

学位論文要旨

Functional analysis of thyroid hormone receptor beta in *Xenopus tropicalis* using genome editing technology

(ネッタイツメガエルにおけるゲノム編集技術を用いた甲状腺ホルモン受容体 β の機能解析)

広島大学大学院理学研究科 数理分子生命理学専攻

氏名 坂根 祐人

1. 研究の背景と目的

甲状腺ホルモン (TH) は脊椎動物の発生や成長、代謝などにおいて重要な役割をもっており、その作用は 2 つの甲状腺ホルモン受容体 (TR α および TR β) を介して起こることが知られている。TR は核内受容体スーパーファミリーに属する転写因子であり、TH 応答遺伝子の転写を TH 依存的に促進または抑制する。両生類は変態というユニークな発生様式を有しており、TH 依存的に幼生組織を消失あるいは成体組織へと再構築することによって、幼生型から成体型へと体制を変換させる。これまでに両生類のモデル生物であるツメガエルにおいて、変態に関連する TH 応答遺伝子が数多く同定されてきたが、これらの遺伝子機能解析はほとんど進んでいない。その理由として、両生類における実用的な標的遺伝子破壊法が確立されていなかったことが挙げられる。近年、ゲノム編集技術を用いたノックアウトやノックイン法の開発は、様々なモデル生物を用いた生物学においてブレイクスルーをもたらしている。そこで、本研究では、ツメガエルにおいてゲノム編集技術を用いた遺伝子破壊法を確立し、変態に重要と考えられる *tr β* 遺伝子の機能解析を行うことを目的とした。

2. アフリカツメガエルにおける遺伝子破壊法の確立 (第 1 章)

アフリカツメガエルは古くから生物学に用いられているモデル生物であるが、異質 4 倍体であるために遺伝子機能解析には機能冗長性のある 2 つの相同遺伝子 (ホメオログ) を同時に破壊する必要がある。そこで、人工 DNA 切断酵素である transcription activator-like effector nuclease (TALEN) を用いて遺伝子破壊を試みた。TALE リピートのアミノ酸バリエーションに注目し、それらを周期的に組み合わせた従来型より高い活性を示す TALEN (Platinum TALEN) を用いて、色素合成に関連する *tyr* 遺伝子のホメオログ (*tyr.L*, *tyr.S*) と *egfp* 遺伝子の複数遺伝子同時破壊および *npm3* 遺伝子のホメオログ同時破壊に成功した。これらの結果は、アフリカツメガエルにおいて TALEN を用いた遺伝子破壊が有効であることを示している。

3. ネッタイツメガエルにおける遺伝子破壊法の確立 (第 2 章)

アフリカツメガエルの近縁種であるネッタイツメガエルは 2 倍体であることや、性成熟に要する時間が短いことなどの利点から、アフリカツメガエルよりも遺伝子破壊法をベースにした遺伝子機能解析に適したモデル生物である。clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-CRISPR associated (Cas) (CRISPR-Cas) システムは、構築の簡便性と迅速性に加えて、Cas9

ヌクレアーゼを mRNA の代わりにタンパク質として導入できることから、より早期に高効率な遺伝子破壊が期待できると考えた。そこでまず、色素合成関連遺伝子 (*tyr, oca2, tyrp1, slc45a2*) と眼形成関連遺伝子 (*pax6*) の破壊をモデルに、sgRNA と Cas9 ヌクレアーゼをリボヌクレオタンパク質 (RNP) としてネッタイツメガエル受精卵に導入し、高効率な遺伝子破壊の条件検討を行った。その結果、ファウンダー (F0) 世代で非常に高い効率で遺伝子破壊の表現型個体を作成できる条件を設定することに成功した。これら CRISPR-Cas システムを用いて作製した遺伝子破壊個体 (以下、*crispant* と呼ぶ) の標的ゲノム領域を次世代シーケンサーにより解析したところ、非常に高い変異導入効率 (体細胞変異率 99%以上) であることが分かった。本研究で得られた成果より、CRISPR-Cas の RNP 導入は、ネッタイツメガエルの F0 世代において簡便かつ高効率な遺伝子破壊法であることが示された。

3. ネッタイツメガエルにおける甲状腺ホルモン受容体 β の機能解析 (第3章)

TR は、両生類の変態における TH シグナル伝達経路の最上流に位置する。特に、TR β は生体内の TH 濃度が上昇するとポジティブフィードバック制御によってその発現が劇的に上昇することから、変態のマスター制御因子として考えられている。そこで、第2章でネッタイツメガエルにおいて確立した CRISPR-Cas システムを用いて *tr β* 遺伝子破壊個体 (*tr β crispant*) を作製し、変態における TR β の機能解析を行った。*tr β* 遺伝子のコード領域およびスプライスドナーサイトを標的とした sgRNA を作製し、sgRNA/Cas9 RNP として受精卵に導入したところ、標的配列への変異導入による遺伝子破壊およびスプライシングエラーが確認された。次に TH への応答能を調べるために、変態前期のオタマジャクシに TH (Triiodothyronine; T3) を暴露したところ、コントロール個体では後肢の発達やエラの退縮といった顕著な変態現象が誘導されたが、*tr β crispant* ではエラの退縮が抑制された。T3 曝露個体における TH 応答遺伝子の発現をリアルタイム RT-PCR 法で解析したところ、*tr β crispant* では転写因子である *klf9* や *fra-2* の発現は誘導されたが、プロテアーゼである *mmp13* や *fapa* の発現は誘導されなかった。また、自然変態における *tr β* 遺伝子欠損の影響を調べたところ、*tr β crispant* はコントロール個体と比較して尾の退縮が有意に遅延することが明らかになった。しかし、最終的に *tr β crispant* の尾は完全に吸収され、自然変態を完了した。また、幼生に特徴的な触角の退縮も同様に遅延した。一方、変態に際して再構築される小腸では *tr β crispant* においても成体に特徴的なヒダ構造が観察された。さらに、*tr β crispant* 同士を掛け合わせた F1 世代の *tr β* 変異体でも、F0 個体同様に完全な変態が観察された。

以上の結果より、ネッタイツメガエルの変態において TR β は、プロテアーゼ遺伝子の発現誘導を担い、幼生組織の退縮のタイミングを制御している可能性が示唆された。一方で、TR β の欠損はすべての TH 応答遺伝子の発現誘導および変態の開始には影響しない。これらの結果は、TR α と TR β の部分的な代償やサブタイプ特異的な機能を持つ可能性を示唆する。

まとめ

本研究では、アフリカツメガエルとネッタイツメガエルの両種においてこれまで困難であった遺伝子破壊をベースにした遺伝子機能解析法の確立に成功した。さらにこの技術を用いて、ネッタイツメガエルの変態における TR β の機能を示唆する結果が得られた。以上の研究成果は、両生類変態の分子機構および TH の発生・成長への役割の解明に重要な知見をもたらすことが期待される。