

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)	氏名	LIU DAMING
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 ①・② 項該当		
論文題目			
Targeted mutagenesis using CRISPR-Cas9 in sea urchin, <i>Hemicentrotus pulcherrimus</i> (バフンウニにおける CRISPR-Cas9 を用いた標的遺伝子への変異導入)			
論文審査担当者			
主 査	准教授	坂 本 尚 昭	
審査委員	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	講 師	佐久間 哲 史	
〔論文審査の要旨〕			
<p>ウニは発生生物学研究のモデル生物として使われ、近年では動物の初期発生を担う遺伝子制御ネットワークの解析にも用いられてきた。ウニにおける遺伝子の機能解析には、モルフォリノアンチセンスオリゴ (MASO) による遺伝子ノックダウンが用いられてきたが、MASO 自体の毒性や MASO の効果が後期発生まで持続しない等の問題点もあった。しかし、近年のゲノム編集技術の発展により、様々な生物種でのゲノム改変が可能となってきた。バフンウニ (<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>) では、Zinc Finger Nuclease (ZFN) や Transcription Activator-Like Effector Nuclease (TALEN) によるゲノム編集がこれまでに報告されていたが、どちらも初期発生における遺伝子の機能解析に十分な編集効率が得られていなかった。したがって、バフンウニにおける遺伝子の機能解析には、さらに高いゲノム編集効率が求められていた。また、後期発生から変態を経て成体となるまでの期間における遺伝子機能の解析例も、これまでに報告されていなかった。そこで本論文の著者は、バフンウニにおけるより高効率なゲノム編集法を確立するために、CRISPR-Cas9 システムによるゲノム編集を行った。</p> <p>バフンウニにおける CRISPR-Cas9 システムの効果を検証するために、<i>Nodal</i> 遺伝子を標的としたゲノム編集を行った。<i>Nodal</i> はウニ胚における口側-反口側軸に沿ったパターン形成に重要な因子であり、その機能阻害により胚の形態が放射状になることが知られている。そこで、<i>Nodal</i> 遺伝子を標的とする 2 種類のガイド RNA (sgRNA#1 と #2) を作製し、<i>Cas9</i> mRNA とともにバフンウニ受精卵に共注入した。24 時間後に 20 個体の胚からゲノム DNA を抽出し、標的部位の塩基配列を解析したところ、sgRNA#1 導入胚における変異導入効率は 65% の変異導入率であることが明らかになった。また sgRNA#1 導入胚の表現型を解析したところ、多くの胚が放射状の形態を示したことから、CRISPR-Cas9 システムはバフンウニにおけるゲノム編集に利用可能であることが示された。</p> <p>次に、色素合成関連遺伝子であるポリケチド合成酵素 <i>Pks1</i> のノックアウトを行った。はじめに、バフンウニ <i>Pks1</i> 遺伝子の発現解析を行ったところ、<i>Pks1</i> 遺伝子は胞胚期より発現が始まり、プリズム幼生でピークに達することが示された。またその発現領域は、間</p>			

充織胞胚では予定二次間充織細胞，後期原腸胚では将来の色素細胞となる二次間充織細胞であった。そこで、*Pks1* 遺伝子を標的とする 3 種類の sgRNA (#1~#3) を作製し、*Cas9* mRNA とともにバフンウニ受精卵に共注入した。24 時間後に 20 個体の胚からゲノム DNA を抽出し、HMA アッセイにより変異導入の有無を調べたところ、sgRNA#2 と #3 を用いたときに変異導入が検出された。シーケンス解析の結果、sgRNA#2 導入胚では 100% の変異導入効率が得られ、両アレルでの変異導入に成功したことが示された。また、sgRNA#3 導入胚でも 80% の変異導入効率が得られた。sgRNA#2 についてはバフンウニゲノム中に類似の配列が存在したため、2 箇所の類似配列におけるオフターゲット作用を調べたが、sgRNA#2 によるオフターゲット作用は検出されなかった。したがって、sgRNA#2 による変異導入は、高効率かつ高特異性であることが示された。変異導入のタイミングについて解析したところ、sgRNA#2 による変異導入は受精後 6 時間で最初に検出され、12 時間でピークに達することが示された。これは、ZFN や TALEN で示されていた変異導入のタイミングと同等のものであった。

sgRNA 導入胚の表現型を解析したところ、sgRNA#2 を導入されたすべてのプルテウス幼生が、色素合成を欠失したアルビノ表現型を示したが、色素欠失以外の幼生の形態は正常であった。sgRNA#3 については効果が弱く、完全に色素を欠失したアルビノ幼生が 28%、部分的に欠失したアルビノ幼生が 60% だったが、これまでに観察されていた ZFN や TALEN による変異表現型の割合よりも高かった。このアルビノ幼生をさらに飼育して観察したところ、アルビノ表現型は後期発生においても維持され、その後の色素形成も観察されなかったが、成体原基の形成・成長は正常に行われた。変態後の稚ウニにおいても色素形成は観察されず、白い成体ウニへと成長し、1 年以上飼育することに成功した。

sgRNA#2 により *Pks1* 遺伝子をノックアウトされた 3 個体のアルビノ成体ウニの遺伝子型を解析したところ、各個体は複数のタイプの変異をもっていたものの、どの個体からも野生型の対立遺伝子は検出されなかった。したがって、ノックアウト成体ウニの確立に成功したと考えられる。

sgRNA#2 導入胚のアルビノ表現型についてさらに詳細に解析したところ、*Gcm* 遺伝子の mRNA が色素細胞へと分化する二次間充織細胞で検出され、sgRNA#2 導入胚では二次間充織細胞が正常に形成されていることが示された。また、*Pks1* mRNA も二次間充織細胞で検出されたことから、sgRNA#2 導入胚では *Pks1* 遺伝子の転写は正常だが翻訳が正常に行われず、その結果ポリケチド合成酵素 *Pks1* を欠失したことが示された。

以上の結果から、CRISPR-Cas9 システムはバフンウニにおける遺伝子改変において高効率かつ特異性の高い手法であることが示された。この成果は、CRISPR-Cas9 システムによるゲノム編集がウニ初期発生のみならず後期発生の解析にも有効なツールであることを示しており、さらに次世代のノックアウトウニを使った遺伝学的解析の可能性も示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

Establishment of knockout adult sea urchins by using a CRISPR-Cas9 system.

Daming Liu, Akinori Awazu, Tetsushi Sakuma, Takashi Yamamoto & Naoaki Sakamoto.

Development, growth & differentiation, 61(6), 378-388 (2019)