

学位論文要旨

Functional analysis of autophagy-related genes using CRISPR-Cas9 during metamorphosis of *Xenopus tropicalis*

(ネッタイツメガエルの変態過程における CRISPR-Cas9 を用いたオートファジー関連遺伝子の機能解析)

広島大学大学院理学研究科 数理分子生命理学専攻 重田 美津紀

1. 研究背景と目的

両生類は、古くから細胞生物学や発生生物学、内分泌学、生理学等の基礎生物学に多大な貢献をしてきた実験動物である。中でもネッタイツメガエル(*Xenopus tropicalis*)は、遺伝子機能解析の容易さから現在ではモデル生物として広く応用されるようになってきている。両生類は水生から陸生への環境に適応するために変態という特徴的な生命現象を経て、幼生から成体へと体をダイナミックに変化させる。尾や鰓は消失し、また腸や膵臓、表皮や赤血球は幼生型から成体型へと作り替わる。しかしこの間、摂食をしないことから、変態中は体内で大規模な栄養のリサイクルが起きているものと考えられる。つまり両生類の変態時に幼生の組織が分解され、成体型の組織を作る材料となっている可能性がある。私はこのプロセスに、不要な物質を除去すると同時に、その分解産物を栄養素として細胞に供給するという二つの役割をもつオートファジーが関与しているのではないかと考えた。

オートファジーとは細胞質成分をリソソームへ運び込み分解する機構である。その後生じたアミノ酸や脂質、糖などは再利用される。近年の様々な生物種での解析により、オートファジーは飢餓応答、初期発生や細胞分化などのさまざまな生命現象に深く関わることが明らかになってきた。中でも最も重要な機能は飢餓応答であり、オートファジー関連(*autophagy-related: ATG*)遺伝子欠損個体の中には栄養飢餓時において分化や発生において様々な異常を呈する。オートファジーのプロセスは多くの *Atg* 因子により制御されることが示されているが、これらは酵母から哺乳類まで広く保存されているため、オートファジーの機能解析には逆遺伝学的なアプローチが有効である。そこでゲノム編集技術の中でも簡便かつ汎用性が高い *clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-Cas9* を用いてネッタイツメガエルの *atg* 遺伝子をノックアウトした個体を作製し、変態におけるオートファジーの機能解析を目指した。

ネッタイツメガエルは次世代を得るまでに一年程度の期間が必要なため、ファウンダー(F0)での機能解析が望ましく、そのためには効率的なノックアウト技術が必要である。加えて、ゲノム編集技術を介したノックアウトにより作製した F0 はモザイク状に変異が導入されるため、個体中の体細胞変異率を評価するために簡便かつ精度の高い変異率の算出法の開発も必要不可欠である。私は、まずネッタイツメガエルにおける CRISPR-Cas9 を用いた高効率で簡便な遺伝子機能解析法の確立を目指し、さらにこのワークフローを用いて F0 個体で変態時におけるオートファジー関連遺伝子の機能解明を試みた。

2. CRISPR-Cas9 を用いた高効率な遺伝子機能解析法の確立(第1章)

まずメラニン合成酵素をコードする *tyrosinase(tyr)* を標的として、Cas9ヌクレアーゼを mRNA とタンパク質で導入し、変異導入効率を比較した。mRNA インジェクションでは mRNA の合成を工夫し、タンパク質インジェクションではバッファの組成を検討した。その結果、mRNA の導入によってほぼ完全なアルビノ表現型を示す個体をタン

パク質導入時と同程度の割合で得ることができ、目立った毒性も見られなかった。次に、Cas9 ヌクレアーゼ mRNA による遺伝子ノックアウトのモデルとして色素合成関連遺伝子である *solute carrier family 45 member 2 (slc45a2)*、*leukocyte tyrosine kinase (ltk)* を破壊した結果、*tyr* と同様にそれぞれ大部分の色素を欠いた個体を得ることができた。アンプリコンシーケンス解析の結果、これらの表現型を示す個体において 95% 以上の高効率な体細胞変異率を確認できた。

次に、体細胞変異率の効率的な解析法(ジェノタイピング法)として、リコンビナント Cas9 ヌクレアーゼと restriction fragment length polymorphism (RFLP) を組み合わせた RNA-guided engineered nuclease (RGEN)-RFLP を確立した。色素関連遺伝子をそれぞれ破壊した様々な表現型の個体を RGEN-RFLP とアンプリコンシーケンスにより体細胞変異率を算出し比較したところ、高い相関を示した。このことは RGEN-RFLP が、アンプリコン解析に匹敵する正確性と従来の RFLP 法の簡便さを兼ね揃えたジェノタイピング法であることを示している。また、類似した配列に変異を導入するオフターゲット作用を簡便に検出する方法を確立し、得られた遺伝子破壊個体にもほとんどオフターゲット作用がないことも示した。以上の結果から、他の生物種にも応用可能な高効率な遺伝子機能解析のワークフローを確立することができた。

3. ネットアイツメガエルファウンダーを用いた変態時の *atg5* と *atg7* の機能解析(第 2 章)

次に第 1 章で確立されたワークフローを用いることにより、オートファゴソーム形成に関わる *autophagy-related 5 (atg5)* と *autophagy-related 7 (atg7)* をダブルノックアウト(DKO)した F0 個体を作製し、変態におけるそれらの遺伝子機能の解析を行った。コントロール群は、それぞれの遺伝子を標的とする sgRNA の配列にミスマッチを導入し、目的遺伝子を切断しない sgRNA を等量導入して作製した。DKO 個体に関してジェノタイピングを行ったところ、90% 以上の高効率な体細胞変異率を確認できた。

DKO 個体は外見的にはほぼ正常な状態で発生したが、変態期ではコントロール群と比較して体重の減少が見られた。さらに、変態期での死亡率の劇的な増加が観察された。このことは、オートファジーが栄養のリサイクルに必要なものであるという見解に一致し、変態という飢餓状態において栄養の転換が起きていない可能性が示唆された。

次に変態期における *atg5* と *atg7* の機能を推定するため、幼生型から成体型への体制の変換に着目して以下の解析を行った。まず DKO 個体の様々な組織や器官の組織切片を作製し、HE 染色により組織学的解析を行った。しかし幼生型から成体型への変換が起こる表皮や小腸には、組織学的な目立った異常は確認されなかった。次に、変態期で起こる幼生型から成体型への赤血球の変換に注目し、それぞれの赤血球に特異的なグロビン遺伝子の発現を検証した。その結果、幼生型グロビン遺伝子の発現量に差はみられなかったのに対し、成体型グロビン遺伝子の発現量の減少が確認された。さらに血球計算版にて赤血球数を調べたところ、赤血球数が 7 割程度に減少していた。以上のことから、*atg5* と *atg7* は変態期における幼生型から成体型への赤血球の変換に関与していることが示唆された。

4. まとめ

本研究により、ネットアイツメガエルにおける CRISPR-Cas9 を使った遺伝子機能解析を F0 個体で可能とするワークフローを確立した。さらに未だ両生類での報告のない *atg* 遺伝子欠損個体を用いて、変態におけるオートファジーの役割を精査する研究を行った。これらの研究成果から、ネットアイツメガエルにおいて *atg5* と *atg7* は変態時の赤血球の変換に重要な働きを担うことが示唆され、今後の両生類の変態におけるオートファジーの意義を調べるための重要な知見となることが期待される。