



Title	ワカレオタマボヤにおけるRNAiおよびDNAiを用いた遺伝子解析手法の確立および母性因子のDNAiスクリーニング
Author(s)	表迫, 竜也
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/56073
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (表迫 竜也)

論文題名

ワカレオタマボヤにおけるRNAiおよびDNAiを用いた遺伝子解析手法の確立および母性因子のDNAiスクリーニング

論文内容の要旨

様々な生物において母性因子が胚発生の重要な過程に関わっていることが知られている。例えばホヤ類では古くから母性mRNAの研究が盛んに行われており、細胞質移植実験により未受精卵中に筋肉、表皮、内胚葉運命決定因子の存在が予見されている。しかしながら母性因子に対する大規模な機能阻害スクリーニングは技術的な制限からハエ、線虫、ゼブラフィッシュといった一部の生物でしか行われていない。この為、これまでに知られている母性因子の機能は一部に限られており、胚発生に重要な母性因子として予見されている因子には未知なものとして残されているものが存在している。

本研究で用いるワカレオタマボヤは脊索動物門尾索動物亜門に属する海洋性のプランクトンであり、脊索動物に属しながらも、細胞数が少ない、ライフサイクルが5日と短い、胚、成体ともに透明で顕微鏡観察に優れるといった線虫に匹敵する様な特徴を持つことから新規のモデル生物の候補として実験が行われてきた。近年の研究の成果により、卵巣内顕微注入法により卵母細胞内へ核酸を取り込ませることが可能となっている。この特徴から卵巣内にdsRNAを注入することにより卵巣内で遺伝子機能を抑制することが可能になるのではないかと考えた。もしこれが可能になれば母性因子の機能阻害が可能になり、これまで知見の乏しかった母性因子の研究が可能になると期待される。このことから本研究では①卵巣内顕微注入によるRNAi法の検証、②卵巣内顕微注入によるDNAi法の確立、③DNAiを用いた母性因子のスクリーニングという3つに対して実験を行った。

① 卵巣内顕微注入による RNAi 法の確立

RNAiは菌類から脊椎動物に至るまで広く保存された遺伝子サイレンシング機構である。この現象は様々な生物で遺伝子機能阻害法として実験的に利用されており、内在遺伝子と相同な配列を持つdsRNAを細胞内に取り込ませることにより、その内在遺伝子のmRNAの分解が誘導される。そこで本研究では蛍光タンパク質をコードするmRNAおよび、脊索形成のキー転写因子として知られる*Brachyury*に対するdsRNAの注入を行った。この結果dsRNAにより標的的特異的なmRNAの分解が引き起こされ、*Brachyury*に対するdsRNAの注入により脊索形成の異常を示す表現型が観察された。この結果からワカレオタマボヤにおいて卵巣内顕微注入法を用いたRNAiによる機能阻害法が確立された。

② 卵巣内顕微注入による DNAi 法の確立

遺伝子サイレンシング機構の一つとしてDNA interference (DNAi)が知られている。DNAiは細胞内に直鎖状の二重鎖DNAもしくは環状の二重鎖DNAを取り込ませることにより、標的的特異的な機能阻害が引き起こされるという現象として、一部の植物、ゾウリムシ、高度好熱菌において報告されていた。そこでワカレオタマボヤにおいてもこの現象が見られるかを調べる為に*Brachyury*に対するPCR断片の注入を行った。この結果、標的的特異的なmRNAの減少が引き起こされ脊索形成異常が観察された。これらの結果からワカレオタマボヤを用いて多細胞動物で初めてのDNAiの例を報告した。またこれにより、RNAiに比べ容易に機能阻害を行うことが可能となり、ワカレオタマボヤにおいて大規模なスクリーニングが可能となった。

③ DNAiを用いた母性因子のスクリーニング

①②の結果からワカレオタマボヤにおいて卵巣内顕微注入法を用いることにより卵巣内での機能阻害が可能となり、この手法は母性因子の機能阻害に有効であることが示された。この利点を活かしてDNAi法を用いて卵巣特異的に発現する遺伝子に対する機能阻害スクリーニングを行った。これまでに卵巣特異的に発現する遺伝子の51.9%に対してスクリーニングを行い7個の初期発生期に異常を示す遺伝子を同定した。このスクリーニングの結果、産み落とされた卵の初期発生期において、細胞接着に関わる因子、細胞分裂に関わる因子等が同定された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (表 迫 竜 也)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教 授 西 田 宏 記
	副 査	教 授 柿 本 辰 男
	副 査	准教授 木 村 幸 太 郎

論文審査の結果の要旨

母性因子には体軸形成、細胞運命決定といった胚発生の重要な過程に関わっていると考えられているものの、これまで技術的制限から多くの生物では解析がなされておらず、未解明な因子が沢山残されていた。申請者は、これまで十分に解析が行われていないこの母性因子の機能を網羅的に調べることを目的に実験を行った。本論文は三部構成になっており、第一部では、ワカレオタマボヤにおいて RNAi 法による遺伝子機能阻害法を確立したことを報告している。第二部では、RNAi に比べより容易に機能阻害を行うことが可能な DNAi 法の発見、確立を行ったことを報告している。最後に第三部で、本研究で確立した DNAi 法を用いて母性因子スクリーニングを行ったことを報告している。

ワカレオタマボヤは、脊索動物に属しながらも細胞数が少ない、胚や成体が透明である、ライフサイクルが 5 日と短いといった特徴から新規のモデル生物として期待されているが、実験技術が十分に確立されていなかった。申請者はこのワカレオタマボヤにおいて RNAi 法を確立することで、初めて遺伝子機能阻害を可能にした。これによりワカレオタマボヤにおいて蓄積しているゲノム情報やマイクロアレイデータといった情報を有効に活用することを可能にした。この成果は、Development Genes and Evolution 誌に論文として出版された。

次に、ワカレオタマボヤを用いて DNAi という新しい遺伝子サイレンシング機構を多細胞動物で初めて発見した。申請者はこの現象を解析する為に、様々な遺伝子や様々な遺伝子領域に対する PCR 断片を作成し、機能阻害の効果の違いを比較した。これによりエキソン領域のみならず、イントロン、UTR、遺伝子の上流配列を標的にした場合でも機能阻害が引き起こされること、また機能阻害は直鎖状の DNA 特異的に引き起こされることなどを明らかにした。さらに卵巣内顕微注入法を用いることで母親卵巣内で合成される母性因子の機能阻害も可能であることを示した。この発見により PCR 断片を注入するだけで遺伝子機能阻害が可能となることを示し、オタマボヤの実験動物としての有用性を更に高めた。これらの成果は Proceeding of the Royal Society of London B 誌に論文として出版された。

上記の 2 つの研究において、卵巣内顕微注入をもちいることで母性因子の機能阻害が可能になった。この点を活かして、申請者は次に母性因子の DNAi スクリーニングを行った。卵巣特異的遺伝子の 56.9% に相当する遺伝子の機能阻害を行い、7 個の母性効果の異常を示す遺伝子を同定した。これにより、これまで技術的制限から十分に解析がなされていなかった母性因子を効率的に解析する、脊索動物での新しい実験系が確立された。

実験動物として十分な情報や技術が整備されていない状況から、DNAi という新しい現象を発見し、新たに開発した技術を利用して、他の脊索動物を用いては困難であった実験系をオタマボヤで確立した上記の研究は新奇性と学術的価値が高いと考えられる。

よって、本論文は博士(理学)の学位論文として十分に価値のあるものであると認める。