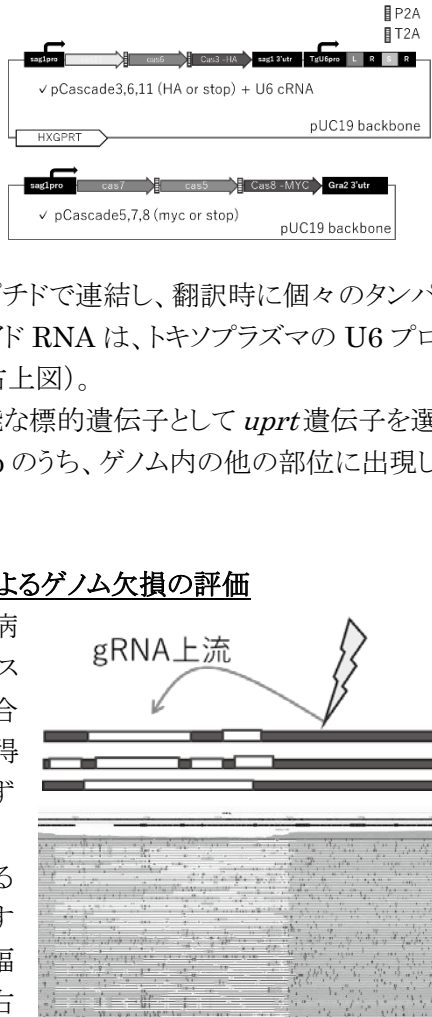


帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2025 年 5 月 28 日

採択番号	2024 共同-8		
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	新規ゲノム編集 CRISPR/Cas3 系によるトキソプラズマの ゲノム"ごそつ"欠損方法の開発		
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 国際協力教育部門・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	2024 年 4 月 1 日 ～ 2025 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	CRISPR/Cas3 を用いたゲノム編集技術は、①標的配列を決定するガイド RNA が長く、特異性を確保しやすいこと、②gRNA 配列の 5'側において最大約 100 kb にわたる広範なゲノム領域を欠損させることが可能である、という特徴を有する。本技術は、2019 年に哺乳類細胞においてその再構築およびゲノム編集への応用が報告された新しいタイプのゲノム編集技術であり、これまでに原虫への導入例は報告されていない。 本研究の目的は、この新規ゲノム編集技術である CRISPR/Cas3 をトキソプラズマに導入し、原虫において本技術が導入された際に、どのような割合・長さのゲノム欠損が生じるのかという基礎的知見を蓄積することである。これらの知見は、将来的に病原性因子を広範に欠損させた「最弱トキソプラズマ」の創出に向けて、大規模なゲノム欠失を誘導するための基盤技術の確立に貢献すると期待される。		
研究経過の概要	<u>(1)CRISPR/Cas3 システム発現原虫の作出</u> ヒト細胞で再構成された CRISPR/Cas3 システム (PMID: 31811138) をトキソプラズマに導入するため、トキソプラズマ特異的な遺伝子発現制御配列に置換したプラスミドを新たに構築した。また、モデル遺伝子として選定した <i>uprt</i> 遺伝子領域を標的とするガイド RNA についても、設計を完了した。 <u>(2)モデル遺伝子座を利用した、CRISPR/Cas3 が引き起こすゲノム欠損の評価</u> 導入された CRISPR/Cas3 コンプレックスが原虫内でどのようなゲノム欠損を誘導できるかを評価するため、ネガティブセレクションが可能なモデル遺伝子座として <i>uprt</i> 遺伝子座を用いた。原虫病研究センターから分与を受けた RH 株において、Cas3 複合体および対応する guide RNA を発現させ、標的位置におけるゲノム欠損を解析した。その結果、他生物での報告と同様に、gRNA 標的部位の近傍から上流方向に数百～数千 bp		

	の範囲でゲノム欠損が生じていることが確認された。これにより、トキソプラズマにおいても CRISPR/Cas3 を用いたゲノム編集が有効に機能することが実証された。
研究成果の概要	(1) CRISPR/Cas3 システム発現原虫の作出 Cas3 発現プラスミド (Addgene #134920) および Cas5, 6, 7, 8, 11 を同時に発現するプラスミド (Addgene #134919) から、それぞれの複合体構成タンパク質の CDS を抽出し、トキソプラズマの <i>sag1</i> プロモーターで発現するプラスミドを構築した。構成要素が多いため、Cas11, 6, 3 および Cas7, 5, 8 をそれぞれ P2A, T2A のスキップペプチドで連結し、翻訳時に個々のタンパク質として切り出されるよう設計した。Cas3 用のガイド RNA は、トキソプラズマの U6 プロモーターにより発現されるように組み込んだ (添付右上図)。 また、FUDR によるネガティブセレクションが可能な標的遺伝子として <i>uprt</i> 遺伝子を選定し、Cas3 の PAM 配列である AAG に続く 32 bp のうち、ゲノム内の他の部位に出現しない配列をガイド RNA として選定した。 (2) モデル遺伝子座を利用した CRISPR/Cas3 によるゲノム欠損の評価 遺伝子導入効率が高い RH 株について、原虫病研究センターから分与を受けた。上記の Cas3 システムを電気穿孔法により導入した。全ての Cas3 複合体を導入した原虫では FUDR 耐性を示す個体が得られた。一方、Cas11, 6, 3 または Cas7, 5, 8 のいずれかを欠く実験群では耐性原虫は得られなかった。得られた耐性原虫は、さまざまな欠損領域を有する原虫の集団である。欠損の程度を網羅的に評価するため、標的ゲノム領域の周辺 6 kb を PCR で増幅し、長断片 NGS により欠損領域の特定を行った (右挿入図に代表例を示す。欠損領域は白抜きで表示した)。複数回の独立に実施した遺伝子導入実験からは標的位置から約 200 bp 離れた上流側から、最小 62bp 最大 3kbp の欠損が最大で同時に3回まで導入されていることがわかった。 このような多様性に富む欠損の存在は、CRISPR/Cas3 システムが偏りなく広範なゲノム欠損を引き起こせることを示している。一方で、一回の遺伝子導入試験から得られた欠損パターンは多くても数種類に限られており、10^6 個の原虫に対する遺伝子導入による結果としては非常に少数であることから、限られた原虫のみでゲノム欠損が生じていたことを意味する。そのため、実用的な技術とするにはゲノム編集効率の向上が今後の課題として残されている。  The figure contains two schematic diagrams and a gel image. The top diagram shows a construct with a <i>sag1</i> promoter, a Cas3 gene, a P2A linker, a T2A linker, and a U6 promoter driving a guide RNA. The bottom diagram shows a similar construct but with Cas5, 6, 7, 8, and 11 genes instead of Cas3. The gel image shows a DNA ladder and several lanes with bands of varying lengths, representing genomic deletions. An arrow labeled 'gRNA上流' (upstream of gRNA) points to a specific region on the gel.
研究成果の発表	該当なし