

氏名	近藤 星
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第6167号
学位授与の日付	令和2年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	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
論文審査委員	窪木 拓男 教授 池亀 美華 准教授 伊原木 聡一郎 准教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

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.

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.

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.

【方法】

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.

【結果】

PCMV-UCA1 発現カセットを含む領域を標的とする PCR により、38 匹中 3 匹の産仔（#22, #23, #60）に全長 1ssODN の挿入が示唆された。#22, #23, #60 について、標的部位に全長 1ssODN が正確に KI されているか確認するために、KI 領域外側から UCA1 内側の PCR を行い、その PCR 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 pcDNA3.1 の接合部までの領域を標的とする PCR を行った結果、#22, #23, #60 全てで目的の断片が増幅された。PCR により全長 1ssODN 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 1ssODN 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 1ssODN 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、1ssODN 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。

論文審査結果の要旨

【背景】受精卵への目的遺伝子のノックインは、組換えおよび導入効率が低いため、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、従来は困難とされてきた長鎖遺伝子（6 kb）のノックインを、エレクトロポレーションと長鎖一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（lssODN）を用いた新たな方法で試みた。

【材料と方法】長鎖非コード RNA の一種である urothelial cancer-associated 1（UCA1）発現カセットとその両端に約 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。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、目的遺伝子の挿入の有無を検討した。また dual-labeled real-time PCR により 1 ゲノム中の挿入遺伝子量を比較した。

【結果】PCR により、ノックインの可能性が高い産仔 3 匹（#22, #23, #60）を同定したのち、標的部位への全長 lssODN のノックイン確認のため、ノックイン領域外側から挿入遺伝子までの領域を含む PCR と、その産物を用いた nested PCR を、上・下流側で行った。その結果、#22, #23 では全ての領域で、#60 については一部を除きほぼ全ての領域で、目的の長さの断片が増幅された。また、dual-labeled real-time PCR において、#60 は最高値を示した。さらに、塩基配列解析により、3 匹全てで lssODN 内部の配列が確認された。以上から、#22, #23, #60 への全長 lssODN のノックインが成功したと考えられた。

【考察】本来マウスに存在するはずがないヒト科霊長類特異的 lncRNA である UCA1 の塩基配列がマウス産仔ゲノム DNA に確かに認められたこと、さらには全長 lssODN の両端のノックイン領域外側から挿入遺伝子までの領域を含む PCR により目的の長さの断片が増幅されたことから目的とされた挿入場所に全長 lssODN のノックインが成功したことは確実と思われる。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受精卵への長鎖遺伝子 KI の制限要因であると考えられているが、本研究の結果から、約 6 kb 程度であれば、サイズや導入電圧は制限要因ではないことが示された。さらに、Cas9 mRNA でなくタンパク質を導入したことにより、速やかな標的部位切断と切断後の Cas9 の分解が見込め、オフターゲット変異の大幅な抑制が可能になり、lssODN の相同性アームを 5' と 3' の両側で 1.5 kb に設計したことにより、HR 中の特異性とノックイン効率が向上したと考えられた。

本論文は、従来は困難とされてきたエレクトロポレーションによる受精卵への長鎖遺伝子のノックインが可能であることを新たに示すものであった。本研究によって得られた知見は、ノックイン動物を作製する上で、実験環境や技術に関する制約を緩和する一助となることが期待される。よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。