

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07470

研究課題名(和文) 中間宿主を用いた実験的交雑によるトキソプラズマの新規病原性遺伝子の探索

研究課題名(英文) Genetic screen for novel virulence factor of *Toxoplasma gondii* using induced cross within an intermediate host

研究代表者

松崎 素道 (Matsuzaki, Motomichi)

国立研究開発法人理化学研究所・革新知能統合研究センター・研究員

研究者番号：00511396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、日本で分離された遺伝子型と表現型に特徴がある株を材料として用い、中間宿主であるマウスの腸内で交雑させた株を多数取得し、ゲノムリシーケンスにより得たSNP情報を使ったQTL解析によって新規の病原性因子を同定することを目的とした。しかしながら、研究期間の開始とともにCOVID-19の感染拡大が繰り返したため、長期に渡る培養実験や動物実験は先が見通せない状況では着手困難であった。そのため本研究では文献調査や学会参加によって情報収集に注力し、最終年度に若干の実験を実施できたに留まり、実質的な研究成果は得られていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究期間を通じてCOVID-19の感染拡大が繰り返したため、文献調査や学会参加による情報収集と、最終年度に若干の実験を実施できたに留まり、実質的な研究成果は得られていない。

研究成果の概要(英文)：This research project aimed at identifying novel virulence factors of *Toxoplasma gondii*, by performing QTL analysis using genome-wide SNP information obtained from a cross of a Japanese strain with a characteristic phenotype induced within an intermediate host. However, long-term experiments were difficult to undertake due to the repeated spread of COVID-19 infection that starts concurrently with the study. The study was thus limited to collecting information through literature surveys and online conferences and conducting a few experiments in the final year. As a result, no substantial achievements were obtained.

研究分野：寄生虫学

キーワード：トキソプラズマ 病原性 QTL解析

1. 研究開始当初の背景

トキソプラズマ *Toxoplasma gondii* はヒトを含む幅広い哺乳類や鳥類の細胞内に寄生する単細胞生物である。終宿主はネコ科動物であり、小腸内で有性生殖を行い糞便中にオーシストが排出され、これがマウス、ブタ、ヒトなどの幅広い中間宿主への感染源となる。ヒトにおいては通常不顕性感染となるが、免疫が抑制状態にある臓器移植患者や、妊婦が初感染した場合の胎児などで重篤な症状を引き起こす。

トキソプラズマの遺伝子型は現在のところ 6 系統 16 ハプログループに分類されており、遺伝子型によって病原性に差異があることが知られている。実験的に得た交雑株の病原性の強弱と遺伝マーカーとを統計解析する QTL 解析によって、ROP5, ROP16, ROP18 が支配的な病原性因子だと報告されてきたが、しかし実験的に交雑させることの困難さから南北アメリカ大陸で代表的な株同士の交雑が数回行われたにすぎず、病原性規定因子の探索が十分になされたとは言いがたい状況である。その一方で、われわれは日本各地で単離されたトキソプラズマ株の病原性解析とゲノム解析を行い、これまで見落とされてきた領域に病原性の強弱を支配する因子が存在することを示唆する結果を得ていた。

2019 年に本来は終宿主ではないマウスの腸内で有性生殖を行わせる方法が報告され、またゲノム配列のリシーケンスが十分低廉になったことから、今やトキソプラズマで実験的交雑株を用いた QTL 解析を行うことは十分現実的な手法になった。すなわち、われわれの持つ日本分離株を用いた交雑実験を行うことで、病原性の強弱を支配する ROP5, ROP16, ROP18 以外の因子の同定が可能だと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では遺伝的にほぼ同一ながら明確な病原性の差を示す岐阜株と CTG 株との間で交雑株を得て、ゲノムワイドに取得した SNP 情報を使った QTL 解析を行うことで、トキソプラズマの病原性の強弱を支配する新規の病原性因子を同定することを目的とした。

トキソプラズマの交雑実験を行うには、ネコを用いるところに動物実験施設の管理運営上のハードルが存在する。そこで本研究では、2019 年に報告されたマウス腸内でトキソプラズマの有性生殖を行わせる実験系を応用し、交雑実験のハードルを下げることを狙った。これにより、トキソプラズマの病原性理解が進むだけでなく、様々な基礎的メカニズムの解明が促進されることを期待したものである。

3. 研究の方法

(1) 交雑親株の準備

交雑実験の際に交雑株と自殖株とを弁別するため、また遺伝的な差が少ない 2 株間で利用可能な遺伝マーカーを増やすため、岐阜株と CTG 株から誘発突然変異により薬剤耐性株を作出して交雑親株とする。突然変異誘発剤は N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) を、選択薬剤としては 5-fluorodeoxyuridine (5-FdU) または sinefungin (SNF) を用いる。得られた交雑親株は、マウスに対する病原性の差が維持されていることを確認し、リシーケンスを行って 2 株間の SNP を用いて染色体ごとに PCR-HRM マーカーを設計する。交雑親株はマウスに腹腔接種して 1 ヶ月後に脳乳剤を作成し、シストの存在を確認後に以後の実験に用いる。

(2) マウス腸内での有性生殖

マウス腸内でトキソプラズマの有性生殖を行わせる実験系は、概ね以下のとおりである (Martorelli Di Genova et al. 2019, PLOS Biol. 17: e30000364)。マウスは C57BL/6J を使い、あらかじめリノール酸を十分添加した飼料を与えておく。 Δ^6 -desaturase を阻害するため阻害剤 SC-26196 50 mg/kg を 12 時間ごとに経口投与する。マウスの脳から調製したシストを最初の阻害剤投与から 12 時間後に経口で接種し、以降 5 日目まで阻害剤の投与を継続する。有性生殖の結果、8-9 日目をピークに糞便中にオーシストが排出される。

本研究ではまず原報告と同様に ME49 株を用いて、オーシストが排出されマウスへの再感染能を持つかを確認する。続いて 2 種の交雑親株が同様にオーシストを形成するかを調べる。なお単独感染ではオーシストを形成しにくい株の存在が知られているため、この時点でオーシストが形成されない場合でも以降に進む。一般にトキソプラズマは終宿主に対しては強い病原性を

示さないと考えられているが、本来中間宿主であるマウスを使った実験系では、有性生殖に進まなかったわずかな原虫により致死的な感染が起こりオーシスト排出前にマウスが死亡する可能性がある。その場合には sulfadiazine 投与によって原虫の増殖を抑制しながらオーシストが得られないか検討する。

(3) 交雑株の取得

2 種の交雑親株のシストを混合し、上記のとおりマウスに経口接種してオーシストを得る。シヨ糖浮遊法で単離し成熟させてから脱嚢後、*in vitro* 培養系でプラークを形成させる。このとき選択薬剤なし、単剤、二剤の計 4 通りに培養し、プラーク数から交雑の割合を求める。両剤耐性のプラーク(すべて交雑株)と、選択薬剤なしのプラーク(自殖株を多く含む)からそれぞれ 24 クローンを目標に取得する。親株間の SNP をマーカーとした PCR-HRM で各染色体がどちらの親株に由来するかをタイピングし、交雑した染色体が満遍なくカバーされるように 24 クローンを選定する。

(4) QTL 解析

平均深度 50x を目標に各交雑株の配列を得て、それぞれリファレンス配列にマッピングして SNP コールを行う。また交雑株をマウス 5 匹ずつに接種して 30 日間観察し、生存マウスの血清陽転を確認した上で生存率を求め、これを病原性の指標とする。病原性を量的形質として染色体上の相関座位を探索し、病原性因子を推定する。

(5) 病原性因子であることの検証

見出した候補因子について、交雑親株の遺伝子破壊を行った上で双方の遺伝子型を相補した株を作成する。上記のとおり病原性を評価し、予想通り病原性に差が出るか確認する。

4. 研究成果

研究期間の開始とともに COVID-19 の感染拡大が起こり、新規研究である本研究課題は開始を保留せざるを得なくなった。とくに研究代表者の所属部署においては、実質的に完全な在宅勤務態勢となり外勤も原則禁止とされたため、実験設備を必要とする研究は推進することができなかった。1 つの実験が 2~3 ヶ月と長期に渡るため、感染拡大が繰り返し先が見通せない状況では実験に着手すること自体が大きなりリスク要因であり、部分的に推進することも断念せざるを得なかった。第 1 年度・第 2 年度は文献調査やオンライン学会への参加によって情報収集にとめたのみであり、第 3 年度に若干の実験を開始したが、実質的な研究成果は得られていない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	永宗 喜三郎 (Nagamune Kisaburo) (90314418)	国立感染症研究所・寄生動物部・室長 (82603)	
研究分担者	高島 康弘 (Takashima Yasuhiro) (20333552)	岐阜大学・応用生物科学部・准教授 (13701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関