

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6日

採択番号	2021-共同-5		
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	西川 義文
研究課題名	ポピュレーショントラックによる マウスでの潜伏感染に必要なトキソプラズマ原虫遺伝子の機能評価		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	すぎ たつき 杉 達紀	北海道大学 人獣共通感染症国際共同研究所・助教	
研究分担者			
	にしかわ よしふみ 西川 義文	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>トキソプラズマ原虫の潜伏感染は永続的なものではなく、宿主による原虫の排除が生じていることが近年報告されている。潜伏感染の維持を左右する原虫側因子を同定し作用機序を解明することは、潜伏感染の排除速度に介入して潜伏感染を制御する手法につながる。一方、トキソプラズマの感染実験において潜伏感染成立・維持の最終的な評価軸である脳内シスト数はマウス個体間で振れ幅が大きく、潜伏感染成立に影響する原虫因子の解析を妨げている。我々は解析対象遺伝子に変異を持った原虫と野生型原虫の増殖性の差異を同一マウス体内で評価することにより遺伝子機能を評価する手法の確立を目指した。</p>		
研究経過の概要	<p>①迅速な遺伝子変異原虫ポピュレーション調整手法の確立 CRISPR/Cas9 を用いて変異導入された原虫集団を低継代数で樹立する系の確立を試みた。トキソプラズマ原虫において十分な効率で変異導入を実現する donor oligo の条件検討を実施した。トランスフェクション後にゲノム編集がされた原虫を薬剤選択し、変異株ポピュレーションが十分に濃縮できる期間の検討を実施した。</p> <p>②NGS によるポピュレーション追跡手法の確立 次世代シーケンサー(NGS)を用いて、変異株と野生株などの混合集団におけるポピュレーションを推定する手法の確立を試みた。解析モデルとして TgGP 遺伝子にサイレント変異株もしくは KO 変異を導入した 2 株の混合集団の <i>in vitro</i> 培養のサンプルを利用した。継代のたびにゲノム DNA を精製し、変異 SNP 導入箇所を増幅し NGS 解析により KO 変異の割合を解析した。</p>		

<p>研究成果の概要</p>	<p><u>①迅速な遺伝子変異原虫ポピュレーション調整手法の確立</u></p> <p>ゲノム編集をするトキソプラズマ原虫の親株として潜伏感染実験系が確立している <i>Pru Δku80Δhxgprt</i> 株を導入し(Dr. David Bzik より許可を得て帯広畜産大学西川教授より分与を受けた)、一つのプラスミドに Cas9:gRNA:選択マーカを搭載した組換えコンストラクトおよび種々の長さの単鎖 DNA ドナーと組み合わせて電気穿孔法で原虫へ導入した。Cas9 が切断する部位の周囲 100bp のドナーを用いることで、遺伝子導入後の薬剤選択 1~2 週間で 9 割を超えた原虫に変異が導入されていることを確認した。樹立した系を用いてアミロペクチン代謝に関わる 6 遺伝子(TgGP/ TgGWD/ TgPPDK/ Amy1/ Amy2/ D-enzyme)の全てについて KO 変異を導入することに成功した。</p> <p><u>②NGS によるポピュレーション追跡手法の確立</u></p> <p>TgGP の KO 変異もしくはサイレント変異が導入された混合集団のポピュレーション推移を NGS を用いて解析したところ、<i>in vitro</i> での継代期間に応じて KO 変異株の割合が減少していた。培養条件において TgGP が原虫増殖の適合性に寄与していることが明らかとなった。</p> <p>確立されたポピュレーション追跡手法を用いて、潜伏感染状態のマウスの脳から得られたサンプルの解析を進めた。TgGP の活性型変異を導入された原虫と野生株の混合集団を腹腔内に投与後、感染後 1 か月目の感染感染マウスから回収した虫体では活性型変異原虫は野生株と同等程度存在していたのに対して、感染後 3 か月目では活性型変異原虫の割合が増加している傾向がみられた。野生型原虫と変異原虫の集団構成について同一の実験群の中でもマウスごとにばらつきが見られた。ばらつきの原因としては脳組織へ原虫が移行する際に少数の原虫が絞込まれている「ボトルネック効果」を受けていることが挙げられる。今後は投与する原虫の数を増やしてボトルネックを通過する際の原虫数を増やす、もしくは解析するマウスの個体数を増やすなどして、より頑強に潜伏感染時のポピュレーション推移を観察する予定である。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>特記事項なし</p>