

平成30年8月30日

学 長 殿

主 査 玄 学南



学位論文審査の要旨及び結果並びに試験の  
結果について（報告）

平成30年7月18日付けで依頼されました下記の者の学位論文審査  
の要旨及び結果並びに試験の結果を別紙1及び別紙2のとおり報告します。

記

専 攻 畜産衛生学専攻（博士後期課程）

氏 名 LIU Mingming

(別紙1)

学位論文審査の結果の要旨	
専攻	畜産衛生学専攻 (博士後期課程)
氏名	LIU Mingming
審査委員署名	主査 云学南 副査 西川義文 副査 五十嵐郁男 副査 五十嵐慎 副査 河津信一郎
題目	Establishment of transient and stable transfection systems for genetic manipulation of <i>Babesia gibsoni</i> (バベシア・ギブソニの遺伝子操作のための一過性及び安定したトランスフェクションシステムの確立)
審査結果の要旨 (1,000字程度)	
<p>マダニに媒介される赤血球内寄生原虫であるバベシア属には約 100 種類同定されているが、牛に寄生する 3 種類 (<i>B. bovis</i>, <i>B. bigemina</i>, <i>B. ovata</i>) のみについて遺伝子組換え方法が確立されている。他のバベシアについても遺伝子組換え方法の導入が求められている。そこで、日本を含むアジア地域で犬に広範に流行し、ペット産業に深刻な被害を与えている、イヌバベシア (<i>B. gibsoni</i>) について遺伝子組換え方法の確立を試みた。</p> <p>第 1 章では外来遺伝子一過性発現虫体の作製を試みた。<i>B. gibsoni</i> のゲノムデータベースより伸長因子 <math>\alpha</math> (<i>ef-1<math>\alpha</math></i>) のプロモーター領域を特定し、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子またはルシフェラーゼ (<i>Luc</i>) 遺伝子発現プラスミドを構築した。最初は、これらのプラスミドをウシバベシアで報告された方法でトランスフェクションを行ったところ、いずれも成功しなかった。そこで、種々のトランスフェクション方法を検討したところ、Lonza 社製の AMAXA 4D Nucleofector™ 装置用と特定の緩衝液を用いたところ、GFP または <i>Luc</i> 遺伝子一過性発現虫体の作製に成功した。</p>	

第2章ではプロモーターの探索を行った。上記の伸長因子 $\alpha$ プロモーターを含む6種類のプロモーター領域の制御下でLuc発現プラスミドを作製し、異なるプロモーターの活性を測定したところ、アクチン (actin) プロモーターが最も強い活性を有することが判明した。また、*B. gibsoni* と *B. bovis* の ef-1 $\alpha$  と actin プロモーターをそれぞれ、異種虫体に導入してそのプロモーター活性を調べたところ、これらのプロモーターは異種虫体においても機能することを突き止めた。

第3章では外来遺伝子安定発現虫体の作製を行った。ゲノムの標的部位に外来遺伝子を導入し、安定発現を実現するために、ef-1 $\alpha$  遺伝子の上流と下流ゲノム断片を発現ユニット (ef-1 $\alpha$  プロモーター : GFP ORF : ターミネーター : actin プロモーター : dhfr ORF : ef-1 $\alpha$  ターミネーター) の両側にもつプラスミドを構築し、虫体に導入した後に、薬剤選択を行ったところ、相同組み換えにより GFP 遺伝子と dhfr 遺伝子が標的ゲノム部位に組み込まれた安定発現虫体の作製に成功した。また、標的部位の ef-1 $\alpha$  遺伝子がノックアウト (KO) されたことも確認した。

以上のように、この研究では、ウシバベシア以外のバベシア種では、初めてイヌバベシア原虫の遺伝子組換え法の確立に成功した。今回確立した方法により、イヌバベシア原虫に自由自在に外来遺伝子を導入でき、また、標的遺伝子を簡単に KO することが出来るようになった。今後、イヌバベシア原虫の病原性遺伝子の特定・KO による、虫体の弱毒化と、この弱毒化虫体をベクターとした新規組換えワクチン開発への応用が期待される。

以上について、審査委員全員一致で本論文が帯広畜産大学大学院畜産学研究科博士後期課程の学位論文として十分価値があると認めた。

#### 学位論文の基礎となる学術論文

題目 Transient transfection of intraerythrocytic *Babesia gibsoni* using *elongationfactor-1 alpha* promoter.

著者 Mingming Liu, Masahito Asada, Shinuo Cao, Paul Franck Adjou Moumouni, Patrick Vudriko, Artemis Efstratiou, Hassan Hakimi, Tatsunori Masatani, Fujiko Sunaga, Shin-ichiro Kawazu, Junya Yamagishi, and Xuenan Xuan.

学術雑誌 Molecular and Biochemical Parasitology

(巻・号・頁) (216巻・2号・56-59頁)

発表年月 2017年9月

題目 Identification and characterization of interchangeable cross-species functional promoters between *Babesia gibsoni* and *Babesia bovis*.

著者 Mingming Liu, Paul Franck Adjou Moumouni, Shinuo Cao, Masahito Asada, Guanbo Wang, Yang Gao, Huanping Guo, Jixu Li, Patrick Vudriko, Artemis Efstratiou, Aaron Edmond Ringo, Seung-Hun Lee, Hassan Hakimi, Tatsunori Masatani, Fujiko Sunaga, Shin-ichiro Kawazu, Junya Yamagishi, Lijun Jia, Noboru Inoue, and Xuenan Xuan.

学術雑誌 Ticks and Tick-borne Diseases

(巻・号・頁) (9巻・2号・330-333頁)

発表年月 2018年2月

題目 Establishment of a stable transfection system for genetic manipulation of *Babesia gibsoni*.

著者 Mingming Liu, Paul Franck Adjou Moumouni, Masahito Asada, Hassan Hakimi, Guanbo Wang, Tatsunori Masatani, Patrick Vudriko, Seung-Hun Lee, Shin-ichiro Kawazu, Junya Yamagishi, and Xuenan Xuan.

学術雑誌 Parasites & Vectors

(巻・号・頁) (11巻・1号・260頁)

発表年月 2018年4月

(別紙2)

最終試験の結果の要旨	
専攻	畜産衛生学専攻（博士後期課程）
氏名	LIU Mingming
審査委員署名	主査 玄学南 副査 西川 義文 副査 五十嵐 有男 副査 五十嵐 慎 副査 河津信一郎
実施年月日	平成30年8月29日
試験方法 (該当のものを○で 囲むこと)	<input checked="" type="radio"/> 口頭・筆記
要 旨	
<p>主査及び副査の5名は、学位申請者に対し、原虫病研究センターPK ホールにおいて、学位申請者本人に口頭発表による学位論文内容の説明を行わせ、その内容について質疑応答を行った。また、関連する専門知識について口頭により試問を行った。</p> <p>その結果、学位申請者が帯広畜産大学大学院畜産学研究科畜産衛生学専攻博士後期課程の修了者としてふさわしい学力および見識を有すると判断し、博士（畜産衛生学）の学位を授与するに値すると判断した。</p>	