



Title	Development of transgenic <i>Daphnia magna</i> for visualizing homology-directed repair of DNA
Author(s)	Fatimah, Mutiara Rizky
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/89506
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Abstract of Thesis

Name (FATIMAH RIZKY MUTIARA)	
Title	Development of transgenic <i>Daphnia magna</i> for visualizing homology-directed repair of DNA (形質転換体を利用したミジンコにおける相同組換え修復の可視化)
<p>Abstract of Thesis</p> <p>Genomes are threatened by endogenous and exogenous factors, leading to DNA double-strand breaks (DSBs). To ensure genetic stability and cellular viability, repairing the DSBs is essential. Homology-directed repair (HDR) is one of the main pathways to repair DSBs in the genome. Compared with the other pathway (i.e. Non-Homologous End Joining, NHEJ), HDR is capable to repair DSB in high fidelity and errorless manner. Fluorescence live-imaging of the HDR event is essential not only for investigating how and where the genome integrity is maintained but also for evaluating the HDR activity by manipulating the components for DNA repair.</p> <p>In the crustacean <i>Daphnia magna</i>, studying HDR is important to understand genome maintenance during parthenogenesis, the effects of environmental toxicants on the genome, and the improvement of HDR-mediated genome editing. However, there are no tools available to evaluate HDR events in this species. Here, I developed a transgenic <i>D. magna</i> that expresses green fluorescence protein (GFP) upon HDR occurrence.</p> <p>I utilized the previously established reporter plasmid named DR-GFP that has a mutated <i>eGFP</i> gene (<i>SceGFP</i>) and the tandemly located donor <i>GFP</i> gene fragment (<i>iGFP</i>). Upon double-strand break (DSB) introduction on <i>SceGFP</i>, the <i>iGFP</i> gene fragment acts as the HDR template and restores functional eGFP expression. I customized this reporter plasmid to allow bicistronic expression of <i>mCherry</i> gene under the control of the <i>D. magna EF1a-1</i> promoter/enhancer. By CRISPR/Cas-mediated knock-in of this plasmid via non-homologous joining, I generated the transgenic <i>D. magna</i> that expresses mCherry ubiquitously, suggesting that the DR-GFP reporter gene is expressed in most cells. In contrast, this line did not show any eGFP signals under the laboratory culture condition. However, when a DSB in the <i>SceGFP</i> gene was introduced using the Cas9-gRNA complex targeting I-SceI recognition site, the eGFP signal was successfully observed in 80% of samples, indicating the visualization of HDR occurrence in response to the DSB. Furthermore, the eGFP signal was observed broadly in various body parts such as the head and thoracic appendages. This implies that DR-GFP could detect HDR in any tissue.</p> <p>Introducing DSB on the <i>SceGFP</i> resulted in eGFP expression and this HDR event could be detected by fluorescence, genomic PCR, and quantitative reverse-transcription PCR, suggesting this line could be used for evaluating HDR. The established reporter line might expand our understanding of the HDR mechanism and also improve the HDR-based gene-editing system in this important model organism.</p> <p>Publication <u>Fatimah, R. M.</u>, Adhitama, N., Kato, Y., Watanabe, H. (2022). Development of transgenic <i>Daphnia magna</i> for visualizing homology-directed repair of DNA. <i>Scientific Reports</i>, 12, 2497. https://doi.org/10.1038/s41598-022-06526-8</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (FATIMAH RIZKY MUTIARA)			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	教授	渡邊 肇
	副 査	教授	村中 俊哉
	副 査	教授	本田 孝祐

論文審査の結果の要旨

本論文は、遺伝子編集技術を用いてミジンコにおける遺伝子の相同組換えを可視化する技術について報告するもので、全3章から構成されている。

第1章の序論では、単為生殖をするミジンコにおける遺伝子の相同組換えの重要性や遺伝子編集技術開発における相同組換えの位置づけなどを概観し、本技術開発の重要性について述べている。

第2章ではミジンコのゲノム内で相同組換えが生じた際に、当該の細胞を可視化する技術開発とその評価を行っている。相同組換えが生じた細胞の可視化においては2種類の緑色蛍光タンパク質遺伝子を用いている。1つは強力な遺伝子発現制御領域の下流に、変異を導入した緑色蛍光タンパク質遺伝子であり、これ自身では蛍光を発しないように設計している。もう1つは遺伝子発現制御領域を持たないが完全な構造を有する緑色蛍光タンパク質遺伝子を用いている。これら2種類の緑色蛍光タンパク質遺伝子をタンデムに結合させたDNAを遺伝子編集技術を利用してミジンコのゲノム内に導入し遺伝子改変ミジンコの作製に成功している。この遺伝子を導入したミジンコは、通常は緑色蛍光を発しないが、当該遺伝子が相同組換えを起こすと、変異を導入した緑色蛍光タンパク質遺伝子が完全な構造を有する緑色蛍光タンパク質遺伝子に置き換わり、蛍光を発するようにデザインされている。

この遺伝子改変ミジンコの評価を行うために、実際にゲノムDNAをゲノム編集技術を利用して切断し、相同組換えを誘起させることにより、通常は蛍光を発しないミジンコの個体が蛍光を発することを確認している。またこの蛍光が実際に相同組換えによって生じていることを、ゲノムDNAのPCR解析によって確認している。

第3章では第2章の結果をふまえて、その異議と利用法について述べている。

以上のように、本論文は近年その応用範囲が急速に広がっている遺伝子編集技術を向上させるために貢献するのみならず、相同組換えの理解にもつながるツール開発となっており、その意義は大きい。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。