

## 動物の変態の共通性を理解するためのホヤ RXR 関連遺伝子のノックアウトの試み

中畑 あずさ (筑波大学 生物学類) 指導教員: 笹倉 靖徳 (筑波大学 生命環境系)

## 背景・目的

変態とは、動物の成長過程において、その姿形を大きく変化させる現象である。多くの動物で認められる変態であるが、その様式は動物種によって非常に異なる様相を呈するため、一見すれば、各動物のグループで独立して獲得されたようなものに思える。一方、現存する動物は共通祖先から進化してきた。その進化過程の中で、変態という現象もまた共通祖先から受け継いだ現象なのか、それとも各動物が独立に獲得してきたものなのかについてはこれまで議論的であった。その背景のなか、近年の発生生物学的研究は、動物の変態が分子レベルで共通である可能性を指摘してきた。

RXR(Retinoid X Receptor)は、動物間で広く保存されている核内受容体で、他の核内受容体とヘテロダイマーを形成して作用する。近年、RXR 相同遺伝子が凍胞動物、節足動物、脊椎動物で共通して変態を制御することが判明した。この共通性は、動物が共通の分子機構を基に変態を進化させてきたことを支持するものである。しかしながら多くの動物群での RXR の機能解析は進んでおらず、RXR を中心にした分子機構が真に変態の共通原理であるかどうかを結論づけるにはさらなる解析が必要である。

ホヤは、幼生期はオタマジャクシの形態を取り、活発に泳ぎまわりますが、変態を終えて成体になると殆ど動きまわらない固着生活を始める。ホヤの変態は昆虫類や両生類の変態とは異なり、数日で完了する非常にダイナミックなものであり、素早く変態が行われることから、研究に非常に適した材料である。また、ホヤは脊索動物であり、我々脊椎動物と最も近い動物群であるが、ホヤは脊椎動物と分岐してのちに、独自に変態機構を獲得したと考えられている。私はホヤの変態が進化過程で獲得されたメカニズム、特に他の動物と共通の分子機構を基に進化したのか、について興味を持ち、ホヤの RXR を中心に機能解析を進めることとした。

RXR が変態においてどのような影響があるかを調べる際、RXR は脊索動物においてレチノイン酸経路で働いていることが知られているため、変態における機能とレチノイン酸経路での機能を区別するため、本研究では RAR(Retinoic Acid Receptor)についても研究対象とした。さらに、ホヤは脊椎動物との直接の姉妹群を形成する動物であり、両者の変態機構の共通性を重点的に調べたい。両生類の変態においては甲状腺ホルモン受容体が RXR とヘテロダイマーを形成することで中心的な役割を果たしている。ホヤにはこの受容体の相同遺伝子 NOR1 があり、この遺伝子の機能解析も同時に進めた。本研究では、ホヤの 1 種であり、カタユウレイボヤを用いて実験を行った。カタユウレイボヤはゲノム DNA の塩基配列が既に決定されており、また、TALEN を用いた遺伝子ノックアウトが可能である。そこで TALEN を用いて RXR、RAR、NOR1 のノックアウトを行い、RXR を中心とする遺伝子群がホヤの変態に与える影響を検証することを本研究の目的とした。

## 方法

RXR、RAR、NOR1 のそれぞれについて、遺伝子をノックアウトするための TALEN を作製した。ホヤのゲノムデータベースより、カタユウレイボヤの RAR、RXR、NOR1 の遺伝子配列を得た。それぞれの遺伝子配列から TALEN Targeter (<https://tale-nt.cac.cornell.edu/node/add/talen>) により作製する TALEN の配列を決定した。デザインした TALEN に対する cDNA は Golden Gate 法により作製した。TALEN cDNA をハウスキープング遺伝子 EF1a の転写調節領域に結合し、発現ベクターを構築した。TALEN 発現ベクターをカタユウレイボヤ卵にエレクトロポレーションで導入し、その後発生させた胚からゲノム DNA を抽出し、DNA のターゲット領域に変異が入っていることを CelI エンドヌクレアーゼを用いて検証した。続いて該当 DNA 領域をクローニングし、配列決定、野生型と配列を比較することで変異が入っていること、及び変異導入率を確認した。

## 結果

最終的に、RXR、RAR、NOR1 遺伝子に効率よく変異を導入する活性を有する TALEN の作製に成功した。RXR については DNA 結合ドメインと開始 ATG をターゲットとする TALEN をそれぞれ 2 種類作製した。開始 ATG に対する TALEN について、CelI ヌクレアーゼを用いた解析で変異導入を示唆するバンドを検出できた。シーケンス解析の結果、開始 ATG をターゲットとするものの 1 種類について、確かに DNA の塩基配列に変異が導入されていることが確認され、その変異導入効率は約 75%と推定された。DNA 結合ドメインをターゲットとする 2 種類については CelI ヌクレアーゼ解析では変異導入活性を有していなかったため、以後の解析には用いなかった。

RAR については DNA 結合ドメインをターゲットとした TALEN を 3 種類作製した。そのうち 1 種類について、確かに DNA の塩基配列に変異が導入されていることが確認され、その変異導入効率は約 87.5%と推定された。残りの 2 種類については CelI ヌクレアーゼ解析では変異導入活性を有していなかった。NOR1 については TALEN を 1 種類作製し、CelI ヌクレアーゼを用いた解析で変異導入を示唆するバンドを検出できた。シーケンス解析の結果、変異導入効率は約 100%と推定された。

## 考察

RXR、RAR の双方について、同一遺伝子をターゲットとするにも関わらず、変異効率の高い TALEN と低い TALEN が存在した。変異効率の低い TALEN については、ゲノム DNA の修飾やクロマチン状態などの理由から、DNA の 2 重鎖切断の起こりにくい部位をターゲットにしていたことが、変異効率を下げた可能性として考えられる。今回得られた TALEN を用いて、今後 RXR 関連遺伝子の機能解析を進めていきたい。