



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Analysis of transcriptional regulation in <i>Toxoplasma gondii</i> sporozoites [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	木高, 大志
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第15210号
Issue Date	2022-09-26
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/87319
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	KIDAKA_Taishi_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨
Abstract of the dissertation

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学） 氏名：木高 大志
Name

学位論文題名
The title of the doctoral dissertation

Analysis of transcriptional regulation in *Toxoplasma gondii*
sporozoites

(トキソプラズマ原虫スポロゾイトにおける転写制御機構の解析)

トキソプラズマ原虫はヒトを含めたすべての哺乳類に感染し、トキソプラズマ症を引き起こす原虫である。トキソプラズマ原虫は動物種や宿主の免疫状態によりその形態を変化させる。その中で、伝播と病原性に関わる代表的なステージとして、タキゾイト、ブラディゾイトおよびスポロゾイトが知られている。タキゾイトおよびブラディゾイトはフラスコ内での培養も容易なため、ステージ特異的な遺伝子発現制御機構において様々な実験がなされてきた。その結果ブラディゾイトステージ変換をターゲットにした抗トキソプラズマ薬やワクチン等の開発にも発展している。しかしながら、終宿主であるネコ科の動物のみから排出されるオーシスト内で形成されるスポロゾイトにおいては、*in vitro* での培養法が確立されておらず、倫理的な観点からサンプルの調整が困難なため、スポロゾイトステージ特異的な遺伝子の制御機構について解明されている事は多くない。そこで、本研究ではスポロゾイトステージに焦点を置き、遺伝子発現制御機構を解明するために以下の研究を行った。

第1章では、RNA-seq および TSS-seq を組み合わせることで発現プロファイリングとプロモータープロファイリングを精緻に取得し、その結果、スポロゾイトで初めて TGTANNTACA からなるモチーフを同定した。また、当該モチーフは、各 TSS より-50 塩基から-75 塩基の領域に分布しており、さらにスポロゾイト特異的なプロモーターに有意に濃縮していることが分かった。アピコンプレックス門原虫の転写制御では一般に *cis*-element と TSS の距離が一定に保たれており、当該モチーフが転写における *cis*-element として機能する可能性が強く示唆された。興味深いことに、当該モチーフは一部のマラリア原虫でも報告があり、他のアピコンプレックス門原虫におけるモチーフの有無や機能するステージ、さらには配列の多様性を確認することができれば、アピコンプレックス門における遺伝子制御機構の進化的解明につながる可能性がある。

第2章では、第1章で発見したスポロゾイト特異的なモチーフを、終宿主であるネコ科

の動物を使わずに、機能証明することに挑戦した。そこで、タキゾイトステージの遺伝子発現制御機構を攪乱し、タキゾイトステージ以外の遺伝子を強制的に発現させるヒストン脱アセチル化酵素阻害薬(HDACi)に着目し、トリコスタチンA (TSA) およびスベロイルアニリドヒドロキサム酸(SAHA)により刺激された細胞外タキゾイトの RNA-seq を行った。その結果、第1章で同定された720個のスポロゾイト特異的遺伝子のうち、TSAとSAHAでそれぞれ352個と199個の遺伝子に発現上昇がみられることが確認された。これらの遺伝子の中から (i) スポロゾイト特異的遺伝子であること(ii) TSA および SAHA の刺激により共通して発現が上昇すること(iii) TGTANNTACA モチーフが主要 TSS ピークの上流-15塩基から115塩基中に存在することを指標に、TGME49_205090 遺伝子を選抜した。当該遺伝子プロモーターを利用してレポーターアッセイを行った結果、コントロールと比較して TSA では約180倍、SAHA では約40倍の発現上昇がHDACi刺激後4時間で見られた。一方で、モチーフを変異させた株を刺激した場合、TSA および SAHA とともに変異無し株と比べて発現の上昇は半分以下となった。この結果から、TGTANNTACA モチーフはスポロゾイト遺伝子を特異的に制御している可能性が示唆された。

以上、本研究ではプロモーターに存在するスポロゾイト特異的モチーフを初めて解析により同定した。さらにそのモチーフが機能的であることをネコ科の動物を用いずに証明することができた。今後、この方法を培養が困難もしくは現段階で確立されていないガメートサイト等のステージにも拡大、応用することで、ステージ変換における遺伝子制御機構の深層を理解し、トキソプラズマ症により効率的に対抗するための知見を得ることが可能であると考えられる。