

氏名 (本籍)	飯塚 貴子 ( 茨城県 )		
学位の種類	博 士 ( 理学 )		
学位記番号	博 甲 第 7160 号		
学位授与年月日	平成 26 年 11 月 30 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	A Novel Technique to Specifically Knockdown Maternal Gene Expression in <i>Ciona intestinalis</i> (カタユウレイボヤを用いた遺伝子の母性発現を特異的にノックダウンする新技術の開発)		
主査	筑波大学教授	博士(理学)	笹倉 靖徳
副査	筑波大学教授	理学博士	稲葉 一男
副査	筑波大学教授	博士(理学)	和田 洋
副査	筑波大学教授	理学博士	齊藤 康典

## 論 文 の 要 旨

母性因子は卵内に蓄積されている mRNA やタンパク質の総称で、これらの因子は胚発生期において重要な役割を果たしている。海産無脊椎の脊索動物であるホヤは、卵が典型的なモザイク卵であることが古くから知られており、母性因子研究が盛んに行われてきた。特にホヤの 1 種カタユウレイボヤでは約 40 種もの卵の一部に顕著な局在を示す母性 mRNA の存在が確認されている。その一方で、これらの局在母性 mRNA のほとんどは機能未知である。これは、従来カタユウレイボヤにおける遺伝子機能解析手法では母性因子の機能解析が困難であることに起因する。本論文ではこの問題の解決を目指し、カタユウレイボヤで確立している遺伝子組換え系統の作製技術を応用し、遺伝子の母性発現を特異的に抑制する新技術の開発を目的に研究を行った。

カタユウレイボヤの卵において GFP を発現させるトランスジェニック系統がトランスポゾン技術により多数作製されている。これらのトランスジェニック系統では、GFP の卵細胞における発現がモザイクになる。具体的には、GFP が発現する卵と発現しない卵が同一個体内で混在していた。このうち、GFP 発現が認められない卵では GFP が mRNA レベルで発現抑制されていた。母性 mRNA をコードする遺伝子 *posterior end mark (Ci-pem)* のプロモーターを用いて、卵で GFP を発現させた系統 (*pem>GFP* 系統) においても、卵における GFP 発現のモザイク性が観察された。本系統の GFP 発現のない卵を幼生期まで発生させたところ、発生が異常になった。GFP の発現が抑制された卵における *Ci-pem* mRNA の発現量を調べたところ、この母性 mRNA の発現がコントロールと比較して大きく減少していた。GFP 発現の抑制された *pem>GFP* 系統の卵に *Ci-pem* mRNA の顕微注入によるレスキュー実験を試みたところ、幼生期まで正常に発生した。また *Ci-pem* の発現が抑制された卵では、他の母性 mRNA の発現量には影響が出ていない。以上の結果から、*pem>GFP* 系統の GFP 抑制卵では、*Ci-pem* mRNA の発現が特異的に抑制され、発生に異常が生じることが判明した。

*pem>GFP* 系統の卵で *Ci-pem* mRNA の発現が抑制される現象は、*pem>GFP* 系統を作製する際に使用したベクターによる影響であることが推測された。そこで導入ベクターの有する *Ci-pem* 5' 非翻訳領域 (UTR)、レポーター遺伝子領域のそれぞれを改変したベクターをホヤに導入し系統を作製した。その結果、*Ci-pem* 5' UTR をベクターから削った場合には、得られた系統の卵で *Ci-pem* の発現抑制は生じなかった。さらに 5' UTR を他の母性発現遺伝子のものに改変した場合には、5' UTR の由来となる遺伝子の母性 mRNA が強く抑制された。これらのことから母性 mRNA の抑制機構においては、5' UTR がターゲットとなる遺伝子を決めていることが推察された。さらにこの結果から、本現象は *Ci-pem* 遺伝子に特異的でないことが示された。実際に母性発現遺伝子の *Ci-mT* と *Ci-Nut* 遺伝子を選択し、これらの遺伝子のプロモーターと 5' UTR を用いて GFP を卵において発現させる系統を樹立した。その

結果、それぞれの系統で *Ci-mT* や *Ci-Nut* 遺伝子の母性発現の抑制が確認された。

*Ci-Nut* 遺伝子は母性と胚性の両方の発現を有することから、*Ci-Nut* 母性 mRNA の発現が抑制された卵から発生した胚を利用して、胚性の *Ci-Nut* mRNA の発現をコントロールと比較した。その結果、本系統の胚性 *Ci-Nut* mRNA の発現はコントロールと変わらないことが分かった。そのことから、本現象ではターゲットとなる遺伝子の母性発現のみが特異的に抑制され、胚性発現には影響が無いと結論された。

続いて本論文では、GFP 母性発現系統において母性 mRNA の発現が抑制される分子機構の解明を目指した。*pem>GFP* 系統の卵を用いて small RNA をターゲットとした RNA seq を行った。その結果、*pem>GFP* 系統の卵では *Ci-pem* 5' UTR のアンチセンス鎖から作られる small RNA の量が大幅に増加していることが分かった。このことから、本技術では導入ベクターのターゲットの 5' UTR からアンチセンス small RNA が作られ、転写もしくは転写後抑制を生じている可能性が高いことが判明した。

本研究により開発された、カタウレイボヤの母性 mRNA 特異的発現抑制法は maternal mRNA-specific knockdown、略して MASK 法と名付けられた。MASK 法の開発により、研究対象となる遺伝子の母性因子としての発現・機能を容易にかつ特異的に阻害し、解析することが可能になった。

## 審 査 の 要 旨

本学位論文において飯塚貴子氏は、ホヤ卵の母性 mRNA を逆遺伝学的に抑制する新技術 MASK 法の開発に成功した。ホヤは古くから母性因子研究の好材料とされており、それらの因子の機能解明が待ち望まれている。MASK 法はこれまで困難であったホヤの母性発現遺伝子の機能解明を容易に達成するものであり、その手法の開発により、今後の母性 mRNA の機能解明が大幅に進展すると期待される。またこの MASK 法はこれまで他の生物から報告されている各種方法とは大きく異なるオリジナリティの高いものであり、また母性 mRNA の抑制メカニズムにも迫るなど実験も深く行われており、総じて極めて学術的価値の高い研究である。

平成 26 年 10 月 2 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。