

| | |
|--------------|---|
| Title | Role of Toxoplasma gondii rhoptry kinase ROP16 in Stat6 activation |
| Author(s) | 小川, 雅弘 |
| Citation | 大阪大学, 2010, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/54125 |
| rights | |
| Note | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。 |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【40】

| | |
|------------|---|
| 氏名 | 小川 雅弘 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士 (医学) |
| 学位記番号 | 第 23609 号 |
| 学位授与年月日 | 平成22年3月23日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 医学系研究科予防環境医学専攻 |
| 学位論文名 | Role of <i>Toxoplasma gondii</i> rhopty kinase ROP16 in Stat6 activation (トキソプラズマ原虫ROP16によるStat6活性化機構) |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 竹田 潔 (副査) 教授 荒瀬 尚 教授 熊ノ郷 淳 |

論文内容の要旨

〔 目 的 〕

トキソプラズマ原虫は病原性などにより大きく3つに分類される。Ⅱ型トキソプラズマ原虫はⅠ型に比べて病原性は弱く、近年の研究によりⅡ型におけるROP16の遺伝子多型が病原性に深く関与することが解明されている。我々はROP16が宿主内でStat3の活性化を制御していることを解明、報告している。ROP16のさらなる宿主細胞内での機能を検討した。

〔 方法ならびに成績 〕

ROP16のトキソプラズマ原虫内での機能を調べるため、遺伝子改変により、ROP16を欠損させたⅠ型トキソプラズマ原虫を作製した。トキソプラズマ原虫をマウスの腹腔マクロファージに感染させたところ、野生型ではStat3およびStat6のリン酸化が認められるが、ROP16を欠損させたトキソプラズマ原虫ではリン酸化が認められなかった。このことより、ROP16がStat3だけでなくStat6の活性化も制御していることが示唆された。

ROP16の発現ベクターを作製し、Stat6依存的に活性化されるプロモーターと共に293細胞中に発現させ、ルシフェーラスアッセイを行ったところ、ROP16単独による活性化が認められた。またROP16とStat6の発現ベクターを共に293細胞中に発現させると、ROP16によるStat6のリン酸化が認められた。このことより、哺乳動物細胞内でROP16がStat6の活性化を引き起こすことが確認された。

ROP16の593番目のアミノ酸を置換し、ROP16のリン酸化能を消失させたROP16を作製した。このリン酸化能の消失により、Stat6依存的プロモーターの活性化ならびにStat6のリン酸化

の消失が確認された。このリン酸化が直接的であるかを確認するために、in vitro kinase assay を行いました。293細胞中にROP16のタンパクを発現させ、免疫沈降後リコンビナントのStat6と反応させたところ、Stat6のリン酸化が認められたことから、Stat6のリン酸化が直接的であることが示された。

ROP16はN末側で直接Stat3に結合することが分かっているので、345番目アミノ酸までのN末を欠損させたROP16を作製した。このN末欠損ROP16はStat6依存的プロモーターの活性化能を消失した。Stat3と同様にStat6とも結合し得るかを免疫沈降法により検討し、全長ROP16とStat6の結合が認められた。しかし、N末欠損ROP16との結合が認められなかったことから、N末側にStat6との結合領域があり、Stat6の活性化に寄与していることが示された。

II型トキソプラズマ原虫においてROP16の遺伝子多型が認められる。当研究室は幾つかある遺伝子多型のうち503番目のアミノ酸が構造的に重要でありStat3の活性化に関与していることを報告しています。この503番目のアミノ酸置換を伴う遺伝子多型がStat3のみならずStat6の活性化にも関与するかどうかを検討しました。I型のROP16では活性化されていたStat6依存的プロモーターがアミノ酸置換により活性化されなくなりました。反対にII型ROP16では活性化されなかったのが、アミノ酸置換により活性化されるようになりました。このことから、Stat3と同様にStat6の活性化においても503番目のアミノ酸が重要な意味を持つことが明らかにされた。

〔 総 括 〕

ROP16はトキソプラズマ原虫において、病毒性を左右する遺伝子と報告されている。本研究により、ROP16が宿主細胞内においてStat3のみならずStat6に対しても活性化を制御する機構を有していることが明らかにされた。ROP16のStat6活性化機構にはROP16N末側とStat6の結合、ならびにリン酸化活性が必要であることが示された。同時にII型トキソプラズマ原虫におけるROP16の遺伝子多型のうち、503番目のアミノ酸が関与していることも明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

トキソプラズマ原虫はヒトに感染した際、健康状態では無症状であるが、免疫抑制状態にあるヒトに感染するとトキソプラズマ脳炎などの重篤な病状を示す日和見感染病原体として知られている。トキソプラズマ原虫は大きく3つに分類され、それぞれの病原性と遺伝子多型に関わりがあることが報告されている。

本研究では、II型トキソプラズマ原虫において遺伝子多型を有していることが知られるROP16の宿主細胞内における機能について解析した。この中で、ROP16は宿主細胞内においてStat6と結合し、その活性化を誘導する因子であることが明らかにされた。ROP16がStat6の活性化を制御しており、宿主免疫応答およびトキソプラズマ原虫の病原性に関わりがあることが示唆された。

本研究により、トキソプラズマ原虫による宿主細胞内における免疫制御機構が明らかにされ、非常に意義のある研究成果だと考えられる。よって本研究は博士（医学）の学位授与に値する。