

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22570211

研究課題名(和文)棘皮動物をモデルとした再生機構の進化の解明

研究課題名(英文)Evolutionary analysis of regeneration using echinoderms

研究代表者

近藤 真理子(Kondo, Mariko)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70372414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：棘皮動物は強い再生能力を持つものが多いが、再生に関与する分子機構や未分化細胞の存在はほとんど明らかにされていない。本研究では主にウミシダ腕再生過程で発現する遺伝子を解析した。その結果、腕には未分化細胞が備わっていることが明らかになった。また、レチノイン酸合成経路の遺伝子やHox遺伝子などが再生組織の領域性へ関与することが示唆された。これらの発現は、動物における再生の共通性を示していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We are studying regeneration in the feather star, since echinoderms exhibit a strong capacity for regeneration, and feather stars are reported to regenerate most of its body parts. Though there have been morphological or histological studies on echinoderm regeneration, only few have dealt with the molecular basis of regeneration. To study the evolution of regeneration, such molecular approach is necessary. We have isolated several genes from the feather star, and analyzed the expression of these genes during regeneration to test their involvement. Our data showed that there are undifferentiated cells in the arm that may be recruited for regeneration, using stem cell marker genes. Expression of genes involved in specification of anterior-posterior (Hox genes) and distal-proximal (RA-related genes) were found in the regenerating arm, and these may specify the character of the regenerating tissue. These results indicate the presence of a conserved mechanism in animal regeneration.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：再生 棘皮動物

1. 研究開始当初の背景

動物の組織などが切除などで失われても元の形態が作られる再生については動物の進化に伴い進化してきたと考えられる。進化の過程でどのように再生が獲得されたかについては以前から議論されてきた (Sánchez Alvarado, 2000; Brockes et al., 2001)。再生機構が進化の過程で偶然に別々の系統で創出されたのではない限り、それぞれは異なっているはずであるが、実際は再生芽の形成など共通点が見られるため、再生は後生動物の原始的な特質であると考えられる。しかし、比較生物学的なアプローチはあまりなされていない。

2. 研究の目的

再生現象を総合的に理解するには進化的な観点から論じることが必要であると考えられる。そのためには多くの生物種を対象として再生に関わる分子機構を検討する比較生物学的アプローチが必要である。また、それによって進化の過程が解明されると期待できる。本研究では強い再生能力を持つ動物が含まれる棘皮動物をモデルとして比較解析する。本研究を通し、再生機能の共通性や相違点を明確にすることによって、再生の進化について解明することを目的とした。

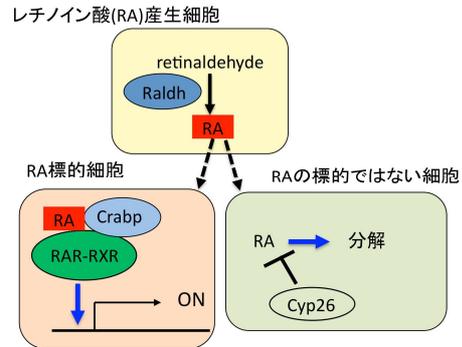
3. 研究の方法

ウミシダ腕再生過程で発現する再生関連遺伝子の単離・同定
棘皮動物は強い再生能力を持つものが多いが、再生に関与する分子機構や未分化細胞の存在はほとんど明らかにされていない。本研究では棘皮動物ウミユリ綱のニッポンウミシダ (*Oxycomanthus japonicus*) (下図) を用いた。ニッポンウミシダは 40 本ほどの腕を持ち、腕の特定の部位で自切する。その後、速やかに再生が開始する。その再生関連遺伝子の候補として、これまで様々な生物種で発生や再生に関わると知られている遺伝子を選び出し、クローニングを試み、解析した。



体軸形成、細胞増殖、神経分化などに関わる遺伝子の再生への関連の解析
再生過程と発生過程には、体組織の構築という共通点があることから、発生や分化に関連する遺伝子が再生にも関連していることが予想される。特に、どのような過程で失われた構造と同じものを再生するのかはたいへん興味深い。ウミシダの腕を再生する際には体軸の領域性を認識することが必要となるだろうと考え、2 種類の遺伝子について解析を行った。まず、これまで様々な生物種で発生におい

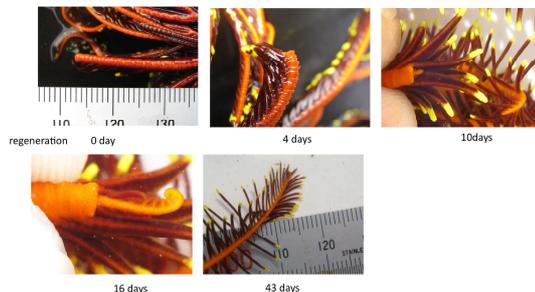
て重要な役割を持つレチノイン酸(RA)に着目し、ウミシダの再生関連遺伝子の候補として RA の合成と分解に関与する遺伝子を選んでクローニングし、解析した。



さらに、これまで再生の観点からはあまり解析されていない遺伝子である、体の領域性を決める遺伝子とされている Hox クラスターの遺伝子について、解析を行った。これらの遺伝子群は体軸の領域性への関与が知られているので、これらを通して種を超えた再生機構の保存性や再生腕の体軸についての知見が得られると考えた。また、神経発生に関わる遺伝子をマーカーとして使用すべく、解析を行った。

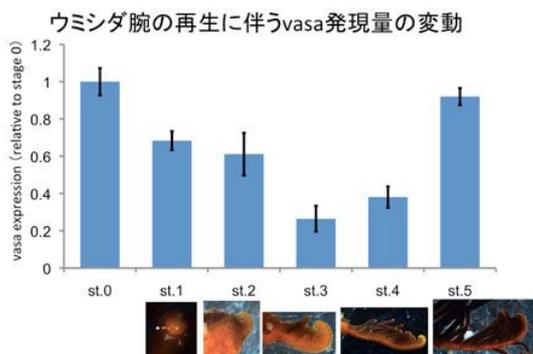
4. 研究成果

ウミシダ腕再生の観察と再生関連候補遺伝子の解析
ウミシダの腕の実験的におこさせ、その再生過程を観察した。飼育条件によって再生に要する時間は異なっており、夏季には短時間で、冬季には長時間かけて再生することを確認した。腕を自切させた後、創傷治癒は速やかに起こり、その後、2 日程度で小さい再生芽と呼ばれる再生を開始する際の組織の膨らみが生じる。再生が完了し、元の腕と同等に成長するには夏季で約 1 ヶ月半かかる (下図: ニッポンウミシダの腕の再生過程)。

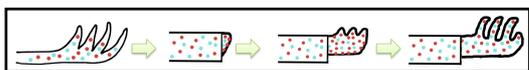


続いてウミシダの再生関連遺伝子の候補としてこれまで様々な生物種で発生や再生に関わると知られている遺伝子を選び出し、クローニングを試み、解析した。vasa 遺伝子は数多くの動物種から同定されており、生殖細胞などの未分化細胞での発現が知られているので、ウミシダでも腕の再生過程においてまず vasa の発現を詳細に解析し

た。
人為的にニッポンウミシダの腕の自切を誘発し、再生の過程を追って再生組織をサンプリングした。vasa は未処理のウミシダの腕でも発現していることがわかった。



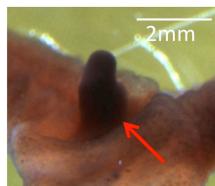
再生中の遺伝子発現量の変動を見ると、再生の進行にともなって発現量は次第に減少し、また増加に転じる発現パターンを示した(上図)。ウミシダは環境の悪化などのストレスで腕を自切するため、再生は頻繁に起こる現象である。vasa が再生に關与する未分化細胞の存在を示すとすると、ウミシ



ダは常に再生に備えて未分化細胞を腕に持ち、再生の初期には再生芽に集まった未分化細胞が増殖しつつも分化するが、ある程度組織が分化すると、次の再生に備えて未分化細胞が増えるのではないかと解釈できる(上図：再生過程の未分化細胞(青)と分化した細胞(赤)の存在様式の模式図)。

実際に再生組織の遺伝子発現の領域を調べようと WISH を行った。その結果、再生芽の組織にシグナルが観察され、再生芽および初期の再生組織に未分化細胞が集合していることが判明した(下図、赤矢印の部分が再生組織)。

また、同様に未分化細胞のマーカーとして piwi と oct の発現解析を行ったが、これらは腕の再生過程では発現量が少なく、これらの遺伝子を発現している細胞の関与は少ないことが予想された。

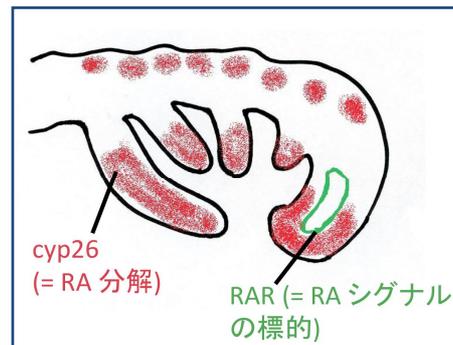


これらの結果から、ウミシダの再生能力の高さは未分化細胞が用意されていることがその要因であると考えられた。今後、比較生物学的な観点から再生とその進化を考える上では、未分化細胞に注目することが必要であることが示唆された。

再生におけるレチノイン酸の関与と再生組織の領域性の解析
レチノイン酸(RA)はこれまで、アフリカツ

メガエル幼生の肢の再生において、遠近軸に沿った濃度勾配があることが McEwan ら(2011)によって報告されている。そこで、ウミシダでも腕の遠近軸方向やその領域性をきめるのにはレチノイン酸が関わっているのではないかと考え、RA の合成と分解に關与する遺伝子を選んでクローニングし、解析した。

その結果、raldh (RA 合成に關与) の発現は再生組織では見られず、もし合成されるとしたら、再生の基部側の組織で作られて

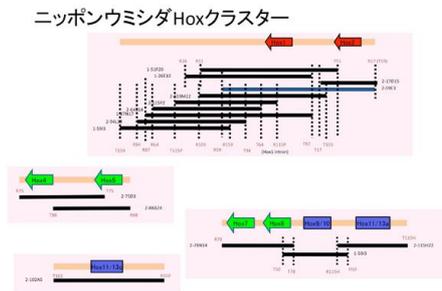


いると考えられる。また、cyp26 (RA 分解に關与) が再生組織の先端に発現することが明らかになった。つまり再生組織の先端では RA が分解され、腕の遠近軸に沿って濃度勾配ができあがっていると考えられる。一方、RAR (RA 受容体) は水管系の内腔の上皮に発現していた。すなわち、これらの細胞が RA の標的となっている可能性が示唆される。このような再生組織での RA の濃度勾配はアフリカツメガエルの再生肢と同様なので、動物門を超えたシグナルとしての役割の保存性が考えられる。

ニッポンウミシダ Hox クラスターの構造と再生過程での遺伝子発現
Hox 遺伝子はゲノム中にクラスターを形成していることやその並び順に一致して体の前後軸に沿った発現があることがマウスやショウジョウバエで知られているが、成体の前後軸が明確には存在しない棘皮動物においては五放射に伸びる体中心からの遠近軸の領域性を決めている可能性が考えられる。そこで、ウミシダでの解析を行った。

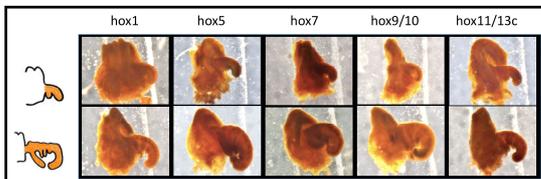
一般に Hox 遺伝子は 13 の遺伝子からなるファミリーで、これらの遺伝子はゲノム上での位置が番号順に並んでいるとされている。ニッポンウミシダの Hox 遺伝子は 9 つ単離された(鶴ヶ谷ら、未発表)ので、そのゲノム上での位置を決定するため、ゲノム BAC ライブラリーを用いてそれらの遺伝子に対応するクローンの単離を行った。それらの位置関係を確認し、さらに両隣にあるクローンを探ることで、クラスター全体の構造を明らかにしようと試みた。さらに、新たに作成したゲノム fosmid ライブラリーからもクローンを探した。これまで 4 つのコンティグが得られた(下図)

が、それぞれをつなぐことはできなかった。

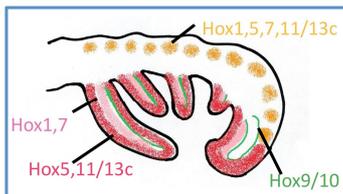


この解析は今後の課題として継続することとした。

Hox 遺伝子の再生過程での発現を解析した。その結果、すべての遺伝子ではないが、組織の先端、組織の内側、水管系の内腔などにはっきりした発現パターンが示された。



しかし、Hox はその番号順に並んで発現しているようには見えなかった。しかし、遺伝子間では発現部位が一致しているものや発現が重ならないものもあり、領域性の存在を示唆している。これらの発現組織の同



神経発生関連遺伝子の解析

ニッポンウミシダの再生過程ではまず神経のある部分に再生芽が作られるように見える。そこで、神経の再生が他の組織の再生にも関与している可能性や、神経の発生に関わる遺伝子が再生でも機能していることが考



えられる。そこで、再生中の神経を神経マーカー遺伝子である *elav* の発現を見ることで解析した。その結果、上図にあるように、再生の初期から新しい組織にマーカーの発現が見られた。このことは、神経由来の細胞が再生芽にも含まれることと、再生芽の中に神経の性質を持つ細胞が現れるという、二つの可能性があり、神経細胞の再生への関与を示唆している。

また、再生過程の比較のために、非常に強い再生能力を持つナマコを材料とすることにした。再生過程でも発生に関わる遺伝子の発

現があることが報告されていることから、中でも神経に着目し、神経発生に関わる遺伝子をクローニングした。具体的には *elav*、*musashi*、*soxB1* を cDNA よりクローニングした。これらは神経



幹細胞や神経へと分化していく細胞に発現が認められるとして、半索動物などで神経マーカーとして用いられるものである。期間中には発生過程での発現を確認した。ナマコは幼生から成体に変態する際に体の形だけでなく、神経組織の分布も変わり、左右相称から五放射相称になる。成体の神経系は幼生のものとは異なり、体の中にある「水腔」と呼ばれる組織から作り出されることが、*elav* および *musashi* の発現解析から明らかになった（上図：ナマコ幼生における神経マーカーの発現。左：水腔の位置（紫）。中：*elav* の発現。右：*musashi* の発現。）。このような神経前駆細胞のマーカーと考えられる遺伝子は今後、ナマコの再生過程の解析でも使うことができると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Kondo, M. and Akasaka, K.
Current Status of Echinoderm Genome Analysis - What Do We Know?
Current Genomics 2012; 13: 134-143.
(査読有)
DOI: 10.2174/138920212799860643

Kondo M, Akasaka K.
Regeneration in crinoids.
Dev Growth Differ 2010; 52:57-68 (査読有)
DOI: 10.1111/j.1440-169X.2009.01159.x

Sasakura Y, Inaba K, Satoh N, Kondo M, Akasaka K.
Ciona intestinalis and *Oxycomanthus japonicus*, representatives of marine invertebrates.
Exp Anim 2009; 58:459-69 (査読有)
DOI:10.1538/expanim.58.459

〔学会発表〕(計 10 件)

永井 晶子, 菊池 摩仁, 大森 紹仁, 赤坂 甲治, 近藤 真理子
マナマコにおける成体神経発生
第 36 回日本分子生物学会年会
(12/3-6/2013) 神戸

Mariko Kondo, Shusaku Ueda, Rikai Sawafuji, Toko Tsurugaya, Akihito

Omori, Koji Akasaka
Gene expression during regeneration of
an echinoderm, *Oxycomanthus japonicus*
第35回日本分子生物学会年会
(12/11-14/2012) 福岡

Kondo M., Ueda S., Sawafuji R,
Tsurugaya T., Omori A., Akasaka K.
Gene expression during regeneration of
a crinoid, *Oxycomanthus japonicus*
Developmental Biology of the Sea
Urchin XXI (Oct.24-27, 2012)
Woods Hole, MA 02543, USA

上田修作, 大森紹仁, 鶴ヶ谷柊子,
赤坂甲治, 近藤真理子
ニッポンウミシダ再生過程における遺伝
子発現の解析
日本動物学会第83回大会 (2012年9月
13-15日)大阪

Kondo M., Tsurugaya T., Ueda S.,
Sawafuji R., Omori A., Sumiyoshi N. and
Akasaka K. Genomic and regeneration
studies on a crinoid, *Oxycomanthus*
japonicus
14th International Echinoderm
Conference (August 20-24, 2012)
The Royal Academy of Sciences of
Belgium, Brussels, Belgium

上田修作, 大森紹仁, 澤藤りかい,
池田つばみ, 井上祐介, 赤坂甲治, 近藤
真理子
棘皮動物日本ウミシダ再生過程における
レチノイン酸遺伝子の発現
日本動物学会第82回大会 (2011年9月
21-23日)旭川

近藤真理子, 鶴ヶ谷柊子, 住吉範子,
生田哲朗, 大田竜也, 池尾一穂, 西駕秀
俊, 赤坂甲治
棘皮動物ニッポンウミシダの Hox クラス
ター構造の解析
第33回日本分子生物学会年会
(12/7-10/2010) 神戸

澤藤りかい, 直良悠子, 赤坂甲治,
近藤真理子
棘皮動物ニッポンウミシダの再生過程に
おける vasa 遺伝子の発現
日本動物学会第81回大会
(9/23-25/2010) 東京

近藤真理子, 鶴ヶ谷柊子, 住吉範子,
生田哲朗, 大田竜也, 池尾一穂, 西駕秀
俊, 赤坂甲治
棘皮動物ニッポンウミシダの Hox クラス
ター構造の解析
日本動物学会第81回大会

(9/23-25/2010) 東京

近藤真理子, 鶴ヶ谷柊子, 住吉範子,
生田哲朗, 大田竜也, 池尾一穂, 西駕秀
俊, 赤坂甲治
棘皮動物ニッポンウミシダの Hox クラス
ター構造の解析
第12回日本進化学会大会
(8/2-5/2010) 東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

近藤 真理子 (KONDO, Mariko)
東京大学・大学院理学系研究科・准教授
研究者番号: 70372414

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし