

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲 第 1206 号	氏 名	栗 原 大 河
論文審査担当者	主 査 樋 口 京 一 副 査 沢 村 達 也 ・ 新 藤 隆 行		
(論文審査の結果の要旨)			
<p>遺伝子ノックインの高効率化を目指すために、相同領域の長さを 1.6 kb-2.0kb に伸長したドナーベクターを用いると、以前行った相同領域が 0.5kb のドナーベクターでの遺伝子ノックイン効率が 2%程度であったのに対し、14%程度まで上昇した。また、子宮内エレクトロポレーション法を行う際に相同領域が 1.6 kb-2.0kb のドナーベクターと RAD51 発現ベクターを同時に導入することで、ノックイン効率が 25%まで上昇することを見出した。</p> <p>しかし、これまでに RAD51 を神経細胞に過剰発現させた報告はなく、本技術を脳機能解析に用いるためには、RAD51 過剰発現が神経細胞に悪影響を及ぼさないことを調べておくことにした。</p> <p>そこで、RAD51 を過剰発現させた神経細胞では細胞移動、スパイン密度に影響があるかを調べた。この神経細胞の分布様式は、RAD51 を過剰発現させた場合においても変わりはなかった。また、スパインの密度も、RAD51 の過剰発現の有無に関わらず同程度だった。このように、RAD51 を過剰発現させた神経細胞では細胞移動、スパイン密度には異常は観察されなかった。</p> <p>また、異なるベクターの組み合わせでも RAD51 過剰発現によりノックイン効率は上昇するのかを検証した。</p> <p>β アクチン遺伝子の別の領域を切断するガイド RNA 発現ベクターとドナーベクターを用いた場合においても RAD51 過剰発現により遺伝子ノックイン効率が 2 倍程度上昇することが分かった。</p> <p>次に、脳神経細胞に豊富に発現していることから β アクチン遺伝子とは異なる CamK2a 遺伝子でも RAD51 共発現によってノックイン効率は上昇するのかを調べた。その結果、RAD51 共発現下では EGFP ノックイン効率がおよそ 2.5 倍に上昇した。</p> <p>今回の研究ではドナーの相同領域の長さを伸長し、かつ RAD51 を過剰発現させることにより、ノックイン効率を 10 倍以上に上昇させることに成功した。そして、RAD51 過剰発現による神経細胞の移動やスパインの密度などの形態への影響も認められなかった。また、異なるプラスミドベクターを用いても、異なる遺伝子座においてもノックイン効率を上昇させることがわかった。このことから、RAD51 遺伝子の過剰発現によるノックイン効率の上昇は、特定の遺伝子だけで機能する現象ではないことが分かった。</p> <p>本研究により、脳神経細胞に外来遺伝子を高効率でノックインできる技術が確立できた。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。</p>			