

## 論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 ( 理 学 )	氏名	國 井 厚 志
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 ①・② 項該当		
論文題目			
Development and optimization of CRISPR-Cas9-based artificial transcription activator systems ( CRISPR-Cas9 を基盤とする人工転写活性化システムの開発と最適化 )			
論文審査担当者			
主 査	准教授	佐久間 哲史	
審査委員	教 授	井出 博	
審査委員	教 授	坂本 敦	
審査委員	教 授	山本 卓	
審査委員	准教授	坂本 尚昭	
〔論文審査の要旨〕			
<p>代表的なゲノム編集ツールの一つである CRISPR-Cas9 システムは、配列特異的に DNA を認識して結合する性質を有することから、特定ゲノム領域のエピジェネティック修飾の改変や特定遺伝子の転写の調節など、遺伝子改変を目的とする本来の用途とは異なるさまざまな利用法にも汎用されている。これらの派生的手法は、ゲノム配列の書き換えを伴わないことから、遺伝子の機能調節を安全に実行できる技術として近年注目を浴びている。特に転写の活性化を誘導する人工転写活性化システムについては、がん治療や再生医療における利用価値が高く、盛んに技術開発が進められている。一方で、これまでに開発されてきた人工転写活性化システムでは必ずしも十分な活性化効果が得られない場合もあり、更なる技術改良が求められる状況にあった。そこで本論文の著者は、既存の人工転写活性化システムを階層的に組み合わせた独自の高活性型システムを構築すると共に、その構成要素を拡充し、さまざまな細胞種や遺伝子座で高い効果を得ることのできるシステム群を整備した。</p> <p>第一章では、従来型のシステムとして報告されている SAM および dCas9-SunTag を統合した独自のシステム「TREE」(Three-component Repurposed technology for Enhanced Expression) を開発し、機能性を解析した。TREE では、ヌクレアーゼ不活性化型 Cas9 である dCas9 に転写活性化ドメイン VP64 を融合した dCas9-VP64 を使用し、これと複合体を形成する sgRNA には RNA アプタマーの一種である MS2 配列を付与している。この MS2 配列に対して特異的に結合する MS2 コートタンパク質 (MCP) に、ポリペプチド性タグである SunTag を融合し、SunTag に結合する性質を有する scFv を連結した転写活性化ドメインを呼び込むことで、大量の転写活性化ドメインを局所的に集積させることを可能とした。TREE の機能性は、MIA-PaCa2 細胞における <i>CDH1</i> 遺伝子の活性化、および HEK293T 細胞における <i>RANKL</i> 遺伝子の活性化によって実証され、いずれの事例においても、従来システムと比べて有意に高い活性を呈することが示された。特に <i>CDH1</i> 遺伝子の活性化においては、当該遺伝子がコードするタンパク質である E-cadherin の発現増</p>			

強効果を、免疫染色およびウエスタンブロッティングにより解析した結果、TREEを導入した細胞群では、従来型システムであるSAMを導入した細胞群と比べておよそ30倍のタンパク質発現誘導効果が認められた。これらの実験結果より、従来型の人工転写活性化システムと比したTREEの優位性が立証された。

第二章では、TREEの構成要素であるRNAアプタマーとポリペプチド性タグを、それぞれ4種類（MS2、PP7、boxB、com）と3種類（SunTag、sfGFP11tag、MoonTag）に拡張すると共に、タグを介さずに転写活性化ドメインを直接各種アプタマーに呼び込む構造のシステムも構築し、一連のシステム群を「EARTH」（Effectors Accumulated by RNAs and Tags for High activity）コレクションと命名した。EARTHコレクションのシステム一式について、HEK293T細胞を用いて複数の遺伝子座（*RANKL*、*MMP9*、*CTCF*）で総当たりでの機能検証を行った結果、遺伝子座によって最適なシステムが異なることが示された。更に、同細胞株に加えてMCF-7細胞を用いて、各遺伝子座での転写活性化効果を従来型システムと比較検討した結果、全ての事例において、EARTHコレクションのシステム群のうち少なくとも一つが、従来型システムの効果を有意に上回ることが示された。またこのときの各細胞株・各遺伝子座における最適なシステムは一様ではなく、EARTHコレクションとして多様なシステム群を整備する意義も同時に示された。

以上の結果から、従来型の人工転写活性化システムを上回る活性を示す基盤的システムであるTREEを構築すると共に、そのラインナップを拡充したEARTHコレクションを整備することで、本論文の筆者は、最適な人工転写活性化システムを細胞株や遺伝子座に依存して選択できる包括的なプラットフォームを確立した。人工転写活性化システムは、ゲノムワイドスクリーニングなど遺伝子の機能解析にも応用されており、本研究において開発された技術を用いてその精度を向上させることにより、従来技術では見逃されていた遺伝子の発見にも繋がることを期待される。更に、TREEおよびEARTHコレクションは、集積させる因子を変更することで、転写の活性化のみならず転写の抑制、エピゲノム編集、塩基編集、ライブイメージングなどさまざまな用途に応用できる可能性を有し、また複数のシステムを同一細胞内で同時に作用させることも原理上可能であることから、ゲノム編集およびその派生的手法を複雑に組み合わせて運用するための技術基盤となると考えられる。

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

Three-component repurposed technology for enhanced expression: highly accumulable transcriptional activators via branched tag arrays.

Atsushi Kunii, Yoshihiro Hara, Mitsumasa Takenaga, Naoko Hattori, Takuya Fukazawa, Toshikazu Ushijima, Takashi Yamamoto and Tetsushi Sakuma.

The CRISPR Journal, 1(5)(2018)337–347.

参考論文

- (1) Biased genome editing using the local accumulation of DSB repair molecules system.

Shota Nakade, Keiji Mochida, Atsushi Kunii, Kazuki Nakamae, Tomomi Aida, Koichi Tanaka, Naoaki Sakamoto, Tetsushi Sakuma and Takashi Yamamoto.

Nature Communications, 9(1)(2018)3270.

- (2) Various strategies of effector accumulation to improve the efficiency of genome editing and derivative methodologies.

Atsushi Kunii, Takashi Yamamoto and Tetsushi Sakuma.

In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal, 56(2020)359–366.