

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)	氏名	中 出 翔 太
学位授与の要件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目			
<p style="text-align: center;">Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells using TALENs and CRISPR/Cas9</p> <p style="text-align: center;">(細胞における TALEN や CRISPR/Cas9 を用いたドナー DNA のマイクロホモロジー媒介末端結合依存的な挿入)</p>			
論文審査担当者			
主 査	教 授	山 本	卓
審査委員	教 授	井 出	博
審査委員	教 授	坂 本	敦
審査委員	教 授	小 原	政 信
〔論文審査の要旨〕			
<p>ゲノム編集法は、人工 DNA 切断酵素を用いて細胞内で DNA 二本鎖切断(DSB)を導入し、その修復過程で標的遺伝子の破壊(遺伝子ノックアウト)や外来遺伝子の挿入(遺伝子ノックイン)を行う方法である。このうちゲノム編集法による遺伝子ノックインでは、姉妹染色分体を鋳型とする相同組換え(HR)を利用した正確な遺伝子挿入が可能である。しかしながら、HR の活性は細胞種や細胞周期に依存するため、遺伝子ノックインは限られた細胞種において利用可能な方法である。また HR においては、挿入する遺伝子の両側に 1 kb 以上の相同配列を必要とするため、ドナーベクターの構築に時間と労力を要する。そこで本論文の著者は、DSB の修復経路としてマイクロホモロジー媒介末端結合(MMEJ)を利用した簡便かつ高効率な遺伝子ノックイン方法(PITCh 法)の開発を試みた。</p> <p>MMEJ は、DSB 末端の近傍に存在する 5-25 bp の短いマイクロホモロジー配列を利用する DNA 修復経路である。HR による修復が細胞周期の S/G2 期に限定されるのに対して、MMEJ による修復は全での細胞周期で生じると考えられている。筆者は、まず人工 DNA 切断酵素 TALEN によって標的遺伝子座とドナーベクターの両方に DSB を導入し、生じたマイクロホモロジー配列が正確に連結する方法(TAL-PITCh 法)の開発を行った。まず fibrillarin 遺伝子(<i>FBL</i>)を切断する人工 DNA 切断酵素の TALEN を作製し、<i>FBL</i> の C 末端コード領域への緑色蛍光タンパク質 (mNeonGreen) 遺伝子と puromycin 耐性遺伝子の挿入を試みた。MMEJ によってドナーベクターが正しく挿入されると、<i>FBL</i> の内在プロモーターによって mNeonGreen が発現し、緑色蛍光が核小体に局在するとともに、puromycin 耐性を獲得すると予想される。作製した TALEN 発現ベクターとドナーベクターを HEK293T 細胞に共導入したところ、72 時間後に核小体に緑色蛍光が観察され、7 日間の薬剤選抜とシングルセルクローニングによってノックイン細胞クローンが得られた。クローンのゲノム DNA からノックイン配列の連結部を genomic PCR によって解析したところ、60%のクローンで連結部が正しく増幅され、シーケンス解析によってすべてのクローンにおいて MMEJ による正確な連結が起こっていることがわかった。サザンブロット</p>			

解析によって標的遺伝子座へノックインされている遺伝子のコピー数を調べたところ、1コピーの遺伝子が正確に挿入され、他の遺伝子座へのランダムな挿入は生じていないことが明らかになった。また、異なる遺伝子座 β -Actin 遺伝子座においても TAL-PTCh 法での正確な遺伝子ノックインが可能であることが確認された。さらに、HR を利用した従来の方法と比較したところ、MMEJ を利用した方法では 2.5 倍のコロニーが観察された。これらの結果から、TAL-PITCh 法は高効率かつ正確な遺伝子ノックイン法であることが示された。

次に筆者は、近年利用が広がっている人工 DNA 切断酵素の CRISPR/Cas9 を用いて MMEJ を介した遺伝子ノックイン法 (CRIS-PITCh 法) の確立を試みた。CRISPR/Cas9 は guide RNA (gRNA) によって標的配列を認識するため、同時に複数の標的を切断できる。そのため、CRIS-PITCh 用ドナーベクターでは、挿入遺伝子の両端にゲノム中の標的配列と 10 bp 程度のマイクロホモロジー配列を付加し、標的配列と挿入遺伝子の両側を 3 種類の gRNA で切断することによって、ドナーベクターの余分な配列を除いた発現カセットを *FBL* の C 末端に挿入する方法を検討した。*FBL* とドナーベクターを切断するための CRISPR/Cas9 発現ベクターと蛍光遺伝子を挿入するためのドナーベクターを HEK293T 細胞に導入し 3 日間培養したところ、緑色蛍光が核小体に観察された。シーケンス解析によって連結部分の塩基配列を確認したところ、5'側の連結部は 40% のクローンで正確な挿入が観察され、3'側の連結部については全てのクローンに欠失や挿入が見られた。そこで、連結部分の正確性を向上させる目的で、筆者は DSB 末端より内側のマイクロホモロジー配列を介した MMEJ (Distal-MMEJ) に注目し、Distal-MMEJ を利用した改良型 CRIS-PITCh 法を検討した。CRISPR/Cas9 ベクターと Distal-MMEJ 用ドナーベクターを HEK293T 細胞に導入し、核小体に蛍光を発する細胞でのノックインの連結部の塩基配列の解析を行った。その結果、約 80% の細胞において正確に連結されていることがわかった。これらの結果から、Distal-MMEJ を利用した改良型 CRIS-PITCh 法より正確な遺伝子ノックインが可能であることが示された。

最後に、筆者は MMEJ を利用して作製した遺伝子ノックイン細胞において、人工 DNA 切断酵素の標的配列以外への変異導入 (オフターゲット変異導入) について解析した。解析プログラム PROGNOS を用いて TALEN によるオフターゲット配列を検索し、上位 6 候補についてシーケンス解析を行った。また、CRISPR デザインツールを用いて CRISPR/Cas9 のオフターゲット配列を検索し、上位第 3 候補についてシーケンス解析を行った。これら解析の結果、本実験で利用した TALEN および gRNA についてはオフターゲット変異導入は確認されなかった。

以上の結果から、TLEN および CRISPR/Cas9 を利用した PITCh 法は、培養細胞において高効率かつ安全な遺伝子ノックイン法であることが示された。本研究成果は、これまでの HR に依存した方法とは異なる MMEJ を利用した新規の遺伝子ノックイン法を確立した研究として高く評価される。

以上、審査の結果、本論文の著者は博士 (理学) の学位を授与される十分な資格があるものと認める。

公表論文

Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9.

Shota Nakade, Takuya Tsubota, Yuto Sakane, Satoshi Kume, Naoaki Sakamoto, Masanobu Obara, Takaaki Daimon, Hideki Sezutsu, Takashi Yamamoto, Tetsushi Sakuma and Ken-ichi T. Suzuki.

Nature Communications, 5, 5560 (2014)

Precise in-frame integration of exogenous DNA mediated by CRISPR/Cas9 system in zebrafish.

Yu Hisano, Tetsushi Sakuma, Shota Nakade, Rie Ohga, Satoshi Ota, Hitoshi Okamoto, Takashi Yamamoto and Atsuo Kawahara.

Scientific Reports, 5, 8841 (2015)

MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR/Cas9 with the PITCh systems.

Tetsushi Sakuma, Shota Nakade, Yuto Sakane, Ken-Ichi T. Suzuki, Takashi Yamamoto.

Nature protocols, 11, 118-133 (2016)

参考論文

Homeolog-specific targeted mutagenesis in *Xenopus laevis* using TALENs.

Shota Nakade, Tetsushi Sakuma, Yuto Sakane, Yoshihiro Hara, Atsushi Kurabayashi, Keiko Kashiwagi, Akihiko Kashiwagi, Takashi Yamamoto and Masanobu Obara.

In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, 51, 879-884 (2015)