

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 4 日現在

機関番号：24506
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21570232
 研究課題名（和文） アフリカツメガエル幼生の尾部再生における単一細胞レベルの解析
 研究課題名（英文） Single cell analysis of tail regeneration in Xenopus tadpole
 研究代表者
 餅井 真 (MOCHII MAKOTO)
 兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・准教授
 研究者番号：90202358

研究成果の概要（和文）：

アフリカツメガエル幼生の尾部再生過程において、FGF や hedgehog 等のシグナル因子が個々の細胞にどのように作用するかを明らかにしようとした。具体的モデルとして、脊索細胞が *in vitro* で液胞化し、成熟する過程を解析できる実験系を確立した。さらに脊索細胞の成熟に hedgehog シグナルが必要であり、FGF によりその過程が阻害されることがわかった。また、脊索細胞の成熟に伴い発現変化する遺伝子を複数同定した。

研究成果の概要（英文）：

To analyze direct effects of fibroblast growth factor and hedgehog signalings in the tail regeneration notochord cells were isolated from Xenopus tadpole. Isolated immature cells proliferated and terminally differentiated into vacuole-containing cells in a culture condition. The vacuolation was inhibited by FGFs or by hedgehog inhibitor. Genes associated with the notochord maturation were identified after a gene expression screening.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：アフリカツメガエル、尾部再生、脊索、表皮

1. 研究開始当初の背景

イモリやカエルなど両生類を材料とした器官再生の研究は古い歴史を持ち、生命科学において非常に重要な貢献をしてきた。一方、ほ乳動物の幹細胞研究は近年めざましい進歩をとげ、培養細胞から様々な分化細胞を作り出すことに成功している。しかし、大量の幹細胞を集合させても、そこから秩序だった完全な器官を作り出すことは現時点で不可

能である。これに対し、両生類の四肢や尾部が失われた場合には、見事なまでに完璧に失われた構造が生体内で再構築される。そこで、再生過程における細胞の秩序だった増殖、分化、移動のメカニズムを理解するためには、両生類を材料とした再生研究が、今現在でもなお大きな意義を持つと考えられる。

近年、有尾両生類（アホロートル）の四肢と尾部、アフリカツメガエルの尾部を材料

として、我々を含む複数の研究グループにより、器官再生を制御する細胞外シグナル因子の役割が明らかになってきた。例えば、再生芽の細胞の増殖と分化には FGF、hedgehog や canonical Wnt シグナルが必要であることが明らかになった。まだ不明な点も多いが、胚発生過程で用いられたシグナルが、タイミングや組織特異性に違いがあるものの再生過程で再び重要な働きを持つことが大筋で明らかになった。しかし、再生における器官再構築のメカニズムを理解するためには、個々の細胞がいつ、どのようなシグナルを受け、どのような行動をとるのかまで明らかにする必要がある。両生類を用いた実験系では大きな器官や組織レベルでの解析が豊富なのに対し、個々の細胞レベルでの解析においては、きわめて限定的な情報しかない。そこでこのギャップを埋め器官再生のメカニズムの全体像を解明するには、再生を制御するシグナル機構を詳細に理解することに加えて、細胞個々のレベルでの分裂、移動、細胞死の解析や、遺伝子発現解析が必要である。

2. 研究の目的

アフリカツメガエル幼生の尾部再生をモデルとして、これまでに尾部の主要な組織である脊髄、脊索、筋肉が、もとの組織に含まれている細胞の増殖、分化により再構築されること (Sugiura et al., 2004; Mochii et al., 2007)、尾部再生過程で FGF シグナルが脊索前駆細胞の増殖や分化に重要な働きを持つこと (Taniguchi et al., 2008)、hedgehog シグナルが筋肉や脊索の再生に重要であること、さらには Wnt-5a による non-canonical シグナルが基部末端方向への尾部の構築を誘導することを明らかにしてきた (Sugiura et al. 2009)。これらの研究をさらに進め、個々の細胞が各種シグナルに対してどのように反応し、行動するのかを明らかにしようとした。

3. 研究の方法

(1) 細胞標識法の検討

これまでにエレクトロポレーション法により、表皮細胞、脊索細胞、脊髄細胞、筋線維細胞の一部を GFP により標識することに成功している。さらに、長期間安定に標識するため、トランスジェニック法を用いる、あるいは、局所的に細胞を標識するため、蛍光色素等による直接標識を試みる。

(2) 細胞の単離と遺伝子発現解析。個々の細胞レベルでの遺伝子発現解析をおこなうために、各組織の細胞を単離し、1細胞あるいは少数の細胞から cDNA を単離する。これらの cDNA を用いて既存のマーカー遺伝子の発現を解析するとともに、細胞種特異的に発現する遺伝子を新たに単離する。また遺伝子発現パターンから細胞の分類、性質の推定をおこなう。

(3) 培養細胞を用いた解析。単離した細胞に対して、各種シグナルが具体的にどのような作用を持つのかを細胞レベルで解析するために、幼生尾部各組織から単離した細胞を培養し、分化させる実験系の確立をめざす。

4. 研究成果

(1) 蛍光色素を用いた傷表皮形成過程の観察

尾部切断後の表皮細胞の移動を追跡する目的で、幼生尾部表皮の表面細胞だけを標識する方法を検討した。その結果、Sulfo-NHS-LC biotin 試薬や、蛍光標識小麦胚芽レクチン (WGA) を用いることにより、表面細胞のみを標識することができた。これらの方法を用いて傷表皮形成過程を観察したところ、尾部切断後 3-6 時間で個々の表皮細胞が変形・移動し、約 12 時間で完全に傷口を被うことがわかった。また、これまで考えられていたような、表皮の基底層に位置する細胞が個々に移動するのではなく、むしろ表面細胞がシート状に移動することにより傷表皮が形成されるらしいことがわかった。

(2) 脊索細胞の単離と培養

幼生尾部を断片化し、ディスペーゼで処理した後、脊索のみを単離することに成功した。単離した脊索を、解離・培養したところ、大きな液胞を含む成熟した脊索細胞と、小さな未分化脊索細胞とが含まれていた。培養を継続することにより、未分化細胞内に液胞が形成され、それが大きくなり成熟する過程を連続的に単一細胞レベルで観察することに成功した。また、この成熟過程は hedgehog シグナルを必要とし、FGF により抑制されることもわかった。以上の現象は、体内で尾部が切断した後におきる一連の変化を再現していると考えられ、FGF と hedgehog の役割を一部具体的に明らかにすることができた。

(3) 脊索分化制御に関連する遺伝子の単離と発現解析

単離した純粋な脊索を材料として cDNA ライブラリーを作成し、ランダムに単離したクローンから、約 100 種類の遺伝子を選び出し、その再生過程および、培養脊索分化過程における発現を解析した。その結果、脊索で多く発現する遺伝子として、8 種類の遺伝子を新たに同定した。さらに、このうち 3 種類は脊索細胞の成熟 (液胞化) と密接に関連して発現上昇した。その一つ chloride intracellular channel protein - 5 (CLIC5) の液胞化における役割が強く示唆された。

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 8 件)

- ① Yoshii S, Yamaguchi M, Oogata Y, Tazaki A, Mochii M, Suzuki S, Kinoshita T. (2011) The Analysis of the Expression of a Novel Gene, *Xenopus Polka Dots*, which was Expressed in the Embryonic and Larval Epidermis during Early Development. *Zool. Sci.* (査読あり) 28(11):809-16. DOI: 10.2108/zsj.28.809
- ② Takechi M, Takeuchi M, Ota KG, Nishimura O, Mochii M, Itomi K, Adachi N, Takahashi M, Fujimoto S, Tarui H, Okabe M, Aizawa S and Kuratani S (2011) An overview of transcriptome profiles identified in hagfish, shark, and bichir: Current issues arising from some nonmodel vertebrate taxa. *J. Exp. Zool. Part B Mol. Dev. Evol.* (査読あり) 316(7):526-46. DOI: 10.1002/jez.b.21427
- ③ Kogo N, Tazaki A, Kashino Y, Morichika K, Orii H, Mochii M, Watanabe K. (2011) Germ-line mitochondria exhibit suppressed respiratory activity to support their accurate transmission to the next generation. *Dev Biol.* (査読あり) 349:462-469. DOI: 10.1016/j.ydbio.2010.11.021
- ④ Suzuki, K, Kashiwagi, K, Ujihara, M, Marukane, T, Tazaki, A, Watanabe, K, Mizuno, N, Ueda, Y, Kondoh, H, Kashiwagi, A and Mochii, M (2010) Characterization of a novel type I keratin gene and generation of transgenic lines with fluorescent reporter genes driven by its promoter/enhancer in *Xenopus laevis*. *Dev Dyn.* (査読あり) 239: 3172-3181. DOI: 10.1002/dvdy.22451
- ⑤ Wakabayashi, T, Kosaka, J, Mochii, M, Miki, Y, Mori, T, Takamori, Y and Yamada, H. (2010) C38, equivalent to BM88, is developmentally expressed in maturing retinal neurons and enhances neuronal maturation. *J. Neurochem.* (査読あり) 1112: 1235-1248. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2009.06536.x
- ⑥ Morichika, K, Kataoka, K, Terayama, K, Tazaki, A, Kinoshita, T, Watanabe, K and Mochii, M. (2010) Perturbation of Notch/Suppressor of Hairless pathway disturbs migration of primordial germ cells in *Xenopus* embryo. *Dev. Growth Differ.* (査読あり) 52: 235-244. DOI: 10.1111/j.1440-169X.2009.01164.x
- ⑦ Adameyko I, Lallemand F, Aquino JB, Pereira JA, Topilko P, Müller T, Fritz N, Beljajeva A, Mochii M, Liste I, Usoskin D, Suter U, Birchmeier C and Ernfors P (2009) Schwann cell precursors from nerve

innervation are a cellular origin of melanocytes in skin. *Cell* (査読あり) 139:366-379.

DOI: 10.1016/j.cell.2009.07.049

⑧ Sugiura, T, Tazaki, A, Ueno, N, Watanabe, K and Mochii, M (2009) *Xenopus Wnt-5a* induces an ectopic larval tail at injured site, suggesting a crucial role for noncanonical Wnt signal in tail regeneration. *Mech. Dev.* (査読あり) 126:56-67.

DOI: 10.1016/j.mod.2008.10.002

[学会発表] (計 17件)

① Shigehiro Yasukawa, Kaname Yoneda, Akira Tazaki, Kenji Watanabe, Makoto Mochii (2012) *Xenopus ES1* is expressed in the wound epidermis of regenerating tail and limb bud in tadpole. Joint Meeting of the 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologist & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology. (Kobe)

② 寺山耕平、片岡研介、森近恵祐、渡辺憲二、織井秀文、餅井真 (2011) アフリカツメガエル始原生殖細胞の移動に関する研究。日本動物学会 82 回大会 (旭川)

③ 餅井真 (2011) ゼノパス始原生殖細胞の運動制御機構。日本動物学会 82 回大会 (旭川)

④ Makoto Mochii, Kenji Watanabe (2011) Terminal differentiation of notochord cells isolated from *Xenopus* tadpole. 44th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists (Ginowan).

⑤ Kohei Terayama, Kensuke Kataoka, Keisuke Morichika, Hideo Orii, Kenji Watanabe, Makoto Mochii (2011) In vitro studies on migratory activity of *Xenopus* primordial cells. 44th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists (Ginowan).

⑥ Makoto Mochii, Kenji Watanabe (2011) In vitro study on terminal differentiation of notochord cells isolated from *Xenopus* tadpole. Joint Meeting of the German and Japanese Societies of Developmental Biologists. (Dresden)

⑦ 杉本 哲治, 日吉真照, 片岡 研介, 餅井真, 渡辺 憲二, 高宗 和史 (2010) 生殖隆起に入らなかった *Xenopus* 始原生殖細胞における Xtr の量的変化と形態変化。日本動物学会 81 回大会 (東京)

⑧ 寺山耕平、東野仁央、織井秀文、渡辺憲二、餅井真 (2010) *Xenopus* 始原生殖細胞の運動性は発生時期に依存して変化する。日本動物学会 81 回大会 (東京)

⑨ Kohei Terayama, Kensuke Kataoka, Keisuke Morichika, Hidefumi Orii, Kenji Watanabe, Makoto Mochii (2010) Developmental change of motility in Xenopus PGCs. 13th International Xenopus Conference (Lake Louise, Canada)

⑩ Makoto Mochii (2010) (oral) Developmental change of motility in Xenopus PGCs. 13th International Xenopus Conference (Lake Louise, Canada)

⑪ Shunsuke Yoneda, Kenji Watanabe, Makoto Mochii (2010) Fibroblast growth factor and hedgehog regulate growth and maturation of larval notochord cell in Xenopus. CDB symposium 2010 (Kobe)

⑫ 杉本 哲治, 片岡 研介, 餅井 真, 渡辺 憲二, 高宗 和史 (2009) 生殖隆起に入れなかった Xenopus 始原生殖細胞における Xtr タンパク質の消失と形態変化。日本動物学会 80 回大会 (静岡)

⑬ 田口彩華, 平林美紀, 餅井真, 渡辺憲二 (2009) アフリカツメガエルの初期原腸胚における生殖細胞質の再配置。日本動物学会 80 回大会 (静岡)

⑭ Kohei Terayama, Kensuke Kataoka, Keisuke Morichika, Kenji Watanabe, Hidefumi Orii, Makoto Mochii (2009) Molecular mechanism of primordial germ cell migration in Xenopus. 42nd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists (Niigata).

⑮ Shunsuke Yoshii, Masahiro Yamaguchi, Yuichiro Oogata, Akira Tazaki, Makoto Mochii, Shintaro Suzuki, Tsutomu Kinoshita (2009) Characterization of Xpod-expressing cells in the Xenopus larval epidermis. 42nd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists (Niigata).

⑯ Naomi Kogo, Akira Tazaki, Hidefumi Orii, Makoto Mochii, Kenji Watanabe (2009) Activity of mitochondria in germ plasm is regulated dramatically during oogenesis of Xenopus laevis. 42nd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists (Niigata).

⑰ Shunsuke Yoneda, Kenji Watanabe, Makoto Mochii (2009) In vivo and in vitro analysis of notochord cell differentiation of Xenopus larva. 42nd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists (Niigata).

[図書] (計 1 件)

① Makoto Mochii, Yuka Taniguchi (2009) Electroporation in the regenerating tail of the Xenopus tadpole. In Electroporation

and Sonoporation in Developmental Biology. (Ed. H. Nakamura), pp. 239-247. Springer, Tokyo.

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

餅井真 (MOCHII MAKOTO)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科
・准教授

研究者番号 : 90202358

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :