

生命現象は様々な遺伝子の働きによって制御されているため、遺伝子の塩基配列や発現を意のままにコントロールできるようになれば、生命現象の理解に大きく貢献すると期待される。本研究では、こうした観点から、染色体にコードされた遺伝子を自由自在に操作するための技術開発を目的としている。近年、生命科学の諸分野では、機能を調べたい遺伝子の塩基配列を書き換えてその遺伝子を破壊したり、当該遺伝子に点変異を導入する目的で、原核生物の獲得免疫システム (CRISPR-Cas9 システム) に由来する RNA 依存性 DNA 切断酵素 (Cas9) を用いたゲノム編集が行われている。この Cas9 に基づくゲノム編集技術は極めて簡便な点が大きな特長である一方で、Cas9 の酵素活性をコントロールできないため、例えば、組織の中の狙った細胞のゲノムを狙ったタイミングで操作することができないなど、その応用に制約が課せられていた。このような背景のもと、本研究では、Cas9 の DNA 切断活性を光で制御することにより、染色体にコードされた遺伝子の塩基配列を自在に操作する技術を開発している。さらに、Cas9 の DNA 結合能を応用して、染色体にコードされた遺伝子の発現を光で自在にコントロールする技術を開発している。

本論文は 5 つの章で構成されている。第 1 章では、本論文の緒言として、CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノム編集技術の背景とその課題について説明し、本研究の目的を明確にしている。

第 2 章では、光で活性化できる Cas9 (photoactivatable Cas9, 略して paCas9) を開発している。paCas9 の開発戦略として、まず様々な位置で Cas9 を二分割して得られた 18 種類の分割体 (split-Cas9) の N 末端側断片と C 末端側断片に、ラパマイシンで二量体を形成する 2 つのタンパク質 (FKBP, FRB) をそれぞれ連結し、FKBP と FRB の二量体形成に応答して最も効率よく DNA 切断活性が生起する split-Cas9 をスクリーニングしている。このスクリーニングによって得られた split-Cas9 に、光で二量体を形成する光スイッチタンパク質を連結することにより、paCas9 を設計している。paCas9 に導入する光スイッチタンパク質として、Magnet システムと呼ばれるアカパンカビ由来の光受容体 (Vivid) の変異体が最適であることを示している。このように split-Cas9 と Magnet システムを用いて開発した paCas9 が、光刺激に応答して遺伝子の塩基配列を高い効率で編集できることを *CCR5*, *EMX1*, *VEGFA*, *AAVS* などの遺伝子を例として実証している。加えて、光刺激を止めると DNA 切断活性を失うという paCas9 の可逆性や、当該ツールが Cas9 と同様の塩基配列選択性を有することを示すなど、多方面から paCas9 の検証を行なっている。さらに、paCas9 に変異を導入して DNA 切断活性を欠失させることにより、遺伝子の発現を光で抑制する技術の開発にも成功している。このように、染色体にコードされた遺伝子の塩基配列を光刺激で自由自在に編集できるツールを設計・開発し、その実用性と汎用性を実証すると共に、当該技術を遺伝子発現の抑制技術へと展開した点は高く評価できる。

第 3 章と第 4 章では、染色体にコードされた遺伝子の発現を光で活性化する技術を開発している。本技術には DNA 切断活性を欠失した Cas9 変異体 (dCas9) を用い、光刺激に

より dCas9 に転写活性化因子が結合して標的遺伝子の発現を活性化するように設計されている。特に第 3 章では、*ASCL1*, *MYOD1*, *NANOG*, *ILIRN* などの遺伝子を例として、本技術を検証している。さらに、当該技術を用いて遺伝子発現のパターンを時空間制御できることも検証している。第 4 章では、第 3 章で開発した技術をさらに改良して、より強力に遺伝子の発現を光で活性化する技術を開発している。さらに、この技術をヒト人工多能性幹細胞 (iPSC) に応用し、染色体にコードされた遺伝子の発現を光で強く活性化することにより、iPSC から神経細胞への分化を光で制御できることを示している。技術の開発と検証に加えて、分化という極めて重要な細胞機能を光で自在に操作できることを実証した点は、非常に意義深い成果と言える。

第 5 章では、本論文の結言として、各章の一連の結果について総括し、本研究の成果を整理している。

以上のように二本垣氏は、ゲノムの光操作を実現する、実用性と汎用性に優れた技術を開発した。本研究の成果は、ゲノムエンジニアリングやオプトジェネティクスに新たな進歩をもたらし、基礎生命科学や創薬、医療分野に大きなインパクトを与えるものとして高く評価できる。以上の点から本審査委員会は、本論文が博士 (学術) の学位を授与するのにふさわしいものと認定する。