

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	田中 慎吾
論文題目	小型魚類を対象とした標的ヌクレオチドの置換編集		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>CRISPR/Cas9 は標的 DNA 配列上に DNA 二本鎖切断を引き起こすことで簡便かつ高効率に DNA 配列を編集することができる画期的な技術である。CRISPR/Cas9 を応用することで、遺伝性疾患を引き起こす異常な DNA 配列を編集し、正常な DNA 配列に修正するという遺伝子治療が可能になると期待されている。しかしながら、CRISPR/Cas9 により導入される DNA 二本鎖切断は挿入欠失変異および置換変異をランダムに引き起こすため、編集後の DNA 配列は一意には定まらない。また、DNA 二本鎖切断が細胞死や癌化を引き起こす可能性も指摘されている。これらは遺伝子治療に向けたゲノム編集技術の応用可能性を狭める要因となっている。従って、動物個体に適用可能であり、かつ DNA 二本鎖切断を介さないゲノム編集技術の開発が望まれている。</p> <p>申請者はシトシンの脱アミノ化を介するゲノム編集技術である Target-AID をゼブラフィッシュに適用し、脊椎動物個体を対象とした標的ヌクレオチドの置換編集が可能であることを実証した。まず、2 種類の遺伝子(<i>chordin (chd)</i>, <i>one-eyed pinhead (oep)</i>)を標的遺伝子として設定し、ゼブラフィッシュ受精卵を対象とした Target-AID によるヌクレオチド置換効果の検証を行った。その結果、Target-AID は各遺伝子上の標的としたヌクレオチドを構成するシトシンをチミンに置換することが明らかになった。一方で、標的外のヌクレオチドに対する置換変異を副次的に誘導し得ることを示唆する結果も得られた。次に挿入欠失変異効果の検証を行った結果、Target-AID が標的 DNA 配列上において挿入欠失変異も誘導し得ることが明らかになった。これらの挿入欠失変異はシトシンの脱アミノ化により生じたウラシルに対する塩基除去修復の過程で生じていると推察された。そこで、DNA 上に生じたウラシルの除去を担うウラシル DNA グリコシラーゼを Target-AID と融合して発現させたところ、挿入欠失変異効果の促進が認められた。この時、ウラシルの除去により生じる脱塩基部位の切断を担う AP エンドヌクレアーゼを過剰発現させると、挿入欠失変異効果は更に促進されることが明らかになった。これらの結果は、ウラシルの除去の抑制及び脱塩基部位の切断の抑制が Target-AID による挿入欠失変異効果の抑制に繋がることを示唆している。</p> <p>次に、Target-AID により引き起こされた変異の遺伝性について検証した。上述の遺伝子に対して Target-AID によるゲノム編集を施したゼブラフィッシュと野生型ゼブラフィッシュを交配させたところ、各遺伝子上の標的ヌクレオチドを構成するシトシンがチミンに置換されたアレルを有するヘテロ接合体の子孫が得られた。さらにこれらの置換を有するヘテロ接合体同士で交配を行ったところ、各遺伝子の欠失変異体が示す既知の表現型を示す子孫が得られた。</p> <p>以上の結果から、Target-AID は脊椎動物であるゼブラフィッシュに於いて、標的ヌクレオチドの置換編集を実現できる技術であると結論づけた。</p>			

( 論文審査の結果の要旨 )

2012 年に報告された CRISPR/Cas9 は簡便かつ効率的な DNA の編集を実現し、ゲノム編集の爆発的な普及を促した。その編集効果の特異性の高さから、遺伝性疾患を引き起こす異常な DNA 配列を修復するという遺伝子治療が可能になるのではないかと期待されている。しかしながら CRISPR/Cas9 は DNA 二本鎖切断を介してゲノム編集を行うため、標的 DNA 上に挿入欠失変異及び置換変異をランダムに導入してしまう。また、DNA 二本鎖切断により細胞の癌化や細胞死が引き起こされる危険性も指摘されている。これらは動物個体を対象としたゲノム編集の実施に於ける潜在的リスクであり、ゲノム編集技術の応用可能性を狭める要因となる。動物個体に於いて DNA 二本鎖切断を介さないゲノム編集技術による DNA の編集可能性を実証することは、これらの潜在的リスクを解消するための重要なステップと位置付けられる。本研究において申請者は DNA 二本鎖切断を介さずにヌクレオチドの置換編集を誘導するゲノム編集技術である "Target-AID" をモデル脊椎動物であるゼブラフィッシュに適用し、Target-AID のゲノム編集効果とその遺伝性について検証を行った。

まず申請者は、ゼブラフィッシュ受精卵に Target-AID を導入し、2 種類の遺伝子 (*chordin (chd)* , *one-eyed pinhead (oep)*) 上の標的ヌクレオチドが置換されるかどうかをシーケンシング解析により検証した。その結果、各遺伝子上の標的ヌクレオチドが置換され、未成熟終止コドンが作出されていることが明らかになった。一方で、標的外のヌクレオチドにおける置換変異や、挿入欠失変異を引き起こし得ることを示す結果も得られた。

次に申請者は、Target-AID により誘導される変異の遺伝性を検証した。Target-AID を導入したゼブラフィッシュと野生型ゼブラフィッシュの交配実験により、次世代のゼブラフィッシュに標的ヌクレオチド置換の生じたアリルが伝達することが明らかになった。さらに、これらのアリルを有する個体同士を交配させたところ、次世代のゼブラフィッシュ胚に於いて *chd* 遺伝子と *oep* 遺伝子の欠失変異体が示す既知の表現型が認められた。シーケンシング解析によるジェノタイピングの結果、これらの胚は標的ヌクレオチドの置換が生じたアリルを有するホモ接合体であることが明らかになった。

以上の結果から、申請者は DNA 二本鎖切断を介さないゲノム編集技術である Target-AID の標的ヌクレオチド置換編集効果をゼブラフィッシュに於いて実証し、この Target-AID によるゲノム編集が動物個体に対して可能であることを示した。この知見はゲノム編集技術の遺伝子治療への応用の可能性を広げるものであると考えられる。

以上のように、本論文はモデル脊椎動物であるゼブラフィッシュに於いて標的ヌクレオチド置換編集技術である Target-AID のゲノム編集効果とその遺伝性について検証したもので、分子生物学分野における優れた研究能力、そして、生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見が示されており、また、論理的かつ一貫性を持って記述されている。よって博士 (生命科学) の学位論文として価値あるものと認めた。更に、令和 3 年 2 月 8 日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、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。(ただし、学位規則第 8 条の規定により、猶予期間は学位授与日から 3 ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日：                      年                      月                      日