

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14723

研究課題名(和文) ゲノム編集による四肢再生特異的発現遺伝子の機能解析とツメガエル成体の再生能回復

研究課題名(英文) Functional analysis of genes specifically expressed for limb regeneration by genome editing and recovery of regenerative capacity in adult *Xenopus laevis*

研究代表者

川住 愛子 (Aiko, Kawasumi)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：80625484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：高い再生能力をもつアフリカツメガエル幼生が後肢を発生・再生する過程の形態形成期についてトランスクリプトーム解析を行い、「再生領域特異的に発現上昇する遺伝子」を10個同定した。うち2個の遺伝子(X1, X2)についてゲノム編集による機能欠損実験を行ったところ、幼生で後肢再生が異常になる表現系(後肢"発生"には全く異常が見られない)が得られ、複数の形態形成遺伝子発現の減少が見られた。次に熱ショック応答を利用した過剰発現による機能回復実験を行ったところ、成体で後肢切断後に先端が2～3本に分岐した軟骨をもつ器官が再生するという表現系が得られ、形態形成遺伝子発現の上昇が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アフリカツメガエル成体は不完全な後肢再生(通常は単純な1本の軟骨をもつ後肢が再生)しか起こせないが、単一遺伝子を人為的に発現させることで、最大3本に分かれた軟骨をもつ後肢を再生させることができた。また、機能欠損することによって後肢再生部位の形態形成に異常が現れ、その時に発生の形態形成には全く影響が見られなかった。このような働きをもつ遺伝子の発見は世界初である。今回得られた因子をさらに詳しく解析することで、不完全な再生能力をもつアフリカツメガエルに完全な再生をさせるための手がかりが得られると予想される。

研究成果の概要(英文)：We conducted transcriptome analysis of the morphogenesis phase of hindlimb development and regeneration in larvae of *Xenopus laevis*, which has a high regenerative capacity, and identified 10 genes that are upregulated specifically in the regeneration region. Genome editing of two of these genes (X1 and X2) resulted in abnormal hindlimb regeneration in larvae (no abnormalities were observed in hindlimb "development") and a decrease in the expression of several morphogenetic genes. Next, we conducted a functional recovery experiment by overexpression of X1 or X2 using heat shock response, and obtained regenerates with bifurcate/trifurcate cartilage after hindlimb amputation in adult frogs, confirming an increase in morphogenetic gene expression.

研究分野：四肢再生

キーワード：四肢再生 形態形成 ゲノム編集 トランスクリプトーム解析 アフリカツメガエル ネットアイツメガエル RNA-seq

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む哺乳類の再生能力を向上させることは、理学的に魅力的な研究課題であるとともに、医学的にみても究極的な課題の一つである。もちろん哺乳動物を対象にこの課題にダイレクトに踏み込むことは極めて難しく、そのため、再生能力の高いモデル動物を用いて研究を行い、その仕組みを哺乳類へ応用することを模索するというストラテジーがとられてきた。特に両生類は高い再生能力を持ち、四肢再生の研究については長い歴史を持つ。興味深いことに、イモリを代表とする有尾目が一生に渡り四肢再生可能であるのに対し、無尾目(カエル類)は、幼生期には高い四肢再生能を示す一方で、成体になるまでにその能力は低下していき、最終的にはスパイクと呼ばれる1本のとげ状の軟骨と表皮のみの構造が復元されるのみとなる(指や筋肉などの構造ができない)。そこで多くの研究者は哺乳類再生への応用の第一歩として、再生能力の低いカエルの成体において四肢を完全再生させる方法を模索してきた。イモリやカエルにおいて再生可能な器官が損傷を受けると、まずその損傷部位に「再生芽」と呼ばれる特殊な組織が形成されるため、多くの先行研究では、この再生初期の再生芽形成過程にフォーカスし、脱分化・増殖に必要な因子を同定してきた。しかしこれまでに、それらの因子を操作することで後の形態自身の復元に至ったという報告は皆無である。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、トランスクリプトーム解析によって再生領域特異的に発現する遺伝子群を明らかにしてきた。本研究では、これらの遺伝子の機能解析を起点に、ツメガエル四肢再生を駆動する分子機構を明らかにするとともに、その機構を再生能力が著しく低下する成体に誘導することで再生能力を回復させることに挑戦する。

3. 研究の方法

以下の2課題に取り組むことで研究目的を達成する。

[課題1] ゲノム編集技術による再生領域特異的に発現する遺伝子の機能解析

[課題2] 候補遺伝子の過剰発現によるツメガエル成体再生能力回復への挑戦

[課題3] 機能欠損/獲得ツメガエル個体の再生領域における遺伝子発現と細胞増殖の解析

4 . 研究成果

[課題 1]

アフリカツメガエル幼生の四肢再生・発生過程における形態形成期について RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行った結果、再生領域特異的に発現上昇する遺伝子 10 個が同定された。この 10 個のうち最も発現量の差が大きい 2 つの候補遺伝子(X1, X2)について、Crispr-Cas9 系を利用したゲノム編集による機能解析(Loss of Function)を 2 倍体であるネットイツメガエルに対して行った。Founder 個体(F0)は高いモザイク性を示したため次世代(F1)による解析を行ったところ、遺伝子 X1,X2 とともに変異個体(幼生)について四肢再生が異常になる表現系が得られた。この時、四肢再生異常を示した個体は左後肢のみを切断し、右後肢はそのまま発生過程を進めていたのだが、四肢発生に関しては全く異常が見られなかった。この様な「四肢発生には影響せず四肢再生だけで働く遺伝子」はこれまでに知られていない。

[課題 2]

熱ショック応答により遺伝子 X1, X2 発現を誘導できる Transgenic アフリカツメガエル個体を作製し、四肢再生領域で X1, X2 を過剰発現させることによってこれら遺伝子の機能解析(Gain of Function)を行った。野生型のアフリカツメガエルでは、変態後の個体は幼生よりも再生能力が低く、四肢切断を行った場合には 1 本の棒状軟骨をもつ「スパイク」が再生するのみで指などのパターンは再生しない。ところが、遺伝子 X1 をリークにより発現させた Tg 個体(変態後の幼若個体)について後肢切断を行い再生させたところ、先端が 2~3 本に分岐した軟骨をもつ再生が起こること(X1 : N=10/30, X2 : N=7/21)を確認した。

[課題 3]

遺伝子 X1 のゲノム編集 F2 個体(幼生)の四肢再生における形態形成遺伝子発現を RNAscope により確認したところ、最大 4 割の個体でいずれかの遺伝子発現パターンに異常が見られた。同様にして形態形成遺伝子発現量の定量をリアルタイム PCR によって行ったところ、最大 4 割の個体でいずれかの遺伝子発現量の低下を確認した。

次に、遺伝子 X1 の過剰発現個体(変態後の幼若個体)においてもリアルタイム PCR による形態形成遺伝子発現量の定量を行ったところ、約 3 割の個体で形態形成遺伝子発現量の上昇が確認された。

遺伝子 X1 のゲノム編集 F2 個体(幼生)/過剰発現個体(変態後の幼若個体)の四肢再生において、自脚部の低形成/再生部位の膨大がそれぞれ確認されたため、形態変化が現れる少し前の再生部位における細胞増殖パターンをリン酸化ヒストン H3 の免疫染色によって確認した。その結果、ゲノム編集個体/過剰発現個体は野生型と比較してそれぞれ有意に増殖細胞数の減少/増加していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Hasugata Riho, Hayashi Shinichi, Kawasumi-Kita Aiko, Sakamoto Joe, Kamei Yasuhiro, Yokoyama Hitoshi	4. 巻 2018
2. 論文標題 Infrared Laser-Mediated Gene Induction at the Single-Cell Level in the Regenerating Tail of <i>Xenopus laevis</i> Tadpoles	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cold Spring Harbor Protocols	6. 最初と最後の頁 pdb. prot101014
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/pdb.prot101014	査読の有無 無
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2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川住愛子, 鈴木孝幸, 横山仁, 亀井保博, 田村宏治, 森下喜弘
2. 発表標題 アフリカツメガエルとニワトリ胚における四肢形態形成動態の定量比較解析
3. 学会等名 第52回 日本発生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Aiko Kawasumi, Takayuki Suzuki, Hitoshi Yokoyama, Yasuhiro Kamei, Koji Tamura, Yoshihiro Morishita
2. 発表標題 Quantitative and comparative analysis of limb morphogenesis between chick and <i>Xenopus</i> embryos
3. 学会等名 The 52nd annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------