

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657155

研究課題名(和文) 分子遺伝学に基づいた再生研究を可能とする有尾両生類の新規動物実験システムの開発

研究課題名(英文) Development of new molecular genetic systems

研究代表者

竹内 隆 (TAKEUCHI, Takashi)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：70197268

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的であるイモリの分子遺伝学実験システムの確立に向けて、イベリアトゲイモリを導入、世代時間を短縮した。さらにバイオリソースとなる近交系を2系統樹立した。一方、イモリの遺伝子操作方法の整備に関しては、Cre-loxP組換え系が機能することを明らかにした。次いで、人工ヌクレアーゼ(TALEN)を使用したイモリの遺伝子ノックアウトを達成した。さらにCre-loxP組換えとTALEN法を組み合わせ、コンディショナルノックアウトイモリが作製できることを示した。このシステムは再生研究だけでなく、広く他分野への応用が期待できる。本研究の成果に関連して、雑誌論文12件、学会発表等29件を発表した。

研究成果の概要(英文)：An experimental model system for molecular genetics in newts is necessary to clarify the mechanisms of regeneration from the perspective of gene functions. We have introduced Iberian ribbed newt (*Pleurodeles waltl*) as the suitable model newts. In the results of our researches, we have been able to shorten the periods for sexual maturation, and are developing 2 inbred and various transgenic lines of *P. waltl* newts. We also demonstrated that Cre-loxP recombination system efficiently worked in the newts. In addition, we achieved targeted gene knockout in the newt using TALENs. These results show that conditional knockout newts would be available by combination of Cre-loxP recombination and TALENs. Our system would be very powerful for studying the molecular mechanisms of not only regeneration but also various researches. In relation to the result of this research, we published total 12 research and review papers, also our group had 29 conference presentations.

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：発生 再生 有尾両生類 分子遺伝学 トランスジェニック イベリアトゲイモリ 近交系 純系

### 1. 研究開始当初の背景

遺伝子の働きを個体レベルで研究するには、変異体の解析に加えてトランスジェニック (Tg) やノックアウト (KO) などの遺伝子操作を行う分子遺伝学的解析が有用である。しかし、四肢、水晶体、脳、心臓など多数の組織を再生するイモリでは、この分子遺伝学的解析が殆ど行われてこなかった。

そこで、我々は人工繁殖が容易なスペイン産のイベリアトゲイモリ (*Pleurodeles waltl*) を見だし、繁殖力、再生能など多くの点で、実験動物としての優位性を確認した。

このような背景のもと、この種を用いた分子遺伝学的解析が可能な再生研究システムの整備に着手した。

### 2. 研究の目的

イモリの強力な再生能力を分子遺伝学の手法で解析し、その機構を解明し得る実験システムの確立にむけて、次の3点を目的とした。

(1) 分子遺伝学を行う上で、その生物の世代時間 (性成熟に要する期間) の短縮が重要である。そこでイベリアトゲイモリにおける性成熟を目指した。

(2) 既に確立した Tg 技術を基に、両生類の再生研究で最初の Cre-loxP 組換え系、および遺伝子 KO 法の確立に挑戦する。これにより遺伝子機能の検定や細胞系譜の追跡をするような研究を可能にする。

(3) 遺伝学実験および交換移植実験には遺伝的均一性を持つが必要となる。そのためのイモリ系統の樹立を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 性成熟に要する期間の短縮

変態後の幼体 (受精後 2、3 ヶ月) に成熟を促すホルモンを単独、または組み合わせで投与することで、性成熟が促進されるか否かを検討した。同時に、更なる飼育条件の検討による期間短縮の可能性について調べた。

#### (2) Cre-loxP 組換え系と遺伝子 KO 法確立

モデルケースとして、我々が研究している心筋細胞を主な対象に研究を行った。心筋特異的に、組換え酵素である Cre を発現する Tg イモリと Cre 依存的に GFP を発現する Tg イモリを作成する。これらを交配して得た仔の心筋に GFP の発現が誘導されれば、Cre-loxP 系の有効性が確認できる。

次に、特定の DNA 配列を認識・切断する人工ヌクレアーゼ (TALEN) を利用して、標的遺伝子の KO が可能か否かを検討した。

さらに、Cre-loxP 組換え系と TALEN を組み合わせることで、遺伝子のコンディショナル KO 法の確立にも挑戦した。

#### トランスジェニック (Tg) イモリ

#### (3) 遺伝的均一性を持つイモリ系統の樹立

人工単為発生による純系の樹立に必要な、人工授精法の改良を行った。同時に姉妹間の交配による遺伝的背景の均一化も進めた。

### 4. 研究成果

#### (1) 性成熟に要する期間の短縮

分子遺伝学研究をより効率にすすめるためには、対象となる生物が性成熟までに要する時間が短いほどよい。特に器官再生の実験では、主に成体を使用する点からも早い成熟が要求される。

本研究の開始当初、平均的なオスの成熟期間は受精後約 8 ヶ月、メスでは受精後約 12 ヶ月であった。そこで我々は飼育条件の改良や性腺刺激ホルモン処理によるさらなる期間短縮を目指してきた。

その結果、幼体期の個体の飼育に際して、主に餌を与える条件と光周期を変えること、加えてヒト由来の性腺刺激ホルモン (ゴナドトロピン) の適切な投与により、大部分のオス個体を受精後 6 ヶ月、メスでは受精後 9 ヶ月で成熟させることが可能となった (表 1)。

表 1: 両生類の繁殖に関する性質

	アカハライモリ	イベリアトゲイモリ	ゼノバストロピカリス
成熟までの期間	3-5年	♂ 6ヶ月- ♀ 9ヶ月-	♂ 5ヶ月- ♀ 6ヶ月-
卵の大きさ	約 2 mm	1.2-1.5 mm	0.7-0.8 mm
1回の産卵数	5-20個 (数十個/年)	150-600個 (3000個/年)	1000-9000個

特にオス個体に関しては早いものでは 5 ヶ月で精子を得ることができる。

この結果は、現在イモリと同じ両生類の分子遺伝学モデルとして知られているゼノバストロピカリスと同等であるといえる (表 1)。これにより、イベリアトゲイモリを分子遺伝学のモデルとして使用するための基盤を整えることができた。しかし他の脊椎動物における分子遺伝学モデルであるマウスやゼブラフィッシュでは、性成熟に必要な期間は 2-3 ヶ月である。現在はそれらの動物並みの短縮を目指してさらなる条件の改良を進めている。

本項目に関する成果の一部は、Hayashi et al. (2013) に発表された。

#### (2) イモリの遺伝子操作法の確立

コンディショナルに遺伝子进行操作することは、時期・組織特異的な KO や細胞のラベリングに不可欠である。この手法確立の為、まず細胞特異的 Cre-loxP 組換え系を構築した。

この Cre リコンビナーゼと loxP 組換え配列を利用した遺伝子の発現誘導は、マウスやゼブラフィッシュを始めた様な生物で使用されている。本研究では、タモキシフェン存在時のみ機能するタイプの Cre を、心筋細胞特異的なプロモーターするコンストラクトと、Cre 依存的に GFP を発現するコンストラクトをもつダブル Tg イモリを作製した。このイモリは、タモキシフェン非存在下では GFP を発現することは無かったが、幼生期、変態後ともにタモキシフェンの投与により、心筋細胞における GFP の発現を誘導することに成功した (図 1)。また、適切なタモキ

シフェンの量も決定した。

現在はこのイモリ系統を用いた細胞の追跡実験を開始している。

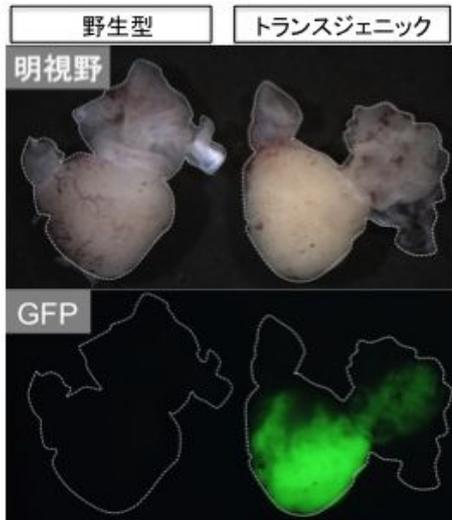


図1:タモキシフェンの投与により、Cre-loxP組換えを起こした結果、GFPを発現したTgイモリの心臓。左側は野生型のコントロール。

イモリの再生機構を遺伝子の機能を真に解明するためには遺伝子をノックアウト (KO) して、その影響を調べることが強力な手段となる。我々は広島大学の山本卓教授らと共同で、人工ヌクレアーゼ (TALEN) を使用したノックアウトイモリの作製の試みに世界で初めて成功した。図2には、体表や網膜色素上皮に存在するメラニン色素の合成に関わるチロシナーゼがノックアウトされて、アルビノ化したイモリを示す。

さらに我々は、コンディショナル KO の作製に必要な loxP サイトの挿入を試みた。その結果、TALEN によるチロシナーゼ遺伝子の切断部位に約 100 bp の loxP をコードする DNA 断片を挿入することに成功した。これを応用すれば、loxP サイトを目的とする遺伝子の上下流の2箇所に導入することで、CRE リコンビナーゼが働いたときに、loxP で挟まれた遺伝子が破壊されるというコンディショナル KO イモリが作製できる。

これらの成果は Hayashi et al. (2014) として報告した。現在は、再生を制御する候補遺伝子のコンディショナル KO イモリの作製が進行中である。



図2:チロシナーゼを標的とするTALENによりアルビノ化した個体(上)と同じ親から生まれたコントロール個体(下)。

(3) 遺伝的均一性を持つイモリ系統の樹立  
免疫学的拒絶がない純系動物は移植実験に有用である。また遺伝的均一性は、ゲノム情報の整備や誤差の少ない実験結果を得るためにも役立つ。

本研究では、姉妹間の交配に基づいた純系化を推進した。これと同時に、魚類で行われている人工単為発生法を応用して、2世代での純系樹立に挑戦してきた。

姉妹間の交配による遺伝的背景の均一化に関しては、研究成果(1)の項にあるとおり、性成熟に要する期間の短縮が順調に進行したこともあり、本研究期間中に、遺伝的均一性の1つの目安である近交系(姉妹間の交配を5世代以上経たもの)を2系統樹立することができた。

姉妹間交配に平行して行った人工単為発生については、その基礎となる人工授精の効率化について検討を行った。その結果、精子の取り扱い方法や質の良い卵を得る方法が確立された。これにより研究開始当初に比べ、人工授精の効率が飛躍的に向上した。

これらの成果を活用して、遺伝的背景が完全に均一化された純系系統の樹立に向け、引き続き人工単為発生の試みと、姉妹間交配を行

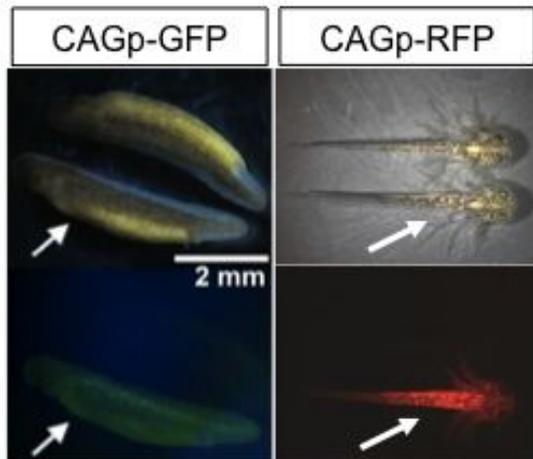


図3:本研究により確立されたTgイモリ系統の例についていく。

先述した2系統の近交系イモリに加えて、図3にある例の様に、多数のTgイモリを作製、それぞれから導入した遺伝子を安定的に発現する子孫を得て、系統化に成功するという成果を得た。

### 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12件)

Tane, S., Kubota, M., Okayama, H., Ikenishi, A., Yoshitome, S., Iwamoto, N., Satoh, Y., Kusakabe, A., Ogawa, S., Kanai, A., Molkenin, J. D.,

Nakamura, K., Ohbayashi, T., and Takeuchi, T. (2014) Repression of *cyclin D1* expression is necessary for the maintenance of cell cycle exit in adult mammalian cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.*, in press. 査読有り DOI:10.1074/jbc.M113.541953

Takeuchi, T. (2014) Regulation of cardiomyocyte proliferation during development and regeneration. *Dev. Growth Differ.*, in press. 査読有り DOI:10.1111/dgd.12134

Tane, S., Ikenishi, A., Okayama, H., Iwamoto, N., Nakayama, I. K., and Takeuchi, T. (2014) CDK inhibitors, p21<sup>Cip1</sup> and p27<sup>Kip1</sup>, participate in cell cycle exit of mammalian cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 443, 1105-1109. 査読有り (ア) DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.12.109

Hayashi, T\*, Sakamoto, K., Sakuma, T., Yokotani, N., Inoue, T., Kawaguchi, E., Agata, K., Yamamoto, T., and Takeuchi, T. (2014) Transcription activator-like effector nucleases efficiently disrupt the target gene in Iberian ribbed newts (*Pleurodeles waltl*), an experimental model animal for regeneration. *Dev. Growth Differ.*, 56, 115-121. 査読有り DOI: 10.1111/dgd.12103.

Inagawa, M., Nakajima, K., Makino, T., Ogawa, S., Kojima, M., Ito, S., Ikenishi, A., Hayashi, T., Schwartz, R. J., Nakamura, K., Obayashi, T., Tachibana, M., Shinkai, Y., Maeda, K., Miyagawa-Tomita, S., and Takeuchi, T. (2013) Histone H3 Lysine 9 methyltransferases, G9a and GLP are essential for cardiac morphogenesis. *Mech. Dev.* 130, 519-531. 査読有り DOI: 10.1016/j.mod.2013.07.002.

Hayashi, T., Yokotani, N., Tane, S., Matsumoto, A., Myouga, A., Okamoto, M., and Takeuchi, T. (2013) Molecular genetic system for regenerative studies using newts. *Dev. Growth Differ.*, 55, 229-236. 査読有り DOI: 10.1111/dgd.12019.

Ikenishi, A., Okayama, H., Iwamoto, N., Yoshitome, S., Tane, S., Nakamura, K., Obayashi, T., Hayashi, T., and Takeuchi, T. (2012) Cell cycle regulation in mouse heart during embryonic and postnatal stages. *Dev. Growth Differ.*, 54, 731-738. 査読有り DOI:10.1111/j.1440-169X.2012.01373.x.

Takahashi, A., Imai, Y., Yamakoshi,

K., Kuninaka, S., Ohtani, N., Yoshimoto, S., Hori, S., Tachibana, M., Anderton, E., Takeuchi, T., Shinkai, Y., Peters, G., Saya, H., and Hara, E. (2012) DNA damage signaling triggers degradation of histone methyltransferases through APC/CCdh1 in senescent cells. *Mol. Cell*, 45, 123-131. 査読有り DOI: 10.1016/j.molcel.2011.10.018.

Munnamalai, V., Hayashi, T., Bermingham-McDonogh, O. (2012) Notch prosensory effects in the Mammalian cochlea are partially mediated by Fgf20. *J. Neurosci.*, 12, 12876-12884. 査読あり DOI:10.1523/JNEUROSCI.2250-12.2012.

林 利憲、竹内 隆 (2014) 再生研究の革命戦士～イベリアトゲイモリの奮闘～ 細胞工学、33, 203-207. 査読無し DOI:無し

竹内 隆、林 利憲 (2014) 種間による自律的な心臓再生能力の違いは何によって決まるのか? 実験医学、32、29-35. 査読無し DOI:無し

竹内 隆、池西 愛子、岡山 仁美、岩本 典子 (2013) 発生過程から成体にかけての心筋細胞の増殖パターンはどのように作られ、どのような意義があるのか? 実験医学、31、205-211. 査読無し DOI:無し

[学会発表](計29件)

Takeuchi, T., Tane, S., Okayama, H., Ikenishi, A., H., Matsumoto, A., Myouga, A., Hayashi, T. Molecular mechanisms of cell proliferation in cardiomyocytes during cardiac development and regeneration. CDB Symposium 2014, 招待講演、2014年3月10-12日 RIKEN CDB 神戸市

Hayashi, T., Yokotani, N., Matsumoto, A., Myouga, A., Sakamoto, K., Inoue, T., Kawaguchi, E., Agata, K., Sakuma, T., Yamamoto, T., Takeuchi, T. Molecular genetic system for regenerative studies using newts Iberian Ribbed Newts (*Pleurodeles waltl*). CDB Symposium 2014, 2014年3月10-12日 RIKEN CDB、神戸市

Myouga, A., Yokotani, N., Takeuchi, T., Hayashi, T. Lineage tracing analysis of cardiomyocytes in the newt cardiac regeneration by tamoxifen-inducible Cre-loxP system. CDB Symposium 2014, 2014年3月10-12日 RIKEN CDB、神戸市

林 利憲、茗荷 あゆみ、横谷 直樹、竹内 隆 イモリの心臓再生における心筋細胞の増殖と、再生心筋組織に対する寄与 日本再生医療学会 2014年3月4-6日 国立京都国際会館 京都市

竹内 隆 心筋細胞の増殖制御と心臓再生 シンポジウム 幹細胞の増殖・分化と再生創薬、招待講演、2014年2月21日、米子コンベンションセンター 米子 市

茗荷 あゆみ、横谷 直樹、竹内 隆、林 利憲 イモリの心臓再生過程における細胞系譜の追跡と再生心筋に対する寄与の解明 日本分子生物学会 2013年12月3-6日 神戸国際会議場 神戸市

岡山 仁美、田根 将志、池西 愛子、竹内 隆 マウス心筋細胞のM期阻害機構はいつ獲得されるのか？日本分子生物学会 2013年12月3-6日 神戸国際会議場 神戸市

池西 愛子、田根 将志、岡山 仁美、竹内 隆 哺乳類心筋細胞のM期進行阻害機構は心傷害によって解除されるか？日本分子生物学会 2013年12月3-6日 神戸国際会議場 神戸市

竹内 隆 心筋細胞の増殖制御と心臓再生 西日本心臓血管発生研究会 特別講演、2013年10月26日、広島大学、広島市

林 利憲、坂本興亮、佐久間哲史、横谷直樹、井上武、川口恵里、阿形清和、山本卓、竹内隆 TALENによるイモリのゲノム編集の可能性と、再生研究への展開 ゲノム編集研究会 2013年10月26-27日、広島大学、東広島市

林 利憲、茗荷 あゆみ、横谷 直樹、佐久間 哲史、山本 卓、竹内 隆 遺伝子操作、ゲノム編集技術を用いたイモリ再生研究の展開 日本動物学会招待講演 2013年9月26-28日 岡山大学 岡山市

Takeuchi, T., Tane, S., Okayama, Ikenishi, A., Yokotani, N., Matsumoto, A., Myouga, A., Hayashi, T. Molecular mechanisms of cell proliferation in cardiomyocytes during cardiac development and regeneration. 日本発生生物学会 招待講演、2013年5月28-31日 くにびきメッセ 松江市

Myouga, A., Yokotani, N., Takeuchi, T., Hayashi, T. Lineage tracing analysis of cardiomyocytes in the newt cardiac regeneration by tamoxifen-inducible Cre-loxP system. 日本発生生物学会、2013年5月28-31日 くにびきメッセ 松江市

Yokotani, N., Inoue, T., Kawaguchi, E., Agata, K., Takeuchi, T., Hayashi, T. What molecule triggers

re-proliferation of cardiomyocytes during newt heart regeneration? 日本発生生物学会、2013年5月28-31日 くにびきメッセ 松江市

Hayashi, T., Yokotani, N., Matsumoto, A., Myouga, A., Okamoto, M., Takeuchi, T. Molecular genetic system for regenerative studies using newt. 日本発生生物学会、2013年5月28-31日 くにびきメッセ 松江市

竹内隆、田根将志、横谷直樹、岡山仁美、池西愛子、松本晃、茗荷あゆみ、林利憲なぜ、哺乳類は心臓を再生できず、イモリはできるのか？ 日本再生医療学会招待講演 2013年3月21-23日 パシフィコ横浜 横浜市

林利憲、横谷直樹、松本晃、茗荷あゆみ、川口恵理、井上武、阿形清和、竹内隆 両生類のイモリを用いた心臓再生機構の解明 日本再生医療学会 2013年3月21-23日 パシフィコ横浜 横浜市

Takeuchi, T., Tane, S., Ikenishi, A., Okayama, H., Yokotani, N., Matsumoto, A., Hayashi, T. Molecular mechanisms of cell cycle arrest in cardiomyocytes during cardiac development and regeneration. 日本分子生物学会 指定演者 2012年12月11-14日 福岡国際会議場 福岡市

Tane, S., Yoshitome, Satoh, Y., Iwamoto, N., Okayama, H., Ikenishi, A., Hayashi, T., Takeuchi, T. How do adult mammalian cardiomyocytes maintain the proliferation arrest? 日本分子生物学会 2012年12月11-14日 福岡国際会議場 福岡市

Ikenishi, Iwamoto, N., Tane, S., Okayama, H., Satoh, Y., Hayashi, T., Takeuchi, T. How does cell cycle of mouse cardiomyocytes arrest?: analysis of cell cycle regulator 日本分子生物学会 2012年12月11-14日 福岡国際会議場 福岡市

21 Okayama, H., Tane, S., Iwamoto, N., Ikenishi, A., Satoh, Y., Hayashi, T., Takeuchi, T. How does cell cycle of mouse cardiomyocytes arrest?: analysis of cell cycle pattern. 日本分子生物学会 2012年12月11-14日 福岡国際会議場 福岡市

22 Hayashi, T., Yokotani, N., Tane, S., Matsumoto, A., Myouga, A., Takeuchi, T. Molecular genetic system for regenerative studies using newt. 日本分子生物学会 2012年12月11-14日 福岡国際会議場 福岡市

23 Yokotani, N., Matsumoto, A., Hayashi, T., Inoue, T., Shibata, N.,

- Kawaguchi, E., Agata, K., Takeuchi, T. What molecule triggers re-proliferation of cardiomyocytes during newt heart regeneration? 日本分子生物学会 2012年12月11-14日 福岡国際会議場 福岡市
- 24 竹内隆、田根将志、岡山仁美、池西愛子、岩本典子、横谷直樹、松本晃、林利憲 心筋細胞の増殖制御機構と心臓再生: マウスとイモリとを比較する 日本動物学会 招待講演 2012年9月13-15日 大阪大学 豊中市
- 25 林利憲、松本晃、横谷直樹、川口恵理、西村 理、井上武、阿形清和、竹内隆 イモリ心臓再生における心筋細胞増殖の時空間パターンの解明 日本動物学会 2012年9月13-15日 大阪大学 豊中市
- 26 竹内隆 心筋細胞の増殖制御機構と心臓再生: なぜ、イモリは心臓再生が可能で哺乳類は不可能なのか? 分子病理学研究会 2012年7月22日 恵那峡グランドホテル 恵那市
- 27 Tane, S., Yoshitome, Satoh, Y., Iwamoto, N., Okayama, H., Ikenishi, A., Hayashi, T., Takeuchi, T. How do adult mammalian cardiomyocytes maintain the proliferation arrest? 日本発生生物学会、細胞生物学会合同大会 2012年5月28-31日 神戸国際会議場 神戸市
- 28 Hayashi, T., Yokotani, N., Matsumoto, A., Tane, S., Takeuchi, T. Development of the model system for molecular genetics for the regenerative studies in urodeles. 日本発生生物学会、細胞生物学会合同大会 2012年5月28-31日 神戸国際会議場 神戸市
- 29 Matsumoto, A., Hayashi, T., Yokotani, N., Kawaguchi, E., Nishimura, O., Agata, K., Takeuchi, T. Analysis of the expression patterns of Cell cycle regulator genes during newt cardiac regeneration. 日本発生生物学会、細胞生物学会合同大会 2012年5月28-31日 神戸国際会議場 神戸市

〔図書〕(計1件)

林利憲、坂根 祐人、竹内隆、鈴木 賢一 (2014) 両生類におけるTALENを用いた遺伝子改変 実験医学別冊 今すぐ始めるゲノム編集(山本卓編集) 羊土社、pp 180-188. 査読無し DOI:無し

〔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

<http://toridaimedseitai.web.fc2.com/index.html>

<http://www.med.tottori-u.ac.jp/biosign/5982.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 隆 (TAKEUCHI, Takashi)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号: 70197268

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

林 利憲 (HAYASHI Toshinori)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号: 60580925