

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 1日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570004

研究課題名（和文） 魚類における再生を支える細胞とシグナルのメカニズム

研究課題名（英文） Cell and signal mechanisms that support tissue regeneration in fish

研究代表者

川上 厚志（KAWAKAMI ATSUSHI）

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・准教授

研究者番号：00221896

研究成果の概要（和文）：

多細胞体の組織ホメオスタシス機構の解明を目指し、ゼブラフィッシュ成体、幼生を使った再生機構の解析を行い、以下の成果が得られた。1) 再生に必須の *junb*, *junbl* と JNK シグナルの役割を解明した。2) 再生ニッチにおける細胞の形成と機能の解明のための、細胞追跡と除去が可能なトランスジェニックの作製を行った。3) 再生欠損変異体の解析から、造血細胞に由来する再生細胞生存因子が存在することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

To clarify the tissue homeostasis mechanism of multicellular organisms, we analyzed the regeneration processes of adult and larval zebrafish tissues and obtained the following results.

1. The signaling pathway involving the *Junb*, *Junbl* and JNK has an essential role in regeneration.
2. To reveal the origin and fate of regenerating cells, we generated transgenic lines for cell fate tracing and cell ablation.
3. From the analysis of regeneration defective zebrafish mutant, we showed that a factor derived from the hematopoietic tissues is necessary for the survival of regenerating cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,111,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：モデル生物、小型魚類における組織再生、ゼブラフィッシュ、トランスジェニック、*Junb*、JNK

## 1. 研究開始当初の背景

多くの脊椎動物では生後に臓器・器官や手足などを失うと、これらは生涯失われたままとなる。しかし、有尾両生類や魚類では多種多様の組織が生涯にわたって再形成可能で

ある。脊椎動物を通じてほぼすべての遺伝子や分子シグナル経路が高度に保存していることは今や明らかであり、従って有尾両生類や魚類での組織再生力も決して例外的な現象ではなく本来すべての種にポテンシャル

として備わっているような性質のものと考えられる。実際、近年における哺乳類の成体幹細胞の発見も、これを支持していると考えられる。このように再生の概念自身が近年変化してきており、生物が環境に応じて多細胞体を維持しようとする普遍的なメカニズムのひとつとして再生が考えられてきている。つまり、大がかりな細胞増殖や分化を伴う再生も、傷害の修復も、さらに心臓、筋肉、血管などの組織維持や改変（リモデリング）なども、共通した恒常性維持のメカニズムの一部と考えられる。

有尾両生類や魚類における再生能力は数世紀も前から知られていたが、有用なアプローチ法がなかったために、長い間組織学的記載以上の解析が進まなかった。しかしこの10年ほどの間に、様々のモデルにおいて多数の分子的な知見が集積してきた。有尾両生類を使った研究では、網膜やレンズ再生、さらに四肢・尾部再生をモデルとして多数の研究が行われており、近年ではWNTシグナルなどが再生の進行に必要であることなど分子的な背景も明らかにされつつある。また無尾両生類のアフリカツメガエルでは、成体の四肢はスパイクという細胞塊を形成して不完全な再生しかしないが、幼生の時期には脚や尾部の再生が可能であり、ユニークな再生モデルとして研究に用いられている。また、両生類では四肢再生が起こるには神経の存在が必須なことが知られていたが、神経由来因子が英国の研究者によって昨年同定されるなど、再生における神経の役割についても解明が進んできている。

魚類ではさらに広範囲で精力的な再生研究がこの数年の間に進んでいる。魚類は最も多様な組織が再生力を持つ優れた系であり、心臓、鱗、脊髄髄臓、肝臓、腎臓をはじめ様々の組織を材料として再生過程の解析が進んでいる。分子的な研究に関しても、種々のシグナルや分子の関与が実際に示されている他、温度感受性変異体を用いた遺伝学解析からFGF20a, Msp1などの分子の再生における必要性が示されている（研究業績7）。また、魚類では近年、再生過程に関連した発現変動遺伝子の精力的な探索も数多く行われており、多数の関連分子が明らかになっている。特に魚類ではトランスジェニック系統が次々と作製され、細胞・器官のイメージングやドミナントネガティブ分子の発現など、多彩な解析手法を組み合わせた研究が進んでいる。いずれのモデルでも、詳細な細胞レベルでの再生過程の再検証とともに、分子的な背景の探索が精力的に行われ、FGF, WNT,

BMPなど種々のシグナルや分子の必要性が示唆されている。

このような成体を用いた解析に対し、私たちはきわめて早いステージの幼生をモデルとして使い、分子的解析には幼若組織を用いて解析を行っている。このような系で再生過程の解析を進めているのは、世界的に見ても我々とごく少数のグループのみである。この独自の幼若組織再生系を成体組織と共に用いることで、より詳細な再生メカニズムの解明が期待できる。

## 2. 研究の目的

再生の細胞的、分子的過程に関して広範囲の知見が蓄積してきたが、一方で成体を用いた解析には多くの限界があり、それぞれの分子の働きがどのようにして組織の再生を可能にしているか、分子のカスケードまで明らかにするのは容易でない。このため、loss-of-function gain-of-functionなどの解析など分子機能の詳細な解析を容易に行い得るような系として、私達はゼブラフィッシュ幼生尾部を使った再生アッセイ系を確立した。この系を用いてマイクロアレイ解析を行った結果、再生組織に誘導される遺伝子群を同定し、幾つかについては阻害実験や変異体を用いた解析などから再生で必須の働きをしていることを示した。また遺伝子発現解析から、再生の進行している組織には従来知られていた「再生芽」と「傷上皮」という細胞タイプだけでなく、多数の異なる細胞タイプ（コンパートメント）が存在することであった。

以上を踏まえ、本研究では、再生過程を理解する次のステップとして、第一に再生の進行、特に再生の開始段階に関わるシグナルメカニズムの解析と、第二に、再生ニッチにおける細胞コンパートメントの形成と機能を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

以下の項目について研究を進めた。

### (1) 再生における JUN/JNK シグナルの役割:

アレイ発現解析から、幼生尾部または成体ひれの再生時には *junB*, *junBL* が切断後1時間以内に、各々異なる細胞で高レベルの発現をすることがわかった。この活性化は再生の最も早期に起こり、再生初期段階を仲介している可能性がある。本研究では、2つの魚類 *Junb* 分子を経由するシグナルの制御と

機能に注目して、JunB, JunBL シグナルの再生における役割を解析することを目指す。

・JunB または JunBL の機能: 遺伝子ノックダウンなどを行い、傷害応答期の JunB/JunBL 転写活性化が、再生や再生遺伝子発現などに必要かどうか、また JunB, JunBL の機能の違いについて解析する。

・JunB リン酸化の制御機構: ほ乳類などでは c-Jun は JNK によるリン酸化によって活性化されるが、JNK による JunB リン酸化は、標的アミノ酸が異なることから起こらない。ゼブラフィッシュ JunB ファミリー分子のリン酸化による活性制御について、配列解析、培養細胞での検定、JNK 阻害剤による *in vivo* の機能解析等を行う。

#### (2) 再生ニッチにおける細胞の起源と運命:

イモリでは再生芽は細胞の脱分化によって生じることが示唆されているが、魚類における再生芽は、起源も分化多能性も分かっていない。そこで、細胞系譜の追跡を行い、再生に関与する細胞の起源と運命を解明する。

すでにトリやツメガエルでは、トランスポゾンベースとした To12 ベクターを用いて体細胞の長期ラベルが可能なが示されており、この系を魚のひれに応用して細胞の追跡を行う計画である。ここでは長期で永続的な細胞のラベルを行うために Cre-lox システムを用い、私達が同定した再生遺伝子プロモーター下に発現させた Cre によって、レポーターコンストラクトの発現遺伝子を DsRed から EGFP へと変換して、恒久的な細胞ラベルを可能にする。代表的な再生遺伝子について Cre コンストラクトを作製し、トランスジェニック (Tg) システムを確立する。

またレポーター系統作製のため、ユビキタスに発現するプロモーターを使って、DsRed をほとんどの組織で発現し、Cre-lox によって発現を EGFP に変える Tg システムを作製する。

#### (3) 再生ニッチにおける細胞の機能解析:

これまでの研究で、私達は再生組織における多数の細胞小集団の存在を明らかにした。再生における個々の細胞集団の機能を明らかにするために細胞のアブレーションを行う。私達はプロドラッグとニトリダクターゼ (NTR) を使って細胞のアブレーションを行う方法を以前の研究で確立しており、NTR を再生応答遺伝子プロモーター下に発現させて細胞機能の解析を行う。細胞の特異的なアブレーション法により、各々の細胞の役割と相互作用について解析する。

## 4. 研究成果

### (1) 再生における JUN/JNK シグナルの役割:

ここでは、再生に関わるシグナル経路の作用機序を明らかにすることを目標とした。特に、私達は、再生組織に誘導される JunB ファミリー分子の関与するシグナルに注目して研究を進めた。

ほ乳類の JunB タンパクはリン酸化部位を欠失し、リン酸化を受けないことが示されているが、配列解析の結果、魚類ではゼブラフィッシュを始め多くの魚類で、2つ存在する JunB と JunB-like のいずれも、cJun リン酸化部位に対応する場所にリン酸化コンセンサス配列が保存されていることがわかった。in vitro で培養細胞を用いて解析した結果、リン酸化 JunB 抗体と反応し、実際にリン酸化されることが示された。組織での解析の結果、このリン酸化は組織の傷害に反応して起こり、リン酸化を上流のキナーゼと考えられる JNK の阻害剤によって阻害すると、リン酸化は低下し、再生も著しく阻害された。これにより、再生に JunB ファミリー分子のリン酸化が必須であることが解明した。これによって、ほ乳類と魚類の間で再生力の違いの元となる分子メカニズムの一つが初めて明らかとなった。

### (2) 再生ニッチにおける細胞の起源と運命:

私達は以前の研究で、再生組織が多様な細胞小区画 (コンパートメント) からなることを示したが、これらの再生微小環境 (ニッチ) における細胞がどのように組織再生過程に働いているか明らかにするためには、個々の細胞を追跡する方法が必要である。このために、私達は再生誘導遺伝子の発現を再現できるようなトランスジェニック (Tg) の作製と、さらに、一過的な再生遺伝子の発現を Cre-lox 組み換えで永続的なラベルに変換できるシステムの構築を目指した。

以前から、私達は再生遺伝子の幾つかについてプロモーターを単離して、Tg 作製を試みてきた。しかしながら、様々の長さの上流域を用いても、ほとんどの場合で安定に EGFP を発現する Tg は得られなかった。わずかに 2, 3 のケースにおいて、再生に反応した遺伝子発現が見られたが、発現細胞が異なったり、非常に弱い発現しか見られなかった。

このため、本研究中盤からは、100kb を超えるゲノム領域を持つ BAC クローンを用いて、完全な再生遺伝子発現を再現する Tg 作製を目指した。BAC は fgf24 などの遺伝子については再生組織での発現を再現できることが予備的な研究でわかったもので、可能性の高い

方法と判断した。BAC Tg 作製に当たっては、遺伝学研究所の川上浩一研究室の協力を得て、BAC 上にトランスポゾン配列を導入して高効率の BAC Tg 作製を行う方法を導入した。コンストラクト作製等で条件検討を要したが、最終的に非常に効率の良いシステムの構築に成功した。BAC Tg は GFP または DsRed を強く発現し、内在の遺伝子発現とも一致しているように見えた。これらの Tg は蛍光タンパクを発現するものと同時に、Cre を発現するものも作製し、並行して Tg 作製を進めている。現在7つの再生遺伝子について BAC Tg 作製を進めている。

以上の再生細胞で Cre を発現させる様々のドライバー系統の作製と同時に、これを永続的な発現に変える Tg 系統の作製を行った。ゼブラフィッシュでは、生涯を通じて発現する良いユビキタスプロモーターがなかったが、私達はメダカ  $\beta$  アクチンプロモーターを用いて高効率の発現に成功した。 $\beta$  アクチン遺伝子はゼブラフィッシュでは2コピーあり、このどちらを用いても満足なレベルの発現はできなかったが、メダカでは1コピーしかなく、しかも遺伝子がコンパクトであることもあって、上流 1.5kb のプロモーターで非常に高い発現をさせることができた。この系統は、受精卵から生涯を通じて、造血系以外の組織で強い DsRed の発現があり肉眼でも赤く見える。この系統と hsp70:mCherry-2a-Cre を掛け合わせて組み換えを誘導し、実際に EGFP の発現が誘導できることも確認できた。最近、ゼブラフィッシュで b-actin2、ubiquitin プロモーターを使ったユビキタス Tg が報告されているが、私達のもは世界でも最も強力かつユビキタスに発現する系統と思われ、今後、Cre-lox や細胞移植などの細胞追跡に強力なツールとなると考えられる。

予定通り実際の解析までは進んでいないが、技術的な問題はすべてクリアできたことから、今後近い将来には、再生芽ないしは傷上皮のラベルされた細胞を追跡することによって、再生組織の細胞の由来と分化運命、能力を明らかにできると考えている。

### (3) 再生ニッチにおける細胞の機能解析：

再生における個々の細胞集団の機能を明らかにするために、再生細胞で細胞のアブレーションを行うシステムの構築を進めた。プロドラッグとニトロリダクターゼ (NTR) を使って細胞のアブレーションを行う方法は、任意の時点で細胞のアブレーションを行える優れた方法である。

上にも述べたように、私達は以前からプロモーターTg の作製を進め、NTR を細胞特異的に発現させることを目指してきた。しかしながら、プロモーターTg では再生遺伝子の発現を再現することが困難であることが判明して、上記と同様に Cre-lox を用いた方法を細胞アブレーションに応用することにした。つまり、上で述べた BAC Tg 法は、レポーター系統で EGFP の代わりに NTR (実際は NTR-EGFP 融合遺伝子) を発現させることで、細胞アブレーションを行うことが可能である。しかも、非常に強力に NTR を発現することで、アブレーション効率も高くなると期待できる。

系の作製に当たって、第一に、 $\beta$  アクチンプロモーターでドライブされる NTR による細胞アブレーションの条件について検討した。このため、 $\beta$ -actin:NTR-EGFP コンストラクトを作製し、受精卵にインジェクションして得られるモザイク胚を用いて、アブレーション条件を検討した。幼生時期になったものをプロドラッグで処理すると、濃度依存的に効果が見られ、10mM では 24 時間以内に多くの細胞が、48 時間以内にほぼすべての細胞が死滅した。同様のことは、モザイク胚を生育させた成体でも確認できた。細胞除去が十分にシャープに作用することわかったので、NTR-EGFP をもつコンストラクトを作製し、レポーター系統の作製を進めている。

## 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 6 件)

- ① Fujita, M., Mitsuhashi, H., Isogai, S., Nakata, T., Kawakami, A., Nonaka, I., Noguchi, S., Hayashi, Y. K., Nishino, I. and Kudo, A. (2012) Filamin C plays an essential role in the maintenance of the structural integrity of cardiac and skeletal muscles, revealed by the medaka mutant *zacro*. *Developmental Biology* 361, 79-89. (査読有)
- ② Yoshinari, N. and Kawakami, A. (2011) Mature and Juvenile Tissue Models of Regeneration in Small Fish Species. *Biological Bulletin* 221, 62-78. \*Corresponding author (総説、査読有り)
- ③ Ishida, T., Nakajima, T., Kudo, A. and \*Kawakami, A. (2010) Phosphorylation of Junb family proteins by the Jun N-terminal kinase supports tissue regeneration in zebrafish

*Developmental Biology* 340, 468–479.  
\*Corresponding author

- ④ Taneda, Y., Konno, S., Makino, S., Fukuda, K., Imai, Y., Kudo, A. and \*Kawakami, A. (2010) Epigenetic control mechanism of cardiomyocyte production in response to a stress during the medaka heart development. *Developmental Biology* 340, 30-40. \*Corresponding author
- ⑤ Kawakami, A. (2010) Stem cell system in tissue regeneration in fish. *Development Growth & Differentiation* 52, 77-87. \*Corresponding author (総説、査読有り)
- ⑥ Yoshinari, N., Ishida, T., Kudo, A., and \*Kawakami, A. (2009) Gene expression and functional analysis of zebrafish larval fin fold regeneration. *Developmental Biology* 325, 71–81. \*Corresponding author

[学会発表] (計 12 件)

- ① 村瀬瑛美子、工藤明、川上厚志、魚類における2つのフィブロネクチンの再生における働きの解析、第34回日本分子生物学会大会(横浜), 2011. 12. 13
- ② Tomoya Hasegawa, Teruhiro Nakajima, Takashi Ishida, Atsushi Kawakami., “A mechanism that controls blastema cell proliferation and survival during fin fold regeneration”, The 21st CDB Meeting” From Regeneration Biology to Regenerative Medicine (I)”, (RIKEN CDB, Kobe), 2011. 11. 24–25
- ③ Atsushi Kawakami, Natsumi Horita, Tomomi Kushida, Kazunori Ando, Emiko Murase, Nozomi Yoshinari, Masato Kinoshita, Genbu Abe, Koichi Kawakami, and Tohru Ishitani  
“Towards understanding tissue regeneration and homeostasis mechanism using fish regeneration models”, The 21st CDB Meeting” From Regeneration Biology to Regenerative Medicine (I)” (RIKEN CDB, Kobe), 2011. 11. 24–25

④ 安藤和則、吉成望、工藤明、川上厚志

“Cell ablation analysis in the regenerating zebrafish fin: Generation of transgenic zebrafish and the cell ablation using the prodrug and nitroreductase”  
ゼブラフィッシュ再生ひれにおける細胞除去: トランスジェニック作製とプロドラッグ、ニトロリダクターゼを用いた細胞除去, 第44回日本発生生物学会大会(沖縄), 2011. 5. 20

⑤ 川上厚志、中島輝弘、石田高志、工藤明, “A mechanism that controls blastema cell proliferation and survival during zebrafish fin fold regeneration”  
ゼブラフィッシュ膜ひれ再生における再生芽の増殖と生存の調節, 第44回日本発生生物学会大会(沖縄), 2011. 5. 19

⑥ 吉成望、工藤明、川上厚志、ユビキタスに蛍光タンパクを発現する新たなゼブラフィッシュ系統, 第10回小型魚類研究会(埼玉), 2010. 9. 18

⑦ 三橋弘明、藤田深里、安田裕隆、林由起子、野口悟、埜中征哉、川上厚志、工藤明、西野一三、心筋・骨格筋に異常を示すメダカ変異体 *zacro* の解析, 第10回小型魚類研究会(埼玉), 2010. 9. 18

⑧ Teruhiro Nakajima, Akira Kudo, and Atsushi Kawakami, “Checkpoint for fast proliferating blastema cells during finfold regeneration”, 再生細胞の早い細胞増殖を検問するチェックポイントメカニズム, 第43回日本発生生物学会大会(京都), 2010. 6. 21

⑨ Nozomi Yoshinari, Akira Kudo, <sup>o</sup>Atsushi Kawakami, “Cell lineage analysis of fish fin blastema for their potential producing multiple cell types during regeneration”  
再生芽細胞の多分化能力を検証するための、魚類鱗の再生組織における細胞系譜の解析, 再生細胞の早い細胞増殖を検問するチェックポイントメカニズム, 第43回日本発生生物学会大会(京都), 2010. 6. 21

⑩ 吉成望、工藤明、川上厚志 (指導学生、ポスター), ゼブラフィッシュにおける再生芽細

胞の分化多能性の検証, 第31回日本分子生物学会大会(横浜), 2009.12.9

⑪ Takashi Ishida, Akira Kudo, and Atsushi Kawakami (口演、英語), “Indispensable role of Junb/Jnk signaling in regeneration: regeneration can be demarcated from wound healing by the dependence on Junb/Jnk signaling”, 第41回日本発生生物学会大会(新潟), 2009.5.30

⑫ Teruhiro Nakajima, Takashi Ishida, Akira Kudo, Atsushi Kawakami (口演), “*cloche* mutation causes the blastema apoptosis during the zebrafish fin fold regeneration”, 第41回日本発生生物学会大会(新潟), 2009.5.28

[その他]

ホームページ等

<http://www.kudo.bio.titech.ac.jp/Index2.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川上 厚志 (KAWAKAMI ATSUSHI)  
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・  
准教授  
研究者番号: 00221896

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし