

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011 ～ 2012
課題番号：23710217
研究課題名（和文） 器官再生における遺伝子発現のエピジェネティックな制御
研究課題名（英文） Epigenetic regulation of gene expressions via methylation of histone tail during tissue regeneration
研究代表者 板東 哲哉（BANDO TETSUYA） 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教 研究者番号：60423422

研究成果の概要（和文）：

コオロギ幼虫の脚を切断すると、切断された領域が再生芽細胞から再生される。分化細胞と異なり、増殖能が高く多分化能を持つ再生芽細胞ではヒストン H3 の 27 番目のリジン残基のメチル化を制御するエピジェネティック因子の発現が上昇していた。RNAi によりヒストンのメチル化を阻害または亢進させると再生脚の形態が異常になり、パターン形成遺伝子の発現パターンが異常になった。ヒストンのメチル化を介したパターン形成遺伝子のエピジェネティックな発現制御が再生脚のパターン形成に重要である。

研究成果の概要（英文）：

Hemimetabolous insects, such as cricket *Gryllus bimaculatus*, have remarkable regenerative capacity. When cricket nymph loses a part of leg, the lost part of leg is regenerated from blastema, which is a population of dedifferentiated proliferating cells. In the blastema cells, expressions of several epigenetic protein genes including *Enhancer of zeste (E(z))*, which encodes methyltransferase on histone H3 27th lysine residue (H3K27), and *Utx*, which encodes demethylase for methylated histone H3K27, were upregulated compared with differentiated cells. We performed RNAi against *E(z)* and *Utx*. Morphologies of regeneration legs of *E(z)*(RNAi) and *Utx*(RNAi) cricket nymphs were abnormal. Several leg patterning genes were ectopically expressed in regeneration leg of *E(z)*(RNAi) cricket and were diminished in *Utx*(RNAi) cricket. Methylation of histone H3K27 was diminished and increased in *E(z)*(RNAi) and *Utx*(RNAi) crickets, respectively, suggesting that epigenetic regulation of leg patterning genes expressions via methylation of histone H3K27 is involved in repatterning process during leg regeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：エピゲノム、器官再生、脱分化

1. 研究開始当初の背景

ヒトやマウス、ニワトリなど高等脊椎動物は器官再生能が低く、ヒトが手足を失うと決して再生することはない。しかしながらヒドラ

やプラナリア、ゴキブリ、メダカ、カエル、イモリなど高い器官再生能を持つ生物は多く存在する。複数種の再生能の高い生物を用いて器官再生の分子メカニズムを解析し比

較することで、器官再生時に働く進化的に保存された分子メカニズムを明らかできる。さらに、再生能の低い生物での再生メカニズムの機能を解析することで、再生能の低い生物での器官再生の可能性を探る試みが進められている。再生生物が器官の一部を失うと、まず傷口の修復が起こり体液の喪失を阻止する。傷口が傷上皮により速やかに閉鎖されると、傷上皮の直下に再生芽が形成される。再生芽の細胞は位置情報に依存して既存の組織と失われた部分とを認識する。パターン形成遺伝子の再発現による再パターンニングを経て失われた部分のみを再生する。これら器官再生の過程は多くの再生生物で共通であり、再生芽の形成が器官再生の可否を決定すると考えられる。再生芽細胞は分化した細胞が脱分化した細胞で、多分化能と増殖能を持つ。再生芽細胞と分化細胞では細胞運命が異なることから、遺伝子発現がダイナミックに変化していると考えられる。これまでに再生芽細胞で働く遺伝子の単離と同定が数種の生物を用いて行われてきた。本研究が標的とするエピジェネティック因子は、再生芽細胞への脱分化のキーと考えられてきたが、再生過程における機能解析の報告はほとんど無かった。

2. 研究の目的

分化細胞から再生芽細胞への脱分化や再生芽細胞から分化細胞への再分化において、遺伝子発現はエピジェネティックに変化すると考えられてきた。再生生物の器官再生過程で見られる脱分化や再分化は、繊維芽細胞から iPS 細胞への脱分化や ES 細胞や iPS 細胞から組織細胞への分化過程に似ていると考えられている。我々はまずコオロギの脚再生過程を器官再生のモデル系と位置づけ、脚再生の脱分化や再分化に働くエピジェネティック因子を網羅的に単離し機能解析を行うことにした。これまでの研究からコオロギ脚再生過程において RNAi (RNA 干渉法) を用いた機能的スクリーニングが行えることが分かっており、また再パターンニングに働くパターン形成遺伝子もいくつか単離されている。これら分子生物学的ツールを使って、再生過程でのエピジェネティック因子の機能解析を行うことにした。脱分化や再分化に働くエピジェネティック因子が単離されれば、繊維芽細胞から iPS 細胞への脱分化誘導や iPS 細胞から分化細胞への再分化誘導の効率化などに貢献出来ると考える。

3. 研究の方法

再生過程で働くエピジェネティック因子を、次世代シーケンサーを使った比較トランスクリプトーム解析により網羅的に単離し、RNAi による機能阻害を行って再生過程での

機能的スクリーニングを行った。

(1) 次世代シーケンサーを用いた比較トランスクリプトーム解析

分化細胞と再生芽細胞とで発現が変化する遺伝子を網羅的に同定するため、脚切断により再生を誘導して 24 時間の再生芽領域と、未切断の領域からトータル RNA を抽出した。得られたトータル RNA より mRNA を精製して cDNA ライブラリーを調製し、イルミナ社 Genome Analyzer IIx でシーケンスした。得られたシーケンスを SOAP de novo ソフトウェアでアセンブルし、アセンブルしたコンティグに対して再生芽由来のシーケンスリードと分化組織由来シーケンスリードをマッピングして、再生芽で 2 倍以上に発現上昇するコンティグと 1/2 以下に発現抑制されるコンティグを網羅的に抽出した。発現変動が見られたコンティグの塩基配列は Blast2GO プログラムによりアノテーションし、どういった遺伝子の発現が変動するかを明らかにした。

(2) 比較トランスクリプトーム解析の妥当性の検討

次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析の結果が妥当かどうかを調べるため、まず再生芽で強く発現上昇していた遺伝子に対する RNAi を行い、表現型を解析した。

(3) 比較トランスクリプトーム解析からエピジェネティック因子の機能解析

トランスクリプトーム解析で発現変動の見られたエピジェネティック因子に対して RNAi による機能的なスクリーニングを行った。フタホシコオロギ 3 齢幼虫に対して、20 μ M に調製した 2 本鎖 RNA (dsRNA) を 210nL 注入し、直後に脚を切断して飼育した。6 齢幼虫に成長したコオロギの再生脚の形態を解析した。また切断後 6 日目の脚を固定して、エピジェネティックな修飾の変化やパターン形成遺伝子の発現解析に用いた。

4. 研究成果

(1) 次世代シーケンサーを用いた比較トランスクリプトーム解析

再生芽由来 RNA と分化組織由来 RNA をそれぞれ 1 Gb ずつシーケンスし、リードをアセンブルして構築したコンティグに各リードをマッピングして発現強度を比較した。約 5 万本のコンティグのうち約 1 万本が再生芽で 2 倍以上に発現上昇しており、約 9 千本が 1/2 以下に発現低下していた。

発現上昇していたコンティグには、他の生物の再生初期過程において発現が上昇することが知られているマトリックスメタロプロテアーゼやアポトーシス関連分子、piRNA 関連分子が含まれていた。またコオロギ脚再生過程において発現が上昇する Wg/Wnt,

Dpp/TGF- β , Hh/Shh シグナル経路関連分子も含まれていた。比較トランスクリプトーム解析において最も強く発現が上昇したのは自然免疫に関連する Toll シグナル分子であり、また初期発生や細胞増殖に関連する JAK/STAT シグナル分子も再生芽細胞で非常に強く発現していた。

(2) 比較トランスクリプトーム解析の妥当性の検討

トランスクリプトーム解析の結果が妥当なものかどうかを検討するため、トランスクリプトームにおいて再生芽細胞で強く発現上昇していた JAK/STAT シグナル分子に対する機能解析を行った。JAK/STAT シグナルの受容体をコードする *domeless* (*dome*)、ヤヌキナーゼをコードする *hopscotch* (*hop*)、転写因子をコードする *Stat*, JAK/STAT シグナルを抑制的に制御する *SOCS2* などのコオロギホモログをクローニングした。リアルタイム qPCR により *dome*, *hop*, *Stat* は脚切断後 24 時間に 2~2.5 倍に発現が上昇することが確認出来たため、コオロギ 3 齢幼虫に対して RNAi を行って脚再生過程での機能解析を行った。コオロギ *dome*(RNAi), *hop*(RNAi), *Stat*(RNAi) 個体は生存可能であったため脚を切断したところ、切断した脚は再生しなかった。野生型と比較して、*Stat*(RNAi) 個体の再生芽では細胞分裂を促進するサイクリン E の発現が半減した。また *SOCS2*(RNAi) により JAK/STAT シグナルを恒常的に活性化するとサイクリン E の発現は 1.7 倍に上昇し、再生脚の長さは通常よりも長くなった。以上の結果より、再生芽で働く因子が比較トランスクリプトーム解析により単離できることが分かった (雑誌論文①)。

(3) 比較トランスクリプトーム解析より同定されたエピジェネティック因子の機能解析

比較トランスクリプトーム解析より、再生芽ではヒストンテイルのメチル化、脱メチル化、脱アセチル化に働く酵素や ATP 依存性 SWI/SNF 複合体因子などを含む 26 種類のエピジェネティック因子の発現が 2 倍以上に上昇していた。最も発現上昇が著しかったのはヒストン H3 27 番目のリジン残基 (H3K27) の脱メチル化に働く *Utx* で、発現は約 9 倍に上昇していた。またヒストン H3K27 のメチル化に働く *Enhancer of zeste* (*E(z)*)、メチル化ヒストン H3K27 に結合する *Polycomb* の発現も 2.2 倍、4.5 倍に上昇しており、ヒストン H3K27 のメチル化状態が器官再生に影響することが示唆された。我々は *E(z)* と *Utx* のコオロギホモログの遺伝子断片をクローニングし、コオロギ 3 齢幼虫に対して RNAi を行って脚再生過程での機能解析を行った。コオロギ *E(z)*(RNAi) 個体と *Utx*(RNAi) 個体の脚切断後 6 日目の再生脚を固定し、抗メチル化ヒストン H3K27 抗体を用いて免疫染色を行ったとこ

ろ、*E(z)*(RNAi) 個体の再生脚全体でメチル化ヒストン H3K27 はほぼ消失し、逆に *Utx*(RNAi) 個体の再生脚では再生された付節領域で強いメチル化ヒストン H3K27 のシグナルが検出された (図 1)。

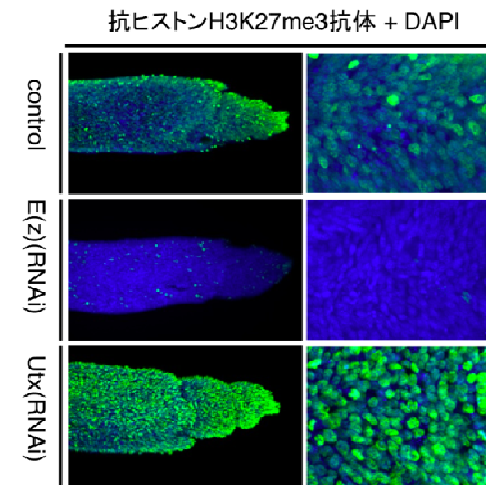


図1 野生型と RNAi 個体の再生脚におけるメチル化ヒストン H3K27 の局在

RNAi によりヒストン H3K27 のメチル化状態が変化することが分かったので、これら RNAi 個体の脚再生過程を調べた。コオロギ *E(z)*(RNAi) 個体の再生脚は、脛節と付節の間に脚節が過剰に形成された形態異常を示した。また *Utx*(RNAi) 個体の再生脚は付節の 2 番目の関節が融合して分節しない形態異常を示した (図 2)。*E(z)*(RNAi) や *Utx*(RNAi) による表現型の頻度は、脚を切断してから RNAi を行うまでの時間が長くなるに従って低下した。以上の結果より、再生初期過程でのヒストン H3K27 のメチル化状態の制御が付節の再生に重要であることが分かった。

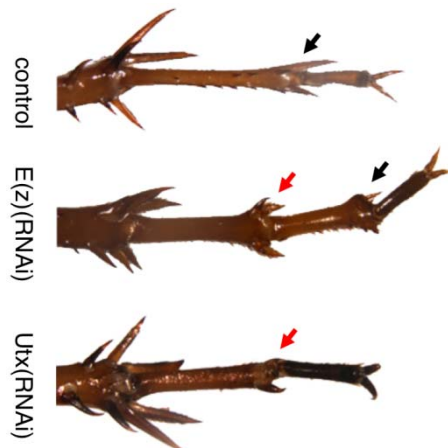


図2 野生型と RNAi 個体の再生脚。
黒い矢印は付節棘を、赤い矢印は形態異常の箇所を示す

これまでの研究から、コオロギの付節形成には *Distal-less* (*Dll*), *dachshund* (*dac*), *Egf*

receptor(*Egfr*)など脚パターン形成遺伝子群の発現が必要なことが分かっている。そこで *E(z)*(RNAi)および *Utx*(RNAi) 個体の再生脚で脚パターン形成遺伝子群の発現パターンを調べた。野生型個体の再生脚では *dac* は脛節の遠位と付節の近位にのみ発現するが、脚節の過形成が起こる *E(z)*(RNAi) 個体の再生脚では *dac* が付節の遠位でも異所的に発現した。また *Egfr* は脛節と付節の関節領域に発現するが、関節が欠損する *Utx*(RNAi) 個体の再生脚では *Egfr* の発現が一部消失した (図3, 未発表)。

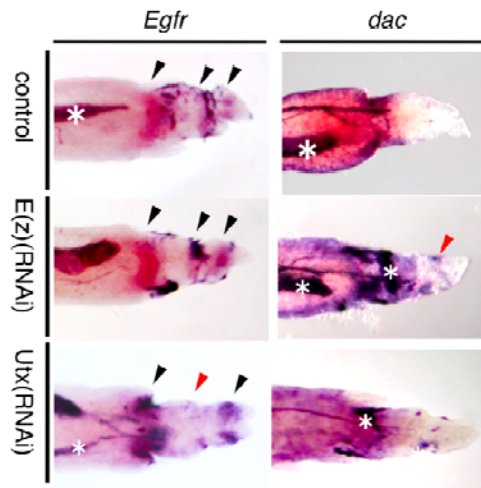


図3 野生型とRNAi個体の再生脚における脚パターン形成遺伝子の発現

(4) 人工酵素を用いた遺伝子ノックアウト、ノックイン系の構築

近年、zinc finger nuclease(ZFN)や TAL effector nuclease(TALEN)などの人工酵素を用いたゲノム編集技術が開発され、非モデル生物でもノックアウト個体やノックイン個体の作出が可能になってきている。脚パターン形成遺伝子の発現をマーカー遺伝子の発現で可視化するため、*Dll*や *dac*のゲノム領域に緑色蛍光タンパク質遺伝子 *GFP*をノックインする方法の開発を行った。ZFNや TALENでコオロギのゲノム編集が行えるかを調べるため、*laccase2*遺伝子を標的として実験系の検討を行った。*laccase2*は色素合成遺伝子で、機能阻害によりコオロギのクチクラは白化する。*laccase2*に対するZFNや TALENを合成し、ZFNや TALENをコードするRNAをコオロギ受精卵に注入したところ、*laccase2*遺伝子のノックアウト個体を作成することに成功した(雑誌論文②)

(5) 結論と今後の予定

比較トランスクリプトーム解析の結果、コオロギ脚再生に必要なエピジェネティック因子を単離し、ヒストン H3K27 のメチル化を介した脚パターン形成遺伝子の発現調節が脚再生の再パターンニングに重要な働きをして

いることを明らかにした。*E(z)*はポリコーム複合体の構成因子であるためポリコーム応答エレメントを使って *E(z)*の働きを可視化する予定であったが、ゲノム解析が難航し可視化のためのベクターの構築には至らなかった。本研究でヒストン H3K27 のメチル化が *dac*, *Egfr* 遺伝子の発現調節に必須であることが示唆されたことから、クロマチン免疫沈降法を使って再生過程での *dac*, *Egfr* 遺伝子近傍のメチル化状態を直接解析していきたい。また ZFN や TALEN を用いて GFP 遺伝子をゲノムにノックインする方法で発現の可視化し、再生芽細胞と分化細胞での遺伝子発現のエピジェネティックな制御を明らかにしていきたい。本研究で解析した *E(z)* と *Utx* 以外にも再生過程で働くことが期待される 24 因子を同定しているの、それら 24 因子についても同様の解析を進め、再生過程におけるエピジェネティックな制御の全貌解明に繋げたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 6 件)

① Tetsuya Bando, Yoshiyasu Ishimaru, Takuro Kida, Yoshimasa Hamada, Yuji Matsuoka, Taro Nakamura, Hideyo Ohuchi, Sumihare Noji and Taro Mito, Analysis of RNA-Seq data reveals involvement of JAK/STAT signalling during leg regeneration in the cricket *Gryllus bimaculatus*., *Development*, vol. 140, 2013, p. 959-964 (査読有)

② Takahito Watanabe, Hiroshi Ochiai, Tetsushi Sakuma, Hadley W. Horch, Naoya Hamaguchi, Taro Nakamura, Tetsuya Bando, Hideyo Ohuchi, Takashi Yamamoto, Sumihare Noji and Taro Mito, Non-transgenic genome modifications in a hemimetabolous insect using zinc-finger and TAL effector nucleases., *Nat. Commun.*, vol. 3, 2012, p. 1017. (査読有)

③ Akira Takagi, Kazuki Kurita, Taiki Terasawa, Taro Nakamura, Tetsuya Bando, Yoshiyuki Moriyama, Taro Mito, Sumihare Noji and Hideyo Ohuchi, Functional analysis of the role of *eyes absent* and *sine oculis* in the developing eye of the cricket *Gryllus bimaculatus*., *Develop. Growth Differ.* vol. 54, 2012, p. 227-240. (査読有)

④ Tetsuya Bando, Yoshimasa Hamada, Kazuki Kurita, Taro Nakamura, Taro Mito, Hideyo Ohuchi, and Sumihare Noji, Lowfat, a mammalian *Lix1* homologue, regulates leg size and growth under the Dachshous/Fat signaling pathway during tissue

regeneration., *Dev. Dyn.* vol. 240, 2011, p. 1440-1453. (査読有)

⑤ Tetsuya Bando, Taro Mito, Taro Nakamura, Hideyo Ohuchi, and Sumihare Noji, Regulation of leg size and shape: involvement of the Dachous-Fat signaling pathway., *Dev. Dyn.* vol. 240, 2011, p. 1028-1041. (査読有)

[学会発表] (計15件)

① 板東哲哉, 再生モデル昆虫を用いた器官再生の分子基盤の研究, 第12回日本再生医療学会総会, 2013年03月21-23日, パシフィコ横浜(横浜市)

② 板東哲哉, コオロギ脚再生において再生芽細胞の増殖を制御する分子メカニズムの解析, 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月11-14日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡市)

③ Tetsuya Bando, Dachous/Fat signaling via Hippo/Salvador/Warts pathway regulates cell proliferation and pattern formation during leg regeneration in the cricket., XXIV International Congress of Entomology(招待講演), 2012年08月19-25日, The EXCO-Daegu Convention Center(韓国(大邱))

④ Yuji Matsuoka, Functional analysis of epigenetic regulation during embryogenesis of the cricket, *Gryllus bimaculatus*., XXIV International Congress of Entomology, 2012年08月19-25日, The EXCO-Daegu Convention Center(韓国(大邱))

⑤ Tetsuya Bando, Angiomotin regulates cell proliferation cooperatively with Expanded and Merlin during leg regeneration in *Gryllus bimaculatus*., 第45回日本発生生物学会, 2012年05月29-31日, 神戸国際会議場(神戸市)

⑥ Tetsuya Bando, Molecular mechanisms underlying cell proliferation and pattern formation during leg regeneration in *Gryllus bimaculatus*., The 2nd international conference on the Cricket / RNAi symposium for medicine-agriculture-engineering collaboration project (joint meeting)(招待講演), 2012年3月19-22日, 徳島大学(徳島市)

⑦ Yuji Matsuoka, Functional analysis of epigenetic regulation during embryogenesis of the cricket, *Gryllus bimaculatus*., The 2nd international conference on the Cricket / RNAi symposium for medicine-agriculture-engineering collaboration project (joint meeting)(招

待講演), 2012年3月19-22日, 徳島大学(徳島市)

⑧ Sumihare Noji, Molecular mechanisms underlying insect leg regeneration: from wound healing to leg size determination., 第34回日本分子生物学会年会(招待講演), 2011年12月13-16日, パシフィコ横浜(横浜市)

⑨ Tetsuya Bando, Angiomotin regulates leg size cooperatively with Expanded and Merlin during regeneration in *Gryllus bimaculatus*., 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月13-16日, パシフィコ横浜(横浜市)

⑩ Yuji Matsuoka, Polycomb group genes epigenetically determines segmental identity in the cricket, *Gryllus bimaculatus*., 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月13-16日, パシフィコ横浜(横浜市)

⑪ Sumihare Noji, Regeneration of Insect Legs: Involvement of the JAK-STAT and Dachous-Fat Signaling Pathways., The 1st CDB-Regeneration Biology Study Group meeting "from Regeneration Biology to Regenerative Medicine (I)" (招待講演), 2011年11月24-25日, 理化学研究所発生再生センター(神戸市)

⑫ Tetsuya Bando, Molecular mechanisms underlying cell proliferation and formation of positional information during insect leg regeneration., The 1st CDB-Regeneration Biology Study Group meeting "from Regeneration Biology to Regenerative Medicine (I)", 2011年11月24-25日, 理化学研究所発生再生センター(神戸市)

⑬ Yoshimasa Hamada, Epigenetic regulation of leg regeneration in the cricket, *Gryllus bimaculatus*., The 1st CDB-Regeneration Biology Study Group meeting "from Regeneration Biology to Regenerative Medicine (I)", 2011年11月24-25日, 理化学研究所発生再生センター(神戸市)

⑭ Yoshimasa Hamada, Epigenetic regulation of gene expressions during leg regeneration in the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*., 第44回日本発生生物学会年会, 2011年5月18-21日, 沖縄コンベンションセンター(沖縄県)

⑮ Tetsuya Bando, Regulatory mechanism of blastemal cells mediated by polarity complexes via Dachous/Fat and Hippo/Salvador/Warts pathway during leg regeneration in *Gryllus bimaculatus*., 第44回日本発生生物学会年会, 2011年5月

18-21 日，沖縄コンベンションセンター(沖縄県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

板東 哲哉 (BANDO TETSUYA)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60423422

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし