

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2024年6月7日

採択番号	2023-共同-16		
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	麻田 正仁
研究課題名	ウシバベシア原虫赤内期必須遺伝子の同定に向けた 次世代型 CRISPR スクリーニング基盤の構築		
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・特任研究員 (現:酪農学園大学獣医学類医動物学ユニット)	
研究分担者			
	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	2023年4月1日 ~ 2024年3月31日		
目的・趣旨	<p><i>Babesia bovis</i> はウシ赤血球内に寄生する原虫であり、感染宿主に発熱、貧血、血色素尿といった症状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。バベシア原虫は全長 8.2Mbp からなる 4 つの染色体に約 3700 個のタンパク質をコードしているが、有用な薬剤やワクチン標的候補抗原の網羅的な探索は未だなされていない。この問題を解決するために感染宿主へ病原性を示す赤内期における原虫の遺伝子必須性を明らかにするハイスループット(HiT)スクリーニングシステムが必要であると考えた。申請者はバベシア原虫と同様に赤血球へ寄生するネズミマラリア原虫において HiT-CRISPR スクリーニング系の開発に成功している。本共同研究では、この手法をバベシア原虫へと応用することで次世代型 CRISPR スクリーニング基盤の開発を目的とする。</p>		
研究経過の概要	<p>HiT-CRISPR スクリーニングに用いるプラスミドのサイズを小さくして遺伝子効率の向上及び、プラスミドクローニングの簡便化を目的として Cas9 発現バベシア原虫の作製を試みた。</p> <p>また、遺伝子組換えに必要な最小相同配列鎖の長さ、及び最少必要プラスミド量についても検討した。</p>		

<p>研究成果の 概 要</p>	<p>Cas9 発現原虫作製に必要なプラズミドの構築及び Cas9 発現カセットを挿入する原虫遺伝子領域に関して決定した。当該プラズミドは作製済みであり、2024 年度に遺伝子組換え原虫の作出を原虫病研究センターと酪農学園大学それぞれで実施する予定である。</p> <p>遺伝子組換えに必要な最小相同配列鎖の長さ及び最少必要プラズミド量の検討実験に使用するプラズミドも作製済みである。5 μg のプラズミド量を用いて実施した組換え実験では、遺伝子組換え原虫を得ることができなかった。この結果は申請者がネズミマラリア原虫を用いて得た結果とは異なっており、その原因として使用する機器の違いが推測された。そこでネズミマラリア原虫の遺伝子組換えに使用した Nucleo fector 4D を用いたバベシア原虫の遺伝子導入プロトコルの最適化を 2024 年度に実施する。当該機器は既に購入済みであり、現在はバベシア原虫の移管手続きを行っている段階である。移管後に条件の最適化実験を速やかに実施した後に、2023 年度に作製したプラズミドを用いて最小相同配列鎖と最少必要プラズミド量の最適化実験を進める。</p> <p>また、ネズミマラリア原虫の HiT-CRISPR スクリーニングに関する研究成果は bioRxiv へ投稿し、現在査読を受けている。</p>
<p>研究成果の 発 表</p>	<p><プレプリント></p> <p>1. T.K. Jonsdottir, M.S. Paoletta, <u>T. Ishizaki</u>, S. Hernandez, M. Ivanova, A.H. Curbelo, P.A. Saiki, M. Selinger, D. Das, J. Henriksson, E.S.C. Bushell. A scalable CRISPR-Cas9 gene editing system facilitates CRISPR screens in the malaria parasite <i>Plasmodium berghei</i>. bioRxiv, 2024.</p>