

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲 先 第 397 号	氏 名	LE ANH QUYNH
審査委員	主査 長宗秀明 副査 宇都義浩 副査 音井威重		
学位論文題目 Studies on genome editing techniques using CRISPR/Cas9 in porcine embryos (ブタ胚におけるCRISPR / Cas9を用いたゲノム編集技術に関する研究)			
審査結果の要旨 <p>ブタは生理学的また解剖学的な特徴、動物愛護の問題が少ないこと、多産系であること、さらに血液臨床生化学的数値などがヒトに近いことから、異種移植臓器提供動物として適しているとされている。このブタ-ヒト間の移植の場合、拒絶反応の原因となる糖鎖抗原が重要な鍵となる。本研究では、遺伝子改変により異種移植用臓器を作製することを目的に、エレクトロポレーション (EP) によるゲノム編集技術の改良およびヒト免疫系に関与する複数種の遺伝子を標的とする CRISPR / Cas9 システムにおける gRNA の効果およびその導入方法について検討した。</p> <p>第 1 章では、MSTN 遺伝子をターゲットとした EP 法において、CRISPR/Cas9 システムに用いる Cas9 タンパク質濃度について検討した。その結果、Cas9 タンパク質濃度は胚の発生に影響を与えなかったが、発生した胚の遺伝子編集効率が、25 ng/μl の低濃度の Cas9 タンパク質を用いた場合に低下することが判明した。一方、用いる Cas9 タンパク質濃度によるオフターゲット効果は認められなかったことから、EP 時の Cas9 タンパク質濃度は遺伝子編集効率に影響を与えるが、胚発生、およびオフターゲット部位での非特異的切断には影響しないことを明らかにした。第 2 章では、ブタ胚における CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集においてモザイク変異の発生が問題となっている。そこで、編集効率を指標に CRISPR/Cas9 システム導入方法として EP と細胞質内マイクロインジェクション (MI) を比較し、さらに胚の発育ステージの影響を検討した。B4GALNT2 遺伝子をターゲットした gRNA を用い、1 細胞期胚と 2 細胞期胚に EP および MI した結果、MI は EP に比較して胚の発生を低下させるものの、1 細胞期胚への注入によりホモ変異率および変異効率の高い胚の作製が可能であることが判明した。これらの結果から、CRISPR/Cas9 システムの導入方法および導入ステージが編集効率に影響を与えることが明らかとなった。第 3 章では、3 つの遺伝子 (GGTA1/CMAH /PDX1) をターゲットに、EP および EP+MI の組み合わせ効果について検討した。EP の 1 時間前後に MI をした場合、胚の発生を低下させたが、MI 処置はいずれも複数遺伝子のホモ変異率および変異効率において効果的であることを明らかにした。</p> <p>以上本研究は、異種移植用臓器提供ブタ作出のため、ゲノム編集条件さらに EP 及び MI との組み合わせによる効率的なゲノム編集法を明らかにしたものであり、本論文は博士 (工学) の学位授与に値するものと判定する。</p>			