

令和元年6月11日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18580

研究課題名(和文)両生類における幼生型から成体型幹細胞への変換機構の解明

研究課題名(英文)Transition of stem cells from the larval to adult type during amphibian metamorphosis

研究代表者

田村 啓 (TAMURA, Kei)

北里大学・理学部・講師

研究者番号：50458767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：両生類の変態では、尾の退縮や四肢の形成などのダイナミックな形態変化が起こる。さらに、血球や小腸では、それまで機能していた幼生型細胞が細胞死によって除去される一方、成体型の機能を持った細胞が増殖・分化することで成体型組織を再構成すると考えられている。本研究において、成体型細胞の起源を明らかにすることができなかったが、細胞系譜の追跡技術の基盤をツメガエルでも整えることができた。一方、変態期の尾部におけるヒレの退縮において、特異的に細胞死を誘導する分子機構を示唆することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発生過程における細胞の系譜について、これまで初期発生を中心に解析が行われてきた。後期発生で起こる両生類の変態は、一度構築した幼生型器官から成体型へと形態・機能的な変化を遂げる。本研究によりツメガエルにおいて細胞系譜を追跡、および細胞死誘導機構を明らかにすることによって、後期発生における器官形成機構を理解することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：During the metamorphosis of anuran amphibians, tissue remodeling occurs in a dynamic and orderly manner through developmental programs. In this process, the larval type of cells is removed by cell death, whereas the adult type of cells proliferates, and differentiates to build adult tissues. In this study, although the origin of adult cells could not be clarified, we were able to set the foundation for cell lineage tracing technology in *Xenopus*. On the other hand, we suggested the molecular mechanisms for fin degeneration during metamorphosis.

研究分野：発生生物学

キーワード：変態

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

両生類の変態では、尾部の退縮や四肢の形成に加え、血球や小腸の再編成が起こる。再構成の際には、それまで機能していた幼生型細胞が細胞死によって除去される一方、成体型の機能を持った細胞が増殖・分化することで成体型組織を形成する。変態は、甲状腺ホルモンによって誘導されることが分かっているが、細胞特異的に細胞の運命を決定する分子機構は未解明な点が多く残されている。特に、変態期に出現する成体型の細胞は、どのような起源をもっているのか、また幼生型細胞がどのように排除されていくのか、その分子機構の解明が変態機構の理解には必要とされている。

2. 研究の目的

これまでの我々の研究から、変態期に起こる赤血球置換において、TNF ファミリーに属する TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL1) が、幼生型赤血球特異的に細胞死を誘導し、赤血球置換を促進していることが分かっていた。しかし、変態期前の幼生に TRAIL1 処理を行っても、成体型赤血球は出現することはなかった。このことから、幼生細胞の除去と成体型細胞の出現には、独立した機構が存在している可能性が考えられる。そこで、成体型赤血球の増殖・分化機構の解明に向けての第一歩として、その細胞の起源を明らかにする必要がある。本研究では、ツメガエルの変態過程において、成体型の細胞が、どのように出現するのか、その起源を探るために、細胞追跡技術をツメガエルに導入する。また、変態期に排除される幼生型の細胞は、どのように識別され細胞死が誘導されていくのか、その分子機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 前駆細胞特異的に発現するレポーターコンストラクトの作製

赤血球の前駆細胞に発現する遺伝子 (*gata2*) の発現調節領域を GFP レポーターに導入し、ネッタイツメガエルの受精卵にメガヌクレアーゼ (I-SceI) を用いて、トランスジェニックカエルを作製した。

(2) ツメガエル培養細胞におけるノックイン効率の検討

EGFP 遺伝子の upstream に標的配列と相同な領域をもつドナー DNA を作製し、FokI-dCas9 とともに、ツメガエル培養細胞に導入し、Microhomology-mediated end joining (MMEJ) 法によって標的遺伝子座に EGFP を挿入した。この際、さらに組み換え後の配列をオリゴ DNA として導入する two-hit by gRNA and two oligos with a targeting plasmid (2H20P) 法も行った。

(3) 尾部におけるヒレ特異的な細胞死誘導機構の解析

TRAIL1 タンパク質を大腸菌で発現・精製し、器官培養した幼生期 (stage 56) の尾部、あるいはツメガエル培養細胞 (XLgoo 細胞および XL-B4 細胞) に添加し、アポトーシス細胞を TUNEL 法によって検出した。

4. 研究成果

(1) 前駆細胞特異的に発現するレポーターコンストラクトの作製

Cre/loxP システムを用いて赤血球分化過程における細胞系譜を追跡するため、*gata2* 遺伝子の転写調節領域を利用した Cre 発現個体の作製を試みた。まず、赤血球前駆細胞での発現に必要な領域を特定するため、種を超えて保存された非翻訳領域である Conserved Noncoding Sequence (CNS) を探索した。その結果、ツメガエル、メダカ、グリーンアノール、ニワトリの *gata2* 遺伝子を比較した結果、転写開始点から上流 14kbp、および第 4 イントロンに保存された領域が存在することが分かった。この領域を用いて、GFP レポーターを作製し、トランスジェニックカエルを作製した。GFP 陽性細胞を観察すると、*gata2*-CNS-EGFP が導入された初期胚 (stage 23) では、内在性の *gata2* 遺伝子の発現と類似した GFP の発現がみられた。このことから、*gata2* 遺伝子周辺の進化的に保存された領域は、初期発生における *gata2* 遺伝子発現制御に重要な領域であることが考えられた。しかし、幼生期においては、GFP の発現を維持する個体を得ることはできなかった。*gata2* 遺伝子以外にも複数のマーカー遺伝子の推定転写調節領域を用いて、トランスジェニックカエルを作製したが、初期発生期には発現がみられないものの、幼生期後期においても安定的に発現する個体を得ることはできなかった。

(2) ツメガエル培養細胞におけるノックイン効率の検討

gata2 遺伝子の推定転写調節領域を用いたトランスジェニックにおいて、赤芽球特異的な発現を制御することができなかったため、次に、内在性の発現により近づけるため、*gata2* 遺伝子座に GFP を導入することを試みた。ツメガエルの培養細胞を用いて、MMEJ 法、および 2H20P 法によるノックインを行った。その結果、どちらの方法においても、GFP を標的遺伝子座に導入することに成功した。しかし、導入効率が低いことから、今後改良を行うことで、ツメガエル

ル個体にも応用することを予定している。

(3) 尾部のヒレ特異的な細胞死誘導機構の解析

幼生型細胞の排除機構に関して、我々がこれまで、赤血球置換に TNF ファミリーに属する TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL1)が、幼生型赤血球特異的に細胞死を誘導することが明らかになっていた。興味深いことに、TRAIL1 受容体が変態期の尾部でも発現が上昇することから、尾部退縮における TRAIL1 の機能解析を行った。まず、変態前の幼生(ステージ 56)から単離した尾を器官培養し、TRAIL1 の影響を調べたところ、TRAIL1 処理した尾では、無処理に比べ、ヒレの面積が有意に減少していた。そこで、器官培養後の尾の組織切片を TUNEL 染色したところ、TRAIL1 処理によりヒレの内側に存在する細胞および表皮細胞に TUNEL 陽性細胞が多く観察されたが、筋組織には TUNEL 陽性細胞はほとんど認められなかった。次に、*X. laevis* の幼生尾部より樹立した細胞株であり、ともに *dr-mmRNA* を発現していることが分かっている筋芽細胞 XL-B4、および血管内皮細胞 XLg00 を用いて、TRAIL1 感受性を調べた。細胞生存率アッセイの結果、XL-B4 細胞では TRAIL1 処理による生存率の変化は認められなかったが、XLg00 細胞では TRAIL1 による濃度依存的な生存率低下がみられた。このことから、TRAIL1 を介した細胞死誘導には細胞特異性があることが示唆された。また、XLg00 細胞における TRAIL1 誘導性細胞死は、caspase-3/7 の活性上昇や核の断片化がみられ、TUNEL 陽性であったことから、この細胞死はアポトーシスであると考えられた。caspase 阻害剤である Z-VAD-FMK で処理をすると、TRAIL1 による核や DNA の断片化は抑制されたことから、caspase によってアポトーシスが誘導されていることが示唆された。このことから、TRAIL1 はヒレを構成する血管内皮細胞、間充細胞や表皮細胞にアポトーシスを誘導すると考えられる。これらの結果から、変態期の尾の退縮において、TRAIL1 は血管内皮細胞をはじめとするヒレの細胞に対して、主に caspase を介したアポトーシスを誘導することで、退縮を促進している可能性が考えられた。現在、TRAIL1 受容体を CRISPR/Cas9 システムによってノックアウトした個体を作製しており、今後、尾部のヒレの退縮、および赤血球置換への影響について解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

Wada, M., Fujitani, K., Tamura, K., Mawaribuchi, S., Kamata, Y., Takamatsu, N., Ito, M.

Masculinization-related genes and cell-mass structures during early gonadal differentiation in the African clawed frog *Xenopus laevis*

Zoological Science, 34: 105-111 (2017).doi: 10.2108/zs160185. 査読有

田村啓

両生類における変態の分子機構

皮膚と美容,49:34-39(2017) <https://www.jhsa.jp/book/hihubv49/> 査読無

[学会発表](計 14 件)

宮坂拓実, 伊藤道彦, 福井彰雅, 高松信彦, 田村啓

ツメガエルの筋組織リモデリングにおける新規ミオシン重鎖遺伝子クラスターの解析

第 41 回日本分子生物学会, 2018 年 11 月, 横浜

加藤啓太, 伊藤道彦, 高松信彦, 田村啓

ネオテニ動物アホロートルの副甲状腺ホルモン遺伝子の構造と発現解析

第 43 回日本比較内分泌学会, 2018 年 11 月, 仙台

中西晋也, 和田美加子, 田村啓, 三浦郁夫, 高松信彦, 伊藤道彦

ツメガエル属の生殖巣形成における雌デフォルト構造 “mass-in-line”

第 43 回日本比較内分泌学会, 2018 年 11 月, 仙台

田村啓, 北岸千明, 高松信彦, 伊藤道彦

変態過程での尾部のヒレが退縮する機構

第 12 回ツメガエル研究集会首都圏大会(XCIJ-MA), 2018 年 7 月, 東京

伊藤道彦, 回淵修治, 中迫啓, 萩田悠作, 林舜, 藤谷和子, 田村啓, 高松信彦
脊椎動物の性決定遺伝子の分子進化および性決定システム進化
生命科学系学会合同年次大会, 2017年12月, 神戸
林舜, 回淵修治, 田村啓, 内山孝司, 高松信彦, 伊藤道彦
トランスポゾン性決定遺伝子 dm-W の新機能獲得に貢献したのか?
生命科学系学会合同年次大会, 2017年12月, 神戸
北岸千明, 高松信彦, 伊藤道彦, 田村啓
ツメガエル幼生尾部由来の血管内皮細胞におけるデス受容体リガンド TRAIL の機能解析
日本動物学会 第88回 富山大会, 2017年9月
萩田悠作, 中迫啓, 回淵修治, 田村啓, 高松信彦, 伊藤道彦
メダカ性決定遺伝子 dmy の DNA 結合性と多量体化に関わるコード領域の分子進化
日本進化学会 第19回大会, 2017年8月, 京都
田村啓, 北岸千明, 高松信彦, 伊藤道彦
アフリカツメガエルの幼生尾部由来培養細胞株を用いた変態過程における細胞運命決定
機構の解析
第3回次世代両生類会議, 2017年8月, 岡崎
Tamura, K., Kitagishi, C., Takamatsu, N., Ito, M.
Thyroid hormone negatively regulates myogenic differentiation in tadpole
tail-derived myoblast cells in *Xenopus laevis*.
18th International Congress of Comparative Endocrinology, 2017年6月, カナダ, アルバータ
Ito, M., Wada, M., Mawaribuchi, S., Tamura, K., Takamatsu, N.
Maintenance & deconstruction of mass-in-line structures by sex steroids or TGF
during early gonadal differentiation in the African clawed frog.
18th International Congress of Comparative Endocrinology, 2017年6月, カナダ, アルバータ
ツメガエル初期生殖巣形成における mass-in-line 構造の雌雄化機構
和田美加子, 藤谷和子, 回淵修治, 田村啓, 高松信彦, 伊藤道彦
第39回日本分子生物学会年会, 2016年12月 横浜
岡野則仁, 藤谷和子, 田村啓, 萩田悠作, 和田美加子, 高松信彦, 伊藤道彦
生殖細胞運命・雄化に関わる転写因子 DMRT1 の天然変性領域とオーダー領域に夜転写活
性化領域の分子進化
第39回日本分子生物学会年会, 2016年12月, 横浜
田村啓, 北岸千明, 平山彩友実, 高松信彦, 伊藤道彦
ツメガエルの変態に関する death receptor 分子 DR-M の発現および機能解析
第10回日本ツメガエル研究集会, 2016年11月, 沖縄

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.kitasato-u.ac.jp/sci/resea/seibutsu/joho/index.htm>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。