

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)	氏名	重 田 美 津 紀
学位授与の要件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目			
<p style="text-align: center;">Functional analysis of autophagy-related genes using CRISPR-Cas9 during metamorphosis of <i>Xenopus tropicalis</i></p> <p style="text-align: center;">(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)</p>			
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	教 授	小原 政信
<p>両生類は、変態によって幼生から成体へと体の構造をダイナミックに変化させる。変態過程の幼生では、尾や鰓の消失に加えて腸や脾臓、表皮や赤血球が幼生型から成体型へと作り替わる。これらの過程で幼生は摂食を行わないことから、体の作り替えに必要な物質は、体内での栄養リサイクルに依存していると考えられる。そこで本論文の著者は、両生類の変態過程において、不要な物質の除去と分解産物の再利用に重要なオートファジーが関与することを明らかにする目的で、ゲノム編集技術を用いたネッタイツメガエル (<i>Xenopus tropicalis</i>) のオートファジー関連 (autophagy-related: <i>ATG</i>) 遺伝子の機能破壊を試みた。</p> <p>第 1 章では、ネッタイツメガエルでの clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-CRISPR associated protein 9 (Cas9) を用いた効率的な標的遺伝子破壊法の確立を行った。CRISPR-Cas9 は、標的遺伝子を短鎖 RNA (sgRNA) と Cas9ヌクレアーゼによって切断するシステムである。筆者はまず、メラニン合成酵素をコードする <i>tyrosinase (tyr)</i> 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 の合成法を改良し、タンパク質インジェクションではバッファーの組成を検討した。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、目立った毒性も検出されなかった。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 <i>solute carrier family 45 member 2 (slc45a2)</i>、<i>leukocyte tyrosine kinase (ltk)</i> を破壊した結果、<i>tyr</i> と同様にそれぞれ色素を欠いた個体を得られ、標的配列のアンプリコンシーケンス解析の結果、95% 以上の高効率な体細胞変異率が確認された。次に、両生類での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</p>			

ころ、高い相関を示した。この結果から、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た。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。

第 2 章では、まずオートファゴソーム形成に関わる *autophagy-related 5 (atg5)* と *autophagy-related 7 (atg7)* の発生過程における発現を RT-PCR により調べた。その結果、*atg5* は母系因子として存在し、変態期においても強く発現する一方、*atg7* は母系因子としてほとんど存在せず、変態期に強く発現することが示された。次に、第 1 章で確立し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 *atg5* と *atg7* を破壊したダブルノックアウト(DKO)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。このことから、*atg5* と *atg7* が変態に関与している可能性が示唆された。さらに変態期における *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、組織学的解析を行った。しかしながら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ることがわかった。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明らかになった。

以上の結果から、ネッタイツメガエルにおける CRISPR-Cas9 を使った遺伝子機能解析を可能とするワークフローが確立された。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。本研究成果から、ネッタ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研究として高く評価される。

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

Rapid and efficient analysis of gene function using CRISPR-Cas9 in *Xenopus tropicalis* founders.

Mitsuki Shigeta, Yuto Sakane, Midori Iida, Miyuki Suzuki, Keiko Kashiwagi, Akihiko Kashiwagi, Satoshi Fujii, Takashi Yamamoto and Ken-ichi T. Suzuki.

Genes to Cells, 21, 755-771 (2016)