

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25870058

研究課題名(和文)両生類における位置特異的な遺伝子発現操作法の確立と形態再生への適用

研究課題名(英文)Local gene induction system in an amphibian and its application to morphogenetic regeneration

研究代表者

横山 仁 (Yokoyama, Hitoshi)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号：90455816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：両生類は四肢を切断しても元通りに再生する高い再生能力を持つ。その一方で遺伝子を体内の特定の位置で発現させる方法がなかったことが分子レベルでの研究をこれまで妨げてきた。本研究では遺伝子組換えを介した熱ショックによる発現誘導系をベースに、IR-LEGOと温冷負荷装置という2つの方法を両生類に適用することで局所的な遺伝子発現の誘導を可能にした。これにより、1細胞レベルで特定の遺伝子の機能を実証し、あるいは四肢の中である領域のみで遺伝子を発現させることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Amphibians have high regenerative capacity. For example, they can regenerate a limb after amputation. However, difficulty in manipulating gene expression in spatially restricted manner has so far hindered elucidation of the molecular mechanisms of regeneration in amphibians. In this study, I applied two types of gene induction systems, IR-LEGO and temperature stimulator to amphibians and enabled local gene induction. As a result, function of a specific gene has been revealed by single cell level gene induction by IR-LEGO. Furthermore, gene induction exclusively in a specific region in a limb has been done by using temperature stimulator.

研究分野：発生生物学、再生生物学

キーワード：再生 両生類 遺伝子発現 四肢

1. 研究開始当初の背景

両生類は四肢(手足)のような器官そのものを再生できる高い再生能力を持つが、遺伝子操作の手段がないことが研究を進める上での障害になっていた。その中で熱ショックプロモーターを組み込んだ遺伝子組換え(Tg)個体を作製し、適切な時期に熱ショックを与えることで任意のタイミングで遺伝子を発現させるやり方が、近年多くの研究者の間で行われていた。その一方で熱ショックを利用した発現誘導はほとんど全てのケースにおいて全身性の発現誘導であり、目的の位置のみに限局した発現誘導の技術は存在しなかった。そこで研究代表者は位置特異的な遺伝子発現の誘導技術をアフリカツメガエル(以下、ゼノパス)で確立することを目指した。ゼノパスは Tg 個体の大量作製が容易で、幼生期には四肢を完全に再生できるが、成体期には1本の棒状な軟骨構造(スパイク)しか再生できないという特徴がある。もし遺伝子操作によってゼノパスの成体により完全な四肢を再生させられれば、3次元的な器官(四肢)の再生能力の回復を示すモデルケースを提供できる。その一方で前述のように、局所的な発現誘導技術がないことが長年研究の障害になっていた。

2. 研究の目的

本研究を開始した当初においては、「1. 効率的な Tg 個体選別法の確立」「2. 位置特異的な遺伝子発現の誘導技術の確立」「3. 遺伝子操作による成体ゼノパスの再生能回復」という大きく分けて3つの目的を掲げていた。Tg 個体を作製すると、とくに最初の世代(F0)においては目的の遺伝子が個体ゲノムに導入されて期待通りの発現を示す個体と、全く発現しない個体とに分かれ、バラつきが非常に大きい。そこで1つめの目的として、これら個体を効率よく選別する方法の確立を目指した。2つめの目的としては個体の体内において目的の位置に限局して遺伝子の発現を誘導する技術の確立を目指した。そして3つめとしてはこの局所的な発現誘導技術を活用して、再生能力の低下したゼノパスに対して再生能力を回復させることを目指した。

3. 研究の方法

本研究では熱ショックプロモーターに目的の遺伝子をつないだ Tg ゼノパスを作製し、IR-LEGO と温冷負荷装置という2種類の方法(図1)を用いて局所的な発現誘導の実現を目指した。IR-LEGO は個体の体の一部に赤外レーザーを照射してその箇所だけに熱ショックを与えることで、局所的な遺伝子発現の誘導を可能にする技術であり、これまでに線虫や魚類で用いられてきた(Kamei et al., 2009; Deguchi et al., 2009 など)。これに対して温冷負荷装置は温度コントロールした金属製のプローブを個体に押し当てるこ

とで、より広範囲にかつ局所的に遺伝子発現を誘導する技術である。これまでにメダカを対象にした研究で有効性が報告されていた(Kobayashi et al., 2013)。本研究ではこれらの実験技術を用いて、ゼノパスにおいて局所的な遺伝子発現の誘導を実現し、1 - 3の目的を達成することを目指した。

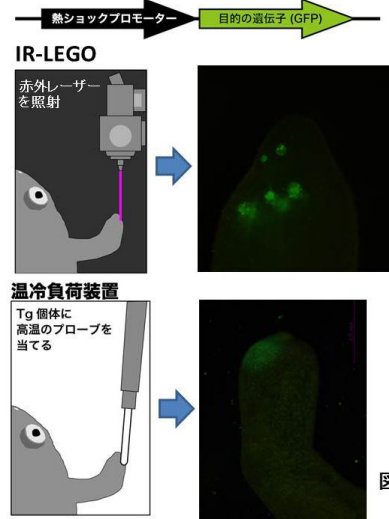


図1 位置特異的な発現操作法

4. 研究成果

研究を開始する時点で、IR-LEGO と温冷負荷装置の技術はゼノパスに対して有効であることを示唆する予備的なデータが得られていたが(図1) 実際に研究を開始するとゼノパス(アフリカツメガエル)だけではなく、有尾両生類のイベリアトゲイモリに対しても有効な技術であることが確認できた(Kawasumi-Kita and Hayashi et al., 2015)。また IR-LEGO に関してはレーザーの強度や照射範囲を変えることで、1細胞レベルから直径数十μm の範囲までさまざまなスケールでの発現誘導が可能であることがわかった(Kawasumi-Kita and Hayashi et al., 2015)。とくに1細胞レベルの発現誘導を利用して、ゼノパス幼生の尾の再生において Hippo シグナル経路の下流に位置する Tead および Yap が重要な機能を持つことを実証した(Hayashi et al., 2014a)。研究代表者らは IR-LEGO を適用する以前から Hippo シグナル経路に着目し、幼生の四肢(肢芽)の再生(Hayashi et al., 2014b)と尾の再生(Hayashi et al., 2014a)における Tead, Yap の必要性を全身レベルでの発現誘導で示していたが、さらに1細胞レベルでの発現誘導を行うことでこれらの分子の細胞自律的な機能を明らかにすることができた。このように目的の2つ目に挙げた位置特異的な遺伝子発現の誘導技術の確立については、予想以上にうまく行き、様々なスケール(範囲)での発現誘導が可能になった。

その一方で1つめの目標に掲げた効率的な Tg 個体選別法の確立については、当初は幼生の尾などに IR-LEGO を行い、光る個体をそこから選別することで目的とする Tg 個

体を選別することを目指したが、一定の条件で各個体に赤外レーザー照射を行うのに予想以上に時間がかかるなどの問題があり、IR-LEGOのみを指標にして Tg 個体の選別を行うのは途中で断念した。そこで従来行ってきたクリスタリンプロモーターで Tg 個体のレンズを標識する方法 (Yokoyama et al., 2011; Hayashi et al., 2014a, 2014b など) と併用しつつ、熱ショックによって目的の遺伝子を発現する理想的な Tg 個体であることの最終確認の方法として IR-LEGO を利用するというやり方に方針を転換した。

3 つめの目的である遺伝子操作による成体ゼノパスの再生能回復については、少なくとも幼生と成体の両方で局所的に遺伝子発現を操作し、四肢の形態形成に変化を与えようことまでは確認できた。例えば Tead, Yap の機能を発生中の肢芽のみに限局して阻害することで、実際に形成される四肢のサイズや形態に変化が生じることを明らかにすることができた。

また当初予定していなかった予想外の成果として、純系統である J 系統のゼノパスを用いることで拒絶を起こさない組織の移植を成体ゼノパスで実現することができた。これにより皮下組織のみで局所的に GFP を発現する個体を作製し、前述の IR-LEGO および温冷負荷装置に依らない方法で細胞標識を行い、皮膚再生に対する皮下組織の寄与を示すことができた (Otsuka-Yamaguchi et al., 2017)。また IR-LEGO によって予想以上に高い精度で局所的に発現を誘導できることから、ある細胞のみをピンポイントで標識してその後の運命を観察する細胞系譜解析にも有効であることがわかった。これまで両生類では困難だった細胞系譜解析を行うために有効なツールになりうると期待される。

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 14 件)

† は equal contribution した co-first authors

Otsuka-Yamaguchi, R., Kawasumi-Kita, A., Kudo, N., Izutsu, Y., Tamura, K. and Yokoyama, H. (2017) Cells from subcutaneous tissues contribute to scarless skin regeneration in *Xenopus laevis* froglets 査読有 *Developmental Dynamics* (accepted)
DOI: 10.1002/DVDY.24520

† Kawasumi-Kita, A., † Hayashi, T., Kobayashi, T., Nagayama, C., Hayashi, S., Kamei, Y., Morishita, Y., Takeuchi, T., Tamura, K. and Yokoyama, H. (2015) Application of local gene induction by

infrared laser-mediated microscope and temperature stimulator to amphibian regeneration study. 査読有 *Development Growth and Differentiation*, **57**, 601-613.

DOI: 10.1111/dgd.12241

Hayashi, S., Kawaguchi, A., Uchiyama, I., Kawasumi-Kita, A., Kobayashi, T., Nishide, H., Tsutsumi, R., Tsuru, K., Inoue, T., Ogino, H., Agata, K., Tamura, K. and Yokoyama, H. (2015a) Epigenetic modification maintains intrinsic limb-cell identity in *Xenopus* limb bud regeneration. 査読有 *Developmental Biology*, **406**, 271-282.

DOI: 10.1016/j.ydbio.2015.08.013

Hayashi, S., Kobayashi, T., Yano, T., Kamiyama, N., Egawa, S., Seki, R., Takizawa, K., Okabe, M., Yokoyama, H. and Tamura, K. (2015b) Evidence for an amphibian sixth digit. 査読有 *Zoological Letters*, **1**:17

DOI: 10.1186/s40851-015-0019-y

Hayashi, S., Yokoyama, H. and Tamura, K. (2015c) Roles of Hippo signaling pathway in size control of organ regeneration. 査読有 *Development Growth and Differentiation*, **57**, 341-351.

DOI: 10.1111/dgd.12212

Hayashi, S., Ochi, H., Ogino, H., Kawasumi, A., Kamei, Y., Tamura, K. and Yokoyama, H. (2014a) Transcriptional regulators in the Hippo signaling pathway control organ growth in *Xenopus* tadpole tail regeneration. 査読有 *Developmental Biology*, **396**, 31-41.

DOI: 10.1016/j.ydbio.2014.09.018

Hayashi, S., Tamura, K. and Yokoyama, H. (2014b) Yap1, transcription regulator in the Hippo signaling pathway, is required for *Xenopus* limb bud regeneration. 査読有 *Developmental Biology*, **388**, 57-67.

DOI: 10.1016/j.ydbio.2014.01.018

[学会発表](計 11 件)

横山仁 (2017 年 3 月 8 日・仙台国際センター、宮城県仙台市)「アフリカツメガエルの皮膚再生と四肢再生 立体的な器官再生の実現に向けての新たな実験ツール」日本再生医療学会総会 シンポジウム 再生生物学からの挑戦 再生医療への新たなアプローチ [招待講演、日本語]

横山仁 (2016年3月28日・ビッグパレットふくしま、福島県郡山市)「四肢と皮膚の完全再生を可能にする分子・細胞メカニズムの探求」日本解剖学会 シンポジウム 再生研究の新機軸 不可能を可能とする内在性プログラムの探索 [招待講演、日本語]

Hitoshi Yokoyama, Rina Otsuka, Aiko Kawasumi-Kita, Tamae Maruoka and Koji Tamura (2016年3月18日・岡崎コンファレンスセンター、愛知県岡崎市)「Skin regeneration of Xenopus, as a model for scar-free skin regeneration in adulthood」Aquatic model organisms for human disease and toxicology research [招待講演、英語]

横山仁 (2013年9月28日・岡山大学、岡山県岡山市)「発生原理から見たアフリカツメガエルの器官再生」日本動物学会 シンポジウム:発生原理に基づく再生生物学とその展望 [招待講演、日本語]

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://nature.cc.hirosaki-u.ac.jp/staff/hitoshi-yokoyama>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 仁 (YOKOYAMA, Hitoshi)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号：90455816

(2) 研究分担者

()
研究者番号：
(3) 連携研究者 ()
研究者番号：
(4) 研究協力者 ()