

Title	オオミジンコにおけるゲノム編集技術の開発
Author(s)	中西, 貴士
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/55982">https://doi.org/10.18910/55982</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

## 論文内容の要旨

氏 名 ( 中西 貴士 )

論文題名 オオミジンコにおけるゲノム編集技術の開発

## 論文内容の要旨

## 第1章 緒論

オオミジンコは淡水系に棲む甲殻類である。環境刺激に敏感に反応するという特徴をもつため、生態学や環境毒性学などの分野で広く研究されてきた。近年では、環境刺激に対して応答する遺伝子群を明らかにするためにゲノミクス技術が活用されており、膨大な遺伝子情報が集積しつつある。しかし、ミジンコで利用可能な遺伝子操作技術は限られていたため、集積した遺伝子情報と表現型との関連はほとんど調べられてこなかった。

そこで私は、CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats- CRISPR-associated protein) や TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease) といった配列特異的ヌクレアーゼによるゲノム編集技術に着目し、ミジンコで標的遺伝子破壊 (ノックアウト) 技術ならびに外来遺伝子導入 (ノックイン) 技術を確立することを目的とした。これらの技術は、集積されてきたミジンコの遺伝子情報と、環境刺激に柔軟に応答する表現型との関連を調べるうえで重要な役割を果たすと考えられた。

## 第2章 CRISPR-Casを用いた標的遺伝子破壊技術の開発

本章では、ゲノム編集ツールのひとつであるCRISPR-Casを利用したノックアウト技術がミジンコに応用可能か調べた。標的として複眼の形態形成に必須の内在性遺伝子*eyeless*オルソログ (*Dma-ey*) を選択した。*in vitro*で合成したCas9ヌクレアーゼをコードするmRNA並びに*Dma-ey* targeting guide RNAを胚に共注入したところ、複眼が奇形の (deformed eye) ノックアウトミジンコを約8%の効率で樹立することができた。ノックアウト個体のゲノム配列を調べたところ、両アレルのguide RNA標的部位周辺で塩基配列の挿入/欠失が引き起こされ、その結果読み枠がずれて*Dma-ey*遺伝子が機能を失っていた。以上より、CRISPR-Casによるノックアウト技術をミジンコで確立することができた。

## 第3章 TALENを利用した相同組換えによる外来遺伝子導入技術の開発

本章では、別のゲノム編集ツールであるTALENを用いた相同組換えによる外来遺伝子導入 (HRノックイン) がミジンコに応用可能か調べた。HRノックインが成功したかどうか簡単に調べるために、第2章で得られた*Dma-ey*変異体のひとつで、deformed eye表現型を示す $ey^{A877/\Delta 1}$ システムを利用した。*Dma-ey*遺伝子座の1塩基欠損アレルを標的として、67 bpの外来DNA配列を1塩基欠損部位にHRノックインで組み込み、復帰変異体を得ることを目指した。そのために、*in vitro*で合成したTALEN mRNAと外来DNA配列を含むドナーDNAを胚に共注入したところ、約2%の効率で期待通りに外来DNA配列が組み込まれ、正常な複眼をもつ復帰変異体を樹立できた。このとき、ドナーDNAとしてplasmid DNA、ssODN (single strand oligo DNA) のどちらを用いてもHRノックインを達成することができた。以上より、TALENを用いたHRノックイン技術をミジンコで確立することができた。

## 第4章 TALENを利用した非相同末端結合による外来遺伝子導入技術の開発

本章では、TALENを用いた非相同末端結合による外来遺伝子導入 (NHEJノックイン) がミジンコに応用可能か調べた。外来DNA配列として、幼若ホルモン依存的にGFPを発現するJHRE::H2B-GFPレポーターカセットをplasmid DNA上に構築した。また、plasmid DNA上にはTALENの標的配列 (*Dma-ey*遺伝子座の一部) も組み込んだ。このplasmid DNAと*Dma-ey* targeting TALEN mRNAを胚に共注入したところ、約3%の効率でGFP蛍光を発するトランスジェニック系統を樹立することができた。得られた3つのトランスジェニック系統のうち、2つでは期待通りplasmid DNA全体が標的である*Dma-ey*遺伝子座に導入されていたが、残りの1つではplasmid DNA全体が別の遺伝子座に挿入されていた。以上より、TALENを用いたNHEJノックイン技術をミジンコで確立することができた。

## 第5章 総括

本研究により、これまでミジンコでは作製が困難だったノックアウト変異体やトランスジェニック個体を、高効率で樹立する技術がそれぞれ確立された。今後はこれらの技術を利用して、ミジンコの遺伝子機能解析や、毒性化学物質依存的に蛍光を発する生体センサーミジンコの樹立といった研究展開が期待される。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 中西 貴士 )	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 教授 渡邊 肇
	副 査 教授 福井 希一
	副 査 教授 村中 俊哉
	副 査
	副 査
	副 査

**論文審査の結果の要旨**

本論文は、淡水性甲殻類の一種であるオオミジンコ (*Daphnia magna*) におけるゲノム編集技術の開発に関する研究をまとめたものであり、得られた主な成果を要約すると以下の通りである。

(1) ゲノム編集ツールのひとつであるCRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR-associated protein) システムがミジンコで機能し、標的遺伝子破壊に利用できることを明らかにした。

(2) (1) で標的とした*eyeless*遺伝子ホモログ*Dma-ey*が、ミジンコで複眼の形態形成に必須であることを示した。

(3) ゲノム編集ツールのひとつであるTALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease) を利用して、相同組換え機構を介した外来遺伝子導入がミジンコでも引き起こせることを明らかにした。

(4) TALENを利用して、非相同末端結合機構を介した外来遺伝子導入がミジンコでも引き起こせることを示した。

以上のように、本論文は甲殻類で初めて標的遺伝子破壊技術ならびに標的遺伝子座への外来遺伝子導入技術を確立したものである。これらの技術はミジンコの遺伝子機能解析などの基礎研究だけでなく、遺伝子組換えミジンコをバイオモニタリングツールとして利用する応用研究まで幅広い分野に大きく貢献するものであるため、本論文は博士論文として価値あるものと認める。