

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K15141

研究課題名（和文）シャーガス病の創薬標的探索に資する遺伝子改変手法の開発

研究課題名（英文）Development of gene modification method that contributes to drug target search for Chagas Disease

研究代表者

高木 悠友子（Takagi, Yuko）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：50783669

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：シャーガス病の原因となる寄生原虫Trypanosoma cruziに対する創薬標的を探索するためには、原虫の増殖に必須な標的遺伝子を特定することが重要である。しかし、宿主細胞内に寄生する感染ステージの原虫では、宿主細胞の存在が障壁となって内部の原虫に直接核酸を導入できないため、創薬研究に重要なこのステージにおいて標的遺伝子の必須性を判定するのが難しいという課題があった。そこで、任意のタイミングでゲノム編集を発動するOn/Offシステムの導入や、細胞内増殖ステージの原虫を宿主外で一定期間培養を可能にすることにより、原虫の全ての生活環において遺伝子ノックアウトの表現型確認をすることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

長らく偏性細胞内寄生体だと信じられてきた宿主内増殖ステージの原虫を、一定期間とはいえ宿主外で培養することは全く新規の手法であり、これを可能にした学術的な意義は大きい。また、その宿主外培養期間中に核酸導入や薬物耐性試験を行うことを可能にしたことにより、創薬研究で一番重要な感染ステージの原虫において標的遺伝子の必須性確認や化合物アッセイができるようになった社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：In order to search for drug targets against Trypanosoma cruzi, the parasitic protozoan that causes Chagas disease, it is important to identify target genes that are essential for the growth of the parasite. However, in the infection stage of T. cruzi, the presence of host cells acts as a barrier and prevents direct introduction of nucleic acids into the intracellular parasite, making it difficult to determine the essentiality of target genes in this stage, which is vital for the drug discovery research.

By incorporating an On/Off system that triggers genome editing at any given time, and by allowing intracellular proliferation stage of parasite to be cultured outside the host for a certain period of time, we made it possible to confirm the gene knockout phenotype in all stages of the parasite life cycle.

研究分野：分子生物学

キーワード：感染症 原虫 創薬標的 ゲノム編集 微生物 培養 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) シャーガス病に対する創薬標的探索の必要性

シャーガス病は、寄生原虫の *Trypanosoma cruzi* を昆虫ベクターが媒介することによりヒトに感染する熱帯病である。罹患者の 4 人に 1 人はその後数年から数十年にわたる潜伏期間を経て慢性期症状を発症し、心臓合併症などにより突然死に至る。これにより中南米では年間 12,000 人が死亡している (Rassi et al. 2010)。治療法としては 2 種類の薬剤が知られているが、いずれも数ヶ月の投与期間を要し、4 割の患者で強い副作用が発生する。しかも慢性期の患者では完治するケースは 2 割に留まる (Apt. 2010)。このため新薬の開発が急務であり、創薬標的となる原虫の必須遺伝子を複数特定することが求められている。

(2) 必須遺伝子の特定における課題

CRISPR/Cas9 システムの導入により、*Trypanosoma cruzi* でもノックアウト実験が簡便に行えるようになってきた。しかし、この原虫においてはエレクトロポレーションが唯一の核酸導入方法であるため課題もある。

まず、gRNA をエレクトロポレーションで導入して致死性のノックアウトが発動した後、大量かつ良質なサンプルを採取することが難しい点である。必須遺伝子をノックアウトされた原虫は増殖せず、数日以内に奇形となりやがて死ぬ。分子生物学的な解析を行える量のサンプルを準備するには多数のキュベットで処理した原虫をプールして回収する必要があり、コストも高く煩雑である。

次に、エレクトロポレーションは昆虫ステージの原虫でしか行えず、哺乳類宿主細胞内で増殖中の原虫には直接核酸の導入ができない点である。創薬標的となる遺伝子は宿主感染時の原虫において必須でなければならないが、昆虫ステージのノックアウトで致死となった原虫は感染形態に分化させることができないため、臨床的に意味のある宿主細胞内での標的必須性を検証できなかった。

2. 研究の目的

現行のノックアウト手法における上記の課題を解決し、シャーガス病の創薬標的となる *Trypanosoma cruzi* の必須遺伝子を宿主内増殖ステージにおいて特定するための新たなノックアウト手法を開発する。

3. 研究の方法

ノックアウト後に回収する原虫サンプルのスケールアップと、宿主内増殖ステージでの時間特異的ノックアウトを両立するための手法として、任意のタイミングで CRISPR/Cas9 を発動できるテトラサイクリン On/Off システムを導入する。

4. 研究成果

(1) CRISPR/Cas9 の On/Off 制御

T7 RNA polymerase と Tet repressor を安定的に発現する原虫株を作製し、Cas9 酵素と gRNA を T7 promoter ならびに Tet operator 下に配置したプラズミドを導入した。これにより、テトラサイクリン添加時にのみ CRISPR/Cas9 が誘導されるシステムを構築した。図 1 は Cas9 酵素に融合された GFP のシグナルがテトラサイクリン添加によって発現することを示した結果である。

実際の原虫遺伝子を標的とした実験では、テトラサイクリン添加後の原虫は奇形を呈し、Cas9 酵素と gRNA の発現によりノックアウトが発動したことが示唆された。

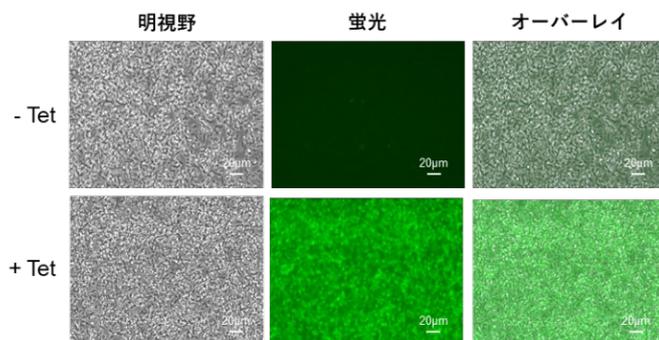


図1. Tet 誘導により CRISPR/Cas9 が発動する原虫株の顕微鏡画像

(2) 感染ステージ原虫への核酸直接導入

研究開始当初に予定していたアプローチではないが、宿主細胞内でしか増殖できないとされてきた感染ステージの原虫を、一定期間であれば宿主外で純粋培養できる条件を見出した (図2)。これにより、宿主外培養中にエレクトロポレーションによる核酸導入を行い、標的遺伝子ノックアウトの表現型を確認できるようになった (図3)。ノックアウト後の原虫は、宿主細胞に再感染させて、宿主内増殖のモニタリングやその後の分化を観察することも可能である。

この手法の開発により、*Trypanosoma*

cruzi の全ての生活環において遺伝子ノックアウトが可能になった。創薬研究において重要な感染ステージの原虫において、創薬標的の必須性を確認できるようになった意義は大きい。

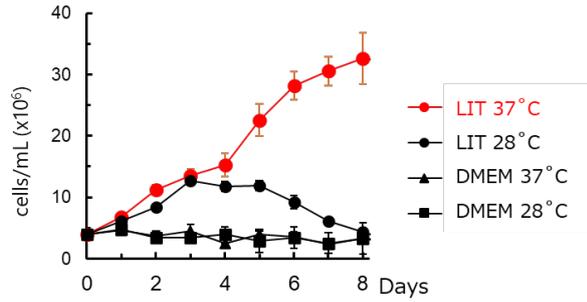


図2. 宿主内増殖ステージの原虫を宿主外で培養する条件の検討

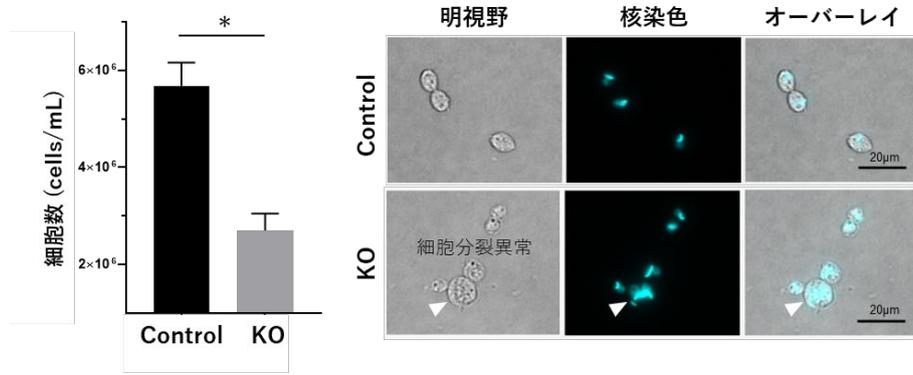


図3. 宿主外培養による感染ステージ原虫の遺伝子ノックアウトの例

<引用文献>

Chagas disease. Anis Rassi Jr, Anis Rassi, José Antonio Marin-Neto. *Lancet*. 2010 Apr 17;375(9723):1388-402.

Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. Werner Apt. *Drug Des Devel Ther*. 2010 Sep 24;4:243-53.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takagi Yuko, Sato Mari, Naya Masami, Sato Chikara	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Differentiating Trypanosoma cruzi in a Host Mammalian Cell Imaged in Aqueous Liquid by Atmospheric Scanning Electron Microscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 e01413-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/spectrum.01413-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takagi Yuko, Kuwabara Naoyuki, Dang Truong Tat, Furukawa Koji, Ho C. Kiong	4. 巻 295
2. 論文標題 Crystal structures of the RNA triphosphatase from Trypanosoma cruzi provide insights into how it recognizes the 5'-end of the RNA substrate	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 9076 ~ 9086
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA119.011811	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Akutsu Yukie, Doi Motomichi, Furukawa Koji, Takagi Yuko	4. 巻 149
2. 論文標題 Introducing a Gene Knockout Directly Into the Amastigote Stage of Trypanosoma cruzi Using the CRISPR/Cas9 System	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/59962	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takagi Yuko, Akutsu Yukie, Doi Motomichi, Furukawa Koji	4. 巻 13
2. 論文標題 Utilization of proliferable extracellular amastigotes for transient gene expression, drug sensitivity assay, and CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in Trypanosoma cruzi	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS Neglected Tropical Diseases	6. 最初と最後の頁 e7088 ~ e7088
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pntd.0007088	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takagi Yuko, Nosato Hirokazu, Doi Motomichi, Furukawa Koji, Sakanashi Hidenori	4. 巻 66
2. 論文標題 Development of a motion-based cell-counting system for Trypanosoma parasite using a pattern recognition approach	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BioTechniques	6. 最初と最後の頁 179 ~ 185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2144/btn-2018-0163	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計10件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 高木悠友子、佐藤真理、納谷昌実、佐藤 主税
2. 発表標題 大気圧走査型電子顕微鏡を使用したTrypanosoma cruziの溶液中観察
3. 学会等名 第91回 日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高木 悠友子、大田 悠里、森田 雅宗、野田 尚宏
2. 発表標題 Water-in-oilドロップレットを用いたTrypanosoma cruziの新規増殖評価手法
3. 学会等名 日本寄生虫学会 日本臨床寄生虫学会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Anna Ignatochkina, Yuko Takagi, Kiong Ho
2. 発表標題 Development of a Tet-inducible CRISPR-Cas9 system to elucidate the role of cap 4 methylation in Trypanosoma cruzi
3. 学会等名 日本寄生虫学会 日本臨床寄生虫学会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Anna Ignatochkina, Yuko Takagi, Kiong Ho
2. 発表標題 Characterization of Trypanosome cap-dependent RNA methyltransferase
3. 学会等名 第22回 日本RNA学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高木悠友子、Kiong Ho
2. 発表標題 Trypanosoma cruziの成長を阻害する低分子化合物の特定
3. 学会等名 第89回 日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuko Takagi, Yukie Akutsu, Motomichi Doi, Koji Furukawa
2. 発表標題 Potential usage of extracellular amastigotes of Trypanosoma cruzi as a temporal axenic culture for transient gene expression, drug sensitivity assay, and CRISPR/Cas9-mediated gene knockout
3. 学会等名 Kinetoplastid Molecular Cell Biology Meeting VIII (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kiong Ho, 高木 悠友子, 桑原 直之, Dang Truong, 古川 功治, 阪下 日登志
2. 発表標題 トリパノソームRNA triphosphataseの結晶構造解析による三リン酸ならびに核酸認識機構の解明
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高木 悠友子、桑原 直之、Truong Dang、古川 功治、阪下 日登志、Kiong Ho
2. 発表標題 トリパノソムmRNAキャッピング酵素の結晶構造と機能解析
3. 学会等名 第88回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坪 ゆき枝、戸井 基道、古川 功治、高木 悠友子
2. 発表標題 Trypanosoma cruzi宿主外アマスティゴートにおけるCRISPR/Cas9を利用した遺伝子ノックアウト
3. 学会等名 第88回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高木 悠友子、桑原 直之、Truong Dang、古川 功治、阪下 日登志、Kiong Ho
2. 発表標題 Structural and functional analysis of protozoan mRNA capping enzyme
3. 学会等名 第20回日本RNA学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------