

トリパノソーマの防御応答回避メカニズムの解析

研究協力者 群馬大学大学院・保健学研究科・生体情報検査科学分野 嶋田 淳子

研究要旨

南米型トリパノソーマ (*Trypanosoma cruzi*) は中南米に流行する寄生原虫で、感染すると宿主細胞のアポトーシスを抑制することがわかっている。宿主アポトーシス抑制因子 c-FLIP と相互作用する原虫側因子を探索するため、photo-cross-linking の実験系を確立した。

A. 研究目的

Trypanosoma cruzi 感染により宿主アポトーシス抑制因子 c-FLIP と相互作用する原虫側因子の探索を行うため、培養細胞を用い、c-FLIP の高発細胞を樹立する。また、c-FLIP と相互作用する原虫側因子を探索することを目的とする。

B. 研究方法

ヒト由来培養細胞 HT1080 に c-FLIP 遺伝子発現細胞を樹立する。予備実験で、全長の c-FLIP 全長を発現することが困難であったため、c-FLIP を DED 領域と pseudo caspase 領域に分け、各々の遺伝子を tag 付ベクターに連結した。リポフェクションにより HT1080 細胞にトランスフェクションし、クローン化後、高発現細胞を樹立した。発現細胞に *T. cruzi* を感染させ、photo アミノ酸を含む培地で 24 時間培養し、UV 照射により photo-cross linking を行った。この方法により、高発現させたタンパク質と相互作用するタンパク質を共有結合させることができる。Photo-cross-linking の実験条件を決めるため、UV 照射条件等を検討した。最適条件で細胞ライセートを調整し、抗 tag 抗体で免疫沈降後ウエスタンブロットを行い、相互作用するタンパク質を探索した。

C. 結果

c-FLIP の pseudo caspase 領域発現細胞クローンを 5 個得ることができ、そのうちの 2 クローンで本タンパク質の発現が確認された。この細胞を用いて photo-cross-linking の実験

条件を検討したところ、波長 365 nm、照射エネルギー 2800 mW/cm²、照射距離 5 cm、16 分間が最適であることがわかった。そこで pseudo caspase 発現細胞に *T. cruzi* を感染させ、この条件下で photo-cross-linking を行ったところ、pseudo caspase より分子量が大きいバンドが複数認められた。

D. 考察

アポトーシス抑制因子 c-FLIP の pseudo caspase 領域を発現する細胞を樹立することができた。DED 領域を発現する細胞のクローンは未だ得られておらず、この領域はアポトーシス誘導と関連しているため、高発現細胞が得られない可能性が考えられた。また、UV 照射により pseudo caspase より分子量が大きいサイズのバンドが検出されたことから、photo-cross-linking 法の実験条件を確立することができ、相互作用するタンパク質の存在が明らかとなった。現在、MS/MS を用いて、pseudo caspase と結合したタンパク質の解析を試みている。

E. 結論

アポトーシス抑制因子 c-FLIP の pseudo caspase 領域を発現する細胞を樹立することができた。c-FLIP と相互作用するタンパク質を探るためのツールとして photo-cross-linking の実験系を確立した。

G. 研究発表

1. 論文発表

和文論文

なし

英文論文

なし

2. 学会発表

本村玲奈、嶋田淳子 南米型トリパノソーマ
感染宿主細胞の細胞分裂とアクチンの解析
第 72 回日本寄生虫学会東日本大会・第 10 回
分子寄生虫・マラリアフォーラム合同大会
群馬大学昭和キャンパス、前橋、平成 24 年 10
月 12 13 日

高橋千由紀、嶋田淳子 *Trypanosoma cruzi*
感染細胞におけるオートファジーと原虫由来の
タンパク質との関連性の解析 第 82 回日本寄
生虫学会大会、東京医科歯科大学、東京、平
成 25 年 3 月 29 31 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし