

氏名（本籍）	Martin Miguel CASCO ROBLES （ ニカラグア ）		
学位の種類	博 士（ 理学 ）		
学位記番号	博 甲 第 6908 号		
学位授与年月日	平成26年 3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Development of Transgenic Techniques for the Study of Adult Newt Retinal Regeneration (成体イモリ網膜再生研究のためのトランスジェニック技術の開発)		
主査	筑波大学准教授	博士（理学）	千葉 親文
副査	筑波大学教授	理学博士	古久保-徳永 克男
副査	筑波大学准教授（連携大学院）	博士（理学）	栗崎 晃
副査	筑波大学准教授	医学博士	中谷 敬

論 文 の 要 旨

有尾両生類に属するイモリ（イモリ科）は、脊椎動物の中でも極めて高い再生能力を有し、変態後の成体でも外傷により失った様々な体の一部を再生することができる。この現象は18世紀から記載されてきたが、その分子メカニズムはほとんど明らかにされていない。その大きな原因として、遺伝子機能を解析する有効な手段がないことがあげられる。

トランスジェニック(TG)などの遺伝子改変技術はイモリにおいても有用であるに違いない。しかし、これまで開発されてきた技術では、成功率が低く実際の研究現場への適用は困難であった。そこで本研究では、簡易で高効率なTG技術の開発に取り組んだ。まず、日本固有種であり幅広い情報が蓄積されているアカハライモリ（*Cynops pyrrhogaster*）に着目し、自然環境を模した水槽システム（TATシステム）内で親イモリを飼育することで、実験室内での繁殖と安定した採卵を可能にした。次に、*I-SceI*メガヌクレアーゼ法を適用することでTGの簡易化と効率化を図るとともに、TGイモリの飼育温度を工夫することにより生存率を向上させることに成功した。これにより、TGの成功率〔外来遺伝子を全身に均一に強く発現する変態個体（5ヵ月齢）を得る確率〕は従来約10倍（約20%）に向上した。

続いて、この基盤技術を再生研究に応用するための技術開発を行った。実験モデルとして網膜再生系を選択した。網膜は眼球内に存在する中枢神経組織で視覚の初期過程に不可欠である。イモリはこの網膜を網膜色素上皮（RPE）細胞という単一の細胞種から完全再生する。成熟したRPE細胞は特殊化しており、RPE65やBest1など特異的な分子を発現している。このように網膜再生系は、他の組織再生系に比べてシンプルであり、分子マーカーによる再生起源細胞の追跡も可能であることから、再生の問題を単純化して解くよい実験系と考えられる。本研究では、終分化RPE細胞と、網膜再生過程においてこの細胞から派生する全ての細胞の遺伝子機能を制御するためのツールとして、まずRPE65遺伝子のプロモーター配列（転写開始点の上流

560bp) をイモリゲノムから単離した。この領域の構造は、他の脊椎動物の *RPE65* プロモーター (*pRPE65*) とよく一致していたが、これらにはない転写因子結合部 (c-Myc/Max、Odd-skipped related factor 1、Zinc Family Factor 2、Six1 の結合部) も有していた。TG 幼生を用いてプロモーターアッセイを行い、この領域が分化した RPE 細胞で活性化することを確認した。導入用コンストラクトの構成によってはプロモーターの異所的な活性化が観察されたが、*HS4* インスレーターをコンストラクトに組み込むことでこの問題を解決した。

次に、遺伝子機能制御のモデルとして、網膜再生過程で発現する遺伝子を終分化 RPE 細胞あるいはその派生細胞でノックダウンするシステムの開発を行った。ここでは標的遺伝子として *Pax6* を選択した。*Pax6* は正常な RPE 細胞には発現しておらず、網膜の外傷にともない増殖を始めた RPE 細胞に発現する転写因子であるが、その機能は不明である。また、この遺伝子については、その発現を効果的にノックダウンする shRNA を共同研究により明らかにしている。しかし、眼や脳の発生に欠かせない遺伝子であることから、shRNA の発生過程での影響を回避する必要がある。そこで、tamoxifen 誘導型の Cre-LoxP システムを組み込んだ 2 つのコンストラクト、*pRPE65-CreERT2-pCAGGs-Cyan* と *pCAGGs-loxP-YFP(stop)-loxP-mCherry-Pax6shRNA* を設計・作製し、これらを同時に受精卵に注入することで、両方を組み込んだ TG 個体を作製した。これらの個体は、変態 (5 カ月) 後も shRNA 発現の指標である mCherry を発現しなかった。そこで、変態直前の幼生に tamoxifen を投与し、変態後に頭部の切片を作製して mCherry の発現を調査した結果、RPE 細胞に mCherry 発現が誘導されることがわかった。

本研究により、これまで困難とされてきたイモリの TG 技術が確立した。さらに、成体において特定の細胞に外来遺伝子を発現させることも可能になった。今回、終分化 RPE 細胞あるいはその派生細胞に *Pax6shRNA* を発現させる系が確立したことから、今後は網膜再生に対する *Pax6* の機能解析を行う予定である。また、本研究期間内に、網膜再生系については大規模な遺伝子情報の収集が進んだことから、これらの遺伝子の機能解明にも取り組んでいきたい。

審 査 の 要 旨

本論文は、イモリ再生メカニズムの解明のための遺伝子機能解析技術について研究・開発したものである。前半では、TG イモリの簡易で高効率な作出技術を確認し、後半では、この基盤技術を網膜再生系に適用して、成体の特定の細胞、特に再生組織の起源となる細胞とそこから派生した全ての細胞に外来遺伝子を発現させる技術を確認した。本研究において確認した技術や得られた知見は、いずれも当該研究分野にブレイクスルーをもたらすものと評価できる。特に、網膜再生過程で RPE 細胞から派生した多能性細胞に発現する *Pax6* をノックダウンする研究は、イモリ再生研究のモデルとして、今後の展開が大いに期待される。したがって本研究が再生生理学の分野に与える影響は大きく、本論文の重要性は高いと言える。

平成 26 年 1 月 27 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士 (理学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。