

## 論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（理学）	氏名	松崎 周
学位授与の要件	学位規則第4条第1・②項該当		
論文題目 大規模遺伝子領域を標的とした多重化 CRISPR-Cas9 を用いたマイクロホモロジー媒介遺伝子置換に関する研究 (Study on microhomology-assisted gene replacement using multiplexed CRISPR-Cas9 targeting large gene region)			
論文審査担当者			
主査	教授	山本 卓	
審査委員	教授	坂本 敦	
審査委員	教授	坊農 秀雅	
審査委員	准教授	坂本 尚昭	
〔論文審査の要旨〕			
<p>本論文では、第一章において「マイクロホモロジーを介した大規模遺伝子置換システムの開発」、第二章において「LoAD システムを用いた REMOVER-PITCh による置換効率の向上」に関する研究成果を記載し、総括において大規模領域を標的とした本研究成果の重要性について述べている。</p> <p>第一章では、先天性代謝性疾患であるムコ多糖症の原因遺伝子である <i>GUSB</i> 遺伝子座および <i>ARSB</i> 遺伝子座を対象として、ヒト培養細胞における簡便かつ高効率な遺伝子ノックイン法である PITCh (Precise Integration into Target Chromosome)法を用いた大規模遺伝子置換法(REMOVER-PITCh)の開発とその有効性を検証した。<i>GUSB</i> 遺伝子座に対してイントロン上に 5 つ、<i>ARSB</i> 遺伝子座に 7 つのガイド RNA を設計し、これらのガイド RNA と Cas9 を発現する Multiplex CRISPR ベクターを構築した。このベクターを用いて HCT116 細胞株に共導入し、約 10 日間の薬剤選抜とシングルセルクローニングによりノックイン細胞のクローンを獲得した。単離したクローンのゲノム DNA を用いてゲノム PCR により標的カセット置換を確認したところ、約 20 kb の <i>GUSB</i> 遺伝子座を標的として 6.0%の効率でカセット置換を達成し、少なくとも片アレルにカセットを有する 4 クローンの樹立に成功した。一方、約 200 kb の <i>ARSB</i> 遺伝子座では、カセット置換クローンの樹立には至らなかった。これは、標的遺伝子領域が大きい場合、細胞にとって有害な DNA 二本鎖切断(DSB)を即座に修復するために、細胞周期のほとんどの段階で活性が高く、修復効率の高い NHEJ が MMEJ に比べて優位に生じていることが原因の 1 つであると考えられた。<i>GUSB</i> 遺伝子座および <i>ARSB</i> 遺伝子座にカセット連結部の増幅は認められたものの、目的のカセット置換アレルを有するクローンは得られなかった。特に標的領域サイズが大きい <i>ARSB</i> 遺伝子座では、切り出した遺伝子断片とドナーカセットが複雑に連結しており、不完全なノックインが生じていた。</p> <p>第二章では、MMEJ の修復効率を高めるために関連因子を集積し、REMOVER-PITCh による大規模遺伝子置換を試みた。LoAD (The local accumulation of DSB repair molecules)システムは、MS2-MCP 相互作用を利用した因子集積システムであり、ガイド RNA のステムループに付与した MS2 配列を介して DSB 周辺に MCP 融合修復因子を集</p>			

積することで修復効率を向上することができる。*GUSB* 遺伝子座では、28 クローン中 2 クローンでカセット置換を達成し、7.1%の置換効率でクローンの樹立に成功した。さらに、200 kb の領域を標的とした *ARSB* 遺伝子座においても、35 クローン中 3 クローンにおいてカセット置換を達成し、8.6%の置換効率でクローンの樹立に成功した。これは CtIP の集積により相同配列を介した修復に必要な DSB 末端の削り込みが促進されたことで、MMEJ が NHEJ より優位となり、カセット置換に繋がったと考えられる。さらに、樹立したクローンにおけるオフターゲット解析によって、全てのクローンでオフターゲット変異導入は検出されなかった。しかしながら、複数同時切断のリスクや切断断片の非特異的挿入の有無など詳細な解析が必要とされる。

本研究では、マイクロホモロジーを介した新規大規模遺伝子置換法として REMOVER-PITCh システムの開発した後、LoAD システムによる CtIP の集積を組み合わせることによって約 200 kb の領域へのカセット置換を達成した。今後、ゲノムワイドな安全性を確認できれば、哺乳類培養細胞における大規模遺伝子置換法として広く利用されることが期待される。

以上、審査の結果、本論文は統合生命科学研究科学学位論文評価基準を満たし、松崎氏は博士（理学）の学位を授与される十分な資格があるものと認められる。