

受理年月日	受理番号

## 帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 29 年 6 月 2 日

採択番号			
研究部門	生体防御学	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	玄 学南
研究課題名	トキソプラズマ潜伏感染が活性化する抗ウイルス自然免疫シグナルのパスウェイ解析		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	まさたに たつのり 正谷 達瞻	鹿児島大学共同獣医学部 附属越境性動物疾病制御研究センター 特任助教	
研究分担者			
	玄 学南	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授 宿主シグナル分子のクローニング、発現ベクター構築	
研究期間	平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	<p>トキソプラズマは、ヒトを含めた多くの哺乳類に感染する人獣共通感染原虫である。同原虫は宿主体内で急性感染期のタキゾイトから潜伏感染期のブラディゾイトへとステージ変換し、休眠状態となって終生寄生する。これまでに、ブラディゾイト潜伏感染時におけるヒト線維芽細胞の遺伝子発現を次世代シーケンスにより網羅的に解析したところ、ブラディゾイト潜伏感染細胞では強い抗ウイルス活性を持つ種々の自然免疫関連蛋白質遺伝子（OAS1およびISG15など、I型インターフェロン(IFN)に誘導されるもの)が強く発現していることを見いだしている。さらに我々は、トキソプラズマを潜伏感染させたマウスは日本脳炎ウイルス及び単純ヘルペスウイルスの感染に対し抵抗性を有しており、その脳内では抗ウイルス自然免疫関連遺伝子の発現が亢進していることも示している。しかしながら、宿主側の網羅的遺伝子発現解析の結果、興味深い事に原虫潜伏感染時にはI型IFN遺伝子の発現は亢進しておらず、トキソプラズマはIFN非依存的に抗ウイルス応答を惹起していることが示唆される。しかし、トキソプラズマが宿主自然免疫シグナル経路のどの因子を標的としているのかについては分かっていない。</p> <p>本研究では、トキソプラズマ潜伏感染によって刺激される宿主パスウェイを特定し、原虫潜伏感染がもたらす宿主自然免疫シグナル亢進の全容解明を目指した。</p>		

受理年月日	受理番号

<p>研究成果の 概要</p>	<p>ゲノム編集を培養細胞に適用し、さまざまな自然免疫シグナル分子ノックアウト細胞を作出する目的で、哺乳類用 CRISPR/Cas9 システムベクターの一つである pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 を入手し、種々のシグナル関連転写因子の遺伝子配列をもとに設計したガイド RNA 配列をこれに導入した。</p> <p>作出したベクターと、薬剤耐性マーカープラスミドのヒト線維芽細胞へのリポフェクション法での共導入を試みたが、導入効率が著しく低かった。そのため、作出したベクターが動作するかどうか確認するため、293 細胞へ同様に導入し、薬剤選択を行った。その結果、いくつかの遺伝子 (PKR、Mx1) で欠損を確認することができた。しかし、293 細胞にトキソプラズマを感染させ、培養液の pH をアルカリ性のものに置換したところ、細胞が死滅してしまった。そのため、本実験はヒト線維芽細胞で実施するか、別のブラディゾイト誘導法で実施する必要があると考えられた。現在、ゲノム編集法をヒト線維芽細胞に適用すべく検討を行っている。</p>
<p>研究成果の 発表</p>	<p>なし。</p>