

(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	GUO Huanping
審査委員署名	主査 玄 学南 副査 西川 義文 副査 五十嵐 慎 副査 河津信一郎 副査 横山直明
題目	Functional characterization of dense granule protein 9 in <i>Toxoplasma gondii</i> (トキソプラズマの GRA9 分子の機能解析)
審査結果の要旨 (1,000 字程度)	
<p><i>Toxoplasma gondii</i> は、アピコンプレクサ門に属する偏性細胞内寄生性の病原性原虫であり、ヒトを含むほぼすべての温血動物に感染する。感染率は世界人口のおよそ 30% に上り、シストが寄生した生あるいは加熱不十分な肉の喫食、オーシストに汚染された水や野菜の摂取により感染する。これらの点から、トキソプラズマ症は世界的に重要な人獣共通感染症である。しかし、現在までトキソプラズマ症を予防する安全かつ効果的なワクチンは開発されていない。したがって、原虫の増殖・病原性因子の同定がその対策の確立には重要である。</p> <p>本研究の主な目的は原虫の増殖および病原性に重要な新規因子を同定することである。タンパク質の分子特性の詳細な理解は当該タンパク質の機能評価に有用である。また、遺伝子のノックアウトによるタンパク質機能の評価もよく利用される手法である。デンスグラニュールタンパク質 (GRA) は <i>T. gondii</i> の寄生胞やシストの構造を維持する主要な因子としての機能を果たしている。さらに、その寄生胞内における特異的な局在は寄生虫・宿主間の様々な相互作用への関与を可能にしている。GRA9 は <i>T. gondii</i> において同定されたが、その増殖過程における役割は明らかになっていない。</p>	

第1章では、*T. gondii*株間および種間でのGRA9タンパク質の系統解析を実施し、GRA9が*T. gondii*株間において高度に保存されていることを示した。配列解析の結果Type I RH株およびType II PLK株におけるGRA9の核酸配列はともに957 bpであり、Type I (TGGT1_251540) およびType II (TGMR49_251540) について予測された配列と一致することが示された。さらに、予測されたアミノ酸配列のアラインメントにより、RH株GRA9とPLK株GRA9との間に1アミノ酸の置換があることが明らかになった。これらは*T. gondii*のGRA9タンパク質の機能をさらに解明するために有用な知見である。

第2章では、GRA9遺伝子を欠損した*T. gondii* RH株およびPLK株派生株をCRISPR/Cas9法により作製した。野生型、欠損株および補完株におけるGRA9の表現型は*in vitro*および*in vivo*でそれぞれVero細胞とBALB/cマウスを用いて解析した。表現型解析の結果、PLK株におけるGRA9のノックアウトは原虫によるプラーク形成と寄生胞からの脱出が阻害されることが明らかになった。PLKΔGRA9株のプラーク形成能および脱出能はともにPLK株GRA9の同義アレルを再導入することで回復した。マウスを用いた実験では、PLK株におけるGRA9の欠損は*T. gondii*の病原性を有意に低下させた。しかし、RH株とRHΔGRA9株の間では、宿主細胞への侵入率の低下以外には表現型の違いは認められなかった。全般的に見て、GRA9の欠損はPLK株においてのみ増殖と病原性に影響した。これらの結果はGRA9が株特異的に原虫の脱出やマウスへの病原性に関与することを示唆している。

以上のように、本研究ではGRA9の詳細な分子特性を明らかにし、Type I RH株とType II PLK株における*in vitro*と*in vivo*における当該タンパク質の機能を解析した。これらの結果はGRA9が*T. gondii*の増殖過程や病原性に関わるメカニズムをさらに理解するにあたって有益な知見を提供するものである。

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 Characterization of strain-specific phenotypes associated with knockout of dense granule protein 9 in *Toxoplasma gondii*.

著者 Huanping Guo, Yang Gao, Honglin Jia, Paul Franck Adjou Moumouni, Tatsunori Masatani, Mingming Liu, Seung-Hun Lee, Eloiza May Galon, Jixu Li, Yongchang Li, Maria Agnes Tumwebaze, Byamukama Benedicto, and Xuenan Xuan.

学術雑誌 Molecular and Biochemical Parasitology

(巻・号・頁) (229巻・2号・53-61頁)

発表年月 2019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	GUO Huanping
審査委員署名	主査 玄 学南 副査 西川 義文 副査 五十嵐 慎 副査 河津 信一郎 副査 横山 直明
実施年月日	令和元年8月22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>	