

## 論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 ( 理 学 )	氏名	中井 裕也
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 ①・② 項該当		
<p>論文題目</p> <p>Reexamination of the immunological rejection model on tail regression during anuran metamorphosis (無尾両生類の変態での尾部退縮に関する拒絶反応説の再検討)</p>			
<p>論文審査担当者</p> <p style="text-align: center;">主 査 教 授 矢尾板 芳郎</p> <p style="text-align: center;">審査委員 教 授 安井 金也</p> <p style="text-align: center;">審査委員 教 授 菊池 裕</p>			
<p>[論文審査の要旨]</p> <p>アフリカツメガエルやネッタイツメガエルなどの無尾両生類の変態は、全身のほぼすべての器官や組織の作り替えを介して、水棲の幼生が陸棲のカエルへと変身する現象である。その中でも最も際立っているのは尾の退縮である。体長の 2、3 倍ある尾が数日で無くなる。その仕組みを説明するものとして 3 つの説が考えられている。第一の説として自殺説がある。これは、変態誘導ホルモンである甲状腺ホルモンが、尾の細胞に直接作用し、アポトーシスが誘導されるというものである。第二の説として他殺説がある。これは、甲状腺ホルモンが作用した尾の細胞が、細胞外基質分解酵素を大量に発現して、細胞外基質が融解し、細胞が付着する場所を失うことによってアポトーシスが誘導されるというものである。そして、第三の説として免疫学的拒絶反応説がある。この説では、幼生期には全身の表皮で発現している <i>Ouro1</i>、<i>Ouro2</i> 蛋白質が、尾の退縮が始まる直前から尾の表皮のみで発現するようになり、成体型となった免疫機構により <i>Ouro</i> 蛋白質が非自己として認識され、尾が拒絶されるという説である。現在、この免疫学的拒絶反応説が最も有力な仮説として考えられている。今回、申請者はこの免疫学的拒絶反応説を検討するため、<i>ouro1</i>、<i>ouro2</i> 遺伝子を破壊したノックアウトガエル、そして拒絶反応に重要な役割を果たす T 細胞が形成される器官である胸腺の形成に必要な転写因子 <i>Forkhead-box n1 (Foxn1)</i> 遺伝子を変異させたノックアウトガエルをそれぞれ作製して解析した。</p> <p>免疫学的拒絶反応説におけるこれまで研究では、アフリカツメガエルを用いて進められてきた。しかし、四倍体であるためノックアウト作製が困難であり、しかも、成熟するに要する期間も長い。そのため本研究では、アフリカツメガエルの近縁種の二倍体で、成熟するまでの期間が短いネッタイツメガエルを使用した。</p> <p>まず、ネッタイツメガエルの発生過程における <i>ouro</i> mRNA や <i>Ouro</i> 蛋白質の発現パターンを調べて、アフリカツメガエルの発現パターンと同様であることを確認した。そして、TALEN 法により <i>ouro1</i>、<i>ouro2</i>、そして <i>Foxn1</i> の各遺伝子を破壊したノックアウトガエルをそれぞれ作製した。</p> <p>ノックアウトガエルを作製するため、まず、各標的遺伝子を破壊できるように設計した TALEN mRNA を合成し、それを野生型の受精卵に注入して、F0 個体を作った。F0 個体では</p>			

細胞ごとに様々な遺伝子変異を有するキメラ個体になっている。この F0 同士を交配させることで、一個体内での全ての細胞が同じ遺伝子型を共有する F1 の個体を得た。得られた F1 の遺伝子型の解析結果、標的とする両方の対立遺伝子が **out-of-frame** か、もしくは開始コドンを含み数百塩基にわたる欠失変異であると証明されたカエルを、目的遺伝子がノックアウトされているものと判断した。

*ouro1* 遺伝子をノックアウトした個体では、期待通り、幼生の尾の表皮での *ouro1* mRNA の発現量が野生型と比べて激減しており、**Ouro1** 蛋白質は検出されなかった。さらに、尾の表皮での **Ouro2** 蛋白質の発現量も減少し、かろうじて検出される程度であった。**Ouro1** 蛋白質と **Ouro2** 蛋白質は、これまでの研究で複合体を作るということが示唆されている。*ouro1* 遺伝子のみをノックアウトしたにも関わらず **Ouro2** 蛋白質の発現量が減少していたのは、**Ouro1** 蛋白質が欠失したことで **Ouro2** 蛋白質の安定性が低下し、分解されたことが原因と考えられる。

一方、*ouro2* 遺伝子をノックアウトした個体では、尾の表皮で *ouro2* mRNA の発現量が野生型と比べて激減しており、**Ouro2** 蛋白質は検出されなかった。同様に表皮での **Ouro1** 蛋白質の発現量も検出限界付近の発現であった。これは *ouro1* ノックアウト個体で **Ouro2** 蛋白質の発現量の減少が観察された理由と同様に、**Ouro1** 蛋白質の安定性が崩れ、分解されたことが考えられる。

これらの *ouro1*、*ouro2* 各ノックアウト個体において、尾の退縮への影響を調べた。尾の退縮が始まる発生段階から、尾の長さが体長の 1/10 になるまでにかかる期間を測定した。その結果、*ouro1*、*ouro2* ノックアウト個体の尾は、どちらの場合でも野生型と同様の時間的経過で退縮していた。つまり **Ouro1** 蛋白質と **Ouro2** 蛋白質が同時に欠失、もしくは発現低下した場合でも尾は正常に退縮することが明らかとなった。

胸腺上皮に発現し、胸腺の形成に必要とされる転写因子である *Foxn1* 遺伝子をノックアウトした個体では、胸腺が形成されず、脾臓における細胞傷害性 T 細胞の量が激減していることが確認された。さらに、*Foxn1* ノックアウト個体に、異系統のカエルの皮膚を移植したところ、この皮膚は生着し拒絶反応は見られなかった。つまり、*Foxn1* ノックアウト個体は、非自己組織に対する拒絶反応機構が働かない免疫不全ガエルになっている。この個体においての尾の退縮過程を調べたところ、野生型と同様の時間的経過で尾は退縮した。この結果から、非自己組織に対する拒絶反応機構が働かない場合でも、尾は正常に退縮することが明確となった。

したがって、申請者は拒絶反応の抗原として働くと提唱された **Ouro1**、**2** 蛋白質が尾表皮で欠失している幼生でも、非自己組織に対する拒絶反応が生じない幼生でも、尾は問題無く退縮することから、変態時の尾の退縮メカニズムの一つである「**Ouro** 蛋白質を抗原とする免疫学的拒絶反応説」は少なくともネッタイツメガエルでは起きていないことを証明した。

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

Ouro proteins are not essential to tail regression during *Xenopus tropicalis* metamorphosis

Yuya Nakai, Keisuke Nakajima, Jacques Robert and Yoshio Yaoita

*Genes to Cells*, 2016, in press

参考論文

Targeted gene disruption in the *Xenopus tropicalis* genome using designed TALE nucleases

Keisuke Nakajima, Yuya Nakai, Morihiko Okada & Yoshio Yaoita

*Zoological Science*, **30**(6) 455-460, 2013