

論文の内容の要旨

論文提出者氏名	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
論文題目	DNA repair protein RAD51 enhances the CRISPR/Cas9-mediated knock-in efficiency in brain neurons (DNA 修復タンパク質 RAD51 は脳の神経細胞での CRISPR/Cas9 を介した遺伝子ノックイン効率を上昇させる。)
(論文の内容の要旨)	<p>【背景と目的】これまで遺伝子の機能を生体で解析するにはマウス ES 細胞を用いた遺伝子ターゲティングが行われていた。通常、マウス ES 細胞からマウスを作成するまでには膨大な労力と時間が必要だが、近年開発された CRISPR-Cas9 システムでは幅広い生物種で迅速なゲノム編集が可能になり、遺伝子機能の解析が盛んに行われている。CRISPR-Cas9 システムを用いると、相同組換え修復による遺伝子ノックインも可能だが、相同組換え修復は分裂細胞においてのみ起こることから、非分裂細胞である神経細胞では、相同組換え修復による遺伝子ノックインは困難であり、これまでに神経細胞において相同組換え修復による遺伝子ノックインは報告されていなかった。</p> <p>しかし、私たちは 2016 年に CRISPR/Cas9 システムと子宮内エレクトロポレーション法を組み合わせることにより、脳神経細胞で遺伝子をノックインすることに成功した。</p> <p>この方法を用いると神経細胞への遺伝子ノックインが可能になるが、遺伝子ノックイン効率はおよそ 2% だった。この効率は、単一のニューロンの形態および分子機能を解析する上では非常に適しているが、脳機能を解析するためにはより多くの神経細胞において遺伝子を改変することが必要である。そこで本研究では遺伝子ノックインの高効率化を目的とした。</p> <p>【方法】本研究では CRISPR/Cas9 システムと子宮内エレクトロポレーション法を組み合わせることにより遺伝子ノックインを行った。E15.5 の子宮内胎児脳の脳室に EGFP ドナープラスミド、Cas9/gRNA の発現プラスミド、レポータープラスミドを導入し、子宮内エレクトロポレーションを用いて遺伝子導入した。EGFP ドナーを用いた相同組換え修復が起きることにより、β-actin 遺伝子の N 末端に EGFP cDNA がノックインされる。相同組換えのノックイン効率に関係する要因として二つのことが考えられる。一つは、ドナーベクターの持つ相同領域の長さを改良することである。相同領域の長さを長くすることで、ゲノムとの親和性が上がり、相同組換えの効率が高まることが報告されている。そこで私は、ドナーベクターの相同領域の長さを改良した 3 種類のベクターを作成した。1 つ目は 3 末端を 1.0kbp に伸ばしたもの、二つ目は 3 末端を 2.0kb に伸ばしたもの、三つ目は二つ目のドナーベクターの 5 末端を 1.6kbp に伸ばしたものを作成した。もう一つは DNA 修復過程の分子メカニズムを操作することである。相同組換え修復で中心的役割を果たしている DNA 修復タンパク質 Rad51 を過剰発現させることにより、遺伝子ノックイン効率が上昇することが非神経細胞で報告されている。そこで私は、DNA 修復タンパク質 Rad51 を過剰発現することにより、神経細胞においても遺伝子ノックイン効率が上昇するのかを調べた。</p> <p>【結果】両端にそれぞれ 0.5kb の相同領域をもつドナーベクターを用いた場合には、ノックイン効率は 2% 程度であったのに対し、相同領域の長さを 1.6 kb-2.0kb に伸ばしたドナーベクターを用いると、遺伝子ノックイン効率は 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>

【結論】 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。また、RAD51 過剰発現による神経細胞への影響を発生過程での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。

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と考えている。今後、さらなる高効率化が可能となれば、遺伝子変異により引き起こされる神経疾患の治療法の開発や精神疾患に関連する遺伝子群の機能解析に応用できるものと考えている。