

( 続紙 1 )

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                   |    |      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|------|
| 京都大学                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 博士 ( 農 学 )                                                                                                        | 氏名 | 村上 悠 |
| 論文題目                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Establishment of a practical gene knock-in system and its application in medaka<br>(メダカにおける実用的なノックインシステムの確立とその応用) |    |      |
| (論文内容の要旨)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                   |    |      |
| <p>メダカ (<i>Oryzias latipes</i>) はモデル生物として有用な特性を備えており、従来より遺伝学的な解析に用いられてきた。近年、ゲノム編集技術を用いた逆遺伝学的なアプローチの普及により、本種は脊椎動物の遺伝学的なモデル生物として重要になっている。特定のターゲット遺伝子のノックアウト、または特定の場所に特定の遺伝子を導入するノックインを可能とするゲノム編集技術が開発され、その応用が広がっている。しかし本研究を開始した当初、魚類に関しては内在遺伝子を破壊するノックアウトは可能であったが、外来遺伝子を部位特異的に挿入するノックインは、実用的な技術として確立されていなかった。そこで本論文では、魚類においてより自在なゲノム改変を達成するため、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 システムを駆使したノックイン (KI) システムの確立と、水産養殖魚への応用をより進めるためゲノム編集ツールを肝臓で発現させ、卵に移行させるシステムの開発を試みたものであり、以下のように要約される。</p>                     |                                                                                                                   |    |      |
| <p>1. 従来の遺伝子導入法では、ゲノム上へのランダム挿入や多コピー挿入が生じるため、外来遺伝子の発現を精密に制御できないことが長年の課題であった。もし相同組み替えを介したKIシステムを確立できれば、この課題の解消だけでなく、緻密な塩基置換や蛍光タンパク質による内在遺伝子の標識等を含めた改変パターンの拡張をも実現できる。最初に、外来遺伝子の両端に付与する Cas 9 で切断されるベイト配列の最適化を行った、哺乳動物で知られている Bait 配列の中で魚類の遺伝子と一致しないものを選択し、選択した Bait 配列と蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子をもつベクターをアクチン遺伝子をターゲットとして筋肉特異的に導入した。その結果、高効率かつ正確なKIを可能にする新規ベイト配列 (BaitD) の特定に成功した。さらにターゲット遺伝子との相同配列の長さを変え、高効率な相同配列の長さ (500 base) を決定した。加えて、異なる2色の蛍光タンパク質をそれぞれKIした個体を用いて、簡便・迅速・非侵襲的な遺伝子型判定法を新たに開発した。</p> |                                                                                                                   |    |      |
| <p>2. 魚類でCRISPR/Cas9を用いてKIを行う場合、変異導入世代の個体では、目的通りに外来遺伝子が導入される細胞以外にも、標的遺伝子へ小規模な塩基挿入・欠損が導入される細胞が混在する。そのため、両アレルに変異を生じた細胞が不必要に増加し、致命的になることが危惧される。このリスクを排除するためには、当該変異を回避してKIできる技術が不可欠である。そこでゲノム編集ツールである2本鎖 DNA を切断する Cas9 の変異体で、2本鎖 DNA の1本鎖のみを切断する Cas9 Nickase (Cas9n) を用い、当該変異の発生原因である非相同末端結合を活性化せずにKIできることを明らかにした。一方、従来のBait 配列はCas9nでは完全に切断されず、導入効率が減少した。そのため、ベクター中のBaitDを反対方向にも直列状に配置することで Cas9nによる Bait の切断を確実にし、KIの高効率化にも成功した。</p>                                                        |                                                                                                                   |    |      |

3. 卵黄球の主成分として知られるビテロジェニン (Vtg) は、肝臓で合成され血中へ分泌された後、卵内へ輸送される。この輸送能を利用すれば、肝臓で発現した任意の外来タンパク質を卵内へ効率的に輸送・蓄積するシステムの構築が可能となる。そこで本研究では、従来の遺伝子導入法や、第1章で確立したノックイン法を駆使し、Vtg の部分配列または全長配列を用いて、肝臓で発現させた外来タンパク質の卵内への輸送が可能であるか評価した。その結果、作出した遺伝子改変個体が産出する卵からは、緑色蛍光タンパク質 (GFP) の蛍光や発光タンパク質であるルシフェラーゼ (Luc) の発光が検出され、肝臓で発現したタンパク質の卵内への輸送システムの構築に成功した。このアプローチにより Cas9/Cas9n を卵に移行させ、卵へのCas9/Cas9n のインジェクションを不要とする KI の可能性を示した。

本研究により魚類に対してCRISPR/Cas9 (Cas9n) システムを用いて、特定の遺伝子をターゲットとした外来遺伝子の KI 技術が確立した。また親魚の肝臓に発現したタンパク質を卵内へ移行するシステムを開発できたため、Cas9(n) タンパク質の卵への注入が不要となる KI システムの開発が可能となった。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせ

て、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し  
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

魚類の育種は植物・動物に比べ遅れている。近年 CRISPR/Cas9 システムを用いた特定の遺伝子部位に外来遺伝子の導入 (KI) が開発されているが、魚類での応用はほとんどなされていなかった。本論文では、魚類を対象としたKIシステムの開発とさらに実用化に優れた Cas(n) タンパク質の卵内への移行法の開発を検討したものである。成果として評価できる点は以下の通りである。

1. CRISPR/Cas9 システムを用いたメダカへの高効率な KI のため、Bait 配列の最適化を行い、標的タンパク質の発現部位特異的に外来遺伝子 (蛍光タンパク質) を高効率で導入する手法を確立した。
2. CRISPR/Cas9 システムを用いてメダカへの KI を行った場合、外来遺伝子が KI された細胞の他、標的遺伝子へ小規模な塩基挿入・欠損が導入される細胞が混在した。そのため、両アレルに変異を生じた細胞が不必要に増加し、致死的になる場合があった。Cas9 の変異体であり、2本鎖 DNA の1本鎖のみを切断する Cas9 Nickase (Cas9n)を用い、BaitD を反対方向にも直列状に配置することで標的遺伝子の変異を抑制し、外来遺伝子の高効率な KI に成功した。
3. CRISPR/Cas9(n) システムを用いて実用魚種に外由来遺伝子をKIする場合、大量のCas9(n) タンパク質を用意する必要がある。この問題を解決するため、親魚の肝臓で発現させたタンパク質をビテロジェニンに連結させて発現するシステムを開発した。

以上のように、本研究は海洋生物機能学、魚類遺伝学、魚類育種学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和2年2月17日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)