

指 導 教 授 氏 名	指 導 役 割
印	全般的な指導
印	実験、研究方針、論文作成指導
印	

学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野：顎口腔再建外科学分野	身分 大学院生	氏名 近藤 星
<p>論 文 題 名：長鎖（約6 kb）lssODNおよびCRISPR/Cas9を用いたヒト科霊長類特異的lncRNAのマウス受精卵へのエレクトロポレーションによるノックイン</p>		
<p>論文内容の要旨（2000字程度）</p> <p>【緒言】</p> <p>近年, clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated proteins 9 (CRISPR/Cas9) などの遺伝子編集技術の急速な発展により, 遺伝子組み換え動物の効率的な生産が可能になった. ただし, 組換えおよび導入効率が低いため, 受精卵への標的遺伝子のノックイン (KI) は依然として困難である. そこで, 本研究では, 導入効率の問題に着目した. すべての KI の手法では, DNA 二本鎖切断を生成するために Cas9 タンパク質などの人工ヌクレアーゼに加えて, ドナーDNA を前核内部に送達する必要がある. しかし, 哺乳類の受精卵には透明帯 (ZP), 細胞膜, および核膜があり, これらが物理的な障壁となるため, ドナーDNA のサイズが大きいほど導入は困難になる.</p> <p>エレクトロポレーションは, 手技が簡単で費用が安く, 一度に遺伝子を導入できる受精卵の数が多いため, ゲノム編集に広く使用されている. しかし, エレクトロポレーションによる長鎖遺伝子の KI は, マイクロインジェクション法と比較して非常に困難とされてきた. 現在までに, 1.1 kb を超える長鎖遺伝子 KI はエレクトロポレーションでは報告されていない.</p> <p>本研究の目的は, 長鎖非コード RNA の一種である urothelial cancer-associated 1 (UCA1) を含む長い一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド (lssODN), Cas9 ヌクレアーゼ, および single guide RNA (sgRNA) を使用することにより, 大きな DNA 断片 (6 kb) をマウス受精卵へ, エレクトロポレーションによって KI にすることであった.</p> <p>【方法】</p> <p>マウス Rosa26 locus の上流, 下流それぞれ約1.5kbのアーム部分を付加した, 約6 kb の lssODN, Cas9 ヌクレアーゼ, sgRNA をエレクトロポレーションによりマウス受精卵へ導入し, 産仔を得た. 得られた産仔よりゲノム DNA を回収し, PCR, およびその塩基配列解析を行い, Rosa26 locus への lssODN の挿入の有無を検討した. さらに dual-labeled real-time PCR をもちいて, 1ゲノム中の挿入遺伝子量を比較した.</p>		

論文内容の要旨（2000字程度）

産物を用いてさらにnested PCRを行なったところ、#22、#23では上流・下流アーム側ともに期待通りの断片が増幅された。#60では長い断片は確認されなかったが、Nested PCRではUCA1遺伝子の挿入が示唆された。KI領域の外側からアームとpcDNA 3.1の接合部までの領域を標的とするPCRを行なった結果、#22、#23、#60全てで目的の断片が増幅された。PCRにより全長lssODNのKIを確認した後、シーケンスによる解析を行なった。#22、#23、#60のPCR断片をクローニング後、遺伝子配列を解析した結果、上流・下流アーム側ともに、標的部位への断片の挿入が確認された。また、#22のダイレクトシーケンスからも、同様の結果を得た。

【考察】

ドナーDNAのサイズと導入電圧は、エレクトロポレーションによる長鎖遺伝子KIの制限要因であると考えられている。しかし今回、CRISPR/Cas9システムと約6 kb lssODNを使用して、エレクトロポレーションによりマウス受精卵に長鎖遺伝子をノックインすることができた。このため、約6 kb程度であれば、ドナーDNAのサイズや導入電圧などの条件は制限要因ではない。

さらに、導入後にKIの効率を高める工夫を行なった。受精卵における迅速な標的部位切断のために、Cas9 mRNAではなくCas9タンパク質を導入した。これにより、Cas9タンパク質が核内に移動しさえすれば、導入後すぐに標的部位を切断でき、標的部位切断後は速やかに分解されるため、オフターゲット変異が大幅に抑制される。また、ドナーDNAとしてdouble-stranded DNAではなく、相同性アームを備えたssODNまたはlssODNを使用することにより、KI効率の向上が報告されている。このため本研究では、lssODNの相同性アームを5'と3'の両側で1.5 kbに設計した。これは一般的に使用される数百から数十塩基よりも長い。これにより、HR中の特異性とKI効率が向上したと考えられる。ただし、この長鎖遺伝子KIが成功した理由は、さらなる分析が必要である。さらに、本研究における最適条件は、マウス以外の動物ではまだ決定されていない。

適切な導入方法を選択することは、受精卵への長鎖遺伝子KIを達成するために非常に重要である。エレクトロポレーションは、マイクロインジェクションよりも短い時間で遺伝子を多数の接合体に同時に導入でき、高価な機器や特別な技術スキルを必要としない。また、ウイルス送達システムよりも時間と労力がかからない。

本研究は、エレクトロポレーションにより長鎖遺伝子KIマウスを簡便かつ安価に生産できることを示した。これにより、より多くの研究者が特別な条件や機器なしでKI研究を実行でき、*in vivo*で標的遺伝子の機能を分析しやすくなると考えられる。