

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19570210

研究課題名 (和文) 尾部再生に必要な基部-先端パターン形成のメカニズム

研究課題名 (英文) Mechanism for proximal-distal patterning in tail regeneration

研究代表者

餅井 真 (MOCHII MAKOTO)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・准教授

研究者番号:90202358

研究成果の概要：アフリカツメガエル幼生尾部の再生には、再生芽の先端で強く発現する *Xwnt-5a* が重要な働きを持つ。*Xwnt-5a* の作用機構を明らかにすることを中心として、尾部再生における基部—先端パターン形成のメカニズムを明らかにしようとした。その結果、*Xwnt-5* は幼生尾部組織に直接作用すること。Canonical Wnt シグナル経路ではなく、JNK シグナルを経由すること。再生芽の伸長やパターン形成には Wnt シグナルに加えて FGF や hedgehog シグナルも重要であることなどがわかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：アフリカツメガエル、尾部再生、基部・先端パターン、Wnt5a、

1. 研究開始当初の背景

アフリカツメガエル幼生の尾部を切断すると2週間以内にほぼ完全に失われた部分が再生するが、背側から半分程度まで切り込みを入れた場合は、切断時と同じ種類の組織が傷つけられたにも関わらず傷の治癒しかおきない。二つの過程で発現の異なる遺伝子を検索した結果、*Xenopus wnt-5a* (*Xwnt-5a*) が尾部切断後は再生芽の先端で強く濃度勾配を持って発現するのに対し、治癒過程では発現上昇しないことがわかった。さらに、切れ込み部分に *Xwnt-5a* を発現する細胞塊 (アニマルキャップ) を移植したところ、尾部再

生と同様な過程を経て、二次的な幼生尾部が形成された。そこで、*Xwnt-5a* が再生芽の基部-先端パターン化に重要な働きをもち、その結果再生芽の伸長と尾部再生の進行がおきると推定した。

2. 研究の目的

Xwnt-5a が実際どのような作用機構によって、傷口部分に二次的な尾部を形成するのか、またなぜ尾部を完全に切断した場合だけ *Xwnt-5a* が発現上昇するのかを明らかにしようとした。また、再生芽の基部—先端パタ

ーン化に *Xwnt-5a* がどのように関わるのか、他のシグナル分子もこの過程に関わっているのかを明らかにしようとした。

3. 研究の方法

(1) アフリカツメガエル幼生(st. 48-50)の尾部を中央部分で切断し、室温で放置したものを正常再生として用いた。また、中央部分に背側から脊索の中央まで切れ込みを入れたものを傷の治癒のモデルとした。

Xwnt-5a 等を用いる場合は、2細胞期胚に mRNA を注入し、胞胚期になったものからアニマルキャップを切り出し、切れ込み部分に挟み込むように移植した。

(2) CMV プロモーターの制御下に EGFP を発現するトランスジェニック系統を作製し、その幼生を移植実験のホストとして用いた。

(3) 尾部から脊髄を除去するには、まず中央部分で尾部を切断し、さらに残った尾部の付け根部分に背側から切れ込みを入れ、露出させた脊髄を抜き取った。FGF を作用させる場合は、適当な濃度の FGF 溶液に浸しておいたアフィゲルブルービーズを、脊髄除去した尾部切断面の脊髄があった場所に押し込んだ。

(3) 様々なシグナル経路に対する阻害剤を用いる場合は、尾部を切断した個体ごと適当な阻害剤溶液中で飼育した。

4. 研究成果

(1) *Xwnt-5a* による異所的尾部はホスト組織に由来する

体全体で EGFP を発現するトランスジェニック幼生をホストとして用いて、*Xwnt-5a* mRNA を注入しておいた胚由来のアニマルキャップを移植したところ、異所的に形成された尾部の組織の大部分がホストの組織由来であることが確認された。アニマルキャップ由来の細胞の多くは、異所的尾部の先端近くで分化性質を持たない細胞塊を形成するか、表皮になっていた。

(2) *Xwnt-5a* はホスト組織に直接作用するアニマルキャップ自身の細胞で Wnt シグナルが働くことを阻害するために dominant-negative Dsh を同時に注入しても、異所的尾部は形成された。また、*Xwnt-5a* を発現するアニマルキャップが *Xwnt-5a* 以外の既知のシグナル因子を強く発現することもなかった。以上のことから、*Xwnt-5a* はホスト組織の細胞に直接働きかけることにより異所的尾部を誘導することが強く示唆された。

(3) *Xwnt-5a* により再生芽先端特異的遺伝子が誘導される

Xwnt-5a により誘導された異所的尾部は、

正常再生尾部と同様に先端で強く、濃度勾配を持って *Xwnt-5a* を発現した。また、以前の研究で我々が単離した遺伝子 *xESI* は、再生尾部先端部分の表皮で強く発現するが、*Xwnt-5a* を作用させた傷口では、この *xESI* の強い発現が異所的に誘導されることもわかった。

(4) 異所的尾部は canonical Wnt シグナルでは誘導されない

再生芽や尾部の切れ込み部分では canonical Wnt として良く知られる *xWnt-8* が発現するが、これをアニマルキャップ移植によって傷口に作用させても、異所的尾部は形成されなかった。また、*Xwnt-11* も同様に異所的尾部を誘導できなかった。以上のことから異所的尾部を形成する能力は *Xwnt-5a* に特有であることがわかり、正常再生においても *Xwnt-5a* が必須であることが示唆された。

(6) *Xwnt-5a* は JNK シグナルを介して働くようだ

Xwnt-8 を作用させた結果から、*Xwnt-5a* が non-canonical 経路を用いて作用することが強く示唆された。Non-canonical シグナル経路として知られる Ca²⁺シグナルと JNK シグナルそれぞれに対する阻害剤を再生尾部に作用させたところ、JNK を阻害した場合、尾芽末端特異的な遺伝子 *xESI* は発現誘導されず、再生も進行しないことがわかった。

(7) 脊髄は完全な尾部再生に必要なイモリなどの有尾両生類では尾部の再生に脊髄の存在が必須であるが、カエル幼生では必須ではないとされていた。アフリカツメガエル幼生から完全に脊髄を除去する手術法を確立し、この問題の検証をおこなったところ、脊髄を除去した尾部は著しく再生の速度が遅くなった。また、脊髄を持たない再生尾部の脊索は細く波打つことがわかった。以上のことからカエル幼生の尾部脊髄は、これまで考えられていたよりも重要な働きを持ち、再生尾部のパターン形成に必須であることがわかった。

(8) FGF は尾部再生を促進する

脊髄を含む再生尾部と含まない再生尾部との遺伝子発現比較から、脊髄を持たない尾部では複数の FGF 遺伝子の発現が低下することがわかった。また、in situ ハイブリダイゼーション解析の結果、再生脊髄は複数の FGF 遺伝子を強く発現することもわかった。FGF を染み込ませたビーズを移植した結果、FGF-10 と bFGF は脊髄を持たない再生芽の伸長を促進し、正常な再生に近づけることがわかった。

(9) hedgehog シグナルは尾部再生に必須である

再生尾部の脊索では sonic hedgehog (shh) が強く発現するが、hedgehog シグナルの特異的阻害である cyclopamine で処理すると、尾

部再生が著しく阻害されることがわかった。詳細な観察の結果、筋肉前駆細胞の移動や増殖が著しく阻害されることと、脊索細胞の最終分化（液胞化）が阻害されることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Sugiura, T, Tazaki, A, Ueno, N, Watanabe, K and Mochii, M (2009) Xenopus Wnt-5a induces an ectopic larval tail at injured site, suggesting a crucial role for noncanonical Wnt signal in tail regeneration. *Mech. Dev.* 126:56-67. 査読有

2. Fujii H, Sakai M, Nishimatsu S, Nohno T, Mochii M, Orii H, Watanabe K. (2008) VegT, eFGF and Xbra cause overall posteriorization while Xwnt8 causes eye-level restricted posteriorization in synergy with chordin in early Xenopus development. *Dev Growth Differ.* 50:169-180. 査読有

3. Taniguchi, Y, Sugiura, T, Tazaki, A, Watanabe, K, Mochii, M. (2008) Spinal cord is required for proper regeneration of the tail in Xenopus tadpoles. *Dev Growth Differ.* 50:109-120. 査読有

4. Mochii M, Taniguchi Y, Shikata I. (2007) Tail regeneration in the Xenopus tadpole. *Dev Growth Differ.* 49: 155-161. 査読有

[学会発表] (計 12 件)

1. Takeshi Yamaguchi, Kensuke Kataoka, Akira Tazaki, Hidefumi Orii, Makoto Mochii, Kenji Watanabe. (2008) The microRNA miR-427 controls PGC-specific expression of the DEADSouth mRNA in Xenopus. 12th International Xenopus Conference (Leiwun, Germany)

2. 杉本 哲治, 片岡 研介, 餅井 真, 渡辺 憲二, 高宗 和史 (2008) 生殖隆起に入った始原生殖細胞で起る Xtr タンパク質の分解と新規合成。日本動物学会第 79 回大会 (福岡)

3. Takako Ishii, Shutaro Takayama, Kei Tamura, Makoto Mochii, Tadayoshi Shiba, Nobuhiko Takamatsu, Michihiko Ito (2008) Xenopus tadpole-derived XL-B4 myoblast

cells transplanted into tadpole tails and limbs. 41st Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists (Tokushima).

4. Keisuke Morichika, Kensuke Kataoka, Kenji Watanabe, Makoto Mochii (2008) Role of Notch signaling in PGC migration of Xenopus embryo. 41st Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists (Tokushima).

5. Kohei Terayama, Kensuke Kataoka, Keisuke Morichika, Hidefumi Orii, Kenji Watanabe, Makoto Mochii (2008) In vitro migration of primoedial germ cell from Xenopus tailbud embryo. 41st Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists (Tokushima).

6. Ayaka Taguchi, Miki Hirabayashi, Mochii Makoto, Watanabe Kenji (2008) GFP-labeled mitochondria visualize germ plasm and primordial germ cells in Xenopus embryos. 41st Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists (Tokushima).

7. 杉浦太久至、田崎啓、上野直人、渡辺憲二、餅井真 (2007) Wnt-5a は傷組織を末端化することにより、Xenopus 幼生の尾部再生を誘導する。日本動物学会第 78 回大会 (弘前)

8. 向後直美、田崎啓、織井秀文、餅井真、渡辺憲二 (2007) ツメガエル卵母細胞の生殖質におけるミトコンドリアの ATP 合成酵素と超微細構造の変動。日本動物学会第 78 回大会 (弘前)

9. 吉井俊祐、山口雅裕、田崎啓、餅井真、木下勉 (2007) 表皮に斑点状に発現する Xenopus polka dot 遺伝子の単利と発現の解析。日本動物学会第 78 回大会 (弘前)

10. 中畑友梨子、谷口由華、杉浦太久至、渡辺憲二、餅井真 (2007) アフリカツメガエル幼生尾部再生には hedgehog シグナルが必須である。日本動物学会第 78 回大会 (弘前)

11. Naomi Kogo, Akira Tazaki, Hidefumi Orii, Makoto Mochii, Kenji Watanabe (2007) Dynamic change of a mitochondrial proteins during germ line development. CDB Symposium 2007 (Kobe)

12. Keisuke Morichika, Kensuke Kataoka,

Kenji Watanabe, Makoto Mochii (2007) Notch signal regulates PGC migration in the Xenopus embryo. CDB Symposium 2007 (Kobe)

〔図書〕(計 1 件)

1. Mochii, M., Taniguchi, Y. (2009) Electroporation in the regenerating tail of the Xenopus tadpole. In Electroporation and Sonoporation in Developmental Biology. (Ed. H. Nakamura), pp. 239-247. Springer, Tokyo.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 件)

○取得状況 (計 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

餅井 真 (MOCHII MAKOTO)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・准教授

研究者番号

90202358

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者