

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和3年5月7日

採択番号	2020-共同-10		
研究部門	感染免疫研究部門	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	酵母ワンハイブリッド法による トキソプラズマステージ変換関連転写因子の同定と機能解析		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	まさたに たつり 正谷 達膳	鹿児島大学共同獣医学部附属越境性疾病制御研究センター・ 准教授(現 岐阜大学応用生物科学部・准教授) 実験の総括と実施	
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	
研究期間	2020年4月1日 ~ 2021年3月31日		
目的・趣旨	<p>トキソプラズマ(<i>Toxoplasma gondii</i>)とは、ネコ科動物を終宿主とし、ヒトや他の動物を中間宿主とする人獣共通感染原虫である。<i>T.gondii</i>は、生体に初感染した時にタキゾイトと呼ばれる急速に増殖する虫体として侵入したのちブラディゾイトと呼ばれる緩慢に増殖する虫体にステージ変換する。ブラディゾイトはシストと呼ばれる壁によって免疫を回避し、宿主が生涯を終えるまで体内に潜伏する。玄学南教授及び北大・人獣センター・山岸准教授は、トキソプラズマ原虫遺伝子の各ステージにおけるトランスクリプトーム解析を行い、約 200 種類の原虫遺伝子がブラディゾイト期にのみ強く発現することを見いだした。さらにそれら遺伝子の上流に存在する共通配列を解析した結果、ブラディゾイト期シスエレメント配列(Bz-cis)と予測される6塩基の共通配列を発見している。そこで申請者らは、①タキゾイト期の原虫に免疫応答などのストレスが加わり、②原虫体内において、未知の転写関連因子群が活性化されて Bz-cis に結合し、③ブラディゾイト特異的遺伝子の転写が開始され、④原虫のステージ変換が開始されると予想している。そこで本研究では、この仮説を実証する上で重要なブラディゾイト特異的遺伝子の転写を司る、ステージ変換関連転写因子の同定を目的とする。</p>		

<p>研究経過の 概 要</p>	<p>酵母ワンハイブリッド法は、酵母にあらかじめ人為的に特異的塩基配列を組み込み、さらにこの酵母に 遺伝子ライブラリを導入・発現させることで、特異的塩基配列に結合する蛋白質遺伝子を同定することが出来るシステムである。Bz-cisと予想される塩基配列に相互作用するトキソプラズマ遺伝子を同定するため、Bz-cis 配列をゲノム中にもつ酵母株を作成した。アラビアゴム溶液を用いてブラディゾイトのみを精製し、RNA を抽出した。精製ブラディゾイト RNA より作成した cDNA ライブラリを形質転換した酵母株より、ステージ変換関連シスエレメント配列に結合する遺伝子をもつ酵母を Aureobasidin A による薬剤スクリーニングにより選抜した。得られた酵母株より、組み込まれた cDNA 配列を PCR で増幅し、遺伝子配列を決定した。</p> <p>本研究では、当初、帯広畜産大学へ共同研究として来訪する予定であったが、COVID-19 による移動制限のため、メール・電話での連絡・経過報告を行うことで、センター教員との連絡を実施した。</p>
<p>研究成果の 概 要</p>	<p>全部で 112 個の Aureobasidin A 耐性酵母(陽性クローン)を得ることができた。これらクローンに組み込まれた cDNA 配列を PCR で増幅し、遺伝子配列を決定した結果、大多数がヒト由来の遺伝子配列またはコンタミネーションと考えられる未知配列(由来生物不明)であった。今後、同様のスクリーニングを行うためには二重に精製をかけるなど、より純度の高いブラディゾイト虫体を得た上で再度 Y1H 法を実施する必要がある。</p> <p>一方、トキソプラズマ配列由来の遺伝子も 5 種類見出された。うち 4 種類は機能未知の遺伝子であり、アノテーションはなされていない。今後、これら分子の詳細を検討していく一方、1種類は X 遺伝子として登録されている遺伝子と高い相同性を示した。しかし最近、トキソプラズマのステージ変換を司る原虫蛋白質として(Myb-like transcription factor)BFD1 が同定され(Waldman et al., Cell, 2020)、その結合配列は今回着目した 6 塩基配列と同一であることが報告されている。今回の我々のスクリーニングでは BFD1 はヒットしてこなかったが、スクリーニングの精度が十分でなかった可能性が考えられた。今後、上記 5 種類の遺伝子産物と Bz-cis 配列との結合能や、これらと BFD1 の関連性を検討していく必要がある。</p>
<p>研究成果の 発 表</p>	<p>なし。</p>