

Title	CRISPR/Cas9-mediated reporter knock-in in mouse haploid embryonic stem cells
Author(s)	木村, 康義
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/55740
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

論文内容の要旨
Synopsis of Thesis

氏名 Name	木村 康義
論文題名 Title	CRISPR/Cas9-mediated reporter knock-in in mouse haploid embryonic stem cells (マウス半数体胚性幹細胞でのCRISPR/Cas9を介したレポーターのノックイン)
論文内容の要旨	
<p>〔目的(Purpose)〕</p> <p>マウス雌性半数体の胚性幹細胞は、卵母細胞から単為発生で得られる多能性幹細胞であり、ゲノムを1組しか持たないため、遺伝子変化の影響を研究する上で強力なツールとなる。しかし、分化過程などの生物学的過程をモニターする理想的なレポーターを持つ細胞株が不足しているため、目的の表現型を持つ細胞を選び出すことには限界があった。本研究では、CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR associated protein 9) を用いてマウス半数体胚性幹細胞の標的遺伝子を破壊すること無くレポーターをノックインする方法を確立し、その有用性とレポーターとしての機能性を評価した。</p>	
<p>〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕</p> <p>最初にCRISPR/Cas9を用いたノックイン系の有効性を評価するために、ハウスキーピング遺伝子である<i>Actb</i>遺伝子座を編集し蛍光タンパクであるVenusレポーターを挿入した。CRISPR/Cas9を用いた遺伝子編集を介して相同組み換えによりノックインが成立すると、β-アクチンとVenusが共発現する様に設計しノックイン効率を検証した。Cas9ヌクレアーゼを用いて標的部位の二本鎖切断を誘導する標準的な方法に加えて、標的外変異が少ないCas9ニッカーゼをペアで用いるDouble Nicking法や短縮型ガイドRNA鎖を用いる方法でもノックインが可能であった。編集効率は通常の二倍体胚性幹細胞と比較して同等以上であり、高いガイド活性を持つガイドRNA鎖を用いて標的を編集した場合に、高いノックイン効率がみられる傾向があった。次に、Double Nicking法を用いて初期神経マーカー遺伝子である<i>Sox1</i>の下流にVenusレポーターを挿入した細胞株を作成した。<i>In vitro</i>神経分化に伴いVenusの発現を認め、FACSを用いた細胞分取によりVenus陽性細胞と陰性細胞を比較したところ、Venus陽性細胞では初期神経マーカーの上昇と非神経マーカーの著減が認められた。以上から、挿入したレポーターにより神経分化過程を追跡する事が可能であった。</p>	
<p>〔総括(Conclusion)〕</p> <p>我々のデータは、CRISPR/Cas9を介したノックイン系を用いることで、実用的な効率で任意の遺伝子特異的レポーターを持つ半数体胚性幹細胞株を樹立できることを示している。遺伝子編集された半数体胚性幹細胞株は、順遺伝学的スクリーニングなどの遺伝子機能研究に応用できる可能性がある。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 木村 康義

	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	大阪大学教授 望月秀樹
	副 査	大阪大学教授 宇野明之
	副 査	大阪大学教授 山下俊英

論文審査の結果の要旨

本論文は、遺伝子編集技術であるCRISPR/Cas9を用いて、マウス半数体胚性幹細胞の標的遺伝子にレポーターをノックインする方法を報告したものである。著者らは、最初にVenusレポーターをハウスキーピング遺伝子座である β -アクチン遺伝子座に挿入し、系の有効性を確認した。また、Cas9ヌクレアーゼを用いる方法に加えて、標的外への変異誘発が少ないCas9ニッカーゼおよび短縮型ガイドRNA鎖でもノックインが可能であること、高いガイド活性を持つガイドRNAを用いた場合に、高いノックイン効率がみられる傾向がある事を示した。レポーターとしての有用性に関しては、神経マーカー遺伝子-Sox1を編集し神経分化をモニターし得る事を示して証明した。

マウス雌性半数体の胚性幹細胞は、ゲノムを1組しか持たない多能性幹細胞という特性を有し遺伝子変化の研究において強力なツールとなるが、レポーター細胞株が不足しているという問題点を有していた。本研究は*in vitro*で任意のレポーター細胞株を作成可能である事を示したものであり、順遺伝学的スクリーニングを含む遺伝子機能研究に資する成果であり、学位に値するものであると認める。