

令和 5年 1月

# 山崎匡太郎 学位論文審査要旨

主査 初 沢 清 隆  
副主査 香 月 康 宏  
同 白 吉 安 昭

## 主論文

Simultaneous loading of PCR-based multiple fragments on mouse artificial chromosome vectors in DT40 cell for gene delivery

(DT40細胞が保持するマウス人工染色体上へ遺伝子搭載を行うための複数PCR断片同時搭載法)

(著者：山崎匡太郎、松尾京亮、岡田茜、宇野愛海、鈴木輝彦、阿部智志、濱道修生、岸間菜々美、兎谷翔太、冨塚一磨、香月康宏)

令和4年 Scientific Reports 12巻 Article number: 21790

## 参考論文

1. Efficient human-like antibody repertoire and hybridoma production in trans-chromosomic mice carrying megabase-sized human immunoglobulin loci

(Mbスケールのヒト抗体遺伝子座を保持するトランスクロモソミックマウスを用いた効率的なヒト様レパトア抗体およびハイブリドーマの作製)

(著者：里深博幸、阿部智志、森脇崇史、岡田茜、香月加奈子、田中博志、山崎匡太郎、飛知和弦輝、森本佳世子、高山悠、中山祐二、畑野晋也、矢田裕太郎、村上康文、馬場義裕、押村光雄、冨塚一磨、香月康宏)

令和4年 Nature Communications 13巻 Article number: 1841

# 学位論文要旨

## Simultaneous loading of PCR-based multiple fragments on mouse artificial chromosome vectors in DT40 cell for gene delivery

(DT40細胞が保持するマウス人工染色体上へ遺伝子搭載を行うための複数PCR断片同時搭載法)

生命現象の解明、疾患原因の探索、治療法の開発などにおいて、遺伝子改変細胞・動物を用いる方法は非常に有用である。マウス／ヒト人工染色体ベクター (MAC/HAC) は、従来法では作製が難しい長大なゲノム領域・複数の遺伝子を搭載可能で、宿主の発現制御に従うという特徴を持つことから、遺伝子改変細胞・動物の作製において大きな役割を果たしてきた。一方で、MAC/HACに遺伝子やゲノム領域を搭載する過程において、1遺伝子を搭載するごとに細胞の単離・解析が必要、同時に搭載できる遺伝子数が3つまで、専用のベクターへのクローニングが必要、という課題が残されていた。そこで本研究では、迅速かつ簡便にMAC/HACへ複数断片の搭載を可能とする、相同組換え修復を介した複数断片同時搭載 (simHDR) 法を開発した。相同組換え修復効率が高いニワトリB細胞株DT40細胞と、標的部位への相同組換えによるノックイン頻度を高めるCRISPR/Cas9を用いることで、simHDR法はこれまでの上限であった3断片以上を同時に搭載可能であり、それぞれの断片はPCRで調製が可能であることが示された。simHDR法によって、MAC/HACを用いた遺伝子改変細胞・動物の作製が高速化することで、生命現象の解明、疾患原因の探索、治療法の開発など、さまざまな分野への波及効果が期待される。

## 方法

マウス10番染色体から作製されたMAC (10MAC2) を保持するDT40細胞を用いて以下3実験を行うことでsimHDR法のコンセプトおよび応用例を示した。全ての実験で、HDRドナーをPCRで調製し、DT40細胞へエレクトロポレーションで導入した。同時に10MAC2上の標的部位に2本鎖切断を起こすcrRNA-Cas9複合体を導入し、蛍光マーカーと薬剤選抜によって細胞を単離した。単離した細胞からゲノムDNAを抽出し、PCRによる解析、組換え部位の配列解析に供した。また、単離した細胞から染色体標本を作製し、染色体解析に供した。1) 複数のPCR断片を一度の操作で10MAC2上へ搭載可能かを検討するために、1~4断片を調製し搭載した。2) simHDR法において相同組換えに必要な相同配列長を検討するために、相

同配列長が622-bp、300-bp、60-bpである断片を搭載した。3) ゲノム領域を大腸菌などの組換え生物を介したクローニングを経由せずに10MAC2上へ搭載することが可能か検討するために、ヒトHepG2細胞のゲノムDNAからHLA-A領域をPCRで増幅し、10MAC2へ搭載した。

## 結 果

方法に示した1)、2)、3) に対応する以下の結果を得た。1) 1断片から4断片までの全ての条件から目的配列が10MAC2へ搭載された細胞を単離した。組換え部位の配列から想定外の変異は見出されず、染色体解析から10MAC2以外の領域へのHDRドナーのランダム挿入は検出されなかった。2) 相同配列長を変えた全ての条件から目的配列が10MAC2へ搭載された細胞を単離した。組換え部位の配列から想定外の変異は見出されず、simHDR法において60-bpの相同配列で十分に正確な搭載が可能であることが示された。3) ゲノムDNAから調製したHLA-A遺伝子およびその上流下流に存在する発現制御領域が10MAC2へ搭載された細胞を単離した。組換え部位の配列解析、染色体解析、mRNAおよびタンパク質の発現解析により、HLA-Aのゲノム領域が想定通りに10MAC2上へ搭載されていることを示した。

## 考 察

今回の研究では10MAC2で検証を行なったが、最適なcrRNAの設計と相同配列を用いることでこれ以外のMAC/HACにも応用が期待できる汎用的な手法である。当初断片数が増えるに従って得られるクローン数は減少すると予想したが、4断片と1断片の条件の間に有意差は認められなかった。これは設計上、断片数が増えるに伴い断片の配列長が短くなるため、各断片の導入効率と全断片が導入される効率の総和が同程度になることが原因と考えられる。さらに長い断片、多くの断片をsimHDR法で搭載する際、導入効率、組換え効率の向上は重要な検討項目である。単離した細胞のjunctionを解析した際、目的通りの組換え体が得られる効率は、1断片よりも複数断片で高い傾向にあった。これは組換え部位を蛍光マーカーや薬剤耐性遺伝子にすることで、ランダム挿入のクローンが得られにくくなっていることが示唆され、simHDR法を用いる際の重要な指針となる。

## 結 論

本研究では、MAC/HACに複数断片を同時搭載可能なsimHDR法を開発することに成功した。本技術は、搭載に必要な工程の短縮、同時搭載可能な上限、という従来法の課題を解決し、染色体工学技術の発展に寄与した。さらには、遺伝子改変細胞・動物の作製迅速化にも貢献しさまざまな分野への波及効果が見込める。