

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830133

研究課題名(和文) 器官再生において再生芽細胞の脱分化と再分化を制御するエピジェネティックな機構

研究課題名(英文) Epigenetic regulation of dedifferentiation and redifferentiation of blastema cells during tissue regeneration

研究代表者

板東 哲哉 (Bando, Tetsuya)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：60423422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：コオロギの脚を切断すると、分化した細胞が脱分化し再生芽が形成される。再生芽ではいくつかのエピジェネティック因子の発現が上昇していた。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E(z)とUtxに着目して解析を行ったところ、これらエピジェネティック因子はヒストンのメチル化を制御することでパターン形成遺伝子の発現を調節し、脚再生における形態形成に寄与した。DNAメチル化を制御する因子は脚再生に貢献せず、コオロギではヒストン修飾を介したエピジェネティックな遺伝子発現調節が重要であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Hemimetabolous insect, cricket regenerate lost tissue parts using blastemal cells, which is a population of dedifferentiated-proliferating cells. Gene expression of epigenetic factors is upregulated in the blastema compared with in differentiated tissue, suggesting that epigenetic changes in gene expression may control the differentiation status of blastema cells. We focused on the function of the E(z) and Utx that regulate the methylation and demethylation on histone H3 27th lysine residue, respectively. Regenerated E(z)RNAi cricket legs exhibited extra tibia segment formation between the tibia and tarsus, and regenerated UtxRNAi cricket legs showed leg joint formation defects in the tarsus. In the E(z)RNAi- and UtxRNAi-regenerating leg, the dac and Egfr expressions were abnormal. These results suggest that regulation of the histone H3K27 methylation state is involved in the repatterning process during leg regeneration via the epigenetic regulation of leg patterning gene expression.

研究分野：再生生物学

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

“器官再生”は生物が器官の失われた部分を修復する現象であり、プラナリア、ゴキブリ、イモリなどを用いて研究されてきた。器官の一部分が失われると、修復された傷口付近に再生芽が形成される。再生芽は、分化細胞が脱分化した再生芽細胞から形成され、幹細胞と同様に増殖能と多分化能を持つ。増殖した再生芽細胞は既存の器官の位置情報を基にして再パターンニングされて失われた器官が再構築される。傷の修復や再生芽細胞の増殖、再パターンニングのメカニズムについてはプラナリアやゼブラフィッシュ、イモリ、カエルなどの再生生物を用いて解析が行われてきた。しかしながら傷の修復から再生芽形成に至るメカニズムについては不明な点が多く、再生芽細胞は分化細胞が脱分化することにより形成されると考えられているが脱分化の機構は未解明である。

フタホシコオロギ(*Gryllus bimaculatus*)の脚を切断すると、器官の位置情報に従って再生芽細胞から失われた部分のみが再生される。これまで昆虫の器官再生の研究は移植実験と形態学的解析が行われてきた。我々はコオロギに対するRNA干渉法(RNAi)やトランスジェニック個体の作出法、人工酵素を用いた遺伝子ノックアウト法を開発し、器官再生を遺伝子レベルで解析することを可能にした。私はコオロギの脚再生を器官再生のモデルと位置づけ、器官再生の分子メカニズムを遺伝子レベルで解明してきた。

2. 研究の目的

本研究はコオロギの脚再生を器官再生のモデル系とし、器官再生の脱分化と再パターンニングにおけるエピジェネティックな遺伝子発現制御を解明することを目的とする。コオロギ再生脚において、再生芽の形成時には分化細胞の脱分化が、再生芽細胞から失われた器官が再生される過程では再生芽細胞の

再分化が起こり、脱分化と再分化の過程で遺伝子発現がエピジェネティックに制御されて切り替わると考えられる。脱分化過程はiPS細胞に見られるリプログラミング、再分化過程は幹細胞の分化誘導と同様の現象と考えることができる。ヒストンの修飾を介したエピジェネティックな遺伝子発現制御機構は酵母や昆虫からヒトまで保存された制御機構である。生殖細胞や幹細胞、細胞のガン化に伴うエピゲノム解析は国内外を問わず精力的に研究されており世界的な注目度も高い。しかしながら研究の多くは細胞レベルの解析であり、個体レベルでの研究は少ない。コオロギ脚再生におけるエピジェネティック因子の機能解析は、個体レベルで細胞のリプログラミングを解析するという独創的な研究であるが、生物が『失った器官を修復できる』という器官再生の普遍的な分子メカニズムの解明に繋がりヒトの器官再生へも応用できると考える。

本研究では、ヒストンH3の27番目のリジン(H3K27)をメチル化するE(z)と脱メチル化するUtxに着目し、標的遺伝子の発現制御を介して再生脚の再パターンニングを調節する分子メカニズムを解明する。またトランスクリプトーム解析から得られた知見を元にさらなるRNAiスクリーニングを行い、脱分化を制御するエピジェネティック因子とその標的遺伝子の探索を行う。脚再生過程におけるエピジェネティック因子を介した細胞の脱分化と再パターンニング機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

コオロギ脚再生過程に働く因子を網羅的に単離するため、再生脚と正常脚の比較トランスクリプトーム解析、発現が変化する遺伝子に対してRNAiによる機能的なスクリーニングを行い器官再生への影響を調べた。また新規の比較トランスクリプトーム解析を

行いさらなる因子の単離を目指した。

RNAi スクリーニングにより表現型が得られた遺伝子については、RNAi とさまざまな移植実験、標的遺伝子の探索と whole-mount *in situ* hybridization による発現解析を行った。また修飾されたヒストンに対する抗体を用いた組織学的・生化学的な実験の検討を行った。

4. 研究成果

4.1 再生脚のトランスクリプトーム解析

コオロギ脚再生過程に働く因子を網羅的に単離するためトランスクリプトーム解析を行った。切断後 24 時間の再生脚と正常脚の比較トランスクリプトーム解析から、再生に伴って 26 種類のエピジェネティック因子をコードする遺伝子の発現が上昇することを見いだした。そこでエピジェネティック因子をコードする約 40 遺伝子に対して RNAi による機能的なスクリーニングを行い器官再生への影響を調べたところ、ヒストンメチル化酵素 E(z) (Ezh2 ホモログ)、Art1 (PRMT8 ホモログ) やヒストン脱メチル化酵素 Utx (KDM6A ホモログ)、CG8165 (KDM3A/B ホモログ)、ヒストン脱アセチル化酵素 Rpd3 (HDAC1 ホモログ) などが脚再生の開始や再生脚の再パターンニングに必要であった。

再生芽細胞は、分化細胞が脱分化した細胞と考えられている。コオロギ脚再生では、再生芽は脚切断後 48 時間では形成されているため、脱分化は脚切断後の早い段階で起こると考えられる。定量 PCR 解析から、コオロギでは脚切断後 2~3 時間においてサイクリン E や EGF レセプター、JAK/STAT シグナル因子などの発現が一過的に低下することが分かった。再生初期に起こる遺伝子発現の一過的な抑制はエピジェネティックな遺伝子発現制御によるものと示唆され、遺伝子発現の抑制と脱分化との関連に興味を持たれた。脱分化過程に働く因子を単離するため、切断後 3 時

間の再生脚と正常脚から mRNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq を行って比較トランスクリプトーム解析を行った。この新規の比較トランスクリプトーム解析から、クチクラ形成、アポトーシス、細胞増殖に関連する遺伝子、VEGF シグナルなどのシグナル因子をコードする遺伝子などの発現が上昇していた。エピジェネティック因子では、ヒストン H3K36 メチル化酵素遺伝子、ヒストン脱アセチル化酵素遺伝子の発現が上昇していた。

4.2 ヒストン H3K27 のメチル化と器官再生

これまでの解析からヒストン H3K27 メチル化酵素 E(z) と脱メチル化酵素 Utx がコオロギ脚再生に寄与することが分かっている。E(z) に対して RNAi を行った再生脚では脛節と附節の間に脚節の過形成が起こる。脛節や附節に発現する遺伝子の発現パターンの変化を調べたところ、E(z) (RNAi) 個体の再生脚では dac 遺伝子の発現が変化し、Egfr や Dll 遺伝子の発現は変化していなかった。Utx に対して RNAi を行った再生脚では附節内の関節の形成不全が起こる。Utx (RNAi) 個体の再生脚では附節の中位で Egfr の発現が消失したが、dac や Dll 遺伝子の発現パターンは変化していなかった。

E(z) (RNAi) 個体で過形成された脚節の由来を調べるため、(1) 後脚と中脚の再生過程を比較検討する、(2) 切断位置を変える、(3) 過剰肢の形成を誘導する、(4) 近縁種コオロギで脚再生を誘導する、の実験を行った。(1) 中脚を切断した再生脚の形態学的な観察により過形成された脚節は脛節由来と考えられた、(2) 腿節で切断しても、脛節の過形成は脛節と附節の間で起こった、(3) 過剰肢においても脛節が過形成された、(4) 脛節の過形成は近縁種コオロギで E(z) (RNAi) を行った場合でも観察された。さらに(5) 脛節内で切断位置を変えて再生を誘導する実験を

行くと、(5)遠位や中位で切断した場合より近位で切断した再生脚のほうが E(z) (RNAi) の表現型の割合が高く、過形成される脛節も長くなることが分かった。

中位や近位で切断した E(z) (RNAi) 個体の再生脚を用いて dac 遺伝子の発現パターンを解析したところ、同位置で切断したコントロール個体の再生脚と比較して、E(z) (RNAi) 個体の再生脚では dac の発現領域が異所的に遠位に拡大しており、近位で切断した再生脚では附節全体で dac が発現した。以上の実験より、E(z) (RNAi) 個体では附節における dac 遺伝子発現の脱抑制の不全により脛節が過形成されることが分かった。

発生過程において E(z) の機能阻害を行ったところ、胚反転の欠如や付属肢の形成異常が観察された。しかしながら、E(z) (RNAi) 再生脚で見られたような脛節の過形成は見られなかった (Matsuoka et al., 2015) ことから、E(z) による dac の発現制御は脚再生過程に特異的なメカニズムと考えられた。

4.3 ヒストン H3K27 のメチル化と再生芽形成

ヒストン H3K27 メチル化が再生芽形成に必須であれば、E(z) (RNAi) や Utx (RNAi) を行った後で一定時間を経過させてから脚を切断すると再生不全の表現型を示すことが期待される。そこで E(z) (RNAi) や Utx (RNAi) を行い 72 時間後に脚を切断して再生過程を調べたが、再生不全の表現型は観察されなかった。すなわち E(z) や Utx によるヒストン H3K27 のメチル化修飾は再生芽形成には必要ないことが分かった (論文投稿中)。

4.4 脚再生における脚パターン形成遺伝子

コオロギ再生脚および発生中の肢芽において、パターン形成遺伝子 dac と Dll は、脛節の遠位と附節の近位に、また附節全体に、それぞれ発現する。これらの遺伝子に対して RNAi を行って再生過程を観察すると、

dac (RNAi) 個体では脛節の遠位と附節の近位が欠損し、Dll (RNAi) 個体では附節全体が欠損した (Ishimaru et al., 2015)。E(z) は dac の発現を制御するが、E(z) (RNAi) と dac (RNAi) では表現型が異なることから、E(z) が dac の発現を抑制する領域は附節の遠位に限局することが示唆された。

4.5 DNA のメチル化と器官再生

トランスクリプトーム解析から、再生芽ではメチル化 DNA 結合因子の発現が上昇していた。そこでコオロギから DNA メチル化酵素 DNMT2 及び DNMT3、メチル化 DNA の能動的排除に働く TET をクローニングして RNAi を行い、再生過程を調べた。DNMT2 (RNAi)、DNMT3 (RNAi)、TET (RNAi) のいずれも再生過程に異常は見られず、コオロギ脚再生においては DNA のメチル化はほとんど働いていないと示唆された。

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) Yuji Matsuoka, Tetsuya Bando, Takahito Watanabe, Yoshiyasu Ishimaru, Sumihare Noji, Aleksandar Popadic, Taro Mito.

Short germ insects utilize both the ancestral and derived mode of Polycomb group-mediated epigenetic silencing of Hox genes.

Biol. Open 2015 (in press) (査読有り)
doi:10.1242/bio.201411064

(2) Yoshiyasu Ishimaru, Taro Nakamura, Tetsuya Bando, Yuji Matsuoka, Hideyo Ohuchi, Sumihare Noji, Taro Mito. Involvement of dachshund and Distal-less in distal pattern formation of the cricket leg during regeneration.

Sci Rep. 2015 Feb 11;5:8387. (査読有り)

doi:10.1038/srep08387.

(3) Hiroshi Yoshida, Tetsuya Bando, Taro Mito, Hideyo Ohuchi, Sumihare Noji. An extended steepness model for leg-size determination based on Dachshous/Fat trans-dimer system.

Sci Rep. 2014 Mar 11;4:4335. (査読有り)

doi:10.1038/srep04335.

(4) 板東哲哉、三戸太郎、野地澄晴、大内淑代

コオロギ脚再生の分子メカニズム

実験医学 2014 Jan; 32 (1):15-21. (査読無し)

[学会発表](計11件)

(1) Tetsuya Bando, Yoshimasa Hamada, Taro Mito, Sumihare Noji, Kenji Tomioka, Hideyo Ohuchi.

Epigenetic regulation on histone H3K27 is involved in redifferentiation process during leg regeneration in the cricket *Gryllus bimaculatus*.

第120回日本解剖学会総会・全国学術集会
第92回日本生理学会大会 合同大会

2015/3/21-2015/3/23

兵庫県神戸市

(2) 板東哲哉、濱田良真、三戸太郎、野地澄晴、大内淑代

コオロギ脚再生において再生芽細胞の再分化はヒストン H3K27 メチル化により制御される

第37回日本分子生物学会年会

2014/11/25-2014/11/27

神奈川県横浜市

(3) Yoshimasa Hamada, Tetsuya Bando, Hideyo Ohuchi, Kenji Tomioka.

Epigenetic factor E(z) is involved in the circadian rhythm and leg regeneration in crickets.

日本動物学会 第85回 仙台大会

2014年9月11日～2014年9月13日

宮城県仙台市

(4) Tetsuya Bando, Yoshiyasu Ishimaru, Hiroshi Yoshida, Taro Nakamura, Taro Mito, Hideyo Ohuchi, Sumihare Noji.

Mechanisms underlying regeneration of the cricket leg, based on extended steepness model.

EMBO Conference: the Molecular & Cellular Basis of Regeneration & Tissue repair (招待講演)

2014/9/6-2014/9/10

スペイン バルセロナ市

(5) Yoshimasa Hamada, Tetsuya Bando, Taro Mito, Kenji Tomioka, Sumihare Noji, Hideyo Ohuchi.

Epigenetic regulation of genes expressions via methylation on histone H3 27th lysine residue during leg regeneration.

第47回日本発生生物学会

2014/5/27-2014/5/30

愛知県名古屋市

(6) 板東哲哉、濱田良真、富岡憲治、野地澄晴、大内淑代

コオロギに学ぶ器官再生の分子メカニズム

第119回日本解剖学会総会・全国学術集会(招待講演)

2014/3/27-2014/3/29

栃木県下野市

(7) Tetsuya Bando, Yoshimasa Hamada, Kenji Tomioka, Taro Mito, Sumihare Noji, Hideyo Ohuchi.

Molecular basis on tissue regeneration in the cricket as revealed by RNA interference.

International Symposium on RNAi and Genome editing methods (招待講演)

2014/3/13-2014/3/16

徳島県徳島市

(8)板東哲哉、濱田良真、三戸太郎、野地澄晴、大内淑代

器官再生において再生芽細胞の再分化を制御するエピジェネティックな機構

第 36 回日本分子生物学会年会

2013/12/3-2013/12/6

兵庫県神戸市

(9)板東哲哉、濱田良真、富岡憲治、野地澄晴、大内淑代

再生を制御する普遍的分子機構の解明：昆虫の脚再生からヒト器官再生を目指して

日本解剖学会 第 68 回中国・四国支部学術集会

2013/10/19-2013/10/20

鳥取県米子市

(10)板東哲哉、濱田良真、富岡憲治、三戸太郎、野地澄晴、大内淑代

フタホシコオロギ脚再生過程におけるパターン形成遺伝子のエピジェネティックな発現制御

日本動物学会第 84 回岡山大会

2013/9/26-2013/9/28

岡山県岡山市

(11)板東哲哉、三戸太郎、大内淑代、野地澄晴

脚再生過程において JAK/STAT シグナルは再生芽細胞の増殖を制御する

第 46 回日本発生生物学会

2013/5/28-2013/5/31

島根県松江市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

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