

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)	氏名	中前 和恭
学位授与の要件	学位規則第4条第①・②項該当		
論文題目			
Automated design and detailed profiling of MMEJ-assisted knock-in using a newly constructed computational pipeline (新規に構築したコンピュータパイプラインを利用した MMEJ ノックインの自動設計及び詳細プロファイリング)			
論文審査担当者			
	主 査	教 授	山本 卓
	審査委員	教 授	井出 博
	審査委員	教 授	坂本 敦
	審査委員	講 師	佐久間 哲史
〔論文審査の要旨〕			
<p>ゲノム編集は、人工 DNA 切断酵素を用いて DNA 二本鎖切断 (DSB) を導入し、その修復過程で標的遺伝子の破壊 (遺伝子ノックアウト) や外来遺伝子の挿入 (遺伝子ノックイン) を行う技術である。近年、人工 DNA 切断酵素の CRISPR-Cas9 を用いたマイクロホモロジー媒介末端結合 (MMEJ) による効率的な遺伝子ノックイン技術として PITCh 法および LoAD 法が開発され、様々な培養細胞株や動物種でその有効性が示されている。しかしながら、PITCh 法や LoAD 法に利用する標的 DNA の特徴やドナー DNA のデザインについて、実験解析データを組み合わせた最適化研究は進んでいない。そこで本論文の著者は、MMEJ を介したノックインに関わる要因を明らかにするために、配列設計から解析までを一貫的に実施するソフトウェアパイプラインを開発した。さらに、40 遺伝子座への遺伝子ノックイン実験を行い、その次世代シーケンス (NGS) データから MMEJ ノックインの効率に与える種々の因子の影響を解析した。</p> <p>第一章では、最適な遺伝子ノックインを行うため、MMEJ ノックインの配列デザイン法の定義を行なった。その定義のためのアプローチとして MMEJ ノックインを一貫的に自動設計するソフトウェア “PITCh designer” を JavaScript+HTML5 を用いて開発した。PITCh designer は任意の標的配列の中から MMEJ ノックインのデザインが可能な領域を検索し、一本鎖ガイド RNA (sgRNA) やマイクロホモロジー配列およびドナー構築に必要なプライマー情報などを提供する。これにより基本的な MMEJ ノックインのデザインをコンピュータアルゴリズムのレベルで定義することに成功した。加えて、様々なタイプの CRISPR-Cas9 での MMEJ ノックインを可能とする Web ツールとして公開することにより、ノックインのデザインの利便性を向上した。</p> <p>第二章では、筆者は MMEJ ノックインの傾向を明らかにするための NGS 解析パイプラインとして “MMEJ-assisted chromosomal integration analysis tools (MaChIAto)” を開発した。MaChIAto は、既存の変異解析汎用ツール CRISPResso と連携してより包括的な変異解析および数百種にわたる特徴解析を可能とした。また変異分類をより正確なも</p>			

のへと再分類する機能を搭載した。人工的な配列を用いて解析を行ったところ、その性能は従来の変異分類解析ツールの中でもトップクラスの正確性を示すことが確認された。MaChIAtO の機能性を検証するため、PITCh designer で設計した 40 種類の遺伝子座に対する MMEJ ノックインデータを MaChIAtO により解析した。その結果、40 遺伝子座の全てにおいて PITCh 法および LoAD 法による正確なノックイン NGS データを得ることができた。また PITCh 法でのノックインの正確性は、CRISPR-Cas9 によるインデル形成能力に依存せず、ドナーがもつマイクロホモロジー配列の熱力学的特性、二次構造因子、あるいは配列コンテキストや標的周辺へのアクセス性に依存していることが明らかとなった。さらに、LoAD 法でのノックインでは類似した傾向を示す一方で、PITCh 法でのノックインよりもこれら因子に対する依存性が緩和されていることが示された。次に、MMEJ ノックインと同時に見られるインデルパターンとノックイン効率に着目した解析を行った。高効率なノックインを示した遺伝子座グループでは 3 塩基以上の欠失が多く見られるに対し、低効率なノックインを示した遺伝子座グループでは 1 塩基挿入が高頻度に観察された。これに関して配列的な特徴に注目したところ、高効率なノックインを示した遺伝子座グループは G リッチなマイクロホモロジー配列を介した MMEJ が比較的多く観察され、さらに 3 塩基周期 (6, 9, 12 bp 等) の欠失が顕著に確認された。一方で低効率なノックインを示した遺伝子座グループの中のいくつかの遺伝子座では、CRISPR-Cas9 による切断面の T 塩基のような一塩基誘導性をもつ配列特徴を有していた。これらの結果から、MMEJ ノックインの効率はマイクロホモロジー内の配列存在比のみならず塩基配列の配置にも依存していることが示唆された。以上第二章の結果から、筆者の開発した MaChIAtO の利用により MMEJ ノックインの傾向の理解につながる様々な特徴を推測できる可能性が示された。

以上本研究では、ゲノム編集技術として汎用的な MMEJ ノックインのデザインから解析に至るまでの一連のソフトウェアパイプラインを開発した。これらのツールを利用することで PITCh 法と LoAD 法による遺伝子ノックインの傾向を解析できることを証明し、(エピ)ゲノムコンテキストとインデルパターンがノックインの効果に寄与していることを示唆した。本研究は MMEJ ノックインの傾向を初めて記述した基盤的な成果であるだけでなく、より情報科学的な視点でゲノム工学技術開発を進めるためのプラットフォーム形成にも寄与したと考えられる。

以上、審査の結果、本論文の著者は博士 (理学) の学位を授与される十分な資格があるものと認める。

公表論文

Establishment of expanded and streamlined pipeline of PITCh knock-in - a web-based design tool for MMEJ-mediated gene knock-in, PITCh designer, and the variations of PITCh, PITCh-TG and PITCh-KIKO.

Kazuki Nakamae, Yuki Nishimura, Mitsumasa Takenaga, Shota Nakade, Naoaki Sakamoto, Hiroshi Ide, Tetsushi Sakuma and Takashi Yamamoto.

Bioengineered, 8, 302-308 (2017)

参考論文

Biased genome editing using the local accumulation of DSB repair molecules system.

Shota Nakade, Keiji Mochida, Atsushi Kunii, Kazuki Nakamae, Tomomi Aida, Kohichi Tanaka, Naoaki Sakamoto, Tetsushi Sakuma and Takashi Yamamoto.

Nature Communications, 9, 3270 (2018)