

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20日

採択番号	2021-共同-11		
研究部門	国際連携研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	麻田 正仁
研究課題名	Bar-seq を用いたウシバベシア原虫赤内期必須遺伝子の同定		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	いしざき たかひろ 石崎 隆弘	ウメオ大学分子感染医学研究所・特別研究員	
研究分担者	かねこ おさむ 金子 修	長崎大学熱帯医学研究所・教授	
	あさだ まさひと 麻田 正仁	帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授	
研究期間	2021年4月1日 ~ 2022年3月31日		
目的・趣旨	<p><i>Babesia bovis</i> はウシ赤血球に寄生する原虫であり、感染宿主に発熱、貧血、血色素尿といった病態を引き起こすことから獣医学領域においてその制圧が課題となっている。ウシバベシア症対策として生ワクチンやジミナゼン等の薬剤が使用されているが安全性及び薬剤耐性原虫出現のリスクといった問題点から、安全で効果的な抗原虫薬やワクチンの開発が求められている。バベシア原虫は全長 8.2Mbp からなる 4 つの染色体を持ち、約 3700 個のタンパク質をコードする遺伝子を有している。宿主に病態を引き起こす赤血球期において発現する、原虫特異的かつ原虫の生存に必須な分子は治療薬やワクチンの標的分子として有望である。そのため赤血球期における必須遺伝子を明らかにすることはウシバベシア症制圧に向けた基礎研究として重要な意味を持つ。本研究ではネズミマラリア原虫の遺伝子必須性解析において既に報告のある Bar-seq ライブラリ技術 (Pfander <i>et al.</i>, 2011; Gomes <i>et al.</i>, 2015; Bushell <i>et al.</i>, 2017) をバベシア原虫へと応用することで、<u>赤血球期におけるバベシア原虫の必須遺伝子を同定することを目的とする。</u></p>		

<p>研究経過の概要</p>	<p>初年度は共同研究者である麻田先生より実験試料であるバベシア原虫ゲノム DNA の提供を受けた。バベシア原虫 DNA をシリンジを用いて裁断、精製した後に pJazz ベクターへの挿入を行なった。サンガーシーケンス法による 1000 プラスミドの解析を実施するにあたり、後述する長鎖相同組換えベクターを用いることが最も効率の良い手法か疑問点が生じたため本解析を一時中断している。</p> <p>現所属が保有しているバーコード配列を保有する PlasmogEM ライブラリー技術は CRISPR/Cas9 システムがアピコンプレクサ門原虫で報告される以前は強力な手法であった。近年マラリア原虫、トキソプラズマ原虫、バベシア原虫での CRISPR/Cas9 系が報告され、トキソプラズマ原虫では CRISPR/Cas9 ライブラリーを用いた大規模な遺伝子必須性及び必須遺伝子機能のスクリーニング解析が実施された。一方、マラリア原虫やバベシア原虫では c-NHEJ 経路を欠損しているため遺伝子の修復にはドナー配列の付与が必要となる。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>組換え時のドナー配列の長さは一般的に 500bp と大規模スクリーニングに適さない長さが必要と考えられていたが、我々の研究室は 50bp という短鎖のドナー配列が遺伝子修復に充分であるという知見を見出した(学会発表 1)。さらに必須遺伝子の機能解析スクリーニングを可能とするエピトープタグ挿入型遺伝子ノックダウン手法も確立した(学会発表 1)。マラリア原虫で CRISPR/Cas9 系に関する知見が実際にバベシア原虫の遺伝子スクリーニング手法に応用可能かどうか？また、長鎖相同組換え領域を有するプラスミドを用いて遺伝子編集が可能か？という 2 点を実際の原虫を用いて検討した後に今後の実験方針を決定したい。また、手法の最適化を検討するにあたり PlasmogEM や CRISPR/Cas9 系を用いた原虫遺伝子の genetic screen に関する知見をまとめた総説が受理された(発表論文 1)。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>&lt;学会発表&gt;</p> <p>1. <b>Ishizaki T.</b>, Bushell E. An effective CRISPR/Cas9 system using short length homology repair template for genetic modification of <i>Plasmodium berghei</i>. BioMalPar XVIII Heidelberg, Germany, May 2022</p> <p>&lt;発表論文&gt;</p> <p>1. <b>Ishizaki T.</b>, Hernandez S., Paoletta M.S., Sanderson T., Bushell E.S.C. CRISPR/Cas9 and genetic screens in malaria parasites: small genomes, big impact. Biochemical Society transactions. 2022 (in press).</p>