

平成 22 年 4 月 21 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19570211

研究課題名 (和文) 四肢再生とレンズ再生に共通する再生開始の初期メカニズムの解明

研究課題名 (英文) Analysis of common initiation mechanism for limb and lens regeneration

研究代表者

芋川 浩 (IMOKAWA YUTAKA)

福岡県立大学 看護学部・准教授

研究者番号：90373274

研究成果の概要 (和文)：

本研究は、四肢やレンズを再生できる脊椎動物であるイモリを用いて、再生開始の分子メカニズムを解明するため、再生開始に関わる未知のレセプター様分子と、血液凝固因子唯一の膜蛋白である「組織因子」に注目し、解析を行った。成果としては、①得られた分子は全くの新規分子であり、ペプチドのモチーフレベルでもホモロジーのないものであったこと、②「組織因子」が再生中のイモリ虹彩上部に特異的に発現しており、レンズ再生と密接に関連していることを見つけたことである。

研究成果の概要 (英文)：

This study was performed to elucidate the molecular mechanism of both limb and lens regeneration in newts. I mainly studied unknown receptor like molecule which is related to the regeneration initiation and "tissue factor" which is the only membrane protein among coagulant factors. Main results are ①I got completely unknown molecule which was not homologous to any other vertebrates' molecules, ② Tissue factor is expressed in the dorsal iris of normal newt eye.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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：遺伝子発現調節、レンズ再生

## 1. 研究開始当初の背景

本研究は、四肢(手足)や眼球内のレンズや網膜を再生できる唯一の脊椎動物であるイモリを用いて、再生開始の分子メカニズムを解明しようというものである。幹細胞を用いた再生医学・再生医療の分野は近年大きく発展してきているが、実際に再生可能な細胞がどのようにして再生能力を獲得し、組織や器官を三次元的に再生できるかはまだほとんどわかっていない。これまでの我々の研究成果により、イモリという脊椎動物の四肢再生とレンズ再生には共通の再生開始分子メカニズムが存在することが示唆されており、そのメカニズムの解明はiPS細胞やES細胞をはじめとした幹細胞の活用を飛躍的に改善できる可能性を秘めており、その解明が大いに期待されていた。アメリカ合州国では国防省が機密国家プロジェクトとして、イモリなどを用いた再生研究を本格的に開始しており、競争が激化してきている状態であった。

## 2. 研究の目的

有尾両生類に属するアカハライモリという動物は、四肢(手足)ばかりではなく、眼球内のレンズ及び、中枢神経系の一つである網膜さえも再生できる唯一の脊椎動物である。このイモリの再生開始メカニズムを解明することは、今後の再生生物学・再生医学の発展に大きく貢献できるものである。しかしながら、その分子メカニズムについてはまだほとんどわかっておらず、その分子メカニズムの解明が本研究の大きな目的の一つである。特に、この再生開始のメカニズムは、これまで全く別々の再生と思われていた「レンズ再生」と「四肢再生」に共通の再生開始メカニズムが存在することがわかり、そのメカニズムを解明することは脊椎動物の再生を理解する上で極めて重要であると考えられた。そして、その候補分子として、レセプター様分子と血液凝固因子の一つであり、その中で唯一の膜タンパク質である「組織因子」が関連することを突き止め、その解析を本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

- ・動物：日本産アカハライモリを野外より捕獲、もしくは業者より購入し、研究室で維持しながら使用した。
- ・細胞：イモリの四肢由来の培養細胞を20℃ 5%CO<sub>2</sub>状態で、70%MEMを用いて培養した。
- ・cDNAライブラリー：再生中のイモリの虹彩や四肢より抽出したRNAよりcDNAを合成し、5'RACEや3'RACEを行うため目的に合わせて使用した。
- ・塩基配列：得られた候補遺伝子は、BeckmanのDNA sequencerを用いて、塩基配列を解析した。

- ・抗体作成：得られた遺伝子情報より、親水領域のペプチドを合成し、マウスに注射することで、ポリクローナル抗体の作成を行った。
- ・免疫組織染色：再生中のイモリの組織を3%パラホルムアルデヒドで固定し、ホルマウント、もしくは凍結切片を用いて、タンパク質の発現領域を蛍光染色し解析した。
- ・In situ hybridization:これまでの私の論文に書かれている方法で行った。基本的には、3%パラホルムアルデヒドで固定した組織にDIGでラベルしたRNAプローブでハイブリダイゼーションし、BCIP/NBTで発色させることで、RNAの発現領域を特定した。

## 4. 研究成果

本研究は、四肢(手足)や眼球内のレンズを再生できる唯一の脊椎動物であるイモリを用いて、再生開始の分子メカニズムを解明しようというものであり、平成19年度より平成21年度までの研究では、再生開始を直接誘導する可能性の高い未知のレセプター様分子と、血液凝固因子唯一の膜タンパク質である「組織因子」と呼ばれる分子に注目して、解析を行った。この主な研究成果としては、以下のとおりである。

(1)再生開始を直接誘導する可能性の高い未知のレセプター様分子はレセプター分子ではない可能性も高くなったが、依然として既知の分子と全くの相同性がない分子であることが判明した。それは小さいアミノ酸モチーフレベルでもである。ゲノムプロジェクトが進んでいるこの時代に再生と関わる分子で依然として既知の分子との相同性がないことは非常に興味深い。そこで、この分子名を新たにA18と名付け、解析を進めている。このA18分子はペプチド断片レベルでもどの分子とも相同性がなく(まだ未発表のためデータ省略、必要であれば機密書類として提出可能)、現在バイオインフォマティクスの研究者と共同研究を行う準備も進めている。この共同研究による解析により、発現様式だけでなく機能解析に対する結果も得られるものと期待している。

また、このA18分子の機能解析のため、イモリA1細胞という細胞を用いた「機能阻害」実験系の確立を行った。これまでにイモリを用いたRNA干渉法の実験系が確立されていなかったため、A1細胞の骨格筋細胞分化をその分化と関連する分子の発現阻害により行えるかどうかを解析した。その結果、イモリの培養細胞系においてもRNA干渉法により機能阻害を行うことができることが明らかとなった(論文①、図1)。

図 1

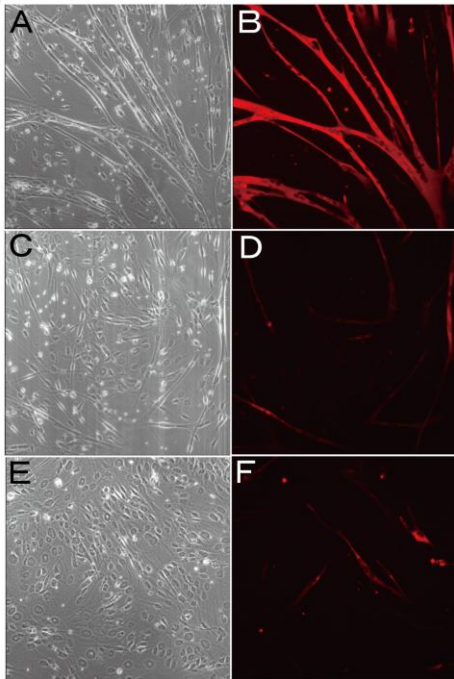


図 1 長鎖ミオシン2本鎖RNA(dsRNA)による多核筋管細胞への分化抑制。  
A-B; 緑色蛍光タンパク質2本鎖RNA(GFPdsRNA)が添加された低血清培地(LS培地)下で分化誘導された多核筋管細胞, C-D;長鎖ミオシンdsRNAが添加されたLS培地下で培養されたA1細胞, E-F; 高血清(HS培地)で培養されたA1細胞, A, C, E; 位相差顕微鏡像, B, D, F; 抗長鎖ミオシン抗体を用いた蛍光染色(赤). 長鎖ミオシンdsRNAの添加により, LS培地下でもA1細胞の多核筋管細胞への分化が抑制されていることがわかる.

今後はこのRNA干渉法を用いて、A18分子のdsRNAを作成し、四肢再生やレンズ再生過程における機能阻害実験を進め、抗体による染色結果やin situ hybridizationによる解析と負わせて、A18分子の再生における機能を詳細に明らかにしていきたいと計画している。

(2)血液凝固因子唯一の膜蛋白である「組織因子」は血液凝固反応の最初に位置しており、私が発見したレンズ再生におけるトロンビンの活性化のさらに上流に存在していると考えられており、レンズ再生と四肢再生の両再生に関わる重要分子として注目した。しかし、これまでイモリの血液凝固反応に関する文献は皆無に近く、その分子の単離が必要であっ

た。現在まだ全長は得られていないが、これまでに得られた発現解析では、組織因子は正常イモリ虹彩の上部に特異的に発現していることが明らかとなった。これはトロンビンがレンズ除去後虹彩上部に特異的に局在する結果を強く支持するものであり、水溶性タンパク質であるトロンビンがどのようにして脱分化が起きると言われている5日間もの間、虹彩の上部に局在できるのかを明らかにするうえでも極めて興味深い結果であった。今後はこの組織因子の発現を再生できない動物、例えば、メキシコサンショウウオなどについても解析することでイモリの組織因子と再生との関係をさらに解析する予定にしている。

#### 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 2 件)

- ① Yutaka Imokawa, Differentiation inhibition of cultured mononucleated myocytes by RNA interference (RNAi), 査読有, FPU Journal of Nursing Research Vol.7 No.1, 2009, pp.6-9
- ② Yutaka Imokawa, Isolation of FGF9 gene that plays an important role in limb regeneration, 査読有, FPU Journal of Nursing Research Vol.7 No.1, 2009, pp.1-5

[学会発表] (計 5 件)

- ① 芋川 浩, 脊椎動物の再生メカニズム, 第 10 回心血管再生医学研究会, 2009, 京都
- ② 芋川 浩, イモリの再生の過去と未来, 第 80 回日本動物学会シンポジウム, 2009, 静岡
- ③ 芋川 浩, イモリから見る生命の不思議, 取手市民公開講座, 2009, 取手
- ④ 芋川 浩, イモリから考える再生医療研究へのアプローチ, 再生医療研究会, 2007, 宇都宮
- ⑤ 芋川 浩, イモリの再生とその再生開始分子を求めて, 第 78 回日本動物学会シンポジウム, 2007, 弘前

[その他]

ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芋川 浩 (IMOKAWA YUTAKA)  
福岡県立大学・看護学部・准教授  
研究者番号：90373274

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

有泉 高史 (ARIIZUMI TAKASHI)  
福岡県立大学・看護学部・准教授  
(現、東京大学・大学院総合文化研究科・  
准教授)  
研究者番号：30286166