

審査の結果の要旨

氏名 許沢 佳弘

本研究は、近年、生体内体細胞に対するゲノム編集技術基盤として注目される、非相同末端結合を介した遺伝子ノックイン反応のノックイン効率を改善するため、遺伝学的探索手法で、同反応の分子機序解明を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 非相同末端結合を介した遺伝子ノックイン手法の再現性を確認するため、HeLa 細胞の GAPDH 3'UTR 領域へレポーター遺伝子の挿入を行った。同手法が HeLa 細胞においても再現可能であることを示すとともに、同ノックイン反応が既報ほどの高い効率を示さない状況の存在を示した。また同実験により、レポーター遺伝子の発現とノックインの成否に解離が生じる可能性を示した。
2. 遺伝子ノックイン効率の定量系構築のため、外来遺伝子をノックインする際に safe harbor 領域として知られる AAVS1 (Adeno-associated virus integration site 1) 部位へレポーター遺伝子を挿入し、フローサイトメトリーでレポーター遺伝子の発現を解析した。Episomal なプラスミド由来のレポーター遺伝子発現とノックインにより生じるレポーター遺伝子発現には、発現強度やその安定性に差があることを示し、ノックイン手法からフローサイトメトリーによる解析までの条件を調節することで、これら 2 種類の遺伝子発現細胞群を明確に区別できることを示した。また両細胞群のゲノムを PCR 法、サンガーシーケンス法で解析し、これらの細胞群がそれぞれノックインの成否を正確に表すことを示した。以上の結果から、レポーター遺伝子の発現とノックインの成否に解離を生じない正確な遺伝子ノックイン効率の定量系の構築が示された。
3. 非相同末端結合を介したノックイン反応の分子機序解明のため、遺伝学的な探索系を構築した。ゲノムスケール CRISPR ノックアウトレンチウイルスライブラリーを用いて作成したゲノムワイド遺伝子ノックアウト細胞群に、非相同末端結合を介したノックイン反応を行い、ノックイン成功細胞におけるノックアウト遺伝子の分布が元の細胞集団における分布とどのように変化するかを次世代シーケンサーで解析した。予備実験で、その遺伝学的探索手法の実現可能性を示すとともに、非相同末端結合を介したノックイン反応を制御しうる 106 の候補遺伝子を示した。

以上、本論文は非相同末端結合を介したノックイン反応の分子機序を解明する有望な探索系を構築した。本研究はこれまで未知に等しかった非相同末端結合を介した遺伝子ノックインの分子機序解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。