

審査の結果の要旨

氏名 大野 元子

本研究は、アルコール代謝酵素の一つアルデヒド脱水素酵素 (Aldehyde dehydrogenase、ALDH2) の一塩基多型 (single nucleotide polymorphism、SNP) の変異型が酵素活性を低下させ癌などの疾患リスクを上昇させることに着目して、Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) を用いた遺伝子編集の手法によりタンパク機能の改善を試み、ALDH2 の 4 量体という特徴によるタンパク機能改善への影響と、遺伝子編集効率改善のための様々な条件を検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. 野生型ホモ (wt/wt) であるヒト腎臓上皮細胞の 293T 細胞では、野生型 ALDH2 の強制発現によって十分なタンパク発現を得られ著明に活性が上昇したものの、ALDH2 遺伝子の SNP 改変では低発現・低活性のままであった。元々 ALDH2 発現がない細胞では、野生型 ALDH2 強制発現が有効であると考えられた。
2. ヘテロ (wt/mut) であるヒト肝臓細胞の JHH7 細胞では、野生型 ALDH2 過剰発現および ALDH2 遺伝子の SNP 改変 (wt/mut→wt/wt) のいずれでも編集前より有意に活性が上昇した。野生型 ALDH2 過剰発現ではタンパク発現量が増加している一方、ALDH2 遺伝子 SNP 改変では明らかな発現増加はなかったが、有意差はないものの野生型 ALDH2 過剰発現より活性改善の程度がやや高い印象であった。ALDH2 発現があるヘテロ (wt/mut) の細胞では、SNP 改変による内在性の変異型サブユニットの消去が効率よく活性を改善させる可能性が考えられた。
3. gRNA の設定による Cas9 切断効率の変化を調べるため、ALDH2 SNP 近傍の計 6 か所のターゲットを設定し、それぞれに対応した gRNA を作成して Cas9 切断効率を確認した。in vivo では gRNA により切断効率差が大きく、細胞内環境の複雑な要因が影響して効率に変化する可能性が考えられた。
4. Cas9 切断効率の良い gRNA のそれぞれに対応して、短い一本鎖 DNA である ssODN (single strand oligo donor nucleotide) をドナーとして作成し、gRNA と ssODN を Cas9 安定発現細胞株に導入した。その後、編集後配列に特異的なプライマーを用いた PCR 法によって編集の有無を確認したところ、切断効率が良好でもターゲットにより編集効率に差が生じ得る可能性が考えられた。
5. gRNA と ssODN の導入量条件を 6 段階設定し Cas9 安定発現細胞株に各条件で導入後、DNA ligaseIV の阻害剤 SCR7 を添加し、DNA 二重鎖切断の修復機構 NHEJ (Non-homologous end joining) の阻害による編集効率への影響を、編集後配列に特異的なプライマーを用いた PCR 法によって確認した。いずれの条件でも SCR7 存在下でより効率良く編集がみられ、NHEJ の阻害

が相同組換え修復による編集を促進し得ることが示唆された。

以上、本論文は 4 量体タンパクである ALDH2 に対し、遺伝子編集の手法によるタンパク機能回復の可能性をある程度の変化として示し、発現様式や目的タンパクの特徴により適切な編集のターゲットや方法を検討する必要性を示した。本研究は遺伝子編集手法を用いた今後の治療・疾患予防法開発の基盤になるものであり、学位の授与に値すると考えられる。