

「抗トキソプラズマ生体防御応答とその破綻による病原性発揮メカニズムの解明」

大阪大学微生物病研究所 教授

山本 雅裕

要旨

本研究では、インターフェロン誘導性 GTPase を抑制する病原性因子を探索し、転写調節因子 IWS1 が ROP18 の発現を制御し、宿主の抗トキソプラズマ免疫応答を抑制することで病原性を調節していることを明らかにした。さらに、*in vivo* CRISPR スクリーン法を開発し、病原性に関与する遺伝子を網羅的に解析した。その結果、新規病原性因子 GRA72 を発見し、寄生胞の維持に関与することを突き止めた。また、宿主適応に重要な TgRimM を同定し、TgRimM がアピコプラスト内で RNA を調節し、原虫の成長に不可欠であることを示した。次に、日本のトキソプラズマ株のゲノム解析を行い、欧米型 (HG2) との混血が見られること、特に沖縄では中南米由来の要素を持つ超強毒株が存在することを発見した。さらに、ゲノム組換え構造の可視化ツールを用いた解析により、日本のトキソプラズマがユーラシア大陸および北米由来の系統と遺伝的交流をしていることが示唆された。このように、本研究は病原性の分子基盤を解明するとともに、日本のトキソプラズマが大陸間で遺伝的交流の証拠を示し、トキソプラズマの新たな病原性獲得機構を解明した。

背景・目的

これまで、免疫不全者や骨髄・臓器移植患者、初感染の妊婦で重篤な感染症を引き起こす寄生虫であるトキソプラズマ原虫の決定的な病原性因子として、トキソプラズマ原虫が感染宿主細胞内に放出するタンパク質である ROP18 が知られていたが、ROP18 がどのようにしてトキソプラズマ原虫の中で作られているのか (発現しているのか) 不明であった。以前に米国の研究グループが免疫細胞であるマクロファージ内でトキソプラズマ原虫が生存し増殖するために必要な原虫の遺伝子群を *in vitro* CRISPR スクリーン法により網羅的に決定していたが、個々の遺伝子の解析はほとんど進んでいなかった [1]。またこのように CRISPR スクリーン法で得られた遺伝子が、個別に検討した場合に、本当に機能を有しているのかについても全く不明であった。そこで本研究で重要な病原性因子を同定する *in vivo* CRISPR スクリーン法の確立を試みたうえで、機能解析を行うことを目的とした。

また、トキソプラズマの病原性が遺伝的特性により大きく異なることが確認されている。2016 年の米国グループの研究により、トキソプラズマは 16 のハプログループ (HG) に分類されている [2]。その中でも、HG 1 は強毒型で、1 虫体の感染でマウスが死亡する。一方、HG 2 や HG 3 は比較的弱毒型であり、マウスの半数致死量は 1,000 虫体以上である。欧州、中東、北米で一般的な HG1-3 の系統が本寄生虫の分子生物学的な研究のほとんどを占めているが、アフリカ、アジア、南アメリカでは遺伝的に大きく異なる系統が存在する。特に中南米に見られるトキソプラズマは、正常な免疫機能を持つヒトにも視力障害や肺炎を引き起こすケースが報告されており、その病因はまだ解明されていない。沖縄で 10 年ほど前に発見された「沖縄 4」株は、強毒型の HG 1 と同様の病原性タンパク質を持ちつつも、遺伝学的に

は異なる特性を示し、さらに毒性としてもマウスのみならず大動物であるブタを死亡させることができる超強毒型である。沖縄では、トキソプラズマによる家畜の感染症が頻発しており、全国の報告のほぼ100%を占め、ヤギ肉の生食もヒトへの感染リスクを高めている。2005から2014年の間に沖縄で報告されたヒトの眼トキソプラズマ症は207件に上る。これらのデータは、本土と異なり沖縄には高リスクのトキソプラズマ株が存在することを示唆しているが、沖縄を含む日本のトキソプラズマ株の詳細なゲノム解析はこれまで行われておらず、沖縄4株のような超強毒型の起源（ルーツ）は謎であった。そこで本研究の目的は、日本産トキソプラズマ集団の遺伝学的特徴を、それらの全ゲノム配列とその構造を高精細に解析し明らかにすることによって、地域固有のリスクを正確に評価し、効果的な対策を立てるための基盤を築くこととした。

方法

****トキソプラズマ株****

RHΔhxgprt および RHΔhxgprtΔku80 を Vero 細胞で維持し、RPMI 培地（2%FBS、ペニシリン、ストレプトマイシン添加）で 37°C・5%CO₂環境下で3日ごとに継代。

****宿主細胞培養****

Vero 細胞は 10%FBS 添加 RPMI、マウス胎児線維芽細胞（MEFs）は 10%FBS 添加 DMEM で培養。

****マウス****

C57BL/6N および Ifngr1^{-/-}マウス（SLC 社）。8～10 週齢雌マウスを使用し、大阪大学微生物病研究所の動物実験委員会の承認を得て実施。

****トキソプラズマ遺伝子ノックアウト****

CRISPR/Cas9 法を用い、目的遺伝子（GOI）を標的とする gRNA を pU6-Universal ベクター（Addgene #52694）にクローニング。GOI の 5'・3'末端 60 bp を相同性領域とし、HXGPRT カセットを利用して遺伝子破壊を行う。

****遺伝子ノックアウトの作製****

RHΔhxgprtΔku80 を Cytomix 中に懸濁し、gRNA プラスミドおよびターゲティングフラグメントと共に電気穿孔。25 μg/ml の MPA と 50 μg/ml のキサランチンで選択し、リミティング・ダイリューションで単クローンを取得。qRT-PCR で遺伝子破壊を確認。

****CRISPR スクリーニング****

ゲノムワイド gRNA ライブラリーの一部を用い、ROP/GRA 遺伝子の gRNA を新規設計。Cas9-T2A-DHFR-T2A-RFP カセットを pU6-Universal ベクターに導入し、RHΔhxgprt にトランスフェクション。パイリメタミンで選択後、P4 段階で遺伝子組換え率を評価。

****バイオインフォマティクス解析****

gRNA 配列をライブラリーとアラインし、各 gRNA の変動を算出。P4 とライブラリーの log₂ fold-change を用い、ウィルコクソン順位和検定で統計解析。Benjamini-Hochberg 法で p 値補正し、階層クラスタリングおよび PCA を実施。

****統計解析****

統計解析は R（v4.1.1）で行い、生存率の比較には GraphPad Prism9 のログランク検定を使用。p<0.05 を有意とした。

全ゲノムシーケンシング

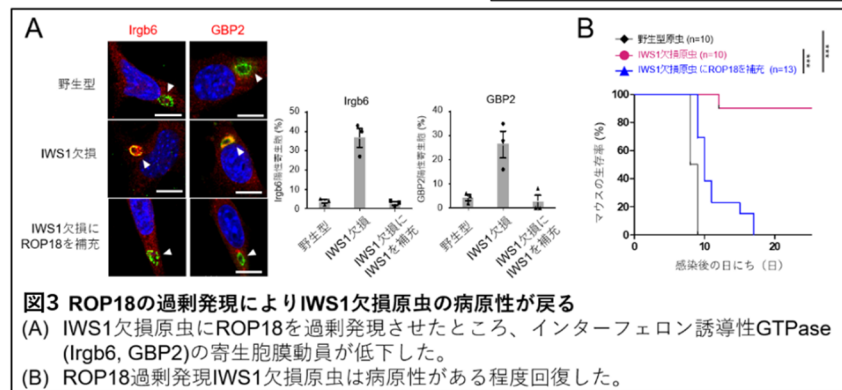
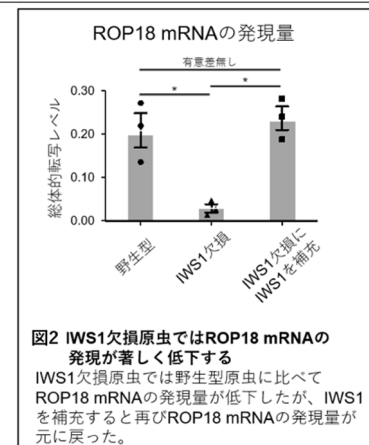
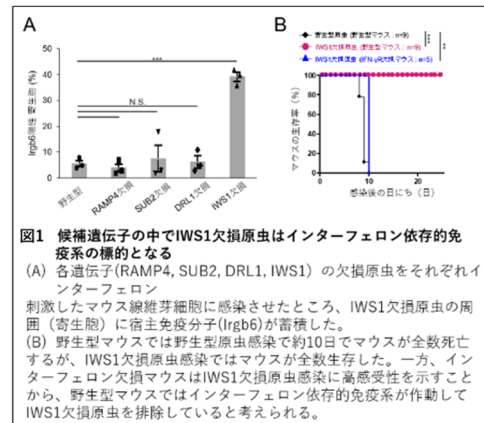
T. gondii 株を Vero 細胞で培養し、5.0 µm フィルターで宿主細胞を除去後、DNA を抽出。大阪大学ゲノム解析施設で Illumina NovaSeq により全ゲノムリシーケンスを実施。fastq アクセッション番号は補足表 S2 に記載。

バリエーション解析および系統解析

全株のゲノムデータを ME49 リファレンスゲノム (ToxoDB v8.2) とアラインメントし、BWA および GATK を用いて SNP をコーリング。質の高い 1,436,410 座位を特定し、NEXUS/PHYLIP 形式に変換後、SplitsTree で根なし系統樹を構築。ブートストラップ 1000 回で支持率 95%以上を確認。アピコプラストゲノム解析も実施。

結果

我々はこれまでにインターフェロン誘導性 GTPase の抗トキソプラズマ免疫応答を研究してきた[3], [4], [5]。高病原性トキソプラズマ原虫はインターフェロン誘導性 GTPase が寄生細胞に動員されないことが高病原性の理由の一つだが、先に米国のグループにより同定された遺伝子群の中にインターフェロン誘導性 GTPase の動員の阻害に関するものがあるのではないかと考えた。そこで、ゲノム編集法により候補遺伝子群を一つ一つ作製し、インターフェロン誘導性 GTPase の寄生胞膜への動員を検討した結果、IWS1 欠損トキソプラズマ原虫ではインターフェロン誘導性 GTPase の寄生胞膜への動員が高い割合で認められ (図 1A)、さらに IWS1 欠損トキソプラズマ原虫では病原性が大幅に低下することを見出した (図 1B)。IWS1 が酵母から高等動物・植物まで広く保存されている転写調節因子であることから、IWS1 は何らかの病原性因子の遺伝子発現を制御しているのではないかと考え、野生型トキソプラズマ原虫と IWS1 欠損トキソプラズマ原虫の間で発現に差がある遺伝子を網羅的に次世代シーケンサーで調べた。その結果、ROP18 の mRNA の発現が IWS1 欠損トキソプラズマ原虫では著しく低下していることが分かった (図 2)。次に ROP18 の発現低下が IWS1 欠損トキソプラズマ原虫におけるインターフェロン誘導性 GTPase の高い寄生胞膜動員率と病原性低下の原因であるかを調べるために、ROP18 mRNA の発現を強制的に IWS1 欠損トキソプラズマ原虫で上げたところ、インターフェロン誘導性 GTPase の寄生胞



膜動員は低下し（図 3A）、病原性が高くなった（図 3B）。以上のことから、トキソプラズマ原虫の転写調節因子 IWS1 は ROP18 mRNA の発現を制御し、インターフェロン依存的な抗トキソプラズマ免疫応答を抑制することで病原性を調節していることが分かった [6]。

CRISPR スクリーニング法の有用性が分かったことから、続いて *in vivo* CRISPR スクリーニング法を立ち上げることにした。通常用いられる全身感染モデルではなく、局所感染モデルを採用することで病原性の問題を克服し、1000 個以上のトキソプラズマ原虫の遺伝子を生体内でスクリーニングすることを目的とする。この新型の生体内 CRISPR スクリーニング法では数千種類の遺伝子変異体を一度にまとめて作製・解析できる。変異体集団のゲノム DNA を次世代シーケンスによって解読し、その膨大なデータをプログラミングと統計で解析するデータサイエンスを駆使して、感染の前後で消失した遺伝子（すなわち病原性に重要な遺伝子）を同定することが可能となる（図 4）。本 *in vivo* CRISPR スクリーニング法の結果、これまで世界中の研究者が 20 年以上をかけて一つずつ

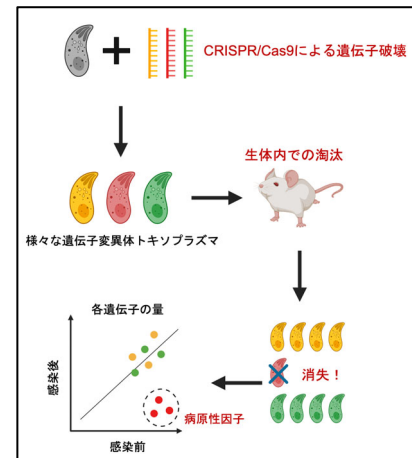


図 4 生体内 CRISPR スクリーニング法の概要

同定してきた既知の病原性因子群を、わずか 1 ヶ月間で根こそぎ検出することができた（図 5）。さらに、これまでに見落とされてきた新規病原性因子 GRA72 を含め、多数の未報告の病原性因子を発見した。GRA72 遺伝子を欠損するトキソプラズマ原虫を作製したところ病原性が完全に消失したことから、このスクリーニング結果の高い信頼性が確認された。また、この GRA72 に関しては詳細な解析を行い、寄生胞と呼ばれるトキソプラズマ原虫が作り出す構造物の維持に関与することを突き止めた。次に抗トキソプラズマ原虫免疫に最も重要な宿主免疫因子として知られているインターフェロン γ を欠損した遺伝子改変マウスを用いて、*in vivo* CRISPR スクリーニングを行った。その結果、トキソプラズマ原虫が宿主のインターフェロン γ 依存的免疫応答を抑制するために持っている 4 つの代表的病原性因子を特異的に検出することに成功した（図 6）。この結果から、病原体と宿主の遺伝学を組み合わせることで、生体内における宿主・病原体相互作用が網羅的に解析可能であることが世界で初めて実証された。さらにこれまで知られていなかった多数の抗インターフェロン γ 病原性因子を同定することにも成功した [7]。

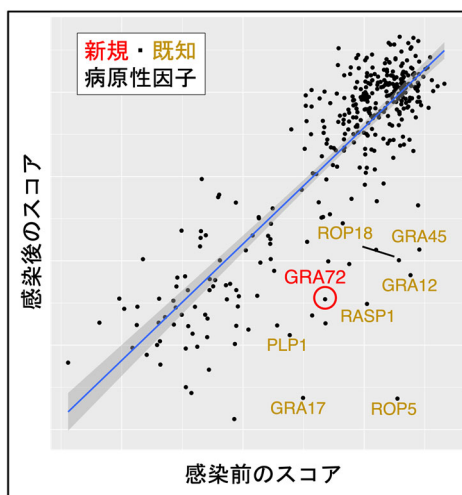


図 5 実際の生体内 CRISPR スクリーニング法の結果

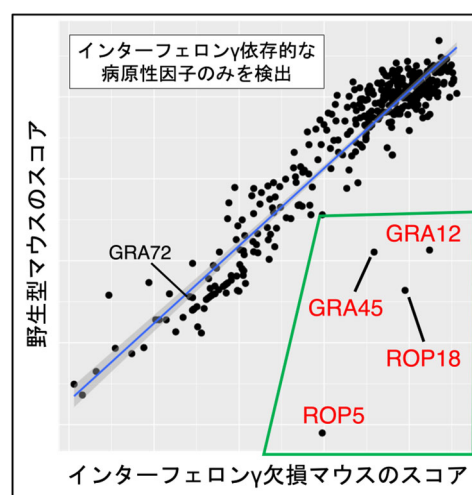


図 6 インターフェロン γ と関連する病原性因子の抽出

次に、細胞内での位置が不明であった遺伝子約 600 個に対して *in vivo* CRISPR スクリーン法を行うことで、トキソプラズマ原虫が宿主の身体の中に適応して病気を起こすのに重要なタンパク質を多数見つけ出すことに成功した。さらに、その中でも寄生虫の中で最も医学的に重要なアピコンプレксаが共通して持っている遺伝子である TgGTPase と TgRimM という 2 つの遺伝子に注目して詳しい解析を行った。その結果、特に TgRimM タンパク質はアピコプラストと呼ばれる葉緑体に類似した色素体に位置していることがわかった (図 7)。このアピコプラストはかつて葉緑体であったと考えられており、現在は光合成を行う能力を喪失しているもの

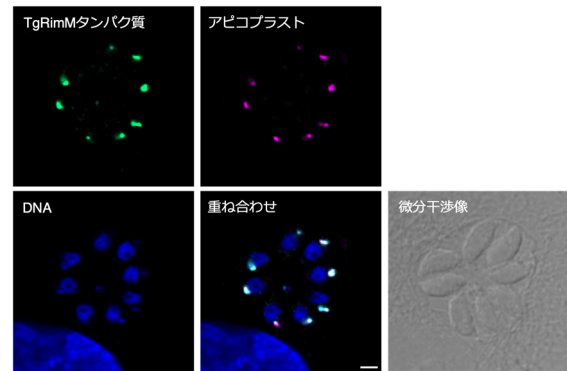


図 7

細胞内で増殖中のトキソプラズマ原虫を顕微鏡で観察した写真。TgRimM タンパク質(緑)はアピコプラスト(マゼンタ)に存在している。

の、今でも寄生虫の成長に必須の栄養素を作り出している。遺伝子操作によって TgRimM を欠損したトキソプラズマは、成長に障害がありマウスに病気を起こすことができなくなった。TgRimM を詳しく調べるとジンクフィンガーと呼ばれる部位があり、このジンクフィンガーを欠損した TgRimM 変異体は正常に機能しなくなることがわかった。大腸菌やシロイヌナズナの持つ RimM タンパク質は RNA と呼ばれる物質の調節に働くと報告されている。そのため、トキソプラズマのアピコプラストの中でも TgRimM が RNA を調節している可能性が示唆されていた。また、同じくアピコンプレксаに属する寄生虫であるマラリア原虫にも RimM 遺伝子は存在し、マラリア原虫の成長にも重要であることが別の研究から示唆されている。以上のことから、RimM 遺伝子はトキソプラズマ原虫に限らずアピコンプレксаに属する寄生虫にとって普遍的に重要な遺伝子である可能性が示唆された [8]。

また日本国内のトキソプラズマ株とデータベースに登録されている世界各地の 65 株のゲノムを比較分析した。遺伝的解析の結果、日本のトキソプラズマは欧米で広くみられる HG2 のゲノムを持ちながら、他の系統との顕著な遺伝的混血が見られた (図 8)。特に注目すべきは、沖縄で特定された超強毒型の【沖

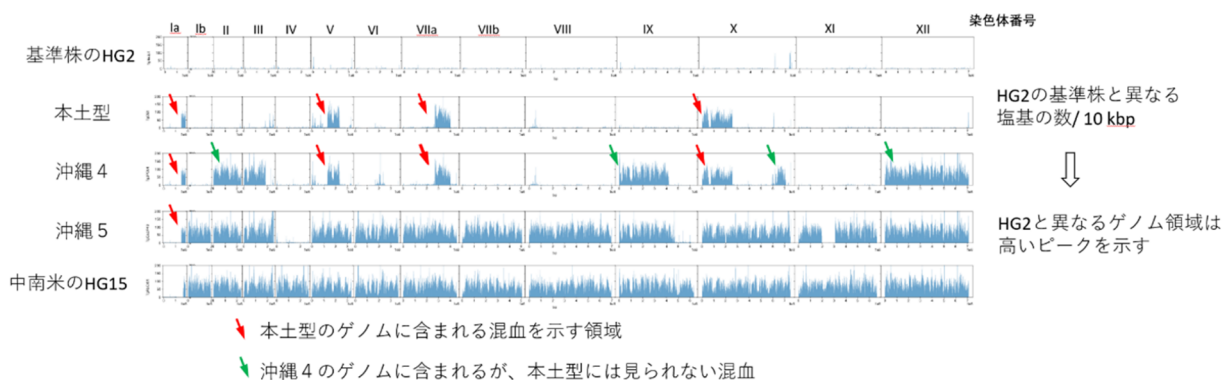


図 8 日本産トキソプラズマの内包する混血

縄 4】株で、さらに多様な遺伝的混血を持つことが判明した。また、弱毒型である【沖縄 5】株は中南米でのみ見られる HG15 と類似していることが明らかになった。さらにアメリカ国立アレルギー・感染症研究所 (NIAID) の Grigg 博士と共同で開発した「POPSICLE」というツールを使用して、トキソプラズマの全ゲノムの組換え構造を視覚化し直感的にとらえることに成功した (図 9)。その結果、日本で広く見ら

れる混血株が HG2 (黄)、中国に分布する HG13 (赤)、そして未知の系統 (ピンク) から構成されていることが確認された。さらに、未知の系統の起源が北アメリカ大陸に存在する系統であることが推測され、日本本土のトキソプラズマと、中国 (ユーラシア大陸) および北アメリカの系統間での大陸を跨いだ独自の遺伝的交流が明らかとなった。続く【沖縄5】株の詳細な全ゲノム構造分析では、中南米の HG 15 と類似した祖先構成が見られたが、独自の祖先系統 (シアン) のゲノムが大きな割合を占めることが新たな発見であった。この祖先系統 (シアン) は実質的に中南米の2株にしか見られず、沖縄固有のトキソプラズマと中南米型株との遺伝的な繋がりが確認された。さらに、超強毒型【沖縄4】株は、弱毒型である日本土着の系統と、中南米産系統と類似している弱毒型の【沖縄5】の交雑から生じていることが強く示唆された (図 9)。また、【沖縄5】株のゲノムの40%を占める祖先系統 (シアン) が中南米では断片化した形跡のみで確認され、中南米のトキソプラズマの一部が東アジアに起源を持つ可能性が示唆された。以上から本研究は、日本のトキソプラズマが北米や中南米にいるトキソプラズマと同じ遺伝的ルーツを持っているという大陸を跨いだ繋がりを明らかにしただけでなく、沖縄では本土型 (弱毒) と中南米型に似た沖縄株 (弱毒) の合体した沖縄4株のような超強毒の新型トキソプラズマが生じていることを示唆していた (図 10) [9]。

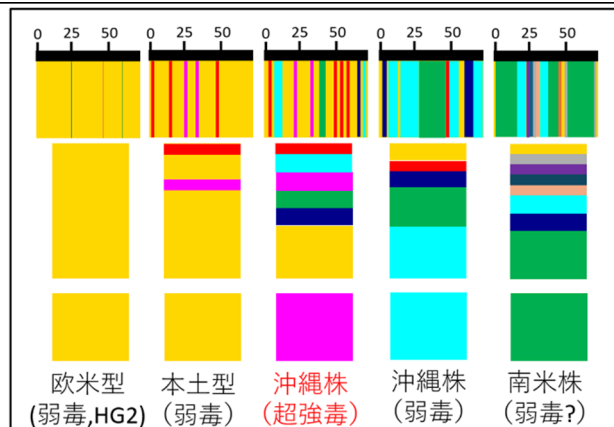


図9 POPSICLEによるゲノム構造の可視化

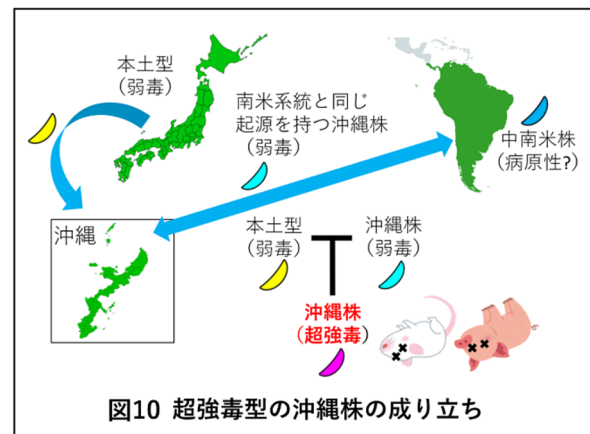


図10 超強毒型の沖縄株の成り立ち

考察

IWS1 の機能解析の研究によって、IWS1 の機能の人為的な阻害による新しいトキソプラズマ症治療戦略につながることを期待される。In vivo CRISPR スクリーン法の開発によって、従来と比較にならない短期間でトキソプラズマ原虫の病原性因子をまとめて同定・解析することが可能となった。トキソプラズマ原虫は一度感染すると、完全に排除することは不可能で生涯に渡って感染し続けるが、本研究で同定された多数の病原性因子はトキソプラズマ原虫の『弱点』であり、それらを標的とした様々な新規治療法やワクチンの開発が大いに期待される。また局在不明の分子群の in vivo CRISPR スクリーン法によって、トキソプラズマが宿主の生体内環境に適応して病気を起こすために重要な遺伝子が多数発見された。その中には TgRimM 遺伝子のように他の寄生虫にも共通して存在するものも含まれていた。今回見つかった病原性に必須の遺伝子はアピコンプレクサに共通する『弱点』であると予想されることから、今後のマラリアやトキソプラズマ症に対する新規治療法やワクチンの開発が大いに期待される。トキソプラズマは遺伝的特性によって病原性が大きく異なるため、地域固有の株の特性を理解することは、効果的な対応戦略を開発するために重要な情報である。日本のトキソプラズマの集団遺伝学的解析によ

って得られた知見をもとに、沖縄の超強毒型トキソプラズマと人間の病気との関連を調査し、他の地域、特に日本本土への本系統の拡散を防止するための監視体制の構築・強化が求められる。総じて、本邦での遺伝的に多様なトキソプラズマが生じる独特なメカニズムに基づいて、日本のトキソプラズマ症の予防および管理の方法を再考する必要があることを問題提起する点が本研究成果の社会的意義である。今後の研究では、POPSICLEを用いて、未解析の地域、特に東南アジアのトキソプラズマゲノムを調査し、アジアと北米・中南米のトキソプラズマ間の遺伝的な繋がりを深く理解することによって、未だ不明な点が多いアジアのトキソプラズマと他の地域との繋がりが明らかになると考えられる。

共同研究者

特になし。

引用論文

- [1] Wang Y, Sangaré LO, Paredes-Santos TC, et al. Genome-wide screens identify *Toxoplasma gondii* determinants of parasite fitness in IFN- γ -activated murine macrophages. *Nat Commun.* 2020. 11:5258.
- [2] Lorenzi H, Khan A, Behnke MS, et al. Local admixture of amplified and diversified secreted pathogenesis determinants shapes mosaic *Toxoplasma gondii* genomes. *Nat Commun.* 2016. 7:10147.
- [3] Yamamoto M, Okuyama M, Ma JS, et al. A cluster of interferon- γ -inducible p65 GTPases plays a critical role in host defense against *Toxoplasma gondii*. *Immunity* 2012. 37:302-313.
- [4] Sasai M, Sakaguchi N, Ma JS, et al. Essential role for GABARAP autophagy proteins in interferon-inducible GTPase-mediated host defense. *Nature Immunology.* 2017. 18:899-910.
- [5] Ihara F, Yamamoto M. The role of IFN- γ -mediated host immune responses in monitoring and the elimination of *Toxoplasma gondii* infection. *Int Immunol.* 2024. 36:199-210.
- [6] Hashizaki E, Sasai M, Okuzaki D, et al. *Toxoplasma* IWS1 Determines Fitness in Interferon- γ -Activated Host Cells and Mice by Indirectly Regulating ROP18 mRNA Expression. *mBio.* 2023. 14:e0325622.
- [7] Tachibana Y, Hashizaki E, Sasai M, et al. Host genetics highlights IFN- γ -dependent *Toxoplasma* genes encoding secreted and non-secreted virulence factors in in vivo CRISPR screens. *Cell Rep.* 2023. 42:e112592.
- [8] Tachibana Y, Sasai M, Yamamoto M. CRISPR screens identify genes essential for in vivo virulence among proteins of hyperLOPIT-unassigned subcellular localization in *Toxoplasma*. *mBio* 2024. 15:e0172824.
- [9] Ihara F, Kyan H, Takashima Y, et al. Far-East Asian *Toxoplasma* isolates share ancestry with North and South/Central American recombinant lineages. *Nat Commun.* 2024. 15:4278.

助成研究に関連した発表論文

- 1) Hashizaki E, Sasai M, Okuzaki D, Nishi T, Kobayashi T, Iwanaga S, **Yamamoto M (Corresponding author)**. *Toxoplasma* IWS1 Determines Fitness in Interferon- γ -Activated Host Cells and Mice by Indirectly Regulating ROP18 mRNA Expression. *mBio*. 2023. 14:e0325622.
- 2) Tachibana Y, Hashizaki E, Sasai M, **Yamamoto M (Corresponding author)**. Host genetics highlights IFN- γ -dependent *Toxoplasma* genes encoding secreted and non-secreted virulence factors in in vivo CRISPR screens. *Cell Rep*. 2023. 42:e112592.
- 3) Tachibana Y, Sasai M, **Yamamoto M (Corresponding author)**. CRISPR screens identify genes essential for in vivo virulence among proteins of hyperLOPIT-unassigned subcellular localization in *Toxoplasma*. *mBio* 2024. 15:e0172824.
- 4) Ihara F, Kyan H, Takashima Y, Ono F, Hayashi K, Matsuo T, Igarashi M, Nishikawa Y, Hikosaka K, Sakamoto H, Nakamura S, Motooka D, Yamauchi K, Ichikawa-Seki M, Fukumoto S, Sasaki M, Ikadai H, Kusakisako K, Ohari Y, Yoshida A, Sasai M, Grigg ME, **Yamamoto M (Corresponding author)**. Far-East Asian *Toxoplasma* isolates share ancestry with North and South/Central American recombinant lineages. *Nat Commun*. 2024. 15:4278.