



Title	Host genetics highlights IFN- γ -dependent <i>Toxoplasma</i> genes encoding secreted and non-secreted virulence factors in <i>in vivo</i> CRISPR screens
Author(s)	橋, 優汰
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/101846
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 大阪大学の博士論文について をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論 文 内 容 の 要 旨
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	橋 優汰
論文題名 Title	Host genetics highlights IFN- γ -dependent <i>Toxoplasma</i> genes encoding secreted and non-secreted virulence factors in <i>in vivo</i> CRISPR screens (トキソプラズマ原虫の生体内CRISPRスクリーニングと宿主遺伝学の併用がインターフェロン- γ 依存的な病原性因子の同定を可能とする)
論文内容の要旨	
〔目的(Objective)〕 病原体の病原性発揮に必要な遺伝子を同定することはこれまで容易ではなかった。特に真核生物である原虫においては、寄生虫に固有の遺伝子が多数を占めるため既存のモデル生物由来の知見が当てはまらないことが多い。また病原体の特性の多くは <i>in vitro</i> における培養系では観察できず、宿主生体内環境 (<i>in vivo</i>) でのみ観察可能であることが実情である。そこで本研究では、細胞内寄生性の病原性原虫であるトキソプラズマ原虫をモデルに高性能な生体内CRISPRスクリーン法を樹立し、野生型マウス生体内における適応に必要な病原体の因子を同定することを目的とした。また異なる遺伝学的背景の宿主における病原体の挙動も評価した。	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 ゲノム編集技術であるCRISPR/Cas9を応用することで、一度のトランスフェクションで数千から数万種類の遺伝子変異体トキソプラズマをまとめて作製することが可能である。作製した遺伝子変異体原虫の集団をマウスへ感染させ、感染前後において集団内に占める割合が変動した変異体およびその責任遺伝子を次世代シーケンサーによって決定することができる。 先行研究で行われてきたトキソプラズマの生体内スクリーニングにおいては高病原性に起因する宿主マウスの早期死亡が技術的な障壁となってきた。そこで、一般的に用いられる腹腔内感染でなく局所感染モデルを採用することで病原性の問題を克服し、感染後7日間と長期に渡って宿主生体内での淘汰を働かせることに成功した。独立して複数回行った生体内スクリーニングの結果は相関係数0.8-0.9と非常に高い相関を示し、再現性の高い実験系であることが示された。今回得られた多数の新規病原性因子の中から、分泌タンパク質であるGRA72に着目し解析を行った。GRA72欠損原虫では寄生胞が膨化し、寄生胞膜に局在する分泌タンパク質であるGRA17とGRA23の局在が異常になった。GRA72の発現を回復させるとこれらの異常は全て正常化した。GRA72は原虫が寄生細胞の内部で構築する膜用構造物である寄生胞の維持および病原性に必須であることが明らかになった。 次に、本手法に免疫学的要素を取り入れた解析を行なった。抗トキソプラズマ宿主免疫に最も重要なサイトカインであるインターフェロン- γ (IFN- γ) 受容体を欠損した遺伝子欠損マウスを用いて生体内CRISPRスクリーニングを行い、野生型マウスの結果と比較した。その結果、宿主のIFN- γ 依存的な既知の病原性因子 (ROP5, ROP18, GRA12, GRA45) だけではなく、未報告のIFN- γ 依存的な病原性因子を複数検出することに成功した (RON1, RON11, GRA23)。これらの遺伝子欠損原虫は野生型マウスにおける病原性は低下するが、IFN- γ 受容体欠損マウスにおいては病原性が回復する。このことから、これらの遺伝子とIFN- γ との関連が証明された。	
〔総 括(Conclusion)〕 再現性の高い生体内CRISPRスクリーニングを樹立した。新規の病原性に必須な分泌タンパク質であるGRA72を同定し解析した。また、病原体と宿主の両者の遺伝子改変技術を併用したCRISPRスクリーニングによって、生体内における特定の宿主因子と病原体遺伝子の相互作用が網羅的に解析可能であることが世界で初めて実証された。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名)		橋 優汰	
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査 大阪大学教授	山本雅裕	署 名
	副 査 大阪大学教授	岩永史訓	署 名
	副 査 大阪大学教授	小林剛	署 名

論文審査の結果の要旨

病原体の持つ性質の多くは *in vivo* 環境においてのみ明らかになる。しかし、宿主体内における病原体の遺伝学的スクリーニングは宿主への病原性に起因する技術的障壁から困難であった。本研究はトキソプラズマ原虫の病原性因子探索において、従来の古典的な順・逆遺伝学的手法の枠組みを超えて、CRISPR/Cas9を応用した網羅的な遺伝学的スクリーニングを宿主体内において可能にしたものである。また、病原体の遺伝学的スクリーニングと宿主遺伝学を併用することで宿主・病原体相互作用の網羅的検出が可能であるという概念を世界で初めて実証した。本論文で同定された新規分泌タンパク質GRA72は寄生胞の維持に必須の役割を果たすことが明らかとなった。また本研究によって新規のIFN- γ に関連する病原性遺伝子が多数同定された。ヒトの病原体であるトキソプラズマ原虫において、高効率に病原性因子の探索を可能とした点は医学上重要な意味を持つ。

以上より、申請者の論文は博士（医学）の学位授与に値する。