

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06664

研究課題名(和文)四肢再生特異的に働く転写因子を起点とした再生駆動機構解明とカエル成体の再生能回復

研究課題名(英文) Mechanisms driving regeneration starting from limb regeneration-specific transcription factors, and restoring the regenerative capacity in metamorphosed frogs

研究代表者

川住 愛子 (Kawasumi, Aiko)

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・訪問研究員

研究者番号：80625484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：高い再生能力をもつツメガエル幼生の四肢再生の形態形成期について「四肢再生領域特異的に発現上昇する遺伝子」としてX1とX2を同定し、それらの機能を解析した。幼生における機能欠損解析と変態後の幼若個体における機能回復解析により、X1、X2が四肢再生特異的に遠位/後方のパターンニング遺伝子発現制御を行うことが示唆され、X1、X2が四肢再生時に形態形成遺伝子発現を開始させるための重要な遺伝子であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変態後のカエルでは不完全な後肢再生しか起こせない(指のない1本の棒状の後肢が再生)。本研究では変態後のカエルで人為的に単一遺伝子(X1またはX2)を発現させることで、先端が3本に分かれた後肢を再生させることができた。このように単一遺伝子の導入のみで再生能力の向上を成し遂げられたのは世界初である。また本研究では四肢再生におけるX1とX2を起点とした「四肢再生時に形態形成機構を再駆動させる分子機構」を詳細に明らかにしつつあり、ツメガエルに完全な再生をさせるための大きな手がかりとなることが予想される。

研究成果の概要(英文)：We identified X1 and X2 as "genes with specific expression in *Xenopus laevis* regenerating limb" and analyzed their functions.

Loss-of-function analysis in larvae and gain-of-function analysis in metamorphosed frogs suggested that X1 and X2 regulate distal/posterior patterning gene expressions in a limb regeneration specific manner, implying that X1 and X2 are important genes for initiating morphogenetic gene expressions during limb regeneration.

研究分野：再生生物学

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 RNA-seq アフリカツメガエル ネット  
イツメガエル

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。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 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。

一方、再生芽形成後の形態形成過程に関しては、発生の形態形成の分子機構とどの程度の共通性があるのか(再生時のみ働く分子機構はあるのか)を網羅的に探索し、かつ機能解析した例は非常に少ない。我々はツメガエル幼生の四肢再生における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する十個の候補遺伝子を見出した。本研究では、そのうち2つの候補遺伝子についてゲノム編集で機能解析することにより、四肢再生を駆動する分子機構の解明を目指す。さらに、再生能力が低下する成体にその分子機構を誘導することで四肢再生能力の回復に挑戦する。

### 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3課題に取り組むことで研究目的を達成する。

[課題1] X1, X2を起点とした四肢再生を駆動するシグナル伝達系の解明

[課題2] 四肢切断後に見られる遠位化(Distalization)の分子機構の解明

[課題3] 転写因子X1, X2過剰発現によるツメガエル成体四肢再生能回復への挑戦

### 4. 研究成果

[課題1]

ネットイツメガエルにおいてゲノム編集によりK0個体を作製し(機能欠損解析)、またアフリカツメガエルにおいて熱ショック応答により遺伝子発現を誘導できるTransgenic個体を作製した(機能獲得解析)。まず幼生K0個体でRNAscopeアッセイとリアルタイムPCR解析を行ったところ、遠位/後方パターンング遺伝子発現が野生型に比べて有意に低下していた。一方、過剰発現Tg(+)幼若個体では遠位ならびに後方パターンング遺伝子がTg(-)個体に比べて有意に発現上昇した。さらに、幼生K0個体/過剰発現Tg(+)幼若個体の四肢再生において、再生遠位領域の低形成/膨大がそれぞれ確認されたため、それぞれの形態変化が現れる少し前の再生遠位領域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ところ、それぞれコントロールに比べて増殖細胞数が有意に減少/増加していた。

[課題2]

X1のK0幼生と野生型の幼生(共にネットイツメガエル)について四肢再生と四肢発生のトランスクリプトーム比較解析を行った。それぞれについてSt52で後肢を切断して4日間再生させ、その再生領域から取得したtotal RNAサンプルを次世代シーケンサーによって解析することで、トランスクリプトームデータを取得した。現在は得られたデータの解析を行っており、四肢形態形成過程が進行する再生組織の遠位部が同様の形態形成が見られる四肢発生過程の遠位部より

も、より強く遠位化(Distalization)している「遠位化」に関連する分子群を同定しようとしている。

[課題 3]

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それぞれ作製し、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 hsp プロモーター制御下で発現する 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。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Matsubara Haruka, Kawasumi Kita Aiko, Nara Saki, Yokoyama Hibiki, Hayashi Toshinori, Takeuchi Takashi, Yokoyama Hitoshi	4. 巻 65
2. 論文標題 Appendage restricted gene induction using a heated agarose gel for studying regeneration in metamorphosed <i>Xenopus laevis</i> and <i>Pleurodeles waltl</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 86 ~ 93
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12841	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1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, 大塚大輔, 李尚雨, 北嶋慶一, 坂根祐人, 田村宏治, 越智陽城, 鈴木賢一, 森下喜弘
2. 発表標題 四肢再生過程における発生プログラム再活性化に必要な転写因子
3. 学会等名 日本発生生物学会第55回大会
4. 発表年 2022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
---------	---------