T2R2 東京工業大学リサーチリポジトリ
Tokyo Tech Research Repository

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	ヒトゲノム大規模改変技術の開発と応用
Title(English)	
著者(和文)	大野知幸
Author(English)	Tomoyuki Ohno
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12265号, 授与年月日:2022年6月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:相澤 康則,林 宣宏,清尾 康志,廣田 順二,白木 伸明
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12265号, Conferred date:2022/6/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

Powered by T2R2 (Tokyo Institute Research Repository)

別　　紙　１（論文博士）

論文審査の要旨及び審査員　　（2000字程度）

報告番号	乙 第　　号	学位申請者	大野　知幸	
論文審査員	氏　　名	職　　名	氏　　名	職　　名
	主査　　相澤　康則	准教授	白木　伸明	准教授
	林　宣宏	教授		
	清尾　康志	教授		
	廣田　順二	教授		

本論文は「ヒトゲノム大規模改変技術の開発と応用」と題し、１０章で構成されている。

第１章「序論」では、ヒトゲノム中の 90%以上を占める非コード領域の機能解析が進まない現状を解説している。非コード領域の機能解析をするためには、広いゲノム領域に対して、選択マーカー等の痕跡を残さない改変を両アレルで実施できる技術を確立する必要性があり、それを本論文の目的としたことを述べている。

第２章「ヒトゲノム大規模改変技術の概要」では、新規に考案したゲノム改変技術 Universal Knock-in System（UKiS）の設計原理について解説している。UKiS は、相同組換えによる変異導入を二段階に分けて行うことで、置換効率の向上に選択マーカーを使用しながらも、対象ゲノム領域の両アレルを任意の配列に改変可能であると述べている。

第３章「*TP53* 遺伝子第一イントロンへの変異導入」では、UKiS の有効性を検証するため、疑似二倍体細胞 HCT116 を用い、がん抑制遺伝子 *TP53* の第一イントロン（10.8 kb）に対し欠失や置換などの様々な変異導入を行っている。この結果から、UKiS が 10 kb を超える領域の両アリルを精密に改変するのに有効な技術であると述べている。

第４章「第一イントロン変異が *TP53* 発現に与える影響の検証」では、前章で作製した４種類の第一イントロン変異細胞株における *TP53* 発現解析を定性的および定量的な観点から行っている。各イントロン変異細胞株でのスプライシング構造の変化から、ヒトの *TP53* 第一イントロン内に、適切なスプライシングに必要な配列が存在する可能性を述べている。また、イントロン変異が *TP53* 発現量に及ぼす影響を検証した結果から、第一イントロン内の霊長類特異的配列が *TP53* の発現を抑制している可能性を論じている。

第５章「*TP53* 第一イントロン内の *Alu* 配列の機能解析」では、霊長類特異的レトロトランスポゾンである *Alu* 配列に注目し、ヒト *TP53* 第一イントロン内の *Alu* 配列が *TP53* 発現に与える影響の検証を行っている。*Alu* 配列は *TP53* 第一イントロン内に 17 個存在し、第一イントロン配列の 51%を占めている。これら全ての、あるいは一部の *Alu* 配列を *TP53* 第一イントロン内から UKiS によって除いたのちに *TP53* 発現への影響を検証した結果から、イントロン内の複数の *Alu* 配列が相加的に *TP53* の転写を抑制する機構の存在を示唆している。

第６章「遺伝子の全イントロン欠失が発現に与える影響の検証」では、HCT116 細胞を用いて、*CD44*（94 kb）、*MET*（126 kb）、*APP*（290 kb）の３遺伝子の全イントロンを欠失した細胞の作製を行い、各遺伝子発現へイントロンが与える影響を検証している。その結果から、UKiS が 100 kb を超える長い領域に対しても有効であることと、遺伝子によって転写発現におけるイントロンの必要性が大きく異なることを述べている。

第７章「トリプレットリピート病疾患モデル細胞の作製」では、UKiS を活用し、近年創薬や疾患メカニズム研究などで注目される、疾患モデル細胞の作製を行っている。具体的にはトリプレットリピート病を対象とし、それに属する脊髄小脳変性症２型（SCA2）のモデル細胞作製を試みている。SCA2 は、原因遺伝子とされる *ATXN2* の CAG リピート数が 34 を超えることが発症の原因とされている。本章では UKiS によって、HCT116 細胞内での *ATXN2* の CAG リピート数を改変し、３種類の細胞（両アレルともリピート数が 22 の細胞、両アレルともリピート数が 76 の細胞、一方のアレルでのリピート数が 22、他方のアレルでのリピート数が 76 の細胞）を同時に作製している。さらに、作製した細胞株での *ATXN2* 発現解析の結果から、CAG リピートの伸長が *ATXN2* の発現を抑制することを明らかにしている。

第８章「iPS 細胞への UKiS 適用可能性の検証」では、様々な組織や臓器の細胞に分化可能であり、ゲノムの機能解析や疾患モデル細胞研究において応用性が高い人工多能性幹細胞（iPS 細胞）に対しても、UKiS によるゲノム改変が可能であるかを検証している。その結果、UKiS によって 10 kb を超えるゲノム領域の両アレルを iPS 細胞内で正確に改変可能であることを示している。また UKiS 適用によっても未分化マーカー遺伝子の発現が iPS 細胞内で維持されていることから、UKiS が iPS 細胞のゲノム改変にも有効な技術であると述べている。

第９章「総括」では、以上の結果をまとめ、今後の展望が議論されている。

第１０章「参考文献」では、本論文で引用した文献の情報をまとめている。

以上を要するに、本論文は、ヒトゲノムの機能解析や疾患モデル細胞研究への活用が可能な汎用性の高いゲノム工学技術の

開発とその実用例を報告したものである。そして本技術を応用して、イントロン配列とリピート配列の変異体解析を行い、ヒト遺伝子発現制御における非コード領域の新しい役割を提唱したことは、理学上貢献するところが大きい。よって本論文は、博士（理学）の学位論文として十分な価値があるものと認められる。

注意：「論文審査の要旨及び審査員」は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。