

# 博士論文審査報告書

## 論 文 題 目

Study of the role of CRMP2 during the nervous system development in zebrafish

申 請 者

Carolina	FIALLOS OLIVEROS
フィアヨス オリベロス	カロリナ

Department of Life Science & Medical Bioscience  
Research on Molecular Brain Science

2020 年 7 月

Collapsin response mediator proteins (CRMPs) /

Dihydropyrimidinase-like (Dpysls) family は微小管結合タンパク質の一つで、軸索伸長や細胞移動といった神経系の発生・発達期のいくつかの過程に関与することが知られている。ゼブラフィッシュとヒトの CRMPs はホモロジーが高く、ゼブラフィッシュの胚が透明で観察しやすく、発生が早く進むので、神経発生において CRMPs がどのような役割を有するのかを調べるのに適している。CRMP2 は CRMP ファミリータンパク質 (CRMP1-5) の内で、最も機能解析されているメンバーで、元々はセマフォリンのシグナルを伝達する分子として見出された。発生期のゼブラフィッシュにおいては、CRMP2 の発現は後脳の脳神経細胞や網膜の神経節細胞、脊髄の Rohon-Beard 細胞などの中枢神経系のいくつかの神経細胞で観察されることが報告されている。CRMP2 は Antisense Morpholino Oligonucleotides (AMO) を用いたノックダウン (KD) 実験により脊髄の Rohon-Beard 細胞や運動神経細胞の配置や軸索伸長に関与していることが報告されているが、CRMP2 の神経発生における機能はまだ十分には解析されていない。

本研究では、脳運動神経の発生・発達における CRMP2 の役割を、これらの神経細胞特異的に GFP が発現する Islet1-GFP トランスジェニックゼブラフィッシュを用いて脳運動神経の発生過程を可視化することで解析可能としている。特に今回着目した顔面運動神経は、後脳の第 4・5 ロンボメアで形成され、第 6・7 ロンボメアへ後方移動し、受精後 36 時間には大部分の神経細胞が第 6・7 ロンボメアへ移動した状態となる。三叉神経と顔面運動神経の軸索はその後に腹側へ伸長し、受精後 52 時間には正中を越え、72 時間後には投射を終了する。これらの神経細胞の移動と軸索の伸長の制御メカニズムにはまだ不明な点が多く残されている。本研究では AMO を用いた KD と CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いた KO という 2 つの実験手法を用いて、これら発生現象への CRMP2 の関与を明らかにすることを目的としている。

第 1 章では、ゼブラフィッシュの発生研究におけるモデル生物の有用性を記述し、研究の背景となった前述のゼブラフィッシュにおける神経発生についての概説と AMO と CRISPR/Cas9 による遺伝子機能解析についてその有用性を議論している。特に、これまで AMO を用いたゼブラフィッシュの CRMP2 の機能解析を行なった先行研究に触れ、CRISPR/Cas9 で KO ゼブラフィッシュを作成して解析する本研究の目的を記載している。これまでの研究を総括して解説されており、研究目的も明確に示されていて評価される。

第 2 章では、本研究で用いられた研究手法を記載しており、特に本研究でどのように CRISPR/Cas9 技術を用いて遺伝子改変を導入したか、AMO により KD を行なったか、を記述している。また、得られた表現型の解析法も独自のアイデアを反映させている。

第 3 章は本研究で得られた結果を記載している。後脳運動神経細胞の発

生・発達を解析する方法として用いた Islet1-GFP トランスジェニックゼブラフィッシュについて、まずは自身の観察結果を元に野生型における観察結果を示し、次に AMO による KD の結果として前述の顔面運動神経の移動が障害されていることを見出している。AMO としては、翻訳阻害型とスプライシング阻害型の 2 種類を用いて、両者とも異常を示す割合が、コントロールの AMO に比べて、高率であることを受精後 50 時間の各条件で 30 以上の胚で比較して示しており、明確な結果であると評価される。また三叉神経と顔面神経の軸索伸長を受精後 58 時間で解析して、伸長異常を見出している。

次に CRISPR/Cas9 による CRMP2 KO ゼブラフィッシュライン確立について記載している。このラインを Islet1-GFP トランスジェニックゼブラフィッシュと交配して、脳神経発生・発達の解析を行なったことを詳細に示している。変異の同定に用いた PCR による遺伝子型検出法にはオリジナルな工夫がみられ、評価される。1 つの胚を AMO による KD 胚で見出された顔面運動神経の移動異常と、三叉神経と顔面神経の軸索伸長異常の発生頻度を PCR による genotyping 結果と合わせて解析した。その結果、CRMP2 KO 胚では、これらの異常が高頻度で認められることを示している。さらに、こうした表現型が CRMP2 欠損の直接的な効果であることを確認するために、レスキュー実験として、*in vitro* で合成した CRMP2 mRNA を CRMP2 KO 胚へインジェクションして回復するかを解析している。顔面運動神経の移動異常について、CRMP2 野生型、CRMP2 KO、CRMP2 KO に CRMP2 mRNA をインジェクションした 3 群について統計的に比較して、CRMP2 KO で他の 2 群と統計的有意差をもって、異なることを示している。こうした実験結果に基づいて、CRMP2 の機能喪失により、顔面運動神経の移動異常が起きていると結論づけている。解析している個体数も 20 以上あり結果は評価される。研究結果として示された CRMP2 の機能は新規の発見であり、Islet1-GFP トランスジェニックゼブラフィッシュラインを用いる工夫により見出されている。CRMP2 KO で単に表現型を観察されたことを記載するのみでなく、この表現型が CRMP2 の機能喪失であることをレスキュー実験によりその特異性を確認している点で評価される。更に、最近 CRMP2 AMO を用いて見出された、視神経の伸長についてもその表現型を解析している。その結果、CRMP2 KO 胚でも同様の表現型がある可能性を示唆するものとなっている。

第 4 章では、本研究で得られた研究結果について議論している。特に、これまで AMO による KD による先行研究で見出された脊髄神経細胞の発生異常の表現型が KO 胚では見出されなかった点について、その結果の違いを議論している。AMO による KD と KO の表現型が異なることはゼブラフィッシュを用いた研究で既に多くの報告があり、AMO によるオフターゲット効果が指摘されている。一方で、KO においては、代償的に他の遺伝子発現が上昇することで、表現型をマスクするケースも報告されるなど、いずれの実験手法も限界があり、今回の結果の様に両者の手法を行ない、同様の表現型が示

されることがより信頼性を上げることが可能となることを議論している。

第5章では、ヒレの再生において **CRMP2 KO** で示された異常を紹介し、**CRMP2** の神経系以外の機能が示唆される点など今後の研究の将来的展望を示しており、後続の研究の指針となるものであり評価される。

公聴会においての審査員と主に以下の質疑があった。

- 1、**CRMP2WT** と **CRMP2+/+**の比較で **severe affected** に差があるのではないかと質問に対して、その解析を追加して **discussion** することとするとの回答であった。
- 2、今回示された解析結果がオフターゲット効果である可能性はあるかという質問に対して、その可能性はあるが、**KD** と **KO** の解析で同じ表現型が見られるものは機能喪失の結果と言えとの説明であった。
- 3、コンディショナル **KO** という技術が今回の解析で有用か、との質問がなされたが、有用ではあるが、発生のタイミングと表現型の関連をより詳細に解析することが先ずは必要と考えるとの回答であった。
- 4、**CRMP2 KO** の親から生まれる次世代に致死が多いがその原因は何か、という質問に対して、**CRMP2** が一種の母性効果遺伝子と捉えられる可能性はあるが、胚の生育不良には多くの環境因子が関連するので、結論づけにはより詳細な検討が必要との回答であった。
- 5、ヒレの発生には異常があるかという質問に対して、発生期には異常はなかったとの回答であった。また、ヒレの再生の表現型は **CRMP2** の神経系の機能によるものか、という質問に対して、非神経系の機能がセマフォリンでもあり、**CRMP2** は非神経系にも発現しているので、非神経系の機能と考えられるとの回答であった。

以上の質疑を通じて、申請者が当該学問領域の十分な学識を有していることが確認出来た。公聴会で指摘された箇所の修正は博士論文に反映されていることを確認した。本研究は、**CRISPR/Cas9** を用いて初めて **CRMP2 KO** ゼブラフィッシュを作成したこと、**AMO** による **KD** と **KO** という2つの異なる実験手法を用いて、顔面運動神経の移動が障害されることを新たに見出している。さらに、レスキュー実験で表現型が回復することも示しており、学術的に評価される研究成果で、当該研究領域を発展させる優れたものであり、博士（理学）に相応しいものであると考える。

2020年6月

主査 早稲田大学教授 医学博士 山梨医科大学 大島 登志男

早稲田大学教授 博士（医学）大阪大学 井上 貴文

早稲田大学教授 博士（理学） 東京大学 佐藤 政充