

京都大学	博士 (医学)	氏名	松永 太一
論文題目	Single-step generation of gene knockout-rescue system in pluripotent stem cells by promoter insertion with CRISPR/Cas9 (CRISPR/Cas9 を用いたプロモーター配列挿入による簡便なノックアウト・レスキューシステムの構築)		
(論文内容の要旨)			
<p>遺伝子の欠損 (ノックアウト)、回復 (レスキュー) は、遺伝子機能を解析する上で強力なツールである。しかし、これらの実験系を構築する為には複数のステップが必要である。例えばノックアウトを行う為には、長い相同領域を有するベクター作製、相同組換え、欠損株の選定等が必要である。また、レスキュー実験の場合、cDNA 抽出、過剰発現ベクター作製、遺伝子導入等が必要である。</p> <p>本研究は、簡便なノックアウト・レスキュー実験系の構築を目的とし、最新のゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 システムを応用し、標的遺伝子本体は操作せず、標的遺伝子の内在性プロモーター領域に誘導性プロモーター配列を挿入することによって標的遺伝子発現を制御する新規手法の開発を試みた。CRISPR/Cas9 とは Cas9 ヌクレアーゼとガイド RNA (gRNA) で構成され、gRNA 配列と相補的なゲノム DNA が Cas9 によって二本鎖切断 (DSB) されるシステムである。また、標的遺伝子は血管内皮細胞分化に必須である血管内皮増殖因子受容体 2 (VEGFR2/Flk1) に設定し、テトラサイクリン制御性トランス活性化因子 (tTA) 発現マウス胚性幹細胞 (ESC) を用いた血管内皮細胞分化系により、Flk1 ノックアウト・レスキュー実験を評価した。</p> <p>まず、gRNA 配列を Flk1 の 5' 末端非翻訳領域 (5' UTR) に設定し DSB を誘導した。この時、同領域に相同性を有するベクターとの相同組換えによって同領域にピューロマイシン耐性遺伝子とテトラサイクリン誘導性プロモーター (TRE-CMV) を挿入した。薬剤選択後、得られた 19 株のゲノム DNA を抽出し PCR を行った。その結果、両アレルとも TRE-CMV が挿入されたホモ変異株が 4 株と片アレルに挿入されたヘテロ変異株が 11 株であった。またシーケンス解析の結果、TRE-CMV が Flk1 の 5' UTR に正しく挿入されたことを確認した。単回の遺伝子導入により複数の変異細胞株を効率的に樹立できた。</p> <p>次に、遺伝子導入した未分化 ESC を用いてドキシサイクリン (Dox) による Flk1 発現調節を検討した。ヘテロ・ホモ変異株共に Dox 除去し TRE-CMV を活性化することにより Flk1 mRNA 及びタンパク発現が誘導された。同様に、分化細胞での Flk1 発現制御を検討した。ESC 由来中胚葉細胞を VEGF 存在下で培養した結果、野生株では約 20% の細胞が内在性 Flk1 を発現した。一方、Dox 存在下では、ヘテロ変異株で約 6% が Flk1 陽性、ホモ変異株ではほぼ全ての細胞が Flk1 陰性であり、変異アレル数に依存した Flk1 発現低下を確認した。また、Dox 除去によって Flk1 発現が亢進し、分化細胞でも標的遺伝子の発現調節が可能であった。</p>			

さらに、誘導した Flk1 機能を血管内皮細胞分化を指標に評価した。野生株では約 15% の細胞が内皮細胞に分化し、ヘテロ変異株は Dox 存在下で約 7% の細胞が内皮細胞に分化した。一方、ホモ変異株より分化した内皮細胞はほとんど認められず、Flk1 欠損細胞の表現型を再現できた。また、Dox 非存在下ではヘテロ・ホモ変異株共に内皮細胞の分化が顕著に促進した。すなわち誘導 Flk1 が正しく機能すること及びノックアウト・レスキューによる細胞表現型を再現できることが明らかになった。

以上、標的遺伝子の内在性プロモーター領域に CRISPR/Cas9 を用いて誘導性プロモーターを挿入することにより、簡便にノックアウト・レスキューの実験系を構築できた。これらの研究成果は、様々な分子機能解析及び幹細胞研究に広く応用可能である。

(論文審査の結果の要旨)

遺伝子の欠損 (ノックアウト)・回復 (レスキュー) は、遺伝子機能解析の強力なツールであるが、複雑な構築過程が必要である。本研究は、簡便なノックアウト・レスキュー実験系の構築を目的とし、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 を応用し、標的遺伝子本体ではなく 5' 非翻訳領域にテトラサイクリン誘導性プロモーター配列 (TRE-CMV) を挿入して標的遺伝子発現を制御する新規手法の開発を試みた。標的遺伝子は血管内皮細胞分化に必須である 2 型血管内皮増殖因子受容体 (Flk1) に設定し、TRE-CMV を挿入した。テトラサイクリン制御性トランス活性化因子発現マウス胚性幹細胞を用いた血管内皮細胞分化系において、Flk1 の誘導性発現と内皮分化における細胞表現型を評価した。

薬剤選択により得られた 19 株のうち、ホモ変異株 4 株、ヘテロ変異株 11 株が樹立できた。標的領域への TRE-CMV の挿入をゲノム PCR およびシーケンス解析にて確認した。プロモーター不活化状態では Flk1 発現と内皮細胞分化をほぼ認めず、Flk1 遺伝子ノックアウトの表現型を再現できた。一方、TRE-CMV 活性化により Flk1 発現の誘導とともに、内皮細胞分化が顕著に増加し、挿入プロモーターにより誘導された Flk1 が機能することが示された。

以上の研究は、遺伝子機能解析の簡便な新規手法を開発し、幹細胞研究等広く生物学の発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 26 年 2 月 12 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降