

(様式7)

受理年月日

平成24年5月29日

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 24年 5月 29日

帯広畜産大学原虫病研究センター長 殿

研究代表者 鈴木 穰

所属機関 東京大学大学院新領域創成科学研究科

職 名 准教授

氏 名 鈴木 穰



下記の共同研究について別紙のとおり報告します。

記

1. 採択番号 23 - 共同 - 7
2. 研究課題名 トキソプラズマ原虫スポロゾイト特異的遺伝子発現の解析

研究課題名：トキソプラズマ原虫スポロゾイト特異的遺伝子発現の解析

研究代表者：東京大学大学院新領域創成科学研究科 鈴木穰

1. はじめに

トキソプラズマ原虫は、原虫のなかでもっとも脊椎動物への感染に成功した生物種である。ヒトの3分の1に感染しているだけでなく、ほ乳類、鳥類、海産ほ乳類にも容易に寄生する。これら中間宿主への寄生にあたっては急速増殖型の *tachyzoite* と緩慢増殖型の *bradyzoite* の2型を呈して無性生殖をおこなう。一方、終宿主であるネコ科動物の体内においては *gametocyte*、*zygote* を経て有性生殖をおこない、最終的には *sporozoite* を含んだ *oocyst* として糞便中に排出される。

このうち、*tachyzoite* と *bradyzoite* ステージについては、次世代シーケンサーを応用したトランスクリプトーム解析技術の1つであり、転写開始点を高感度・網羅的に取得できる TSS-seq 法を用いて、遺伝子発現プロファイルのカタログ化とプロモーター構造の解析を進めている。一方で、終宿主内における有性生殖の各ステージは、*in vitro* 実験系が確立されていないため猫を実験に供する必要があることから、そのトランスクリプトームについては解析が殆ど進展していないが、先般、アメリカ農務省 Dubey 博士の好意により、非常に貴重な *oocyst* サンプルの分与を受けることができた。

そこで今回、*sporozoite* トランスクリプトームを TSS-seq 法を用いて取得することで、そのプロモーター領域を特定し、既に得られている *tachyzoite* と *bradyzoite* のプロモーター領域と比較することにより、代表的な3ステージのプロモーター領域の特徴、特に、転写調節に関わる *cis-element* の同定を試みた。

2. 研究経過

はじめに、精製 *oocyst* をタウロデオキシコール酸で刺激することで、*sporozoite* を脱囊させ、これを TRI reagent に溶解することで精製 RNA を得た。次に、この RNA を鋳型に oligo-capping 法によって 5' 末端の転写開始点が保存された cDNA を合成し、さらにこの cDNA を次世代シーケンサーによって解析することで、*sporozoite* の転写開始点を網羅的に取得した。

3. 研究結果

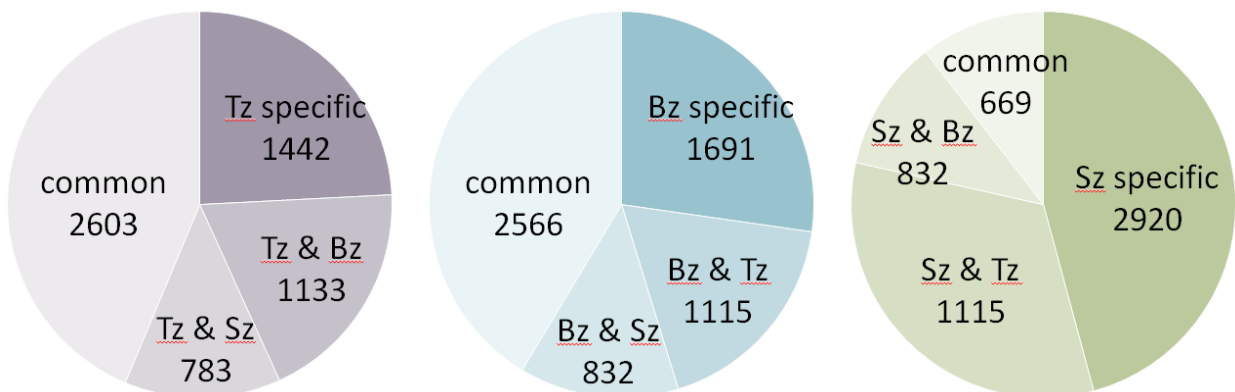
上記の実験により約 3000 万配列を取得し、その内、2100 万配列がトキソプラズマゲノムにマップされた。これを集計することで、*sporozoite* で活性を持つ約 100 万か所の転写開始点を特定した。さらに、転写開始点のクラスタリングにより 24276 か所の転写領域（＝プロモーター領域）を特定した。続いて、これまでの研究により特定されている *tachyzoite* と *bradyzoite*、それぞれ、18959, 7250 か所のプロモーター領域と比較することで、6008, 1039, 2128 のステージ特異的プロモーター領域を、それぞれ、*tachyzoite*, *bradyzoite*, *sporozoite* で特定した。

以上の解析より、プロモーター配列と、その転写特異性が明らかになったため、それらを比較することで特異性を規定する *cis-element* の同定を試みた。その際の解析ソフトウェアには *cis-finder* を用いた。その結果、3ステージで共通するモチーフ、*bradyzoite* 特異的な2つのモチーフ、*sporozoite* 特異的な2つのモチーフが見出された。一般にアピコンプレックス門原虫の転写制御は、転写制御因子 AP2 ファミリーが *cis-element* に結合することで行われると考えられているため、本研究で見出されたモチーフも、AP2 の標的になることで転写制御に関与するものと

考えられる。

4. まとめ

本共同研究により、tachyzoite, bradyzoite, sporozoite ステージ特異的な転写制御に関与する *cis-element* 候補が推定された。トキソプラズマ症はその制圧方法の確立が人獣共に望まれている感染症であり、化学療法と共にワクチンの開発が期待されている。ワクチンについては現在、弱毒株を利用したものが商品化されているが、接種した虫体が復帰変異により bradyzoite を形成してしまえば、個体間の感染を生じさせる結果となり、ワクチンが逆に感染を広げてしまう可能性も指摘されている。そこで、分子機序に基づいたトキソプラズマワクチンの安全性評価基準の確立が重要になるが、本件で見出された *cis-element* 候補や、それらを足掛かりとした転写制御に関わる分子機構の全体像解明は、ワクチンの安全性評価基準の確立や、新規ワクチンのデザインにも重要な知見を提供するものと考えられる。



【図1】 各ステージで特定されたプロモーター領域とその転写特異性。
Tz:tachyzoite, Bz:bradyzoite, Sz:sporozoite。