

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2023年6月7日

採択番号	2022-共同-17		
研究部門	国際連携協力部門	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	2022年4月1日 ~ 2023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。細胞死に関連すると予測された遺伝子を対象とし、ゲノム編集に基づくコンディショナル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>これまでに、細胞死関連遺伝子として注目し選抜された 2 つの遺伝子 (PDCD2、ELMO1) について相同組換えによるノックアウト原虫作出を試みたものの、成功しなかった。具体的には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、すなわち、これら遺伝子は原虫にとって必須遺伝子である可能性が高いと考えられた。</p> <p>前年度、本課題において、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、glmS リボザイムに基づくコンディショナルノックアウト法の確立を試みたものの、本方法は、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。</p> <p>そこで今年度は、オーキシン誘導デグロン法(図)に基づくコンディショナルノックアウト原虫の作出に向けた準備を行なった。具体的には、トキソプラズマ原虫 Pru Δ Ku80 株を対象とし、イネ由来 OsTIR1 を過剰発現する原虫を作出した。この原虫に CRISPR/Cas9 によって目的蛋白質の C 末端にオーキシン誘導デグロン(mAID)タグを付加し、これに基づいたコンディショナルノックアウト法の確立をおこなうためのプラスミドを作出した。</p>		

	<p>図 オーキシシン誘導デグロン法</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>Addgene 社より購入した OsTIR1 強制発現プラスミド(#87258)に搭載された薬剤耐性遺伝子 CAT であったため、CAT を既にゲノム中に組み込まれた Pru Δ Ku80 株には適用できなかった。そのため、同プラスミドの CAT を HXGPRT に置き換えたものを導入することで、OsTIR1 発現 Pru Δ Ku80 株を作出した。</p> <p>次に、PDCD2 及び ELMO1 のコンディショナルノックアウト原虫を樹立するため、Addgene 社より購入した mAID-HXGPRT カセット搭載プラスミド(#87258)の HXGPRT カセットを DHFRTSc3 遺伝子に置き換えたプラスミドを作出し、これを鋳型に PCR 産物として mAID-DHFRTSc3 カセットを増幅し、それぞれの遺伝子の C 末端に mAID が融合するよう設計した CRISPR/Cas9 プラスミドとともに導入した。ピリメタミンで選抜することで、コンディショナルノックアウト原虫を得た。現在これらをクローニング中であり、完了次第、オーキシシン誘導によりノックアウトができるかどうか検証していく。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>なし</p>