

令和 3 年 5 月 23 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06257

研究課題名(和文) 器官再生を惹起するROSシグナルの解明

研究課題名(英文) Analysis of ROS signaling in amphibian organ regeneration

研究代表者

鈴木 賢一 (Suzuki, Ken-ichi)

基礎生物学研究所・新規モデル生物開発センター・特任准教授

研究者番号：90363043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の最終目的は、器官再生におけるROSシグナルの重要性と一連の分子機構を解明することである。高い器官再生能力を持ち、超高効率のゲノム編集が可能なイベリアトゲイモリをモデル動物として研究を行なった。まず四肢再生芽におけるトランスクリプトミクス解析を行い、ROSシグナルの下流において四肢再生の鍵となる候補因子の同定を試みた。次にこれら候補遺伝子群の一部に対してはノックアウト解析を行い、器官再生における機能を評価した。さらに、ROSシグナリングを細胞レベルで時空間的に誘導可能なトランスジェニックイモリの作出も行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

器官再生におけるROSシグナルの重要性と分子機構を解明することが本申請課題の目的である。本研究課題では、高い器官再生能力を持ち、超高効率のゲノム編集が可能であるイベリアトゲイモリをモデルとして用いる。本研究から得られる成果は、発生・再生生物学におけるROSの新たな生物学的意義の発見につながる。くわえて、現在注目度の高い再生医学分野において、器官再生に関する重要な知見をもたらすことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The goal of this study is to elucidate the importance of ROS signaling in organ regeneration and the series of molecular mechanisms involved. We used the Iberian ribbed newt, which has a high capacity for organ regeneration and is capable of highly efficient genome editing, as a model animal. First, we performed transcriptomic analysis of the limb blastema to identify candidate factors downstream of ROS signaling that are key to limb regeneration. Next, we analyzed the knockout of some of these candidate genes and evaluated their functions in organ regeneration. In addition, we generated transgenic newt capable of spatiotemporally inducing ROS signaling at the cellular level.

研究分野：発生生物学

キーワード：イベリアトゲイモリ 器官再生 ROS ゲノム編集 トランスジェニック

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、植物・無脊椎動物・高等脊椎動物の器官再生において、活性酸素(ROS)の重要性を示唆する研究が多数報告され、再生生物学の分野で大きな関心が寄せられている。多細胞生物の組織や器官が物理的損傷を受けた際に生じる生体反応の一つが ROS の発生である。植物から高等脊椎動物まで、ROS が器官再生の最初に誘導される「再生シグナル」である可能性が高まっている。申請者はアフリカツメガエルにおいて器官再生のごく初期段階から発生する ROS が、その後続く大規模なエピジェネティクス修飾の変化に必須である可能性を報告している(Suzuki et al., 2016)。しかしながら、器官再生における ROS の意義と作用機序に関する知見は極めて少ない。本申請課題の問いは、「ROS シグナルがどのような作用機序で器官再生を惹起するのか?」というブラックボックスの中身である。

### 2. 研究の目的

本申請課題の目的は、再生時における ROS シグナルの関与と一連の作用機序(分子機構)を解明することである。モデルとして、器官再生能力が高く、超高効率のゲノム編集と逆遺伝学が可能な新規モデル動物であるイベリアトゲイモリを用いる。オミックス解析・ゲノム編集技術・トランスジェニック技術を駆使して、再生 ROS シグナルに関与する因子を網羅的な同定、再生 ROS シグナル関与因子の *in vivo*での機能解析、器官再生における ROS シグナルを *in vivo*にて解析するツールの開発、これらを用いて上記の分子機構を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) .オミックス解析による再生 ROS シグナルに関与する候補因子の同定:

器官再生時に生じる ROS シグナルとその一連の作用機序を解明するために、四肢再生芽の網羅的なトランスクリプトームおよびプロテオーム解析を行った。イベリアトゲイモリ成体の再生前肢再生芽からタイムコース(0, 3, 19 days)を取って total RNA を抽出し、Illumina HiSeq により RNA-Seq 解析を行った。また、前肢再生芽から可溶性条件を変化させた複数のタンパク質分画を LTQ OrbitrapXL+Ultimate3000nanoLC を用いて、ショットガンプロテオミクス解析を行った。得られたトランスクリプトームおよびプロテオームデータをバイオインフォマティクス解析し、再生 ROS シグナルへの関与が考えられる因子群の候補を絞った。

(2) .迅速 F0 ノックアウトシステムを用いた再生 ROS シグナル関与因子の機能的同定:

まずはノックアウトによる遺伝子機能解析の手法を立ち上げるため、recombinant Cas9 を用いた迅速かつ超高効率な F0 ノックアウト法を確立した。次に上記オミックス解析で絞り込んだ再生 ROS シグナルへの関与が考えられる候補遺伝子群の一部に関して、ノックアウト個体における四肢再生への影響を評価した。

(3) .再生現象における ROS シグナルを *in vivo*解析するシステムの開発:

器官再生における ROS シグナルの関与を *in vivo*でより詳細に解析するため、時空間的に ROS シグナルを細胞レベルで誘導することが可能なトランスジェニック(Tg)イモリの確立を試みた。緑色蛍光照射により活性酸素を産生する KillerRed レポーターTg コンストラクトをイモリ受精卵に導入することにより ROS の産生が誘導可能な Tg イモリファウンダーを作出した。

### 4. 研究成果

(1) .オミックス解析による再生 ROS シグナルに関与する因子のあぶり出し:

日本国内のイベリアトゲイモリ研究者から構成される「イベリアトゲイモリ研究コンソーシア

ム」と共同で、様々な組織や発生段階の RNA-Seq データ (29 サンプル; illumina のプラットフォームでトータル 1.2 Billion リード) を統合して、大規模なトランスクリプトーム解析を行った (申請者が取得したデータ四肢再生芽の RNA-Seq データも含まれる)。WGCNA 解析の結果、様々な組織や発生段階におけるトランスクリプトームの特徴が浮き彫りになり、その中で再生特有 (創傷治癒や再生芽特異的) な 274 遺伝子を同定することができた (Matsunami et al., 2019)。再生特異的な遺伝子群において複数の ROS 関連遺伝子・細胞外マトリックス (ECM) 関連遺伝子・上皮間葉転換 (EMT) 関連遺伝子が確認された。腫瘍における癌関連繊維芽細胞 (CAF) は腫瘍特異的な細胞外環境の形成を行う細胞群として近年注目されているが、この際に ROS を介して ECM リモデリングや EMT に深く関与している可能性についての研究が多数報告されている。CAF と再生芽細胞には共通的な特徴が多数あるため、再生時に ROS が ECM 分解酵素を誘導し、ECM リモデリングを誘発し、分化した細胞の EMT を活性化した結果、再生芽細胞が誕生するのでないかと考察している。

完全に再生するイモリと不完全な再生となるアフリカツメガエルの四肢再生芽のショットガンプロテオミクス解析を行い、得られたカエルとイモリのプロテオームプロファイルを比較することにより、カエルとイモリ特有のタンパク質も複数同定した。しかしながら、イモリ MS スペクトルの Protein Sequence Database (PSD) に対する同定率 (アサイン率) が 30~40% と、他のモデル生物種と比べて低いという問題が生じた。この問題は、上記 short read による RNA-Seq ベースの gene model が不完全であることに起因している (完全長をカバーしていない・コンティグが短い・冗長性が高い)。一方、アフリカツメガエル四肢再生芽のショットガンプロテオミクス解析でのアサイン率は 80% 以上と高い。これは、充実したゲノムデータやトランスクリプトームに裏付けされた gene model を PSD として用いているためである。現在の HiSeq を用いた short リードの RNA-Seq データを用いたイベリアトゲイモリ PSD では、網羅的かつ定量的なプロテオミクス解析は難しく、かつゲノムデータからの gene model 構築は当面望めない状況にある。そこで、PacBio Sequel を用いた完全長 cDNA 解析 (Iso-Seq 解析) を先進ゲノム支援の協力の下に行い、gene model の構築を試みた。これら得られた知見や技術は、本研究課題だけでなくイベリアトゲイモリ研究全体においても今後有用なものとなるであろう。

## (2) .迅速 F0 ノックアウトシステムを用いた再生 ROS シグナル関与因子の機能的同定:

イベリアトゲイモリのゲノム編集技術の開発を行い、recombinant Cas9 と gRNA の RNP 複合体を受精卵にインジェクションすることにより、体細胞変異率 99% 以上の超高効率ノックアウト法を整備した (Suzuki et al., 2018)。この技術に加えて、インジェクション当世代個体 (F0) の体細胞変異率をアンプリコンシークエンスにより正確にカウントする実験プロトコールおよび web ベースの解析アプリケーションである CLICKAR を開発した (Iida et al., 2020)。これらを組み合わせることによりイベリアトゲイモリ にいて迅速・高効率・簡便な遺伝子機能解析システム (Crispant システム) を確立するに至り、国内外で高い評価を得ている。本研究成果により、有尾両生類において本格的な逆遺伝学的手法が完成されたことは再生研究において大きな意義があり、今後当該分野にとどまらないイベリアトゲイモリを用いた生物学研究の展開が期待できる。

研究期間中に上記 (1) にて同定した遺伝子群のノックアウト変異体を複数作出し、一部については四肢再生への影響を精査しているが、現在のところ四肢再生に影響が出る遺伝子は見つかっていない。可能性としては、遺伝子機能の冗長性や複数の遺伝子の同時ノックアウトが必要なのかもしれない。本研究成果にて得られたこれら変異体における器官再生への影響は引き続き

精査していく予定である。

(3) .再生現象における ROS シグナルを *in vivo* 解析するシステムの開発

(2) のように遺伝子ノックアウトにより研究を進めていく一方、細胞レベルで ROS シグナルを制御するツールの開発も行った。緑色光の励起により ROS を産生する赤色蛍光タンパク質である KillerRed を組み込んだ Tg イモリの作出を行った。この Tg は KillerRed をユビキタスに発現しその際にレーザーにより局所的に ROS を産生することができるため、再生器官や組織に重要な特定の細胞集団に細胞死を誘導したり目的タンパク質の不活性化することが *in vivo* で可能となる。セレクションマーカーである Crystallin-CFP 陽性（レンズが青色蛍光を発する）個体を多数得ており、今後ライン化することにより本申請課題を引き続き発展させていく予定である。

以上のように、本研究課題では多くの有意義な知見やツールを得ただけでなく、研究期間内に国際学術誌三本（査読あり）を公表することができたことは大きな成果である。得られた研究成果をもとに、今後も器官再生の分子機構解明を目指して引き続き研究を発展させていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Midori Iida, Miyuki Suzuki, Yuto Sakane, Hiroyo Nishide, Ikuo Uchiyama, Takashi Yamamoto, Ken-ichi T. Suzuki, Satoshi Fujii	4. 巻 25
2. 論文標題 A simple and practical workflow for genotyping of CRISPR-Cas9 based knockout phenotypes using multiplexed amplicon sequencing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 498-509
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12775	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 Masatoshi Matsunami, Miyuki Suzuki, Yoshikazu Haramoto, Akimasa Fukui, Takeshi Inoue, Katsushi Yamaguchi, Ikuo Uchiyama, Kazuki Mori, Kosuke Tashiro, Yuzuru Ito, Takashi Takeuchi, Ken-ichi T Suzuki, Kiyokazu Agata, Shuji Shigenobu, Toshinori Hayashi	4. 巻 26
2. 論文標題 A comprehensive reference transcriptome resource for the Iberian ribbed newt <i>Pleurodeles waltl</i> , an emerging model for developmental and regeneration biology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 DNA Research	6. 最初と最後の頁 217-229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/dnares/dsz003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Miyuki Suzuki, Toshinori Hayashi, Takeshi Inoue, Kiyokazu Agata, Miki Hirayama, Miyuzu Suzuki, Shuji Shigenobu, Takashi Takeuchi, Takashi Yamamoto, Ken-ichi T. Suzuki	4. 巻 443
2. 論文標題 Cas9 ribonucleoprotein complex allows direct and rapid analysis of coding and noncoding regions of target genes in <i>Pleurodeles waltl</i> development and regeneration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 127-136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2018.09.008	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------