

〈研究ノート〉

ゲノム生物学が拓く新たな発生生物学へのアプローチ ～アフリカツメガエルの変態をモデルとした 器官形成研究への応用～

柴田侑毅*

Genome Biology Opens New Approaches to Developmental Biology
Application of the Metamorphosis of the African Clawed Frogs as a
Model for Organogenesis Studies

Yuki SHIBATA *

1. はじめに

有性生殖を行う生物は、受精卵という1つの細胞が様々な分子シグナルを受け、器官を形成し、複雑な形態と機能を有する個体へと成長する。現代の発生生物学は、こうした発生過程における種々の現象に焦点を当て、その分子メカニズムを明らかにする学問と言える。

ヒトを含む脊椎動物では、胎児期の小腸と出生後の小腸ではその形態が大きく異なる。この形態の違いは、出生前後に一過性に血中に分泌される甲状腺ホルモン (TH) により引き起こされる。筆者らはダイナミックに形態が変化する小腸の発生に着目し、モデル生物であるアフリカツメガエルを用いてその分子機構に迫ってきた。ヒトの出生前後の時期は、カエル等の無尾両生類における変態期に相当し、甲状腺ホルモンによりオタマジャクシから成体型のカエルへと劇的な体の作り替えが起こる。この時、小腸を構成していたほとんどの幼生型上皮細胞がアポトーシスにより消失し、ごく一部の幼生型上皮細胞が成体型の上皮幹細胞へと脱分化する。この上皮幹細胞を形成する過程には、様々な分子シグナルが関与しているが、その全容は明らかとなっていない。本稿では筆

* 日本医科大学・生物学教室 Department of Biology, Nippon Medical School

(2)

者らがこれまでに報告した、幹細胞ニッチ形成に関わる TH 依存的な分子メカニズムについて解説する。さらに、逆遺伝学的な遺伝子機能の解析法として主流となっている、ゲノム編集を用いた発生生物学への新たな取り組みについて紹介する。

2. アフリカツメガエルと発生生物学

古くから発生生物学の分野では、脊椎動物の後胚発生や器官形成のモデル動物として、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) が用いられてきた。アフリカツメガエルは卵生であり、1度の交配で1000個以上の受精卵が得られる。また体外で胚発生が進むため、哺乳類では母胎内で起こる胚の形態変化を容易に観察することが可能である。加えて、母体から胎盤を通じた血液交換がないため、母体の血中ホルモン量や栄養状態等の影響を受けない。そのためアフリカツメガエルの胚は自らの発生運命に従って個体発生を進め、わずか4日で幼体（オタマジャクシ）へと成長する。さらに変態（Metamorphosis）という劇的な体の作り替えが起こり、幼生型の形態から成体のカエルになる。アフリカツメガエルをモデル動物として用いることで、母体の影響を受けずに個体発生、器官形成、変態等のメカニズムを解析できる（図1）。



図1. 発生生物学におけるアフリカツメガエルの有用性

両生類における変態は、骨組織の硬骨化や四肢形成のような成体型器官の形成、

鰓や尾等の幼生型器官の消失、そして幼生型から成体型器官への組織再構築を伴うリモデリングに分類される。これらの変化は甲状腺ホルモン (TH) によって惹起され、わずか2週間のうちにオタマジャクシからカエルへと劇的にその形態を変化させる。このとき個体の血中 TH 濃度は変態最盛期にピークとなり、このような TH サージはヒトやマウスの出生前後にも観察されることから、器官形成における TH の機能は脊椎動物間で高度に保存されていると考えられている^[1]。我々が着目するアフリカツメガエルの小腸では、変態最盛期に大部分の幼生型上皮細胞がアポトーシスにより消失するが、ごく少数の幼生型上皮細胞が上皮幹細胞へと脱分化する。そして新たに生じた上皮幹細胞から成体型の上皮細胞が分化・増殖し、上皮組織が幼生型から成体型へと再構築される(図2)^[2, 3]。この小腸リモデリングにおける幹細胞ニッチ形成には様々なシグナル経路が関わっていることが報告されている。各シグナル伝達経路の作用機序は多くの場合脊椎動物間で共通するため、両生類を用いた研究結果はヒトを含む他の脊椎動物に応用できる可能性がある。次項では当研究室がこれまでに報告してきた、幹細胞ニッチ形成に関わるシグナル伝達経路について紹介する。

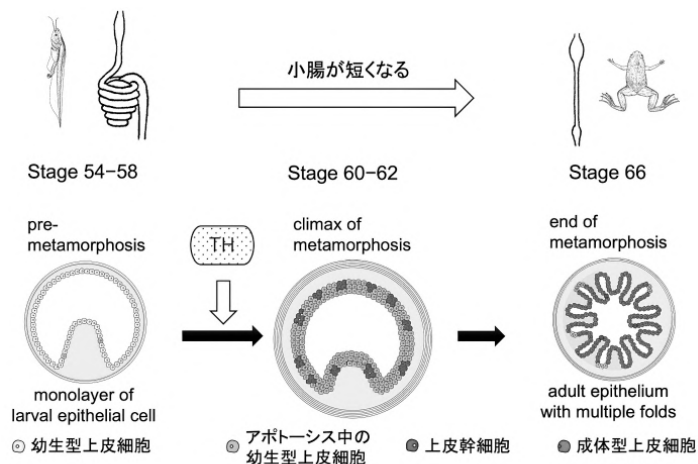


図2. 変態によるツメガエル小腸の劇的な形態変化

3. 幹細胞ニッチ形成に関わるシグナル伝達経路

3.1. 甲状腺ホルモン (TH) および TH 受容体 (TR)

甲状腺ホルモン (TH) は定常的に物質の代謝を担う重要なホルモンであるが、

(4)

ヒトを含む哺乳類では出生の前後に一過性に血中 TH 濃度が増大することで、個体の成長や器官形成にも寄与している。出生前後に TH が不足する甲状腺機能低下症では、母体の月経異常や不妊に加え、胎児や乳児の成長や発達の遅れが生じる。このため現在では生後5-7日目の新生児に TSH の測定による新生児マスキリング検査を行い、異常があれば甲状腺ホルモン製剤（レボチロキシンナトリウム）を投与する治療が行われている（日本小児内分泌学会 HP：先天性甲状腺機能低下症参照：<http://jspe.umin.jp/public/senten.html>）。こうした TH による胎児や乳児期の器官形成やその成熟機構は脊椎動物間で高度に保存されていると考えられており、カエルの変態はこれらの過程を詳細に観察するモデルとして、古くから用いられてきた。

TH は核内受容体である甲状腺ホルモン受容体 (TR) と結合し、標的遺伝子の転写を促進する。脊椎動物には2種類の TR (TR α と TR β) が存在し、ヒトでは選択的スプライシングにより複数のタンパク質 (TR α 1, TR α 2, TR β 1, TR β 2) が生じる。このうち TR α 2 は Ligand binding domain (LBD) 領域を欠くため、TH と結合することができない (図3)。TR は *9-cis* retinoic acid receptor (RXR) と二量体を形成し、標的遺伝子の調節 DNA 領域に存在する TRE (thyroid hormone response element) に結合する。甲状腺形成が未発達であり、TH の合成・分泌が起きていない個体 (発生初期) では、TR/RXR が

甲状腺ホルモン受容体 (TR)- 核内受容体

Gene	Type	Expression
TR α	α 1	Widely, especially cardiac and skeletal muscles
	α 2	Widely, but unable to bind TH
TR β	β 1	Brain, Liver and Kidney
	β 2	Hypothalamus and pituitary

Schematic model of nuclear receptors



図3. ヒト甲状腺ホルモン受容体 (TR) の発現パターンと構造

リプレッサーとして機能し、TH の標的遺伝子の発現を抑制的に制御している。一方、TH が合成・分泌され TR と結合すると、TR/RXR はアクチベーターとして機能し、標的遺伝子の転写を促進する。このように TR には TH が結合し

ていない場合と結合している場合とで、TH 標的遺伝子の転写調節機構が大きく異なる (TRs dual function model) ^[4]。また TR α 遺伝子の点突然変異は、先天的な甲状腺機能低下症の原因であることが報告されており、発生や器官形成において TR が非常に重要な機能を持つと考えられている ^[5]。

モデル生物である水棲種のアフリカツメガエルやネッタイツメガエル (*Xenopus tropicalis*) は、その全ゲノムが解読されデータベース化されていることから (Xenbase: <https://www.xenbase.org/xenbase/>)、ゲノム編集のような逆遺伝学的な解析にも適している ^[6, 7]。アフリカツメガエルは2種類の異なる祖先種が異種交配し、全ゲノム重複を起こしたため、2種類のサブゲノム (L と S) が含まれる偽四倍体ゲノムを持つ。一方、同じ水棲種であるネッタイツメガエルは二倍体のゲノムを持つため、ゲノム編集を用いた研究ではこちらのカエルを用いる研究者も増えている。どちらのカエルのオタマジャクシでも、変態始動期に TH が甲状腺から血中に分泌されはじめ、TH の標的遺伝子の発現を増加させることで、変態を開始させる。また、甲状腺を外科的に破壊するとオタマジャクシが変態を行うことができず、巨大なオタマジャクシになるという報告があるため ^[8]、TH は変態を開始させ、器官形成を誘導するマスターレギュレーターであると考えられてきた。筆者はネッタイツメガエルを用いてゲノム編集 (CRISPR-Cas9) により内因性 TR (TR α と TR β) のダブルノックアウト (TRDKO) を行い、個体発生や変態における TR の機能を詳細に解析した。驚くべきことに TR の完全欠損個体 (TRDKO) でも一部の組織の変態 (四肢形成、骨組織の硬骨化、成体型皮膚形成) が起こり、TH が全ての組織の変態を開始させるマスターレギュレーターではなく、一部の変態を惹起し、亢進させるトリガーであることが示された ^[9]。小腸のリモデリングに着目すると、非上皮組織 (筋層および結合組織) では成体型組織への形態変化が観察され、非上皮組織の変態は TH 非依存的に生じることが明らかとなった ^[10]。これは本来 TH と結合していない TR が標的遺伝子の発現を抑制しているが、TR のダブルノックアウトによりその抑制的な制御が外れたため、TH が結合していなくても TH 標的遺伝子の転写が促進されたためと考えられている。実際に小腸における TH 標的遺伝子の発現を real-time RT-PCR や RNA-seq により確認すると、TH が分泌されていない発生ステージにおいても、一部の TH 標的遺伝子の発現が促進されていた。これらの結果から、TR が TH 標的遺伝子の発現を抑制することで、十分に個体が成長するまで変態が起こらないように抑制的に制御していると考えられる。一

(6)

方で、TR を完全に除去すると上皮組織における幼生型上皮細胞の細胞死（アポトーシス）は観察されず、さらに幼生型上皮細胞の上皮幹細胞への脱分化も完全に抑制された^[10]。この結果は上皮組織における幹細胞ニッチ形成には、TH による一過性な TH 標的遺伝子の発現増加が不可欠であると考えられる^[1]。マウスの腸管成熟も血中 TH 濃度がピークに達する出生直後に起こることから、腸管発生における TH-TR シグナルの機能は脊椎動物間で高度に保存されている可能性がある。

3.2. SHH/BMP4 Signaling Pathway

ソニックヘッジホッグ（SHH）はハエからヒトまで広く保存された遺伝子であり、SHH シグナル伝達経路は多くの器官形成に重要な働きをしている。哺乳類の腸では、SHH は絨毛よりも陰窩基部の上皮細胞に多く発現しており、細胞増殖、パネート細胞や杯細胞の分化に関与している^[11]。変態最盛期のアフリカツメガエルの小腸において、*shh* は TH によって直接転写が促進され、上皮幹細胞に特異的に発現する^[12]。その後、上皮幹細胞に発現した Shh は結合組織に移動し、その受容体であるパッチド（Ptc1）を発現する細胞によって受容される^[13]。Shh シグナルを受容した細胞は、転写因子 Gli1 の発現が亢進し、これにより Shh 標的遺伝子の発現が促進される^[14]。加えて、結合組織の細胞に発現する Bmp4 は、上皮側にシグナルを戻し、上皮幹細胞から吸収上皮細胞への分化を促進する^[15, 16]。Shh は上皮組織と結合組織の両方で細胞増殖を促進するが^[17]、Bmp4 は上皮細胞の増殖には影響せず、結合組織の細胞増殖を抑制するようである^[15]。

加えて、Shh が転写因子 Foxl1 の発現を制御し、その調節 DNA 領域には複数の Gli 結合部位が含まれることを示した^[18]。哺乳類の小腸において Foxl1 は、上皮幹細胞直下の間葉系細胞であるテロサイト（telocyte）に発現している^[19]。アフリカツメガエルの小腸でも同様に、上皮幹細胞の直下にある結合組織の細胞に Foxl1 が発現し、その細胞の形態が哺乳類のテロサイトと類似していることから、幹細胞ニッチ形成に関わるテロサイトの機能は進化的に脊椎動物間で保存されていることが示唆された^[18]。

3.3. Canonical and Non-Canonical WNT Signaling Pathway

WNT シグナル伝達経路は、転写共役因子 β -catenin を介して核内に WNT のシグナルを伝える標準（Canonical）WNT シグナル伝達経路と、細胞極性の変

化や細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇することで標的遺伝子の発現を制御する非標準 (Non-canonical) WNT シグナル伝達経路が存在する。このうち標準 WNT シグナル伝達経路は、哺乳類の小腸における上皮幹細胞の増殖を促進する上で重要な役割を果たすことが知られている。しかしながら、どの WNT リガンドがアフリカツメガエルの小腸における幹細胞制御に関与しているかは不明である。そこで標準 WNT シグナル伝達経路が活性化された際に発現が上昇する β -catenin 遺伝子に着目し、この遺伝子に変態最盛期の上皮幹細胞に強く発現する事を報告した^[20]。この結果は同時に、標準 WNT シグナル伝達経路が TH によって活性化されることを示唆している。

CD44は WNT シグナルの主要な標的遺伝子であり、細胞接着を含むさまざまな役割を担っている^[21]。また、CD44はヒアルロン酸 (HA) の主要なレセプターでもあり、上皮幹細胞が発現する小腸の陰窩に発現している。アフリカツメガエルの小腸における CD44の発現は、変態最盛期に上皮幹細胞とそれを取り囲む結合組織の細胞において一過性に上昇する^[22]。さらに HA 合成を阻害すると上皮幹細胞が形成されないことから、HA が上皮幹細胞の形成に必須であることを示している^[22]。

非標準 WNT シグナル伝達経路の平面細胞極性 (PCP) 経路について、筆者らはマイクロアレイ解析によって TH 応答遺伝子として同定された Wnt5a/ 受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体2 (*ror2*) シグナル伝達経路に注目した^[23]。これらの遺伝子は、変態中のアフリカツメガエルの小腸において一過性に発現が上昇した。また、変態前の小腸において、*ror2*の発現は幼生型上皮に散在しているが、変態最盛期には上皮幹細胞に特異的に発現するようになる^[24]。したがって、*ror2*を発現している幼生型の上皮細胞は、TH の作用によって上皮幹細胞に脱分化する運命にある予定幹細胞であると考えられている。さらに *wnt5a* の発現を抑制すると上皮幹細胞の形成が阻害されたため、*wnt5a/ror2* シグナル伝達経路が *ror2*陽性の予定幹細胞 (幼生型上皮細胞) から上皮幹細胞への脱分化に不可欠であることを示している^[24]。

3.4. Notch Signaling Pathway

哺乳類の小腸における Notch シグナル伝達経路の機能として、1. 上皮幹細胞の維持と 2. 上皮幹細胞から吸収上皮細胞あるいは分泌細胞への分化を誘導する細胞運命決定の制御が挙げられる^[25]。上皮幹細胞の維持にはノッチリガンドで

(8)

あるデルタ様リガンド1 (Dll1) と Dll4が必要である^[26]。また、マウスの小腸において Notch シグナルを阻害すると、陰窩における杯細胞への分化が促進されることが報告されている^[27]。一方、変態最盛期のアフリカツメガエル小腸では、THに応答した *notch1* と *dll1* の発現が上皮幹細胞において一過性に上昇する。筆者らのグループは、実験的に Notch シグナル伝達経路を阻害すると TH によって誘発される Lgr5 (上皮幹細胞マーカー遺伝子) の発現が抑制されることを示し、上皮幹細胞の発生に Notch シグナル伝達経路が関与する事を明らかにした。さらに、小腸のリモデリング中に Notch シグナル伝達経路を阻害すると、哺乳類の小腸を用いた実験と同様に、分泌細胞の過形成と吸収上皮細胞の減少が観察された。これらの結果は、Notch シグナルが上皮幹細胞から分化する細胞の運命決定に関与し、その機構が脊椎動物間で進化的に保存されていることを示唆している^[28]。

3.5. Hippo Signaling Pathway

Hippo シグナル伝達経路は、器官サイズ、再生、細胞分化、がん抑制において極めて重要な役割を果たしている^[29]。Hippo シグナル伝達経路は転写共役因子 YAP と TAZ のリン酸化カスケードによって制御されている。Hippo シグナルが活性化されると、YAP/TAZ はリン酸化され不活性になる。リン酸化された YAP/TAZ は細胞外へ排出されるため、主に細胞増殖に関連する遺伝子の発現が抑制される。一方、Hippo シグナルが不活性化すると、リン酸化されていない YAP/TAZ は核内に局在し、そこで結合パートナーである転写因子 TEAD と結合し、標的遺伝子の発現を促進する^[30]。また成体哺乳類の腸管において、YAP は腸管上皮幹細胞に強く発現している^[31]。腸管特異的な YAP1 欠損マウスでは、腸管の再生能力の低下、WNT シグナル伝達経路の過剰な働きによる陰窩の上皮幹細胞の増加、異所性の陰窩形成や微小アデノーマ形成が引き起こされる^[32]。このように哺乳類の腸管では、正常な組織の恒常性を維持するために Hippo シグナル伝達経路が重要な役割を担っている。

変態期のアフリカツメガエルの小腸では、上皮幹細胞とその周囲の結合組織細胞において、CD44 と同様に TH に応答して *yap1* の発現が一過性に上昇する^[33]。このことから Yap1 は WNT シグナル伝達経路の標的遺伝子であることが示唆されている。Yap1 は変態最盛期の発生ステージ 59 において Ror2 を発現している一部の幼生型上皮細胞の核に局在しており、幼生型上皮細胞から上皮幹細胞への

脱分化過程に Yap1 が関与する可能性が示された。さらに筆者らは、Yap-Tead 複合体の形成が、上皮幹細胞の増殖に必要であることを実験的に証明した^[34]。これらの結果から Hippo シグナル伝達経路は、アフリカツメガエルの小腸においても幹細胞ニッチ形成に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

4. ゲノム編集技術を用いたアフリカツメガエルの発生生物学研究に向けて

アフリカツメガエルの小腸の変態をモデルとした上皮幹細胞形成に関する研究は、本学の岡敦子名誉教授、長谷部孝教授、藤本健太准教授らにより飛躍的に前進した。その一方で、これまでに解説した遺伝子やシグナル伝達経路は、生物の発生や成長に非常に重要であるため、*in vivo* での逆遺伝学的な解析が困難であった。現代のバイオサイエンス分野はロングリードシーケンスの登場によるゲノム解析の簡便化と高速化により、いわゆるポストゲノム時代に突入した。ゲノム情報が整備されることで、RNA シーケンスのように網羅的に遺伝子機能やシグナル経路を解析することが一般的となった。サイエンスの様々な分野で日々開発される新しい実験手技を、どのように発生生物学に取り入れていくかが、今後独創的な発生生物学研究を進めるための鍵となる。この最後の項では、筆者がこれまでに取り組んできた、ツメガエルを用いたゲノム編集技術の開発と発生生物学への応用についてまとめる。

4.1. CRISPR-Cas9 によるゲノム編集

近年、両生類においてもゲノム編集による逆遺伝学的な解析が容易となったが、発生に関わる遺伝子の変異は胎生致死や発生不全を惹起し、標的遺伝子の発生や器官形成における機能解析が出来ない点が報告されている。筆者の研究でも、変態最盛期の小腸において TH 依存的に発現量が増加する *prmt1* や *dot1* をノックアウトすると、胚発生の完了後の比較的早い発生ステージにおいて致死となり、変態期における機能を解析できなかった^[35, 36]。こうした発生や成長に重要な遺伝子の機能を解析するためには、時期特異的に遺伝子を改変する技術が必要となる。マウス等のモデル動物では、標的遺伝子の発現を時期特異的に制御する方法として、Cre-loxP システムや Tet-On システムが最適化され広く

用いられている。これらの手法を用いるには各システムを搭載した DNA 断片を、ゲノム上のセーフハーバー領域（例：ヒト：AAV 遺伝子座、マウス：Rosa26 遺伝子座）に導入したトランスジェニック (Tg) 動物の作出が必要となる。しかしアフリカツメガエルではこれまでセーフハーバー領域が同定されておらず、精子核移植法 (REMI) や *I-SceI* エンドヌクレアーゼを用いた Tg カエル作製法が用いられてきた。これらの手法では、ゲノムに挿入する DNA 断片がランダムに宿主ゲノムに挿入されるため、どこに、どれだけ挿入されるかをコントロールすることは困難であった。Cre-loxP システムや Tet-On システムを利用した時期特異的な遺伝子発現の抑制法は、ゲノムから転写される外来遺伝子のコピー数やゲノムに挿入される向きをコントロールする必要があり、アフリカツメガエルにおいてもセーフハーバーの同定および標的領域に正確に DNA 断片を挿入するゲノムターゲティングを基とした Tg 作製法が必要であった。

そこで筆者らはアフリカツメガエルにおけるセーフハーバー領域を探索し、*tgfbr2l* 遺伝子座が外来遺伝子を高効率で導入できる領域であることを発見した。この発見には筆者と共同研究者がこれまで積み上げてきた、ゲノム編集技術を用いた研究の知見が大いに役に立った。ゲノムにおけるセーフハーバー領域とは、1：サイレンシングを受けず定期的に外来遺伝子を発現できる（不活性化されない）、2：その領域に外来遺伝子が導入されても、生物の発生、成長に影響を与えない、3：外来遺伝子が高効率で挿入される、4：導入された外来遺伝子が子孫に伝播する（生殖系列伝播）、等の条件を備えたゲノム領域である。筆者と共同研究者はゲノム編集技術を用いて、個体発生や器官形成に重要と思われる遺伝子をロックアウトし、その機能を解析してきた。その中でその遺伝子に変異を加えても、個体発生に影響を与えない遺伝子を複数同定していた。これまでこういった遺伝子は、目的とした表現型が得られない、つまり他の遺伝子によりその機能が補完されているため、機能解析ができない遺伝子として捉えられてきた。しかし筆者らは発想を転換させ、これらの遺伝子座がセーフハーバー領域の条件の1つである、「その遺伝子領域に変異が入っても個体発生に影響を与えない」を満たしていることに着目した。すなわちそれらの遺伝子座はセーフハーバー領域の候補となり得る領域であり、もし外来遺伝子が高効率で導入できるのであれば、アフリカツメガエルでもゲノムターゲティングを基とした Tg 動物作製が可能になると着想したのである。

ここでゲノム編集技術として近年注目されている Clustered Regulatory

Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) -Cas9による遺伝子発現抑制について、簡単に説明しておく。CRISPRは原核生物が持つ外来ウイルスに対する防衛機構である。まず感染した外来ウイルスのゲノムDNA（またはRNA）の一部のゲノム配列（スペーサー）が、原核生物自身のゲノム内に取り込まれる。再び同じウイルスが侵入した際に、このスペーサーから転写されたRNAがCas9タンパク質と複合体を形成する。この複合体のうちスペーサーから転写されたRNAが、再び侵入したウイルスのDNAやRNAゲノムにCas9タンパク質を誘導する。するとCas9タンパク質が外来DNAまたはRNAを切断し、体内から除去するという実に巧妙なシステムである。このシステムはまるでヒトの獲得免疫が感染後に抗原の長期記憶をするように、自身のゲノムの中に異物の情報をストックしておくことで、将来的に同じ異物からの感染を防ぐことができる強力な機構である。

研究者が標的とする遺伝子座に変異を入れる場合、まずその遺伝子座に相補的なsingle guide RNA (sgRNA)を設計する。現在、インターネット上で多くのsgRNA設計サイトが存在する (Crispr direct: <https://crispr.dbcls.jp/>、CHOPCHOP: <https://chopchop.cbu.uib.no/>)。各設計サイトに標的遺伝子のDNA配列を入れることで、簡単にsgRNAの候補を検索し、出力してくれる。ただし、設計サイトごとにアルゴリズムが異なるため、sgRNAごとのスコアが異なってくる。また、スコアが高いほどよりDNAの2本鎖切断を起こしやすいとされているが、実際に実験で用いるとスコア通りの切断効率が得られないことが多々ある。そのため実施者はいくつかの設計サイトでsgRNAを検討し、複数のsgRNAを実験に用いる必要がある。設計したsgRNAを市販のRNA合成キットを用いて合成する。sgRNAは先に説明したスペーサーから転写されたRNAである。そのためsgRNAをCas9タンパク質と混ぜ合わせて複合体を形成させ、アフリカツメガエルの受精卵にマイクロニードルを用いて注入すると、sgRNA/Cas9複合体はゲノムの標的領域に結合し、Cas9タンパク質がゲノムに2本鎖切断を生じさせる。2本鎖切断が生じたゲノム領域は、相同組み換え修復 (Homologous recombination: HR) や非相同末端結合 (Non-homologous end joining: NHEJ) により修復される。受精卵にCRISPR-Cas9システムを導入すると、主にNHEJを用いて修復されるが、この際にゲノムに塩基の挿入や欠失といった変異が入りやすく、これらの変異によりコドンの読み枠がずれることでフレームシフト変異やナンセンス変異が生じ、標的遺伝子の正常なタンパク質

形成が阻害される。このように CRISPR-Cas9 システムを利用することで、標的とする遺伝子座に変異を導入し、正常な遺伝子発現を抑制することで逆遺伝学的にその遺伝子の機能を解析することができる。

4.2. 新しい Tg 動物作出法の開発：NEXTrans

ではセーフハーバー領域に外来遺伝子を導入するには、どうすれば良いだろうか？これまでに用いられてきた REMI や *I-SceI* 法では、エンドヌクレアーゼによって生じた2本鎖切断領域に、HR や NHEJ による修復が起こることを利用している。HR を利用する方法として、MMEJ (Microhomology-mediated end joining) を用いる方法がある。この方法では導入したい遺伝子断片の両端に、2本鎖切断が生じる場所と相同な遺伝子配列を人工的に付加する。この人工的に付加する配列の長さは 15-30 bp とされているが、1 kbp ほどの比較的長い配列を付加することもある。一方、NHEJ での修復を利用する場合はより簡単である。NHEJ ではゲノムに導入される DNA 断片に、切断領域の相補的な配列は必要としない。直鎖化した2本鎖 DNA が NHEJ により修復される際に、その領域に外来 DNA が飛び込めばいいのである。つまりセーフハーバー領域 (*tgfbr2l* 遺伝子座) に外来遺伝子を挿入するためには、CRISPR-Cas9 を用いて *tgfbr2l* 遺伝子座に2本鎖切断を生じさせ、直鎖化した外来遺伝子を NHEJ による修復機構を利用して組み込めばいいのである。そこで筆者らは *tgfbr2l* 遺伝子のエキソン1の断片を、環状のプラスミド DNA に組み込んだ。これにより *tgfbr2l* を標的とした sgRNA は、ゲノム DNA だけでなくプラスミド DNA にも2本鎖切断を生じさせる (プラスミド DNA の直鎖化)。2本鎖切断を生じたゲノム DNA は NHEJ により修復されるが、この際に直鎖化したプラスミド DNA がゲノムに組み込まれる。プラスミド DNA にはあらかじめレポーター遺伝子 (蛍光タンパク質) などを組み込んでおくことで、目的とするプラスミド DNA がゲノムに組み込まれたかどうかを判断できる。このコンセプトにしたがって、実際にいくつかの Tg カエルを高効率で作出することに成功し、本手法を New and Easy Xenopus Transgenesis (NEXTrans) と命名した (図4) ^[37]。セーフハーバー領域の条件として、導入された外来遺伝子が不活性化されることなく、次世代にも安定して発現する必要がある。そこで、Tg カエルが性成熟を完了したのち野生型個体との人工授精を行い、次世代子孫においても外来遺伝子の挿入とレポーター遺伝子の安定した発現を確認した。この手法を用いることで、アフリカツ

メガエルのセーフハーバー領域である *tgfbr2l* 遺伝子座に外来のプラスミド DNA を高効率で導入することが可能となったのである。

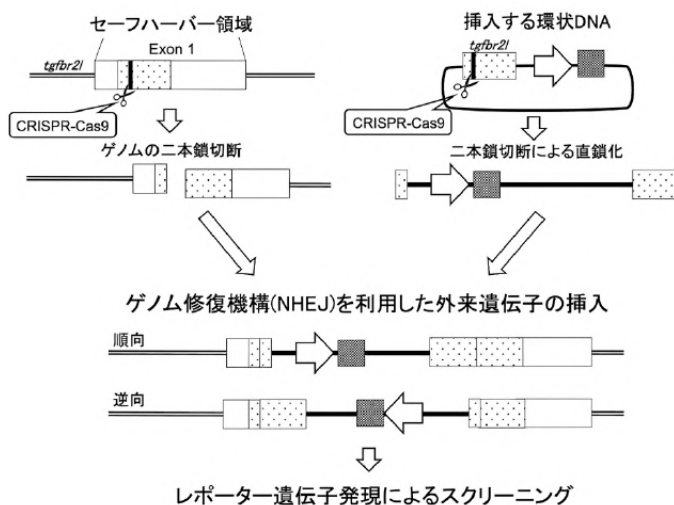


図4. NEXTransによる遺伝子導入の作用機序

4.3. NEXTrans を活用した発生生物学研究

NEXTrans を用いることの最大のメリットとして、ゲノム DNA のどこに、どれだけのプラスミド DNA が組み込まれたかを確認することができる点にある。すなわちこれまで両生類ではあまり活用されていなかった Cre-loxP や Tet-On システムのような、時期特異的に標的遺伝子を抑制（または促進）させる技術を利用できるようになる。前述の通り、従来の単純な遺伝子のノックアウトでは、発生や成長に重要な遺伝子を破壊すると個体死や発生不全が起きてしまう。そこで、その遺伝子機能を解析したい時だけピンポイントにその遺伝子の発現を、（可能であれば目的の組織だけで）抑制（あるいは促進）することができれば、個体の発生、成長に影響を与えることなく、器官形成における標的遺伝子の機能を解析できるのである（標的遺伝子の時空間制御技術）。

筆者らは現在 CRISPR-Cas9 や CRISPR-Cas13d を用いた時期特異的な遺伝子ノックアウト・ノックダウンに取り組んでいる。アフリカツメガエルを遺伝学に用いる際のデメリットとして、性成熟に時間を要する点が挙げられる（約1年）。いくつかの遺伝子改変カエルの作出には成功しているが、これらを実験に使える

(14)

るようになるまで2-3年が必要である。基礎科学研究では成果が出るまで時間がかかることはしばしばあるが、できるだけ早く成果をまとめ、再び本紀要に原稿を掲載できるよう努力する次第である。

5. おわりに

ポストゲノム時代に突入した基礎生物学分野では、これまでモデル生物として利用されていなかった動物でも比較的容易かつ安価にそのゲノム情報を決定することができるようになった。2018年からは世界の50箇所以上の研究所が連携して、地球上の存在する150万種におよぶ脊椎動物の全ゲノムを決定しようとする試みが進められている（地球バイオゲノムプロジェクト）。こうしたゲノム情報が整備されると比較的容易にゲノム編集を行うことが可能となり、遺伝子の機能解析へのアプローチが容易となる。またゲノム解析にとどまらず、さまざまな技術革新により遺伝子の解析手法は新たなステージに進んでいる。例えば、当研究室が新たに取り組んでいる Hybridization Chain Reaction (HCR) 法では、mRNA 1分子の1細胞内における局在を可視化することが可能である。この手法はこれまで用いられてきた *in situ hybridization* 法よりもはるかに高感度で、かつ簡便に標的とする mRNA の細胞内局在を可視化できる。あるいは Photo-Isolation Chemistry (PIC) による空間トランスクリプトーム解析により、切片上で特定の領域に限定した遺伝子発現情報を読み取ることができる。こうした日々報告される新たな手法を取り入れつつ、従来の方法では解析困難であったアフリカツメガエルの発生や器官形成における標的遺伝子の時空間制御に挑む時が来たのである。

References

- [1] Y. B. Shi, Life Without Thyroid Hormone Receptor. *Endocrinology* **162**, (2021).
- [2] Y. B. Shi, Y. Shibata, Y. Tanizaki, L. Fu, The development of adult intestinal stem cells: Insights from studies on thyroid hormone-dependent anuran metamorphosis. *Vitam Horm* **116**, 269-293 (2021).
- [3] K. Fujimoto, Y. Shibata, T. Hasebe, Thyroid Hormone-Activated Signaling Pathways are Essential for Development of Intestinal Stem Cells. *J Nippon Med Sch* **90**, 246-252 (2023).
- [4] L. M. Sachs *et al.*, Dual functions of thyroid hormone receptors during *Xenopus*

- development. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **126**, 199-211 (2000).
- [5] E. Bochukova *et al.*, in *New England Journal of Medicine*. (Massachusetts Medical Society, 2012), vol. 366, pp. 243-249.
- [6] A. M. Session *et al.*, Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. *Nature* **538**, 336-343 (2016).
- [7] U. Hellsten *et al.*, The genome of the Western clawed frog *Xenopus tropicalis*. *Science* **328**, 633-636 (2010).
- [8] M. H. I. Dodd, J. M. Dodd, in *Physiology of the Amphibia*. (Elsevier, 1976), pp. 467-599.
- [9] Y. Shibata, L. Wen, M. Okada, Y. B. Shi, Organ-Specific Requirements for Thyroid Hormone Receptor Ensure Temporal Coordination of Tissue-Specific Transformations and Completion of *Xenopus* Metamorphosis. *Thyroid* **30**, 300-313 (2020).
- [10] Y. Shibata *et al.*, Thyroid Hormone Receptor Is Essential for Larval Epithelial Apoptosis and Adult Epithelial Stem Cell Development but Not Adult Intestinal Morphogenesis during *Xenopus tropicalis* Metamorphosis. *Cells* **10**, (2021).
- [11] J. Gagne-Sansfacon, J. M. Allaire, C. Jones, F. Boudreau, N. Perreault, Loss of Sonic hedgehog leads to alterations in intestinal secretory cell maturation and autophagy. *PLoS One* **9**, e98751 (2014).
- [12] T. Hasebe, M. Kajita, Y. B. Shi, A. Ishizuya-Oka, Thyroid hormone-up-regulated hedgehog interacting protein is involved in larval-to-adult intestinal remodeling by regulating sonic hedgehog signaling pathway in *Xenopus laevis*. *Dev Dyn* **237**, 3006-3015 (2008).
- [13] V. Marigo, R. A. Davey, Y. Zuo, J. M. Cunningham, C. J. Tabin, Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor. *Nature* **384**, 176-179 (1996).
- [14] J. Lee, K. A. Platt, P. Censullo, A. Ruiz i Altaba, Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Development* **124**, 2537-2552 (1997).
- [15] A. Ishizuya-Oka, T. Hasebe, K. Shimizu, K. Suzuki, S. Ueda, Shh/BMP-4 signaling pathway is essential for intestinal epithelial development during *Xenopus* larval-to-adult remodeling. *Dev Dyn* **235**, 3240-3249 (2006).
- [16] T. Hasebe, M. Kajita, L. Fu, Y. B. Shi, A. Ishizuya-Oka, Thyroid hormone-induced sonic hedgehog signal up-regulates its own pathway in a paracrine manner in the *Xenopus laevis* intestine during metamorphosis. *Dev Dyn* **241**, 403-414 (2012).
- [17] A. Ishizuya-Oka *et al.*, Thyroid hormone-induced expression of sonic hedgehog correlates with adult epithelial development during remodeling of the *Xenopus* stomach and intestine. *Differentiation* **69**, 27-37 (2001).
- [18] T. Hasebe, K. Fujimoto, A. Ishizuya-Oka, Thyroid hormone-induced expression of

- Foxl1 in subepithelial fibroblasts correlates with adult stem cell development during *Xenopus* intestinal remodeling. *Sci Rep* **10**, 20715 (2020).
- [19] M. Shoshkes-Carmel *et al.*, Subepithelial telocytes are an important source of Wnts that supports intestinal crypts. *Nature* **557**, 242-246 (2018).
- [20] T. Hasebe, K. Fujimoto, M. Kajita, A. Ishizuya-Oka, Thyroid hormone activates Wnt/beta-catenin signaling involved in adult epithelial development during intestinal remodeling in *Xenopus laevis*. *Cell Tissue Res* **365**, 309-318 (2016).
- [21] M. Katoh, M. Katoh, WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin Cancer Res* **13**, 4042-4045 (2007).
- [22] T. Hasebe, K. Fujimoto, M. Kajita, A. Ishizuya-Oka, Essential Roles of Thyroid Hormone-Regulated Hyaluronan/CD44 Signaling in Adult Stem Cell Development During *Xenopus laevis* Intestinal Remodeling. *Stem Cells* **35**, 2175-2183 (2017).
- [23] D. R. Buchholz, R. A. Heimeier, B. Das, T. Washington, Y. B. Shi, Pairing morphology with gene expression in thyroid hormone-induced intestinal remodeling and identification of a core set of TH-induced genes across tadpole tissues. *Dev Biol* **303**, 576-590 (2007).
- [24] A. Ishizuya-Oka, M. Kajita, T. Hasebe, Thyroid hormone-regulated Wnt5a/Ror2 signaling is essential for dedifferentiation of larval epithelial cells into adult stem cells in the *Xenopus laevis* intestine. *PLoS One* **9**, e107611 (2014).
- [25] S. Fre *et al.*, Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature* **435**, 964-968 (2005).
- [26] L. Pellegrinet *et al.*, Dll1- and dll4-mediated notch signaling are required for homeostasis of intestinal stem cells. *Gastroenterology* **140**, 1230-1240 e1231-1237 (2011).
- [27] J. H. van Es, N. de Geest, M. van de Born, H. Clevers, B. A. Hassan, Intestinal stem cells lacking the Math1 tumour suppressor are refractory to Notch inhibitors. *Nat Commun* **1**, 18 (2010).
- [28] T. Hasebe, K. Fujimoto, M. Kajita, L. Fu, Y.-B. Shi, Thyroid Hormone-Induced Activation of Notch Signaling Is Required for Adult Intestinal Stem Cell Development During *Xenopus Laevis* Metamorphosis ATSUOKA ISHIZUYA-OKA a. *Wiley Online Library* **35**, 1028-1039 (2017).
- [29] F. X. Yu, B. Zhao, K. L. Guan, Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. *Cell* **163**, 811-828 (2015).
- [30] B. Zhao *et al.*, TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes Dev* **22**, 1962-1971 (2008).
- [31] E. R. Barry *et al.*, Restriction of intestinal stem cell expansion and the regenerative response by YAP. *Nature* **493**, 106-110 (2013).

- [32] J. Cai *et al.*, The Hippo signaling pathway restricts the oncogenic potential of an intestinal regeneration program. *Genes Dev* **24**, 2383-2388 (2010).
- [33] W. M. Konsavage, Jr., S. L. Kyler, S. A. Rennoll, G. Jin, G. S. Yochum, Wnt/beta-catenin signaling regulates Yes-associated protein (YAP) gene expression in colorectal carcinoma cells. *J Biol Chem* **287**, 11730-11739 (2012).
- [34] T. Hasebe, K. Fujimoto, A. Ishizuya-Oka, Essential roles of YAP-TEAD complex in adult stem cell development during thyroid hormone-induced intestinal remodeling of *Xenopus laevis*. *Cell Tissue Res* **388**, 313-329 (2022).
- [35] Y. Shibata, M. Okada, T. C. Miller, Y.-B. Shi, Knocking out histone methyltransferase PRMT1 leads to stalled tadpole development and lethality in *Xenopus tropicalis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1864**, (2020).
- [36] L. Wen, L. Fu, X. Guo, Y. Chen, Y. B. Shi, Histone methyltransferase Dot1L plays a role in postembryonic development in *Xenopus tropicalis*. *FASEB J* **29**, 385-393 (2015).
- [37] Y. Shibata *et al.*, CRISPR/Cas9-based simple transgenesis in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* **489**, 76-83 (2022).

(受付日 令和5年 12月 29日)

(受理日 令和6年 3月 5日)