

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07376

研究課題名(和文) FGF活性調節を可能にする新たなゲノム戦略の解明

研究課題名(英文) Study on regulation of FGF signaling during planarian regeneration

研究代表者

梅園 良彦 (Umesono, Yoshihiko)

兵庫県立大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：20391881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：プラナリアは高い再生能力を有する。過去の研究結果から、線維芽細胞増殖因子(FGF)シグナルがプラナリアの頭部再生に働くことが示唆された。申請者は、アフリカツメガエル胚を活用してアッセイ系を構築し、プラナリアFGF(DjFGF)がプラナリアFGF受容体(DjFGFRs)および偽FGF受容体(NDK-DARAKE(NDK)ファミリー)のIgドメインに結合できるかどうかを調べた。その結果、DjFGFは、特定のNDKファミリーのIgドメインに結合できることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究成果により、プラナリアは、nou-darakeを代表とする偽FGF受容体遺伝子をそのゲノムに複数個獲得することによって、FGF活性調節の多様性を生み出すという脊椎動物とは異なる非常にユニークなゲノム戦略を進化の過程で獲得したことが考えられた。

研究成果の概要(英文)：Planarians exhibit extraordinarily high regenerative ability based on somatic pluripotent stem cells. Previous studies suggest that fibroblast growth factor (FGF) signaling plays a crucial role in the regulation of head tissue differentiation during planarian regeneration. In this study, we have established an assay system using *Xenopus laevis* embryos and examined whether planarian FGF (DjFGF) can bind Ig domains of planarian FGF receptor-related protein. This assay provides evidence of positive interaction between DjFGF and Ig domains of a certain planarian FGF receptor-related protein in vivo.

研究分野：再生生物学

キーワード：FGFシグナル 再生 プラナリア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1). プラナリアは分化多能性幹細胞を用いて、失われたすべての組織・器官を再生することが可能な動物である。発生・再生過程において、線維芽細胞増殖因子(Fibroblast growth factor: FGF)は、細胞の増殖、分化および移動など様々な働きをもつ分泌性因子である。FGF は拡散し、細胞質内にキナーゼドメインをもつ膜貫通型 FGF 受容体(FGFR)を介して標的細胞にシグナルを入力する。*nou-darake(ndk)*は、FGFR に相同な細胞外免疫グロブリン(Ig)ドメインを2個有するが、細胞内キナーゼドメインを欠く膜タンパク質をコードしているプラナリア遺伝子であり、頭部領域特異的に発現している。RNA 干渉 (RNAi) により機能阻害を行うと、*ndk* 発現領域である頭部領域を超えて、脳の過形成が生じることが報告されている (Cebrià et al., 2002, *Nature*)。この結果から、NDK は分泌性の前方化因子の拡散を制御することによって、頭部領域に脳細胞の分化を限局させていることが想定された。その後、NDK と同様の構造を有する偽 FGFR をコードする遺伝子がプラナリアには複数存在することが明らかとなった。

(2). プラナリア FGF 分子が分泌性の前方化因子の第一候補として考えられたが、プラナリアにおける FGF リガンドの存在はずっと謎のままであった。申請者は、プラナリア種 (ナミウズムシ) をモデルとして、世界で初めてプラナリア *fgf (Djfgf)* 遺伝子の同定に成功し、解析を進めることが可能となった。

2. 研究の目的

申請者は、NDK を代表とするキナーゼドメインをもたない偽 FGFR の多様化と FGF リガンドとの関係性を明らかにすることで、生物進化における FGF 活性調節の新たなゲノム戦略を理解することを目的とした。具体的には、新たにアッセイ系を構築することで、DjFGF と結合できるプラナリア FGFR (DjFGFRs) および偽 FGFRs を同定することを第一目標とした。また、プラナリア再生過程における FGF シグナル経路の役割を調べることを目指した。

3. 研究の方法

(1). アフリカツメガエル胚を活用し、アフリカツメガエル FGFR の Ig ドメインを DjFGFRs、偽 FGFR である NDK および NDK ファミリーの Ig ドメインで入れ換えたキメラ受容体をコードする mRNA および *Djfgf* mRNA をアフリカツメガエル受精卵に頭微注入し、アニマルキャップを用いてアフリカツメガエル FGF シグナル経路の標的遺伝子である *Xbra* の発現誘導能を定量 RT-PCR 法で解析することによって、DjFGFRs、NDK および NDK ファミリーの Ig ドメインに DjFGF が結合できるかどうかを調べた。

(2). Whole mount *in situ* hybridization による *Djfgf* の再生過程における発現解析および RNAi による *Djfgf* の機能解析をおこなった。

4. 研究成果

(1). 図 1 に示す Chimera *fgfr* mRNA および *Djfgf* mRNA のそれぞれ単独および組み合わせ mRNAs をゼノパス受精卵 2 細胞期のそれぞれの割球に頭微注入し、stage10~11 の animal cap から total RNA を精製し、それを鋳型に cDNA を合成し、アフリカツメガエル胚 FGF シグナルの標的遺伝子である *Xbra* の発現誘導能を定量 RT-PCR 法により解析し、それぞれの単独注入と比較して、共注入が有意に *Xbra* の発現を誘導できるかどうかを調べた。その結果、受精卵を得るために使用したアフリカツメガエル雌雄の遺伝的背景が異なることによって実験結果が非常に不安定になることが判明し、解析は難航したが、結果的には、特定のプラナリア偽 FGFR が DjFGF と結合できることを示唆する統計的に有意な結果を得ることができた。この結果は、新規アッセイ系が構築できたことを意味した。

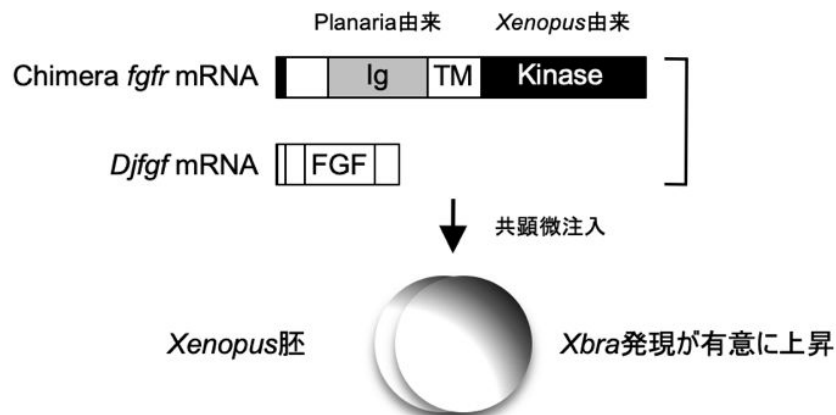


図1 アフリカツメガエル胚を活用したアッセイ系

(2). *Djfgf* は FGF8/17/18 サブファミリーに属するタンパク質をコードし、切断後、頭部再生に伴う幹細胞増殖領域で一過的に発現することがわかった (図 2)。また、その発現パターンは、ERK シグナル経路による正の制御、Wnt/ β -catenin シグナル経路による負の制御によって形成されることもわかった。これらの結果により、*Djfgf* は、プラナリア頭部再生誘導因子として働くことが実際に示唆された。

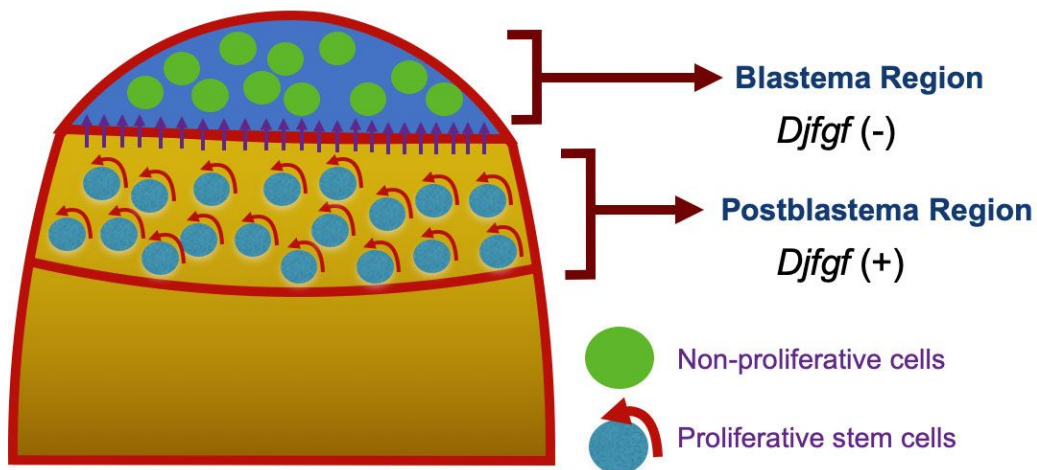


図 2 *Djfgf* の再生過程における発現部位

(3). 驚いたことに、*Djfgf* はこれまでに確立した RNA 干渉法が全く働かないことが判明したため、解析方針を変更し、ビーズを担体とした分泌性タンパク質の機能獲得型実験の確立をめざした。その結果、プラナリア生体へのビーズ移植法の開発に成功した (図 3)。この方法では、少なくとも移植後 3 日間は生体内に移植されたビーズが留まっており、再生における影響を調べることが十分に可能な期間であると判断した。

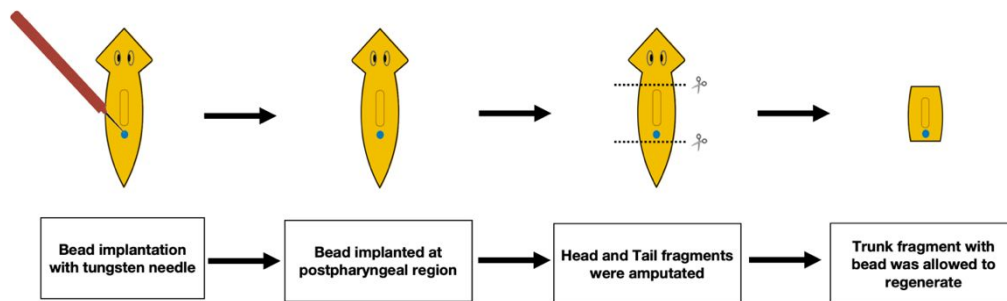


図 3 プラナリア生体におけるビーズ移植

(4). 総合的には、新規アッセイ系および分泌性タンパク質の機能獲得型実験系を開発することができた。依然、プラナリアは遺伝子導入が不可能なため、今後、更なる研究を進めるためのユニークな研究基盤を構築することができた。

(5). 上記の 1 部の研究成果については、論文にまとめて、現在投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hattori, M., Miyamoto, M., Hosoda, K., Umesono Y.	4. 巻 60
2. 論文標題 Usefulness of multiple chalk-based food colorings for inducing better gene silencing by feeding RNA interference in planarians	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 76-81
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12413	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato, K., Umesono, Y., Mochii, M.	4. 巻 433
2. 論文標題 A transgenic reporter under control of an es1 promoter/enhancer marks wound epidermis and apical epithelial cap during tail regeneration in <i>Xenopus laevis</i> tadpole	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 404-415
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ydbio.2017.08.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 梅園良彦
2. 発表標題 プラナリアの前後軸再生機構の解明
3. 学会等名 再生学異分野融合研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梅園良彦
2. 発表標題 プラナリアの前後軸に沿ったからだのプロポーション形成を司る分子基盤
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会（ConBio2017）（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮本真衣、服部美希、細田和孝、梅園良彦
2. 発表標題 プラナリアにおける脳を介さない摂食行動の解析
3. 学会等名 日本発生生物学会 秋期シンポジウム2016
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 梅園良彦
2. 発表標題 Molecular logic of planarian regeneration along the head-to-tail axis
3. 学会等名 第22回国際動物学会 第87回日本動物学会合同大会(国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 細田和孝、梅園良彦
2. 発表標題 Molecular logic for robust organ positioning according to the anterior-posterior axis size during planarian regeneration
3. 学会等名 Joint Meeting of the German and Japanese Societies of Developmental Biologists(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考