

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2023年5月31日

採択番号	2022-共同-4		
研究部門	創薬研究部門	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	2022年4月1日 ~ 2023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。潜伏感染の成立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、潜伏感染を制御する手法につながる。R3年度までにゲノム編集後の継代期間を最小限にして変異原虫の混合ポピュレーションを効率的に樹立する方法を確立し、NGSを用いたポピュレーション解析の感度を感染臓器中の原虫材料に適用可能なレベルまで向上させた。R4年度はマウス感染モデルにおける各感染時期、感染臓器ごとの変異原虫ポピュレーションを追跡し、原虫因子機能の時空間的な解析技術の構築を目指す。</p>		
研究経過の概要	<p><u>①NGSによるポピュレーション追跡手法の実践</u> 遺伝子変異を保有する原虫と野生型の原虫集団が潜伏感染期のマウス脳でどのように集団構成を変化させるかをR3年度に引き続き感染マウスの個体数を増やして実施した。感染期間に依存した変化より感染マウスごとの差が大きく、脳に到達する原虫集団は厳しいボトルネックを経験していることが判明し、ポピュレーション追跡を潜伏感染解析に用いる際の課題を明確にした。</p> <p><u>②NGSによるポピュレーション追跡手法の改良</u> 潜伏感染のみで機能する原虫因子について本手法での解析が不向きであることが①でしめされたことから、解析の焦点を急性期と潜伏期のいずれでも影響の出る因子 <i>myr1</i>へ変更した。また、既存のKO株に適用可能とするため、病原性に影響のない <i>uprt</i> 遺伝子にバーコードを埋め込み、感染マウス個体内で詳細な原虫動態を追跡可能とした。</p>		

<p>研究成果の概要</p>	<p>① <u>NGSによるポピュレーション追跡手法の実践</u></p> <p>急性感染期におけるポピュレーション追跡 親株と TgGP 変異原虫を混合して感染させたマウスから回収した臓器(心、肝、肺、腎)で PCR により変異アリルを増幅し、上記 2 株の割合の増減を観察した。本実験では潜伏感染を成立させるために原虫投与量を少なく設定している。そのため急性期における臓器中の原虫数も少なく、PCR のバイアスは避けられないものの、各臓器から抽出した DNA では上記 2 株の割合は同程度に検出されたため、急性感染期において本遺伝子の変異が影響ないという従来の報告と一致する結果を得た。</p> <p>潜伏感染期におけるポピュレーション追跡 R3 年度に実施していた潜伏感染期における 2 株の割合変動について、マウス個体数を増やして解析した。感染マウス個体ごとのばらつきは再現性がとれ、潜伏感染を成立させた原虫には強いボトルネック効果がかかっていることが改めて確認された。この傾向は 2022 年に Child 等のグループから報告された 96 種類のバーコードを付けた野生株原虫の <i>in vivo</i> での動態解析における潜伏感染移行の際のボトルネック効果と一致しており、ポピュレーション追跡手法を潜伏感染の評価に用いるために解決すべき課題であることが示唆された。</p> <p>② <u>NGSによるポピュレーション追跡手法の改良</u></p> <p>解析の焦点を潜伏期においてシスト形成が全くない、かつ、急性期での宿主体内増殖にも影響が見られる遺伝子にシフトし、急性期のどの段階で影響があり結果的に潜伏感染に至らないのかを解析する手法の開発を目指した。</p> <p>モデル遺伝子として IFN-gamma による抗原虫効果を阻止するエフェクター群の分泌を司る <i>myr1</i> 遺伝子を選択した。<i>myr1</i> の KO および HA タグ付き <i>myr1</i> で相補した株を作成した。KO 株と相補株を混合したポピュレーションを詳細に追跡可能とするため、R3 年度に構築した迅速バーコード技術を用いて、<i>in vivo</i> での増殖に影響がない <i>uprt</i> 遺伝子座にそれぞれの細胞を識別するための 10 塩基のインデックスを挿入した。導入されたインデックスの多様性は、すべての実験群において 10^6 程度の原虫に対して 5000 を超えており、<i>in vivo</i> において混合集団内のポピュレーション変動を超並列に実施可能となる。今後はこの技術でバーコードを付けた原虫集団を混合してマウスに感染させ、急性感染期から脳に到達して潜伏感染を成立させる段階のどこで <i>myr1</i> ノックアウト原虫の割合が変動するかを解析していく。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>特記事項なし</p>