トリアシルグリセロール合成阻害剤によりアポトーシスは抑制された。サイトカイン産生プロファイルの解析により、脂肪滴の蓄積と IL-6 の協調作用がアポトーシス誘導に重要であることが示唆された。

しかし、この細胞死の現象は上記の因子だけでは説明できず、原虫由来因子が補助的な作用をしている可能性が示唆された。そこで、トキソプラズマの完全長 cDNA を作製し、*in silico* 解析を行ったところ、アポトーシス促進活性を有する分泌タンパク質 TgPDCD5 を見出した。このタンパク質はトキソプラズマの分泌小器官に局在する分泌タンパク質であり、本分子の組換えタンパク質は宿主細胞に取り込まれることで宿主細胞のアポトーシスを促進する活性を有していた。TgPDCD5 の機能を詳細に解析するため、本分子を過剰に発現する組換えトキソプラズマを作製した。過剰発現株は、親株と比較して宿主細胞のアポトーシスをより促進した。また、抗 TgPDCD5 抗体は、トキソプラズマ感染が誘導するアポトーシスを阻害した。以上の結果より、TgPDCD5 は宿主細胞のアポトーシス促進活性を有していることが明らかとなった。

これまでの研究成果により、トキソプラズマは自身の増殖に有利なように宿主の脂質代謝を制御し、非感染細胞には細胞死を誘導することが明らかとなった。今後は、細胞内に存在するトキソプラズマが宿主コレステロールを原虫内に輸送するメカニズム、過剰な脂質産生が細胞死を誘導するメカニズムと病原性への関与に着目した「トキソプラズマと宿主間での脂質代謝ネットワークの解明」が課題となる。

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7件)

- ① Unno A, Suzuki K, Xuan X, Nishikawa Y, Kitoh K, Takashima Y. Dissemination of extracellular and intracellular *Toxoplasma gondii* tachyzoites in the blood flow. *Parasitol Int.* 57, 515-518, (2008), 査読有り
- ② Bannai H, Nishikawa Y, Matsuo T, Kawase O, Watanabe J, Sugimoto C, Xuan X. Programmed Cell Death 5 from *Toxoplasma gondii*: a secreted molecule that exerts a pro-apoptotic effect on host cells. *Mol Biochem Parasitol.* 159, 112-120, (2008), 査読有り
- ③ Takashima Y, Suzuki K, Xuan X, Nishikawa Y, Unno A, Kitoh K. Detection of the initial site of *Toxoplasma gondii*

reactivation in brain tissue. Int J Parasitol. 38, 601-607, (2008), 査読有り

- ④ Nishikawa Y, Zhang H, Ibrahim MH, Ui F, Ogiso A, Xuan X. Construction of *Toxoplasma gondii* bradyzoite expressing the green fluorescent protein. Parasitol. Int. 57, 219-222, (2008), 査読有り
- ⑤ 西川義文、総説「トキソプラズマの脂質代謝ネットワーク」獣医寄生虫学会誌、6巻、21-24, (2007), 査読無し
- ⑥ Kawase O, Nishikawa Y, Bannai H, Zhang H, Zhang G, Jin S, Lee EG, Xuan X. Proteomic analysis of calcium-dependent secretion in *Toxoplasma gondii*. Proteomics 7, 3718-3725, (2007), 査読有り
- ⑦ Nishikawa Y, Kawase O, Vielemeyer O, Suzuki H, Joiner K. A Xuan X, Nagasawa H. *Toxoplasma gondii* infection induces apoptosis in non-infected macrophages: role of nitric oxide and other soluble factors. Parasite Immunol. 29, 375-385, (2007), 査読有り

[学会発表] (計 12 件)

- ① 西川義文。細胞内寄生原虫の増殖メカニズムの解明に向けて:トキソプラズマの脂質代謝ネットワーク (ワークショップ)。第 143 回日本獣医学会学術集会、2007 年 4 月 3-5 日、つくば。
- ② 海野明広、玄学南、西川義文、鈴木和彦、鬼頭克也、高島康弘。*Toxoplasma gondii* の全身伝播における血中 Free tachyzoite と末梢血細胞感染 Tachyzoite の関与。第 144 回日本獣医学会学術集会、2007 年 9 月 2-4 日、北海道。
- ③ Yoshifumi Nishikawa, Hiroshi Bannai, Osamu Kawase, Xuan Xuan. *Toxoplasma gondii* infection induces apoptosis in non-infected macrophages: role of nitric oxide and Programmed Cell Death 5 of the parasite. 第 7 回あわじしま感染症・免疫フォーラム、2007 年 9 月 2-5 日、淡路島。
- ④ Hiroshi Bannai, Yoshifumi Nishikawa, Tomohide Matsuo, Osamu Kawase, Junichi Watanabe, Chihiro Sugimoto, and Xuan Xuan. A secreted molecule, Programmed Cell Death 5 from *Toxoplasma gondii*, possesses pro-apoptotic activity on host cells. The 3rd International Zoonosis Seminar, 2007 年 11 月 29-30 日、韓国。

- ⑤ 川瀬撰、西川義文、神繁樹、李應具、玄学南。トキソプラズマ原虫におけるカルシウム依存的分泌タンパク質の網羅的同定および動態解析。第 145 回日本獣医学会学術集会、2008 年 3 月 28-30 日、東京。
- ⑥ 西川義文、玄学南。トキソプラズマの増殖における宿主細胞内コレステロールの役割。第 77 回日本寄生虫学会、2008 年 4 月 2-4 日、長崎。
- ⑦ 高島康弘、鈴木和彦、玄学南、西川義文、海野明広、鬼頭克也。*Toxoplasma gondii* 脳内再活性化原発部位の同定。第 77 回日本寄生虫学会、2008 年 4 月 2-4 日、長崎。
- ⑧ Yoshifumi Nishikawa, Hiroshi Bannai, Kyoko Yamada, Xuan Xuan. Enhancement of host-cell apoptosis by a secreted molecule from *Toxoplasma gondii*, Programmed Cell Death 5. 第 7 回あわじしま感染症・免疫フォーラム、2008 年 9 月 8-11 日、淡路島。
- ⑨ Bannai H, Nishikawa Y, Matsuo T, Kawase O, Watanabe J, Sugimoto C, Xuan X. Enhancement of host cell apoptosis by a secreted molecule from *Toxoplasma gondii*, Programmed Cell Death 5. 16th Japanese-German Cooperative Symposium on Protozoan Diseases, 2008 年 9 月 24-29 日、ドイツ。
- ⑩ Nishikawa Y, Bannai H, Xuan X. Manipulation of host apoptosis during infection with *Toxoplasma gondii*: Molecular mechanisms and role in pathogenesis (招待講演). XVIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria, 2008 年 9 月 24-29 日、韓国。
- ⑪ 西川義文、川瀬撰、坂内天、松尾智英、玄学南。トキソプラズマにおける新規トロンボスポンジン関連タンパク質の解析。第 78 回日本寄生虫学会、2009 年 3 月 27-28 日、東京。
- ⑫ イbrahim ハニー、坂内天、玄学南、西川義文。トキソプラズマ由来 Cyclophilin-18 が誘導する一酸化窒素は CCR5 依存的にブラディゾイト変換を誘導する。第 78 回日本寄生虫学会、2009 年 3 月 27-28 日、東京。

[図書] (計 1 件)

西川義文。羊土社、トキソプラズマ感染による宿主細胞アポトーシスの制御。実験医学増刊号「感染症のサイエンス」、2009 年、218-224。

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

名称：原虫病治療薬

発明者：西川義文

権利者：帯広畜産大学

種類：特許権

番号：特願 2008-064586

出願年月日：2008年3月13日

国内外の別：国内

名称：抗原虫効果を有するヒトデ抽出物

発明者：川瀬撰、玄学南、西川義文

権利者：帯広畜産大学

種類：特許権

番号：特願 2008-193166

出願年月日：2008年7月28日

国内外の別：国内

〔その他〕

研究室ホームページ

<http://www.obihiro.ac.jp/~geneticbiochem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西川 義文 (NISHIKAWA YOSHIFUMI)

帯広畜産大学・原虫病研究センター・准教授

研究者番号：90431395

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：