

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：12102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21300150

研究課題名（和文） アカハライモリの資源化とモデル動物化を支える情報・技術基盤の研究

研究課題名（英文） Ground study for researches with the newt *Cynops pyrrhogaster*

研究代表者

千葉 親文（CHIBA CHIKAFUMI）

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：80272152

研究成果の概要（和文）：イモリは生命科学の広範な研究に有用な実験動物である。本研究では、イモリ研究を前進させるべく「資源化」と「モデル動物化」に向けた調査、研究および技術開発に取り組んだ。その結果、（1）試験田を設置し、屋外での大規模飼育を可能にした、（2）高効率なトランスジェニック技術を確立し、網膜再生研究への適用技術の開発に成功した、（3）*de novo* ゲノムシーケンスのためのプロトコル開発を前進させた。

研究成果の概要（英文）：The newt is a useful animal for a large spectrum of life science researches. In the current project, to move researches with the newt onto the front line, we made efforts to make them a 'model animal' as well as a 'bio-resource' through various investigations, researches and technological development, and (1) realized a large scale rearing of newts by constructing a test rice field outside the laboratory, (2) established a high-throughput transgenic protocol for this animal and surrounding techniques to apply this protocol to the study of retinal regeneration, and (3) proceeded the development of protocols for *de novo* genome sequence.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2010年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2011年度	2,800,000	840,000	3,640,000
総計	13,300,000	3,990,000	17,290,000

研究分野：再生生理学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：イモリ、モデル動物、遺伝子改変、バイオリソース、環境、再生

1. 研究開始当初の背景

アカハライモリは、そのユニークな細胞特性や系統的な位置から、生物学の歴史に残る数多くの発見に貢献してきた我が国を代表する水棲動物である。しかし、近年イモリを扱う若手研究者は激減した。しかもアカハライモリは2006年に準絶滅危惧種に指定された。イモリ研究の展開を図り、ひいては我が国の生命科学水準の向上・強化につなげるためにも、遺伝子から生態・環境にいたる幅広い領域の研究者が、それぞれの領域の枠を超えて有機的に連携し、総力を挙げてアカハライモリの資源化とモデル動物化に取り組む必要がある。また同時に、これらを共通基盤として、各領域における新たな研究の創出を積極的に推進する必要がある。そのため、2008年1月、広範な領域の研究者・支援者が結集しJapan Newt Research Community (JNRC) が結成された。

我々(筑波大を中心とする JNRC サブグループ)は、このような背景を踏まえ、アカハライモリの資源化とモデル動物化に向けた調査、研究および技術開発を前進させるべく本補助金に応募した。

2. 研究の目的

本研究では、イモリ研究の最重要課題の1つである「資源化」と「モデル動物化」に向けた調査、研究および技術開発に取り組む。具体的には、日本固有種アカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*) について、以下の3つ研究開発を行う。

- (1) 生息状況調査と養殖池の整備
- (2) 遺伝子改変と機能評価技術の開発
- (3) ゲノム解析用アルゴリズムの開発

3. 研究の方法

(1) 生息状況調査と養殖池の整備

- ① 文献や聞き取り・実地調査に基づき生息地マップを作成する。
- ② 耕作放棄地に屋外養殖試験池を設置し、個体群再導入を試みる。導入個体の追跡と環境・生物相の推移を調査する。

(2) 遺伝子改変と機能評価技術の開発

- ① 高効率なトランスジェニック技術を確立し、体細胞核移植技術と組み合わせることで、遺伝子改変系統を作出・維持する技術を開発する。
- ② 実験モデルを設定し、遺伝子改変イモリを用いた遺伝子機能解析を実践する。

(3) ゲノム解析用アルゴリズムの開発

- ① 仮想ゲノムおよび既知ゲノム配列を用いた新規 *de novo* ゲノム復元アルゴリズムを開発する。

4. 研究成果

(1) 生息状況調査と養殖池の整備

- ① アカハライモリの保護・保全を目的として、ホームページを開設し、生息情報を収集した。また、市民協力者を募り、イベントや公開講座を開催して啓発に取り組んだ (<http://imori-net.org/>)。環境省レッドリストにおける分布調査や松井正文研究室(京都大学)でのサンプリングと系統解析が進行しているため、今後これらとの情報共有が必要である。

- ② 茨城県取手市の耕作放棄された谷津田を利用して約3ヘクタールの屋外養殖試験田(いもりの里)を設置し、2010年11月に千葉県鴨川市から採集された南関東系統のアカハライモリ約1000匹(雄:雌=1:1)を導入した。さらに井戸ポンプの稼働による水温の調節など、環境条件の改善を行うとともに、個体群の追跡と環境・生物相の推移を調査した。2回の冬季を経験した後も数%の個体が確認されたことから、密度は減少したものの確実に定着したと考えられる。今後も個体群導入とモニタリングを継続し、イモリの自然繁殖を成功させたい。2015年には研究・教育用にイモリを国内外に提供できるようにすることが目標である。「いもりの里」は世界で唯一のイモリストックセンターとして国際誌 *Nature Protocols* や新聞・テレビ等でも紹介された。これらの活動履歴や成果はホームページに掲載している (<http://imori-net.org/>)。

(2) 遺伝子改変と機能評価技術の開発

- ① *I-SceI* メガヌクレアーゼを用いた高効率なトランスジェニック技術を確立した (Casco-Robles et al., 2010, 2011)。この技術により、イモリの全身に強く一様に外来遺伝子を発現させることができるようになり、これまで困難とされてきた遺伝子機能解析に活路を開いた。さらに、成体のトランスジェニックイモリを効率よく得るために、人工変態抑制による簡便な飼育法を確立した (Chiba et al., 2012)。これにより再生研究や生理学研究のように成体をもちいる必要のある研究にも適用可能になった。しかし、遺伝子改変の効果を定量的に評価する

ためには、クローン個体を多数用いるなどの必要がある。今回、体細胞核移植によるクローン作製には至らなかったが、今後もこれに挑戦するとともに、コンストラクトのデザインを工夫することで導入遺伝子の発現量や発現場所を安定化させたい。また、今回、MetallothioneinプロモーターやHsp70プロモーターを利用した条件付き遺伝子発現系の開発、およびモルフォリノ (Tsonis et al., 2011) や shRNA によるノックダウン技術の導入にも着手し、それぞれの条件はほぼ決定したので、今後これらを遺伝子機能解析に利用していきたい。

- ② トランスジェニック技術を適用する対象として網膜再生系を選び、特に再生の開始に関わるシグナル系や分子メカニズムに着目した。網膜再生系では網膜色素上皮 (RPE) 細胞が再生の起源となる。そこで、RPE を含む眼組織の新たな培養系 (RLEC 培養系) を確立し、RPE 細胞の細胞周期進入や Pax6 など網膜幹細胞マーカーの発現に関わる経路の探索を行った。その結果、RPE 細胞の細胞周期進入に、少なくとも MEK-ERK シグナル経路の活性化、heparin 結合性因子 (Wnt、Shh、thrombin など)、接触阻害からの解放、という3つの要因が関わることを明らかにした (Yoshikawa et al., 2012)。さらに、この MEK-ERK シグナルの上昇は一過的で、生体内でも、網膜外傷直後 (30 分以内) に起こることを見出した (投稿中)。

また、今回初めて成体イモリの成熟した RPE 細胞に Pax6 が発現していることを明らかにした (投稿中)。この Pax6 は機能的な Paired-domain を含まないタイプである可能性が高い。この分子の発現は、生体内でも培養でも、神経性網膜の外傷後に上昇した。また、発現上昇そのものには MEK-ERK シグナル経路は関わらないが、heparin 存在下では MEK-ERK シグナル依存的に発現が調節されることもわかった。

一方、一般的な網膜幹細胞/前駆細胞マーカーである通常タイプの Pax6 分子については、特異的に認識する抗体をスクリーニングし、その発現動態の解析を進めている。また、MEK-ERK-Pax6 経路の上流分子であることが議論されている FGF 受容体 1 と 2 の遺伝子も単離し、それらに特異的な抗体を作製し、発現動態の解析を進めている。

成体の RPE とその由来細胞の遺伝子機能を特異的に操作する目的で、RPE 特異的遺伝子である *RPE65* に着目し、そのプロモーターの同定に成功した。

今後、*RPE65* プロモーターの下流で FGF 受容体-MEK-ERK-Pax6 などの分子機能を制御することで、網膜再生におけるそれらの役割を明らかにしていきたい。

(3) ゲノム解析用アルゴリズムの開発

- ① 既知の EST 情報から cDNA を予測し、研究者がオンラインで閲覧できるシステムを確立した。また、ゲノム解読を目指してアSEMBLソフトのメモリ 1/2 減を達成した。
- ② 次世代ゲノムアナライザーを用いた mRNASeq 解析により、網膜再生中に発現する遺伝子について、4 億本の cDNA 断片 (約 40 Gbp ; アカハライモリゲノム長に相等) を取得した。現在、これらから *de novo* で効率よく信頼性の高い数万のコンティグを構築 (すなわち、cDNA 予測) するプロトコルを開発中である。今後、このプロトコルをゲノム解読に繋げていきたい。

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 5 件)

- ① Chiba, C., Yamada, S., Tanaka, H., Inae-Chiba, M., Miura, T., Casco-Robles, M.M., Yoshikawa, T., Inami, W., Mizuno, A., Islam, MD. R., Han, W., Yasumuro, H., Matsumoto, M. and Takayanagi, M. (2012) Metamorphosis inhibition: an alternative rearing protocol for the newt *Cynops pyrrhogaster*. *Zool. Sci.*, **29**:293-298. 査読有
- ② Yoshikawa, T., Mizuno, A., Yasumuro, H., Inami, W., Vergara, M.N., Del Rio-Tsonis, K. and Chiba, C. (2012) MEK-ERK and heparin-susceptible signaling pathways are involved in cell-cycle entry of the wound edge retinal pigment epithelium cells in the adult newt. *Pigment Cell Melanoma Res.* **25**:66-82. 査読有
- ③ Casco-Robles, M.M., Yamada, S., Miura, T., Nakamura, K., Haynes, T., Maki, N., Del Rio-Tsonis, K., Tsonis, P.A. and Chiba, C. (2011) Expressing exogenous genes in newts by transgenesis. *Nature Protocols* **6**: 600-608. 査読有
- ④ Tsonis, P.A., Haynes, T., Maki, N., Nakamura, K., Casco-Robles, M.M., Yamada, S., Miura, T., Chiba, C. and Del Rio-Tsonis, K. (2011) Controlling gene loss of function in newts with emphasis on lens regeneration. *Nature Protocols* **6**:

593-599. 査読有

- ⑤ Casco-Robles, M.M., Yamada, S., Miura, T. and Chiba, C. (2010) Simple and Efficient Transgenesis with I-SceI Meganuclease in the Newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Dev. Dyn.* **239**:3275-3284. 査読有

[学会発表] (計25件)

- ① 千葉親文, MEK-ERK Signaling in Adult Newt Retinal Regeneration, The 1st CDB-Regeneration Biology Study Group meeting, 2011年11月25日、理化学研究所、発生・再生科学総合研究センター(神戸)
- ② 千葉親文, Retinal Regeneration: Learn from Newts, BIT's 4th Annual World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell, 2011年11月11日、北京国際会議センター、中華人民共和国・北京
- ③ 千葉親文, イモリの網膜再生メカニズムはどこまで解ったか、第14回視覚科学フォーラム、2010年8月27日、筑波大学(つくば)
- ④ 千葉親文, 成体イモリの網膜再生、日本動物学会第80回大会、2009年9月18日、コンベンションアーツセンター・グランシップ(静岡)

[図書] (計1件)

- ① 千葉親文, アカハライモリ, pp103-109, 研究者が教える動物飼育 第3巻-ウニ, ナマコから脊椎動物へ(日本比較生理生化学会編)、共立出版、2012、全194ページ、査読有

[その他]

- ① 報道関連情報
イモリの屋外養殖と保護・保全活動が新聞・テレビ等で報道
(<http://imori-net.org/>)
2011年度3イベント
2010年度3イベント
- ② アウトリーチ活動情報
・イモリの屋外飼育と保護・保全に関する市民向けイベントの開催
(<http://imori-net.org/>)
2011年度14回
2010年度9回
2009年度3回
・市民公開講座-今「いもりの里」が大切な理由-の開催・講演、2011年6月、取手市
(<http://imori-net.org/>)
・「TX テクノロジー・ショーケース in つくば」に出展、2010年1月、筑波大学
(<http://www.science-academy.jp/showase/09/>)

③ ホームページ情報

<http://imori-net.org/>
<http://www.biol.tsukuba.ac.jp/~chichiba/gyouseki.html>
<http://www.trios.tsukuba.ac.jp/Profiles/0005/0000815/profile.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 親文 (CHIBA CHIKAFUMI)
筑波大学・生命環境系・准教授
研究者番号: 80272152

(2) 研究分担者

中谷 敬 (NAKATANI KEI)
筑波大学・生命環境系・准教授
研究者番号: 20125040
八畑 謙介 (YAHATA KENSUKE)
筑波大学・生命環境系・講師
研究者番号: 70302370
丸尾 文昭 (MARUO FUMIAKI)
筑波大学・生命環境系・助教
研究者番号: 30199921
外山 史 (TOYAMA FUBITO)
宇都宮大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 60323317
(H21: 連携研究者)
宮崎 淳一 (MIYAZAKI JUNICHI)
山梨大学・教育人間科学部・教授
研究者番号: 80229830
(H21: 連携研究者)
有泉 高史 (ARIIZUMI TAKASHI)
玉川大学・農学部・教授
研究者番号: 30286166
(H21: 連携研究者)
久富 修 (HISATOMI OSAMU)
大阪大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号: 60231544
(H21: 連携研究者)
芋川 浩 (IMOKAWA YUTAKA)
福岡県立大学・看護学部・准教授
研究者番号: 90373274
(H21: 連携研究者)