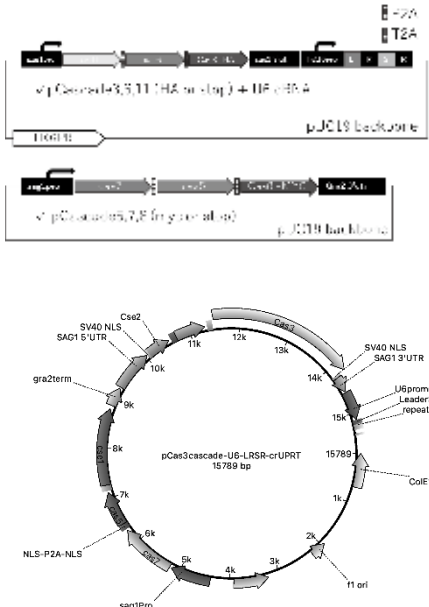


帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2026 年 5 月 26 日

採択番号	2025 共同-23		
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"ごそつと"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	2025 年 4 月 1 日 ～ 2026 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	トキソプラズマは人体、家畜において病状を引き起こす重要な病原原虫である。病原性の発露においては、原虫の様々な病原性因子が働く一方で、既知の病原性因子の多くは培養条件では必須ではない。すなわち、培養に必須でない遺伝子を次々に欠損していくことで高度に弱毒化された原虫の作出が可能である。病原性因子(および培養に必須でない遺伝子)はゲノム全体にちらばっており、時には非必須遺伝子の島を形成している。このような島を、一挙にまとめて欠損させることができれば、培養に不要な病原性領域を欠失した原虫を効率よく作出することが可能となる。 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、特異性が確保しやすい、②標的位置の PAM 上流側において最大 100 kb 程度までの領域を欠損させることができる、という特徴を有する。本技術は哺乳類細胞での再構築およびゲノム編集利用が 2019 年に報告された新しいゲノム編集技術であり、原虫において導入された報告はこれまでにない。 本研究では、新しいゲノム編集技術である CRISPR/Cas3 をトキソプラズマに導入することを目的とする。また、本技術が原虫で導入された場合に、どの程度の割合・長さのゲノム欠損を誘導できるのかについて基礎的知見を蓄積する。さらに、「培養条件で不要なゲノム領域」について、Cas3 による一括欠損を試み、その応用可能性を検証する。		
研究経過の概要	R6 年度中に、Cas3 ゲノム編集に必要な構成因子を 2 つのプラスミドに分けてトキソプラズマにおいて発現させるシステムの構築を完了した。R7 年度は、すべての Cascade 複合体の発現カセットを単一プラスミド上に搭載した発現ベクターを新たに構築するとともに、遺伝子導入効率が高い RH 株をモデル株として用いることで、ゲノム編集効率を大幅に向上させた。実証試験では、ネガティブセレクションが可能な UPRT 領域をモデル領域として選択した。 具体的には、2 つの分割プラスミドシステムにおいて、ランダムな 1 kbp を超える欠損が誘導されることを確認したものの、10^6 個規模で遺伝子導入された原虫集団において観察された欠損イベントは、数クローン由来の限られたものとどまっていた。一方、すべての構成要素を単一プラスミド上に搭載した発現ベクターでは、プラスミド保有原虫を選択的		

	に濃縮することで、ゲノム編集を受けた原虫集団を 20–80%まで濃縮可能となった。 さらに、培養条件下で非必須遺伝子とされる SAG1 およびマルチコピー遺伝子である ROP5 群のゲノム領域について、Cas3 によるゲノム欠損を試み、その欠損様式について解析を進めている。
研究成果の概要	(1) CRISPR/Cas3 システム発現原虫の改良 R6 年度に構築した、2 つのプラスミドに 3 個ずつの Cascade 構成タンパク質を発現させるシステム（右図上段）を改良し、すべての構成要素を単一プラスミド上に搭載した発現ベクター（Cas3 All in one plasmid）を構築した（右図下段）。 この改変により、プラスミドが搭載する薬剤選択マーカーHXGPRT を利用して組換え原虫を選択することで、目的ゲノム領域に欠損を有する原虫を効率よく濃縮できるようになった。 UPRT ネガティブセレクションマーカー領域を標的とした試験では、HXGPRTを保有するMPA/XA 耐性原虫のうち、およそ 20–80%の原虫において FUDR 耐性原虫の出現を認めた（3 回の独立試行で検証）。 Cas9 を用いた場合には、ほぼ 100%の原虫でゲノム編集が成立することと比較すると編集効率は低い。しかしながら、標的遺伝子領域外の選択圧（プラスミド上の HXGPRT マーカーによる選択）のみで、標的ゲノム領域への欠損導入を十分な効率で達成可能である。 (2) in vitro 培養に非必須であるゲノム領域欠損の試み 上記システムでは、標的ゲノム領域の欠損導入がプラスミド側の選択マーカーのみで達成可能である。すなわち、標的ゲノム領域の性質にかかわらず、ゲノム編集原虫を濃縮できる可能性を示している。 そこで、培養条件下で非必須とされるモデル遺伝子として、SAG1 および ROP5 多重遺伝子島の 2 領域を選択し、guide RNA の設計およびそれを組み込んだ Cas3 All in one plasmidの構築を行った。これらのコンストラクトを導入した原虫について、プラスミドが搭載する HXGPRT マーカーを用いて薬剤選択を実施し、得られた耐性原虫ゲノムの解析を進めている。 その結果、薬剤選択後に長期間培養を行うと、ゲノム欠損を有する原虫の割合が減少することが明らかとなった。この結果は、ゲノム欠損そのもの、あるいは Cas3 コンプレックスの発現自体が原虫に対して負の選択圧となっている可能性を示唆している。そのため、ゲノム編集原虫を効率よく回収するための最適な培養期間および回収タイミングを決定することが、今後の課題として抽出された。 
研究成果の発表	国際学会 [1] Tatsuki SUGI, Kyoko HAYASHIDA, Junya YAMAGISHI, Yoshifumi NISHIKAWA Application of a CRISPR/Cas3 System for Kilobase-Scale Genomic Deletion in <i>Toxoplasma gondii</i>. Molecular Parasitology Meeting XXXVI, Sep 16, 2025(Poster)