

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03236

研究課題名（和文）再生現象に伴う新規ATP産生制御機構の探索

研究課題名（英文）Search for a novel ATP production control associated with animal regeneration

研究代表者

梅園 良彦（Umesono, Yoshihiko）

兵庫県立大学・理学研究科・教授

研究者番号：20391881

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：損傷組織を再生するためには、エネルギー通貨であるATPの産生が必須であることは明らかであるが、創傷後におけるATPの産生効率が、再生にどれだけ寄与しているかについては未だに不明である。プラナリアは、絶食状態であるにも関わらず、切断後、時間軸に沿って厳密に分化多能性幹細胞が増殖および分化することで、非常に安定的に高い再生能力を示す。本研究において、我々はプラナリア再生初期過程において特別な分子機構が働くことによって、ミトコンドリア内膜で行われる酸化的リン酸化を亢進し、その結果、ATPを効率よく産生することによって幹細胞の増殖および細胞分化を支持している知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、再生能力とATP産生に着目した新規研究課題であり、今後更なる発展の可能性を秘めている。また、本研究の発想から、創傷組織のATP産生効率を人為的に高めるようなサプリメントを企業と協同研究により開発できるかもしれない。これにより、手術を伴いながら長期治療を余儀なくされる疾病の早期治癒に貢献できるかもしれない。

研究成果の概要（英文）：It has been widely accepted that the production of ATP, which is an energy currency, plays a crucial role in regenerating damaged tissues and organs after injury, but it is still unclear how much the efficiency of ATP production in response to wounding contributes to regeneration. Planarians exhibit extraordinarily robust and high regenerative ability by activating pluripotent stem cells even under starvation. In this study, our findings suggest that gene regulatory networks in a regeneration-specific manner promote oxidative phosphorylation in the inner mitochondrial membrane, resulting in the efficient production of ATP that is essential for stem cell proliferation and differentiation.

研究分野：発生生物学、再生生物学

キーワード：再生 エネルギー代謝 プラナリア

## 1. 研究開始当初の背景

創傷治癒は、個人の潜在的な能力に依存しているのが現状である。例えば、同じ外科的手術を受けた場合において、速やかに完治できて退院できるヒトとなかなか完治できないヒトがいる。特に、高齢者は一般的に治癒速度が遅く、人生 100 年時代の高齢者にかかる医療費負担の増加は深刻な社会問題になっている。我々は、治癒能力に関する個人差は、ATP の産生効率の個人差によっても説明できるのではないかと考えるようになった。すなわち、しかしながら、創傷後の組織幹細胞の増殖および分化における代謝の役割については、精力的に解析されていないのが現状である。

脊椎動物再生実験系におけるその主な理由は、一般的に再生期間が長いこと、生存のために摂餌が必須であること、また、事実として、栄養状態の悪い個体は、正常であるにもかかわらず再生できないという現象がよく観察されており、ATP 産生がその個体の再生能力に大きな影響を及ぼすことは自明の理である一方で、恒常性の維持と再生を切り離して解析することはそもそも非常に困難な状況にあり、その結果、再生に特化した現象を抽出することは極めて困難であることが十分に想像できるからである。一方で、我々は、プラナリアクローン個体集団を用いることで遺伝的な背景を均一化することで、そもそもの個体差を最小限に抑えることができること、絶食状態にも関わらず短期間で非常に安定した再生能力を発揮できること、プラナリア再生の種細胞は分化多能性幹細胞であり、その分子基盤がよくわかっていること、FACS 法を用いることにより、分化多能性幹細胞集団のみを分取可能であることなどの利点を活かすことにより、この問題にアプローチ可能であると考えた。

## 2. 研究の目的

グルコースは細胞質でおこなわれる解糖により、ピルビン酸となり、2 ATP を産生する。好気条件では、ピルビン酸はミトコンドリアに取り込まれ、ピルビン酸脱水素酵素 (PDH) によりアセチル CoA に変換され、TCA 回路と電子伝達系により 36 ATP を産生する。PDH の活性は、ピルビン酸脱水素酵素キナーゼ (PDK) によるリン酸化によって抑制され、ピルビン酸脱水素酵素脱リン酸化酵素 (PDP) による脱リン酸化によって促進される。すなわち、ミトコンドリアにおける ATP の産生効率は、この 2 種類の酵素活性のバランスにより制御されており、再生に参加する幹細胞においては、“*pdk* 遺伝子の発現抑制” かつ “*pdp* 遺伝子の発現促進” が最も ATP の産生効率が高い状態であることが期待された。

本研究では、プラナリア を実験モデルに用いてこの仮説を検証し、再生現象に伴う新規 ATP 産生制御機構の探索を目的とした。また、BMP および FGF シグナル経路との関連性についても検証をおこなう。

## 3. 研究の方法

1) 林らによって確立された FACS 法を用いて (Hayashi *et al.*, DGD, 2006)、ナミウズムシ再生過程における X1 fraction (主に細胞周期 S 期の幹細胞集団)、X2 fraction (再生芽細胞を含む G1/G0 期の分化途上の幹細胞の子孫細胞集団) および X1S fraction (分化細胞集団) をそれぞれ分取して、定量的 RT-PCR 法により *pdk* および *pdp* の発現変動を調べる。

2) 分取した細胞集団の ATP 量を測定する。

3) 細胞集団として、理想的な実験結果が得られた場合は、次世代シーケンサーによる遺伝子発現解析を網羅的におこない、*pdk* および *pdp* の転写制御機構に関与する候補遺伝子を探索する。

4) RNA 干渉により、再生過程における各候補遺伝子の機能阻害実験をおこなう。

5) RNA 干渉により、プラナリア *bmp* および *fgf* 遺伝子の機能阻害実験をおこない、幹細胞の増殖・細胞分化および代謝関連遺伝子の発現における影響を調べる。

## 4. 研究成果

1) 再生および非再生状態のプラナリア個体から FACS を用いて、細胞周期が S 期の分化多能性幹細胞集団、細胞周期が G0/G1 期の幹細胞集団および分裂能を有さない分化細胞集団の 3 つの画分を調整し、代謝関連遺伝子の発現量の変動を定量的 RT-PCR 法により調べた。その結果、*pdk* は再生状態においてのみ、細胞周期が S 期の分化多能性幹細胞集団特異的にその発現量が有意に減少することがわかった。さらには、恒常性維持過程において、*pdk* の発現量を RNA 干渉によって人為的に減少させると、幹細胞の増殖が亢進する可能性を示唆する結果も得られた。また、共同研究により、たまたまこの遺伝子の転写を制御している候補遺伝子を発見することができた。

2) *pdp* は、再生過程の分化細胞集団においてのみその発現量が有意に増加することがわかり、当初の予想に反する結果となった。

3) 1) の結果にともない、再生および非再生状態のプラナリア個体から FACS を用いて、細胞周期が S 期の分化多能性幹細胞集団を分取し、個々の細胞について ATP 量を計測したが、再生過程において ATP 産生量が多い結果を得ることはできなかった。この場合、必要な ATP は速やかに消費された可能性があるため、再度実験系を検討する必要性が生じた。

4) 再生過程において、プラナリア *fgf* 遺伝子は、ERK シグナル経路の活性化および幹細胞の増殖促進に関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Auwal Mohammad Abdul, Kashima Makoto, Nishimura Osamu, Hosoda Kazutaka, Motoishi Minako, Kamimura Akifumi, Okumura Akinori, Agata Kiyokazu, Umesono Yoshihiko	4. 巻 62
2. 論文標題 Identification and characterization of a fibroblast growth factor gene in the planarian <i>Dugesia japonica</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 527 ~ 539
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12696	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 梅園良彦
2. 発表標題 再生過程におけるATP産生を考える
3. 学会等名 再生学異分野融合研究会
4. 発表年 2019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
---------	---------