

## 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25年 5月20日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570208

研究課題名（和文） ヤマトヒメミミズ再生初期に幹細胞に発現する遺伝子 *grimp* の機能解析研究課題名（英文） Functional analysis of *grimp*, a gene involved in early regeneration of *Enchytraeus japonensis* (Enchytraeidae, Oligochaeta)

研究代表者

野呂 知加子 (NORO CHIKAKO)

日本大学・生産工学部・教授

研究者番号：80311356

研究成果の概要（和文）：

本研究は、碎片分離と再生による無性生殖を行うヤマトヒメミミズの、再生のキーとなる遺伝子 *grimp* の機能解析を目的とする。再生初期に中胚葉系再生幹細胞に発現する *grimp* 遺伝子を、大腸菌で発現誘導してタンパク質の精製を試みた。次に、*grimp*-GFP 融合ベクター構築を行い、マウス間葉系細胞株やヒト肝臓がん細胞株に導入したところ、融合タンパクの発現が確認できたが、分解されやすい性質が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

*grimp* gene plays an important role in early stage of regeneration in *Enchytraeus japonensis*. *grimp* mRNA is detected transiently from 3 to 12 h post amputation only in mesodermal stem cells called neoblasts and mesodermal lineage cells. In order to clarify the function and cellular localization of *grimp* protein, we took approaches for the production, purification and characterization of recombinant protein. We also studied the physical role of *grimp* by introducing *grimp*-GFP fusion gene into mammalian stem cells. The results suggested that the half-life of the *grimp*-GFP was relatively short, there could be a mechanism for selective degradation of *grimp* protein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：幹細胞、再生、遺伝子、タンパク質、ヤマトヒメミミズ

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) ヤマトヒメミミズについて

ヤマトヒメミミズは東北農業試験場で見つけた純国産の生物で、碎片分離と再生による無性生殖を行う環形動物である。体長は1 cm ほどで透明な体と体節構造をもつ。実

験室のシャーレ中の寒天上で、通常は摂氏18-25度で、オートミールを餌として飼育する。体節内の特定の位置が収縮して体が引きちぎられて数片の断片となり（碎片分離）、4-5日ほどで頭（脳）と肛門が前後に再生し、肛門前の増殖帯に新しい体節が付加されて

成長し、2週間で数倍の数に増殖することを繰り返す。このミミズの無性生殖子孫は皆同じゲノムを持ったクローンである。無性生殖は人為的に電気刺激により同調的に開始することができる。一方、個体密度のコントロールにより有性生殖も誘導でき（成熟から産卵・発生まで3週間程度）、2つのライフサイクルを使い分けた研究が可能となった

## (2) 分子レベルのアプローチ

研究代表者と連携研究者はこの13年間共同研究を続け、このユニークなヤマトヒメミミズを発生・再生の実験モデル動物として確立すべく、研究と技術開発、解析ツール等の整備を行ってきた。さらに、この研究系に分子生物学的アプローチを加え、これまでに遺伝子発現 (cDNA) ライブラリやゲノムライブラリを準備し、遺伝子発現部位を調べるための *in situ hybridization* や抗体染色も個体レベルでできるようになった。こうした技術を用いて、消化管各部位のマーカー遺伝子3種 (*EjTuba*, *mino*, *horu*) をクローニングし、これらを利用して成長時および再生時の全体調節メカニズムの解明を行った (Takeo et al., 2008 *Dev Dyn.* 237(5): 1284-1294)。

また、生殖幹細胞と再生幹細胞 (ネオプラスト) の形成について *piwi* 関連遺伝子 (Tadokoro et al., 2006 *Curr Biol.* 23, 1012-1017.) および *vasa* 関連遺伝子 (Sugio et al., 2008 *Gene Expr Patterns.* 8(4): 227-36.) をクローニングし、その発現を指標として解析を行った。有性化サイクルを利用して、遺伝子改変体作成などの発生工学的手法も適用可能となった。

## (3) 再生初期に発現する新規遺伝子 *grimp*

一方、研究代表者と連携研究者は、遺伝子機能を阻害する RNAi 法を導入し、再生初期に再生芽に発現する新規遺伝子 *grimp* の解析を行った (Takeo et al., *Int J Dev Biol.*, 2009)。*grimp* は N 端に細胞接着ドメインとして知られる RGDS 配列およびリン酸化部位を含む3つのリピート構造を持つタンパク質である。公共遺伝子データベース検索では、高いホモロジーを示す遺伝子は見つかっていないので、その構造から機能を予測することは困難である。碎片分離3時間後の傷口修復時から RNA の発現が高まり、6-12時間後にピークとなる。この遺伝子は再生幹細胞 (ネオプラスト) に発現していた。その RNA 発現を RNAi 法によって抑制すると再生が阻害されることから、再生のキーとなる遺伝子であると考えられる。さらに、この遺伝子に対する RNAi によって抑制される他の遺伝子を分離した。この遺伝子配列からもまた、機能予測は困難であった。これらの遺伝子について、タンパク質レベルで機能解析することにより、再生開始機構および再生幹細胞の実態について明らかにしたいと考えた。

## (4) これまでの研究成果

再生開始機序の解明と再生幹細胞の動態を調べるために、我々は成長中のヤマトヒメミミズ個体と碎片分離後6時間および12時間後の再生中の個体との間で cDNA subtraction library を作成し、約400クローンから、RT-PCR と *in situ hybridization* (ISH) により、再生初期に再生芽で発現する遺伝子を選択した。このうちの1つ *grimp* 遺伝子はデータベースサーチではホモロジーのある遺伝子が見つからない新規遺伝子であったが、5'側に RGDS (integrin 認識配列) および protein kinase C phosphorylation site を含む3つのリピート構造を持っていた。BrdU により増殖細胞を標識し、*grimp* の ISH と同時に調べたところ、その発現は碎片分離後3-12時間に、再生芽先端付近の増殖中のネオプラストおよびネオプラスト様中胚葉系細胞に見られることがわかった。また3-6時間後には傷口および再生芽だけでなく、体中の表皮下の中胚葉系細胞にその発現が認められた。表皮・筋肉・消化管には発現することはなかった。RNAi 法により *grimp* 遺伝子発現を低下させると、中胚葉の増殖および頭部再生の阻害が起こることを示した。従って *grimp* は再生初期過程に重要な分子であると考えられる (Takeo, Yoshida-Noro, Tochinai. 2010. *Int. J Dev. Biol.* 54, 151-160.)。さらに、*grimp* RNAi 個体において発現低下が起こる新規遺伝子を発見した。

## 2. 研究の目的

本研究は、碎片分離と再生による無性生殖を行うヤマトヒメミミズ *Enchytraeus japonensis* において、再生初期に再生芽先端付近に発現する新規遺伝子 *grimp* に着目して、タンパク質レベルでその機能を明らかにし、さらにこの遺伝子の影響下にある別の新規遺伝子との関係を調べることで、再生開始機構および再生幹細胞の実態について解明することを目的とする。*grimp* は N 端に細胞接着ドメインとして知られる RGDS 配列およびリン酸化部位を含む3つのリピート構造を持つ。*grimp* 遺伝子発現を再生が阻害されることから、再生のキーとなる遺伝子であると考えられる。

## 3. 研究の方法

### (1) *grimp* タンパク質の機能解析

これまでの研究成果から *grimp* 遺伝子発現低下により再生が阻害されることが明らかになっているが、さらに直接的に再生における役割を証明するために、タンパク質レベルの機能解析を行う。具体的には遺伝子から組換えタンパクを作成し、これを利用して抗体を作成する。これを用いてタンパクの同定 (プロセッシングの有無)、タンパクレベルの局在

(細胞の種類、細胞内局在)を示すと共に、タンパクレベルの阻害実験に用いる。一方、このタンパクは RGDS 配列を持つことから、細胞接着に関与する可能性がある。そこで、市販の RGDS 配列ペプチドを利用して、機能阻害実験を試みる。このタンパクと幹細胞増殖、および傷口修復との関連について調べる。

(2) *grimp* タンパク質と再生幹細胞系譜の関係解明

*grimp* 発現は増殖するネオブラストおよびネオブラスト様の中胚葉細胞にみられたが、これらの細胞は再生幹細胞と考えられている。また再生初期には体中の表皮下の中胚葉系細胞にも発現が見られた。再生幹細胞のマーカー *vasa* 遺伝子による ISH と *grimp* 抗体染色を組み合わせることで、*grimp* タンパク質とこれら再生幹細胞系譜との関係について調べる。

### (3) *grimp* 関連遺伝子の解析

新規遺伝子は、*grimp* の発現低下に伴って発現が低下することがわかっているが、その局在や機能は不明である。まず ISH によりその分布を調べ、さらに上記と同様に組換えタンパクから抗体を作成して、タンパクレベルの局在と機能についても調べる。

### (4) *grimp* タンパク質と相互作用するタンパクの同定

上記のように、*grimp* タンパク質は細胞接着様の配列を持っているので、そのレセプターとなるタンパクが存在する可能性がある。*grimp* タンパク質と結合するタンパクについて、遺伝子組換えの手法および抗体を用いて同定する。

### (5) *grimp* 関連遺伝子と *grimp* の関係解明

新規遺伝子の発現低下が、*grimp* タンパク質によって引き起こされるのかどうかについて、時間的空間的に調べ、カスケード解析を行う。

### (6) 他種における相同遺伝子の探索

これらの遺伝子について、ドメイン毎のホモロジーを調べるなど、哺乳類等他種にも近縁の遺伝子が存在するかどうか、どのような機能と関連するかについて、コンピュータ解析により予測する。

これらの研究により、*grimp* の再生開始機構および再生幹細胞における役割を解明する。

## 4. 研究成果

### (1) *grimp* タンパク質の機能解析

*grimp* のタンパク質としての機能を調べるために、*grimp* のコーディング領域を Halo タグ付きベクターに組み込み、大腸菌で発現誘導

したタンパク質の精製を試みたが、RNA までできてはいるものの、タンパク質生成の効率があまりよくなかった。一方、後述のように *grimp*-GFP 融合ベクターを、ほ乳類の間葉系細胞株 C3H10T1/2 に導入したところ、タンパク質が発現していることが、抗 GFP 抗体による western blotting によって確認できた。しかしこのタンパク質の半減期は短く、細胞内で分解されやすい性質を持つことが示唆された。従って、上記の大腸菌におけるタンパク質生成効率の低さも、この性質に起因する可能性がある。そこでさらに工夫し、*grimp* の N 端および C 端へ GFP を融合させたベクター構築を行った。この融合ベクターをヒト肝臓がん細胞 HepG2 株に導入したところ、融合タンパクの発現が確認できた。この融合タンパク質を、ヤマトヒメミズ再生芽およびマウス間葉系細胞株に導入し、増殖、分化、再生への影響について調べると共に、融合タンパク質の分解過程について検討している。

### (2) *grimp* タンパク質と再生幹細胞系譜の関係解明

*grimp* タンパク質と再生幹細胞系譜の関係を解明する準備として、BrdU パルスチェイス実験によりネオブラストの増殖と移動について調べ、再生幹細胞増殖とテロメラーゼ活性との相関を明らかにし、論文発表した(発表雑誌論文①)。ネオブラストは、成長中は分裂せず、静止状態にあるが、切断等の刺激が入ると、体中のネオブラストが DNA 合成を開始した。分裂したネオブラストは背側に移動し、やがて前後の切断面に移動して、再生芽の形成に寄与した。再生初期にはテロメラーゼの活性が高く、再生の終了に伴いその活性が低下すること、このタイミングとネオブラストおよびその子孫細胞増殖のタイミングがほぼ一致することが分かった。この研究により、再生幹細胞ネオブラストの系譜と動態が明らかになった。今後、*grimp* タンパク質発現とネオブラストとの関係について調べる予定である。

### (3) *grimp* 関連遺伝子の解析、および関連遺伝子と *grimp* の関係解明

*grimp* 遺伝子の発現低下に伴って発現が低下する遺伝子の解析を開始した。

### (4) 他種における相同遺伝子の探索

*grimp* 遺伝子の一部とホモロジーがある遺伝子が、無脊椎動物の EST として存在することをデータベース検索によって確認した。しかし、アノテーションはついていないので、機能予測はできなかった。

### (5) *grimp* タンパク質と相互作用するタンパクの同定、および他種における機能の検討

哺乳類間葉系幹細胞株 C3H10T1/2 に *grimp*-GFP 融合遺伝子を強制発現させ、細胞増殖および中胚葉系細胞分化誘導への影響について検討した。導入後、タンパク質が発現していることが、抗 GFP 抗体による western blotting によって確認できた。また、*grimp*-GFP 融合タンパク質の半減期が GFP 単体と比較して短いことがわかった。従って、このタンパク質は細胞内で分解されやすい性質を持つことが示唆された。融合タンパク導入により、特に増殖阻害や分化誘導等の効果は見られなかった。また間葉系幹細胞マーカー遺伝子 (CD90, CD105) および骨や脂肪の分化マーカー遺伝子 (Runx2, Osterix, BSP, OC, PPARgamma2, ADD1) の発現変化も検出されなかった。

次に *grimp* の N 端および C 端へ GFP を融合させたベクターをヒト肝臓がん細胞 HepG2 株に導入したところ、融合タンパクの発現が確認できた。この融合タンパク質を、ヤマトヒメミズ再生芽およびマウス間葉系細胞株に導入し、その機能について調べると共に、相互作用するタンパク質を、抗 GFP 抗体を用いて同定する。

#### 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 4 件)

① Sugio M, Yoshida-Noro C\*, Ozawa K, Tochinai S (2012) Stem Cells in Asexual Reproduction of *Enchytraeus japonensis* (Oligochaeta, Annelid) : Proliferation and Migration of Neoblasts (2012) *Develop. Growth, Differ.* 54(4): 439-450. (DGD 奨励賞受賞)

査読有

DOI: 10.1111/j.1440-169X.2012.01328.x.

② Shan L, Noritake S, Fujiwara M, Asano S, Yoshida-Noro C, Noro N, Yamashita K, Kawakami T. (2012) Sec14l3 is Specifically Expressed in Mouse Airway Ciliated Cells. *Inflammation.* 35(2):702-12. 査読有

DOI: 10.1007/s10753-011-9363-z

③ Saito K, Fukuda N, Matsumoto T, Iribe Y, Tsunemi A, Kazama T, Yoshida-Noro C, Hayashi N. (2010) Moderate low temperature preserves the stemness of neural stem cells and suppresses apoptosis of the cells via activation of the cold-inducible RNA binding Protein. *Brain Research.* 1358:20-9. 査読有

DOI: 10.1016/j.brainres.2010.08.048.

[学会発表] (計 19 件)

① 野呂知加子、伊藤 孝、加瀬榛香 (2012) ヤマトヒメミズ再生・生殖幹細胞系を利用

した環境バイオセンサーの開発 日本動物学会第 83 回大会 2012 年 9 月 15 日 大阪

② Chikako Yoshida-Noro, Gaku Sato, Shota Noguchi, Yoshikazu Mikami, Tomihisa Takahashi, Makoto Takeo, Shin Tochinai (2012) Protein analysis of *grimp*, a gene involved in early regeneration of *Enchytraeus japonensis* (Enchytraeidae, Oligochaete) Joint Meeting of JSDB 45th and JSCB 64th May 30, 2012 Kobe

③ 野口翔太、佐藤岳、三上剛和、武尾真、柄内新、野呂知加子 (2011) ヤマトヒメミズ再生初期の幹細胞増殖に必要な遺伝子 *grimp* のタンパク質機能解析 (Functional Analysis of *grimp* protein during regeneration of *Enchytraeus japonensis* (Enchytraeidae, Oligochaete) 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 13 日 横浜

④ 小澤要、佐藤歩美、柄内新、野呂知加子 (2011) ヤマトヒメミズ再生時におけるテロメラーゼ活性の変化 (Telomerase Activity during Regeneration of *E. japonensis*) 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 13 日 横浜

⑤ 伊藤 孝、村上果歩、田部井謙治、伊藤圭佑、野呂知加子 (2011) 土壌重金属環境をモニターする環境バイオセンサー・ヤマトヒメミズの開発 (Development of Eco-Bio Sensor *E. japonensis*: Monitoring of Heavy Metal in the Soil.) 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 13 日 横浜

⑥ Shota Noguchi, Makoto Takeo, Takashi Ito, Kaname Ozawa, Yuta Miura, Shin Tochinai, Chikako Yoshida-Noro (2011) Functional Analysis of *grimp* protein during regeneration of *Enchytraeus japonensis* (Enchytraeidae, Oligochaete) 44th Annual Meeting of JSDB May 20, 2011 Okinawa

⑦ 小宮山翔吾、松本太郎、加野浩一郎、野呂知加子 (2011) 脱分化脂肪細胞を細胞源とする血管再生医療 第 10 回日本再生医療学会 2011 年 3 月 1 日 東京

⑧ 海老原俊一、山元智衣、風間智彦、加野浩一郎、野呂知加子、松本太郎 (2010) 再生医療に向けた 3 次元組織構築法の開発 2～DFAT 細胞を用いた軟骨再生の基礎研究～ BMB2010 2010 年 12 月 8 日 神戸

⑨ 小宮山翔吾、佐藤泰之、山元智衣、風間智彦、加野浩一郎、松本太郎、野呂知加子 (2010) 再生医療に向けた 3 次元組織構築法の開発 1～DFAT 細胞を用いた血管組織形成～ BMB2010 2010 年 12 月 8 日 神戸

⑩ Yoshida-Noro C, Takeo M, Noguchi S, Tochinai S. (2010) *grimp*, a novel gene required for stem cell proliferation at an initial stage of regeneration in *Enchytraeus japonensis* (Enchytraeidae, Oligochaete). *Differentiation* 80,

Supplement 1, S45. (The 16th International Conference of the International Society of Differentiation, ISD2010. Nov.17 2010, Nara, Japan.)

⑪ Ozawa K, Tochinai S, \*Yoshida-Noro C. (2010) Epigenetic Analysis of Stem Cells in *E. japonensis*: Telomerase Activity during Regeneration Process. 43rd Annual Meeting of JSDB 43rd Annual Meeting of JSDB (日本発生生物学会第43回大会), 2010年6月22日 京都

[図書] (計 3 件)

①野呂知加子 クローン増殖するミミズを使って細胞再生のしくみに迫る (分担) ポスト3・11 変わる学問 気鋭大学人からの警鐘 執筆 (河合塾制作 朝日新聞出版 2012年3月16日発刊) 232 ページ

②野呂知加子 岩波生物学辞典 第5版 執筆者 (岩波書店 2192 ページ 2013年2月26日発刊)

[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  
研究者 URL

[http://www.amc.cit.nihon-u.ac.jp/staff/professor/index\\_noro.html](http://www.amc.cit.nihon-u.ac.jp/staff/professor/index_noro.html)

研究室 URL

[http://www.amc.cit.nihon-u.ac.jp/staff/laboratory/index\\_lab\\_noro.html](http://www.amc.cit.nihon-u.ac.jp/staff/laboratory/index_lab_noro.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野呂 知加子 (NORO CHIKAKO)  
日本大学・生産工学部・教授

研究者番号：80311356

(2) 研究分担者  
なし ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
栃内 新 (TOCHINAI SHIN)  
北海道大学・理学研究科・教授  
研究者番号：20111148