

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)	氏名	坂 根 祐 人
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>Functional analysis of thyroid hormone receptor beta in <i>Xenopus tropicalis</i> using genome editing technology</p> <p>(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)</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	准教授	坂本	尚昭
<p>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 (TRα および TRβ) 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。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 trβ 遺伝子の機能解析を行うことを目的とした。</p> <p>第 1 章では、アフリカツメガエルにおける遺伝子破壊法の確立を行った。アフリカツメガエルは古くから用いられている両生類の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った。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 <i>tyr</i> 遺伝子のホメオログ (<i>tyr.L</i>, <i>tyr.S</i>) と <i>egfp</i> 遺伝子の複数遺伝子同時破壊および <i>npm3</i> 遺伝子のホメオログ同時破壊に成功した。これらの結果から、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た。</p> <p>第 2 章では、ネッタイツメガエルにおける遺伝子破壊法の確立を試みた。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</p>			

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。これらの成果から、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。

第 3 章では、ネッタイツメガエルにおける甲状腺ホルモン受容体 β (TR) の機能解析を行った。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 の発現が促進された。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。しかしながら、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。

以上の結果から、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。これらの研究成果は、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

Targeted mutagenesis of multiple and paralogous genes in *Xenopus laevis* using two pairs of transcription activator-like effector nucleases..

Yuto Sakane, Tetsushi Sakuma, Keiko Kashiwagi, Akihiko Kashiwagi, Takashi Yamamoto and Ken-ichi T. Suzuki.

Development, Growth & Differentiation 56: 108-114 (2014)

Functional analysis of thyroid hormone receptor beta in *Xenopus tropicalis* founders using CRISPR-Cas.

Yuto Sakane, Midori Iida, Takashi Hasebe, Satoshi Fujii, Daniel R. Buchholz, Atsuko Ishizuya-Oka, Takashi Yamamoto and Ken-ichi T. Suzuki.

Biology Open 7 (2018)

参考論文

Repeating pattern of non-RVD variations in DNA-binding modules enhances TALEN activity.

Tetsushi Sakuma, Hiroshi Ochiai, Takehito Kaneko, Tomoji Mashimo, Daisuke Tokumasu, Yuto Sakane Y, Ken-ichi Suzuki, Tatsuo Miyamoto, Naoaki Sakamoto, Shinya Matsuura and Takashi Yamamoto.

Scientific Reports 3: 3379 (2013)