



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_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：木高 大志

審査委員	主査 教授	野中 成晃
	副査 教授	東 秀明
	副査 准教授	山岸 潤也
	副査 助教	杉 達紀

学位論文題名

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全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（ステージ）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、ステージ特異的制御を司るマスター転写因子の特定など、遺伝子発現制御に関わる分子機構の多くが、両ステージにおいて明らかにされてきた。一方、スポロゾイトは終宿主であるネコ科の動物からのみ排出されるオーシスト内で形成される。*in vitro*での培養法も確立されておらず、実験的な解析を行う際に必要となる十分な虫体を得ることが倫理的にも困難なため、当該ステージにおける遺伝子発現制御機構についての知見は限られていた。そこで、スポロゾイトに焦点を当て、当該ステージでの遺伝子発現制御の分子機構を解明するために以下の研究を行った。

第1章では、オーシストを入手し、スポロゾイト特異的な転写制御に関わる *cis*-element の特定を試みた。RNA-seq を用いて発現プロファイルを、TSS-seq を用いて転写開始点を精緻に特定した結果、スポロゾイト特異的に発現する遺伝子の転写開始点上流 50 塩基から 75 塩基に TGTANNTACA からなるモチーフが有意に高頻度に出現することを見出した。当該モチーフは回文構造を有していること、アピコンプレックス門原虫の *cis*-element は転写開始点上流 50 塩基付近に見つかる場合が多いことから、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、一部のマラリア原虫にも当該モチーフが存在し *cis*-element として機能することが報告されており、他のアピコンプレックス

ス門原虫におけるモチーフの有無、機能するステージや配列多様性の比較解析により、遺伝子制御機構の進化が明らかにされる可能性が示唆された。

第2章では、第1章で見出したスポロゾイト特異的モチーフである TGTANNTACA が *cis*-element として機能するかを、入手困難なスポロゾイトの代わりに、タキゾイトを利用した代替手法で評価した。具体的には、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬が、タキゾイトの遺伝子発現制御機構を攪乱することで当該ステージ以外で発現する転写制御因子も誘導する可能性に着目し、当該モチーフを有するプロモーターが活性化する条件を特定した上で、当該モチーフを変異させることで生じる変化を解析した。その結果、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)により刺激されたタキゾイトの RNA-seq により、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を確認した。これらの遺伝子の中から、(1) スポロゾイト特異的遺伝子であること、(2) TSA および SAHA の刺激により共通して発現が上昇すること、(3) 当該モチーフが主要 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 遺伝子を以降の解析対象として選択した。このプロモーター下流をルシフェラーゼ遺伝子で組換えた原虫を作成し、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 倍の発現上昇が刺激後 4 時間で見られた。一方で、モチーフを変異させた原虫を刺激した場合、TSA および SAHA とともに元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、当該モチーフはスポロゾイト遺伝子の特異的制御に関わる *cis*-element である可能性が示唆された。

これら一連の研究により、これまでほとんど解明されていなかったトキソプラズマ原虫のスポロゾイトステージにおける転写制御分子機構の一部が明らかにされた。さらに、今回用いた遺伝子発現制御機構の攪乱を利用した解析方法は、スポロゾイトに留まらず、入手困難な検体の解析にも広く応用可能と考えられることから、本研究の当該分野への貢献は大きい。よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者木高大志氏の学位論文は、北海道大学大学院国際感染症学院規程第 10 条の規定による本学院の行う学位論文の審査等に合格と認めた。