

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)	氏名	鈴木 美有紀
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 ①・② 項該当		
論文題目			
Functional analysis of a cis-regulatory element of <i>sonic hedgehog</i> 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)			
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
〔論文審査の要旨〕			
<p>ソニックヘッジホッグ遺伝子(<i>shh</i>)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。<i>shh</i>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前後軸パターンを失った四肢短縮を示す。また近年、様々な脊椎動物の比較ゲノム解析により、四肢をもたないヘビ亜目の ZRS において特異的に欠失する 17 塩基対(bp)のヘビ亜目特異的欠失配列がマウスの ZRS の機能に重要であることが報告された。</p> <p>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、<i>shh</i> 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 <i>shh</i> 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。そこで本論文の筆者は、四肢再生における ZRS の重要性を明らかにするため、繁殖が容易な新規の器官再生モデル動物であるイベリアトゲイモリ(<i>Pleurodeles waltli</i>; 以下「イモリ」とする)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 <i>shh</i> の発現および四肢発生・再生時の表現型を解析した。</p> <p>第 1 章では、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を行った。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(RNP)を受精卵に導入</p>			

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のディープシーケンス解析を行った。各個体 1 万リード以上を解析したところ野生型のアレル頻度は 1%以下であり、全く野生型アレルが検出されない個体も存在した。さらに、*pax6*, *tbx5* においても同様に非常に高い変異導入率が観察され、F0 世代での高効率な遺伝子ノックアウトの系を確立した。さらに、イベ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変異アレルを有する子孫(F1)を 1 年以内を取得できることを示した。これらの結果は、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ことを示している。

第 2 章において筆者は、*shh* 四肢エンハンサーの四肢再生における機能を解析した。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(822 bp) 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 F0 胚の作出を試みた。得られた F0 胚の四肢発生においては、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。四肢再生時に切り落とした腕からゲノム DNA を抽出し、変異導入部位を解析したところ、一本指を示す表現型の個体でも 17 bp のヘビ垂目特異的欠失配列の完全な欠失は生じておらず、片方の gRNA 領域にのみ 3-4 bp 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 F0 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。

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、3-4 bp 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に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* の結合配列が含まれているため、変異導入により *Hox* 関連タンパク質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され、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可能性を示唆した。これらの成果は、イモリ四肢再生過程における *shh* の発現調節機構の解明に貢献する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

Miyuki Suzuki, Toshinori Hayashi, Takeshi Inoue, Kiyokazu Agata, Miki Hirayama, Miyuzu Suzuki, Shuji Shigenobu, Takashi Takeuchi, Takashi Yamamoto, Ken-ichi T. Suzuki.
Cas9 ribonucleoprotein complex allows direct and rapid analysis of coding and noncoding regions of target genes in *Pleurodeles waltl* development and regeneration
Developmental Biology, 443: 127-136, 2018

参考論文

Kei Miyamoto, Ken-ichi T. Suzuki, Miyuki Suzuki, Yuto Sakane, Tetsushi Sakuma, Sarah Herberg, Angela Simeone, David Simpson, Jerome Jullien, Takashi Yamamoto, J. B. Gurdon.
The Expression of TALEN before Fertilization Provides a Rapid Knock-Out Phenotype in *Xenopus laevis* Founder Embryos
PLoS One, 10: e0142946, 2015

Miyuki Suzuki, Chiyo Takagi, Shinichirou Miura, Yuto Sakane, Makoto Suzuki, Tetsushi Sakuma, Naoaki Sakamoto, Tetsuya Endo, Yasuhiro Kamei, Yuko Sato, Hiroshi Kimura, Takashi Yamamoto, Naoto Ueno, Ken-ichi T. Suzuki.
In vivo tracking of histone H3 lysine 9 acetylation in *Xenopus laevis* during tail regeneration
Genes to Cells, 21: 358-369, 2016

Ken-ichi T. Suzuki, Miyuki Suzuki, Mitsuki Shigeta, Joshua D. Fortriede, Shuji Takahashi, Shuuji Mawaribuchi, Takashi Yamamoto, Masanori Taira, Akimasa Fukui. Clustered *Xenopus* keratin genes: A genomic, transcriptomic, and proteomic analysis
Developmental Biology, 426: 384-392, 2017

Ken-ich T. Suzuki, Yuto Sakane, Miyuki Suzuki, Takashi Yamamoto.
A Simple Knock-In System for *Xenopus* via Microhomology Mediated End Joining Repair: Methods and Protocols
Methods in Molecular Biology, 1865: 91-103, 2018