

学位論文要旨

Functional analysis of a cis-regulatory element of *sonic hedgehog* gene in newt limb regeneration

(イモリ四肢再生におけるソニックヘッジホッグ遺伝子シス調節エレメントの機能解析)

広島大学 大学院理学研究科 数理分子生命理学専攻
氏名 鈴木 美有紀

1. 研究の背景と目的

ソニックヘッジホッグ遺伝子 (*Shh*) は四肢発生において肢芽後方で発現し、肢の前後軸決定に重要な役割を果たす。*Shh* の四肢エンハンサー (ZRS) は脊椎動物間で高度に保存されており、プロモーターから約 100 万塩基対 (Mb) 離れた位置に存在している。マウスにおいて ZRS をノックアウトすると *Shh* の四肢特異的なコンディショナルノックアウトと同様に前後軸パターンを失った四肢短縮を示す。近年、様々な脊椎動物の比較ゲノムにより、四肢をもたないヘビ垂目の ZRS において特異的に失われている 17 塩基対 (bp) の配列が見つかった。マウス内在の ZRS をヘビ ZRS と置換すると *Shh* は発現せず四肢短縮の表現型を示すが、この“ヘビ垂目特異的欠失配列”を補完したヘビ ZRS と置換した場合は正常に四肢発生するため、この配列は ZRS において機能的に重要であると考えられる。

有尾両生類をはじめとする一部の生物は失った器官を再生することが可能である。阻害剤投与や過剰発現実験の結果から、*shh* は両生類の四肢再生においても必要不可欠であることが証明されている。無尾両生類であるアフリカツメガエルは、幼生 (オタマジャクシ) の頃は完全に四肢を再生させることができるが、成体は指をもたない不完全な四肢しか再生できない。その原因の一つとして、変態に伴って ZRS 領域が高度にメチル化されることが挙げられており、ZRS を介した *shh* の再活性化が四肢再生の鍵を握っていると考えられている。本研究では四肢再生における ZRS の重要性を明らかにするため、繁殖が容易で実験に適した新規の器官再生モデル動物であるイベリアトゲイモリ (*Pleurodeles waltl*; 以下、イモリ) においてゲノム編集技術を用いた遺伝子ノックアウト法を確立したのち、イモリ ZRS に変異を導入することによって *shh* の発現および四肢発生・再生時の表現型を解析した。

2. イベリアトゲイモリにおける CRISPR-Cas9 を用いた高効率な遺伝子ノックアウト法の確立

有尾両生類は一般的に性成熟に要する期間が長く、迅速な遺伝子機能解析を行うためには F₀ 世代で高効率な遺伝子破壊を行うことが重要である。イベリアトゲイモリにおける CRISPR-Cas システムの有用性を検証するため、メラニン色素合成酵素であるチロシナーゼ (Tyr)、眼形成のマスターレギュレーターである Pax6、および前肢の発生に必須である Tbx5 の各遺伝子の破壊を試みた。tyr を標的とした sgRNA とリコンビナント Cas9 タンパク質のリボヌクレオタンパク質複合体 (Cas9/sgRNA RNP) を受精卵に導入した結果、導入した全ての胚において全身で色素が欠失したアルビノの表現型を示した。さらに、F₀ 世代における変異導入効率を正確に評価するため、これらの胚からゲノムを抽出して標的領域をディープシーケンシングにより解析した。各個体 1 万リード以上解析しても野生

型のアレルが 1%以下、中には全く検出されない個体も存在した。つまり当世代でありながらほぼすべての体細胞において両アレルで変異が導入されていることが明らかとなった。*pax6*、*tbx5*についても同様に非常に高い変異導入効率が示され、 F_0 世代での高効率な遺伝子ノックアウトの系を確立することができた。さらに、イペリアトゲイモリは他の有尾両生類と比べて性成熟に要する期間が短いという利点を生かし、*tyr* を破壊した個体からホモで変異アレルをもつ子孫 (F_1) を 1 年以内に取得できることを示した。この方法により、有尾両生類の再生能力の解明に繋がる、迅速で簡便な遺伝子機能解析システムを開発した。

3. *shh* 四肢エンハンサーの四肢再生における機能解析

有尾両生類の四肢再生における ZRS の機能を明らかにするため、前述の CRISPR-Cas9 システムにより ZRS を破壊し、四肢発生および再生における影響を検証した。まず、マウス ZRS のコア配列と相同なイモリ ZRS (822bp) 配列を種間で比較した結果、イモリにおいてもヘビ垂目特異的欠失配列が保存されていた。次に 2 箇所の gRNA を導入することにより、このヘビ垂目特異的欠失配列を欠失したイモリ F_0 胚の作出を試みた。得られた F_0 胚の四肢発生においては、ZRS 全長を破壊したマウスで見られたような四肢短縮を示すことはなく、一部の個体で指が一本欠損するに留まり、33 個体中 26 個体は正常に発生した。一方、興味深いことに四肢再生においては、およそ半分が正常に再生することができず (33 個体中 16 個体)、通常の再生では観察されない一本指や二本指の表現型が見られた。なお、一本指の個体を 13 ヶ月経時観察してもさらに再生することはなかったため、遅延ではなく再生能力が完全に損なわれていると考えられる。四肢再生時に切り落とした腕からゲノム DNA を抽出し、変異導入箇所と効率を解析したところ、一本指というシビアな表現型の個体でも 17bp のヘビ垂目特異的欠失配列の抜き取りは生じておらず、片方の gRNA 領域にのみ 3-4bp の変異が導入されていた。また、四肢再生芽の RT-qPCR 解析により *shh* の発現量を定量したところ、この F_0 胚では有意に *shh* 発現量が低下していることも明らかとなった。これらの結果から、イモリ ZRS のヘビ垂目特異的欠失配列近傍の配列が四肢再生において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

4. まとめ

再生関連遺伝子の正確な時空間的発現制御を考えるうえで、シス制御配列の機能解析は非常に重要である。本研究では、新規の器官再生モデル生物とゲノム編集技術を組み合わせることによって *shh* の四肢エンハンサーである ZRS に変異を導入することに成功し、わずか 3-4bp の変異により四肢再生が阻害されることを示した。この成果は、高い再生能力をもつ有尾両生類において、特定のシス制御配列が再生能力に深く関与していることを示した初めての報告である。変異が導入されていた部位は四肢再生に重要と考えられている転写制御因子 *Hoxa/c/d13* の結合配列 (ホメオドメイン DNA 結合配列) であるため、変異導入により *Hox* の結合が阻害されている可能性が高い。以上の考察から、四肢再生において *shh* は ZRS のホメオドメイン DNA 結合配列に転写因子が結合することによって再活性化し、*shh* の十分な発現が保障されることにより正常な四肢再生が成立するモデルを提案するに至った。