

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2022年6月2日

| | | | |
|---------|---|------------------------|------|
| 採択番号 | 2021-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 | トキソプラズマのプログラム細胞死メカニズム解明に向けた研究 | | |
| 研究代表者 | (ふりがな) 氏 名 | 所属部局等・職名 | |
| | まさたに たつのり 正谷 達膳 | 岐阜大学応用生物科学部・准教授 | |
| 研究分担者 | | | |
| | | | |
| | | | |
| | げん がくなん 玄 学南 | 帯広畜産大学原虫病研究センター・教授 | |
| 研究期間 | 2021年4月1日 ~ 2022年3月31日 | | |
| 目的・趣旨 | <p>病原性原虫のプログラム細胞死機構を詳細に知ることは、新規創薬考案のヒントとなりうる。本研究ではトキソプラズマを対象とし、その細胞死シグナル機構を解明することを目的とする。細胞死に先駆けて発現上昇する遺伝子を対象とし、ゲノム編集に基づくノックアウト原虫を作出する。作出されたノックアウト原虫の性状、特にプログラム細胞死への影響を検討することで、当該遺伝子のプログラム細胞死への寄与を評価する。</p> | | |
| 研究経過の概要 | <p>トキソプラズマ細胞死関連遺伝子を探索し、その遺伝子発現量をリアルタイム PCR にて定量することで、これら遺伝子が細胞死に関連することを確認できた。</p> <p>これら遺伝子をノックアウトするため、各遺伝子の特異的 guide RNA 配列を挿入した CRISPR/Cas9 ベクターを作製し、トキソプラズマ RH 株に導入した。しかし、いずれの遺伝子もうまく KO できなかったことから、guide RNA の再設計による再検討または薬剤添加時のみ目的遺伝子の発現量を一過性に減少させる目的で、コンディショナルノックアウト法の確立が必要と考えられた。</p> <p>マラリア、バベシアで活用されているコンディショナルノックアウト法である、glmS リボザイム配列を用いた方法に注目し、トキソプラズマでも可能かどうかを検討した。しかし、トキソプラズマでは本実験系がうまくいかない可能性が示された。コロナ禍での移動制限のため、電話またはメールでの情報のやりとりによる共同研究となった。</p> | | |

| | |
|----------------|--|
| <p>研究成果の概要</p> | <p>はじめにトキソプラズマ細胞死関連遺伝子を探索した。データベース ToxoDB 及び、すでに報告されているトキソプラズマ細胞死関連遺伝子に関する論文 (Ni Nyoman et al., Apoptosis, 2013) を参考に、PDCD2、BI-1 及び ELMO1 に注目した。トキソプラズマ RH 株に細胞死誘導薬剤として知られるスタウロスポリンで処理し、これら遺伝子の発現量をリアルタイム PCR にて定量した。その結果、いずれの遺伝子も発現上昇が認められた。</p> <p>これら遺伝子をノックアウトするため、各遺伝子の特異的 guide RNA 配列を挿入した CRISPR/Cas9 ベクターを構築し、Nucleofector 2b を用いて導入した。しかし、目的のノックアウト原虫を得ることができなかった。次に、相同組換えに基づくノックアウト法を試みる目的で、ベクターを構築し、これを Nucleofector 2b を用いて導入し薬剤により選抜を試みた。しかし、3 度の試みにもかかわらず、目的のノックアウト原虫を得ることができなかった。</p> <p>薬剤添加時のみ目的遺伝子の発現量を一過性に減少させる目的で、コンディショナルノックアウト法の確立を試みた。glmS リボザイム配列を目的遺伝子終止コドン直後に配置するコンディショナルノックアウト法をトキソプラズマでも実施可能かどうか検証する目的で、現在、EGFP 遺伝子に glmS リボザイム配列を付したものを発現させるようプラスミドを構築し、トキソプラズマ RH 株に導入・クローニングすることで、RH-EGFPglmS 株の作出を試みた。しかし、樹立した RH-EGFPglmS 株に、コンディショナルノックアウト誘導試薬であるグルコサミンを、宿主細胞への致死量以下の様々な濃度で添加したものの、EGFP の発光低下はみられなかった。そのため、マラリアやバベシアで可能なコンディショナルノックアウト法である glmS リボザイム法は、トキソプラズマに適用することは困難である可能性が示された。今後は、トキソプラズマですでに確立されているオーキシン誘導デグロン法を適用し、遺伝子コンディショナルノックアウト原虫の樹立を目指す。</p> |
| <p>研究成果の発表</p> | <p>なし。</p> |