

再生能力を規定する遺伝子群の網羅的解析

●田村 宏治

東北大学・大学院生命科学研究所

〈研究の目的と進め方〉

器官再生能力を規定する分子メカニズムに関する情報を得るために、器官再生が可能な動物(アフリカツメガエル)のゲノム情報を利用して四肢再生に関わる遺伝子群の大規模な解析を行うことにより、再生できない動物との比較を行う基盤をつくる。

両生類の四肢再生過程は3つの素過程に分けることができる。アフリカツメガエル成体の四肢再生は再生の初期段階は正常に行われるが後期段階であるパターン形成および組織分化が正常には行われない。このような現象を利用して

- 1.パターン形成および筋分化に関わる遺伝子の発現および機能解析を網羅的に行うことにより、四肢再生におけるパターン形成および組織分化の分子メカニズムを明らかにする
- 2.再生初期段階に特異的に発現する遺伝子の探索を網羅的に行うことにより、四肢再生を引き起こす分子メカニズムを明らかにする

この2つの方法を具体的な進め方として、アフリカツメガエル四肢再生における再生能力を規定する分子メカニズムを網羅的に記述する。

〈研究開始時の研究計画〉

①パターン形成、筋分化に関わる遺伝子の発現解析

前後軸形成に関してはshhシグナリングカスケードに関わるdHAND、shh、Ptc1、Ptc2、Gli1、Gli3、Hoxd13、基部先端部軸形成に関してはHoxa13、Hoxa11、Raldh2、Cyp26b、Meis2、筋分化に関してはMyoD、Myf5、Mrf4、HGF、cMet、Pax3、Pax7、これらの遺伝子発現の有無・消長を再生過程全体にわたって詳細に調べる。方法にはRT-PCR法とin situ hybridization法を用いる。これらにより、それぞれの過程が再生時にどのように進んでいるか、どのような不全があるかに関する大規模な情報を得る。

②機能不全分子の機能獲得実験

①で得られた情報を元に、それらのいくつかをアフリカツメガエルの再生芽に導入することにより、再生の向上を目指す。方法としては、肢芽および再生芽特異的なプロモーターを利用したトランスジェニックガエルの作成と、エレクトロポレーション法による導入を行う。

③再生芽形成初期段階に働く分子の網羅的獲得

再生芽形成の初期段階で働き、再生のinitiationに関わると考えられる因子の探索を行う。再生開始(切断後)4日目の再生芽、創傷治癒4日目の傷口、および除神経した再生芽を用い、再生芽に特異的に発現する遺伝子を探索する。具体的にはordered differential display法を応用した、HiCEP法を用いる。今年度はできるだけ多くの候補遺伝子を獲得することを目指し、その中から数多くの機能分子候補を絞り出す。

〈研究期間の成果〉

まず、研究計画①に関しては、前述した全ての遺伝子

発現解析を終了した。さまざまな知見が得られた中、とくに筋分化に関する解析結果をまとめ、論文1.として発表した。残りの解析に関しては、他の機能解析などと合わせて論文作成中である。特に軸形成に関する遺伝子発現は非常に興味深く、アフリカツメガエルの四肢再生の不全点が分子レベルで明らかになりつつある。また②に関して、エレクトロポレーション法を用いた遺伝子導入システムの構築に成功した。これ以外にも、高効率トランスジェニック法を用いた遺伝子導入システムも構築中である。③に関しては、アフリカツメガエルの四肢再生過程の初期過程を詳細に解析し、その神経依存性の分子メカニズムの一端を明らかにして論文2.として発表するとともに、初期過程に機能する遺伝子の網羅的獲得の基盤を築いた。とくに神経依存性に関してはそれに深く関与するであろうTbx5/Prx1遺伝子の発現解析を詳細に行い、神経依存性を示す時期・事象について多くの知見を得ることに成功した。この成果を元に、HiCEP法を用いた半網羅的遺伝子獲得を進め、1,500以上の中から現在までに数十個の候補遺伝子を獲得している。さらにそれらの候補遺伝子に関してひとつずつリアルタイムRT-PCR法を用いて発現差を同定し、正確な候補遺伝子を絞り込んでいる。すでにFrzbやHes related geneなど、興味深い遺伝子が単離されてきている。現在、HiCEPを継続中であり、得られた遺伝子に関しては発現解析などを進めている。

〈国内外での成果の位置づけ〉

もともと非常に独創的な視点に基いて計画されているため特異な位置づけとなっているが、論文発表後にこれらの研究を元にしたReview寄稿の依頼も来ており、国内外で評価の高い成果がまとまってきていると考えている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

遺伝子導入技術の開発確立に時間を要した。トランスジェニック法による遺伝子導入は、成体にまで導入体を維持するのが非常に困難で効率が低いこと、エレクトロポレーション法による成体間充織組織への遺伝子導入の前例がほとんどなかったこと、などが理由である。しかし、長い努力の甲斐あって機能解析に堪え得る遺伝子導入法が確立できつつある。

〈今後の課題〉

HiCEPで得られた遺伝子の機能解析等が完了しておらずこれからの最大の課題であると考えられる。また、さまざまに発現する遺伝子群の相互関係に関して不明な点も多く、また細胞の脱分化や形態形成などの挙動と遺伝子発現との関係に関して不明な点が多い。今後はこれらの課題をさらに網羅的に示すことで、再生初期過程の分子メカニズムを明らかにしていきたい。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. 0602031355

Satoh, A., Ide, H., and Tamura, K. (2005). Muscle formation in regenerating *Xenopus* froglet limb. *Developmental Dynamics* 233, 337-346.

2. 0602031349

Suzuki, M., Satoh, A., Ide, H., and Tamura, K. (2005). Nerve-dependent and -independent events in blastema formation during *Xenopus* froglet limb regeneration. *Developmental Biology* 286, 361-375.