

## 脊椎動物の器官再生能力の違いを規定するゲノム配列と構造

●田村 宏治 ◆横山 仁  
東北大学大学院生命科学研究所

### <研究の目的と進め方>

“動物種間の再生能力の差を規定するゲノム構造配列”をいくつかの方法を用いて記載し、ポストゲノムのひとつの新しい展開としてゲノム構造の機能面の多様性を比較解析することに着想した。本研究では、再生時における形態形成能力の差とゲノムDNAのエピジェネティック制御の度合いとの関係を様々な解析により検討し、構造としてのゲノムの機能と再生能力との関係を明らかにする。

#### 1. Prx1 再生エンハンサーの比較ゲノム解析

本項目の目的は、Prx1 遺伝子の上流領域にある高度に保存された領域の特性を抽出し、再生過程に Prx1 を再発現させるために必要な領域の同定と、その部分の種間比較をする。

#### 2. ゲノム構造と形態形成能の相関関係

本項目の目的は、ゲノム構造のエピジェネティックな制御が、再生時の形態形成遺伝子の発現にどのような影響を及ぼしているかを、比較ゲノムの観点から調べることである。

### <2008 年度の研究の当初計画>

#### 1. Prx1 再生エンハンサーの比較ゲノム解析

まず、マウス・ヒト・ニワトリ・カエルから本領域をクローニング・トランスジェニックカエルの作成により、再生過程での発現状態を比較する。肢芽間充細胞の培養系を確立し、それぞれのレポーターコンストラクトの導入により活性を調べ、また deletion コンストラクトを作成し、Prx1 の再生特異的発現を制御するエレメントを同定する。さらに、マウス・ヒト Prx1 四肢エンハンサーとカエル Prx1 四肢エンハンサーの性質の再生過程における発現に対する機能差を明らかにし、エンハンサー内の重要な配列の同定とトランス因子の同定を目指して解析を進める。また、比較ゲノムの観点から、肺魚・ゼブラフィッシュ・トラザメ・ヤツメウナギの各動物から Prx1 四肢エンハンサー領域を単離し、この中の再生に関わるエレメントの進化と多様性について詳細な解析を展開する。

#### 2. ゲノム構造と形態形成能の相関関係

本年度は、Shh 遺伝子の肢芽特異的発現エンハンサー配列である MFCS1 のカエルおよび有尾両生類における DNA メチル化解析を、臓器ごとに行い、Shh の肢芽エンハンサーが活性化しない臓器におけるゲノム構造を調べる。MFCS1 のゲノムメチル化の状態と MFCS1 の機能との関係をさらに直接的に調べるために次の実験を行う。

ひとつは、5アザシチジン添加による脱メチル化の誘導による MFCS1 の活性の変化を in vivo/in vitro 両方の系を用いて調べる。もうひとつは、MFCS1 配列のレポーターコンストラクトを人工的にメチル化させて細胞に導入してその活性を調べる方法により、MFCS1 配列のメチル化状態と Shh 遺伝子の発現

との直接的な因果関係を調べる。同様の解析は、ヒト・マウス・ニワトリ・カエル・ゼブラフィッシュの配列に対しても行い、それぞれのメチル化の状態と機能との関係を明らかにする。

### <2008 年度の成果>

#### 1. Prx1 再生エンハンサーの比較ゲノム解析

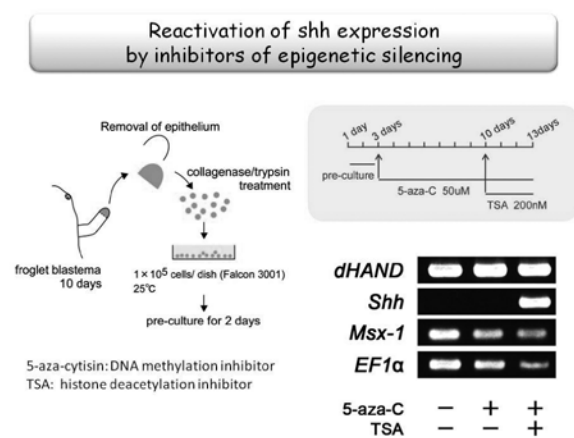
マウス Prx1 四肢エンハンサーが、両生類の創傷治癒過程においてドライブすることを発見した。当初、四肢の再生過程と四肢に創傷を負わせた治癒過程でこのエンハンサーが活性を持つことを見出していたが、さらに背中での創傷治癒過程においてもこのエンハンサーが有効であることがわかった。このことは、Prx1 再生エンハンサーが、単に四肢幹細胞において活性化されるのではなく、広く再生間充細胞において活性化されることを示唆する。実際、両生類の皮膚再生において endogenous な Prx1 遺伝子の発現を定量 PCR によって確認しており、この遺伝子が皮膚再生において重要な役割をもつ可能性が考えられる。哺乳類においては Prx1 がテネシンの活性化を通じて創傷治癒に関わる可能性が示唆されており、哺乳類と両生類の再生過程を直接的に比較できる突破口になることが期待できる。そこで、Prx1 四肢エンハンサーに  $\beta$  Gal をレポーターとしたトランスジェニックマウスを作成した（計画班員・城石俊彦先生との共同研究）。創傷治癒時にマウスにおいてもこのエンハンサーが有効であるかを現在解析中である。またこのエンハンサーの有効性を、他の動物の器官再生過程で解析するために、ゼブラフィッシュを用いて同様のトランスジェニック動物を作成した（計画班員・川上浩一先生との共同研究）。興味深いことにマウス Prx1 エンハンサーは、ゼブラフィッシュの胸鰭発生過程においても有効であることがわかった。現在、鰭再生過程に関して解析を進めている。

この他、比較ゲノムの観点から再生能力を比較解析する新しい実験動物システムとして爬虫類（有鱗類）のコロニーの確立を行った。有鱗類は尾を不完全再生することが知られるが、これをモデル動物化して実験されたことはこれまでにない。Prx1 エンハンサーを足がかりに爬虫類における四肢再生能力についても解析を行うため、単一ペアから5世代分約300匹にまでコロニーを拡大した。発生段階表を作成し論文として発表した他、発生・再生研究のモデル動物化の基礎研究として、遺伝子発現解析系を確立した。

#### 2. ゲノム構造と形態形成能の相関関係

5アザシチジン添加による脱メチル化の誘導による MFCS1 の活性の変化を in vivo/in vitro 両方の系を用いて調べた。in vivo の系では動物飼育が不可能であることが判明したため in vitro 細胞培養系を用いることとし、ツメガエル成体四肢再生芽細胞初代培養系を用いた圧政システムを開発した。この実験系を用いて、ゲノム構造に影響を与える薬剤処理と Shh 遺伝子

発現との関係を解析した。当初、脱メチル化剤の単独投与では Shh 遺伝子の発現を見出すことができなかったが、ヒストン修飾剤である TSA を共投与することによって細胞培養系において Shh 遺伝子の発現をもたすことができることがわかった(図)。これらのことは、ゲノム構造の変化のみで Shh 遺伝子の発現を誘導できることを示すものであり、極めて興味深い。また、各臓器における MFCS1 領域のメチル化状態をさらに詳細に解析し、有尾両生類と無尾両生類さらに硬骨魚類において、器官再生過程におけるゲノム構造の調節の仕方がそれぞれ異なることを示唆する結果を得た。これらの結果と考察の一部は、論文として発表した(研究成果リスト1)。また、MFCS1 配列のメチル化状態とそのエンハンサー活性との関係をより直接的に調べるために、メチル化レポーターアッセイ系をツメガエル成体四肢再生芽細胞初代培養系を用いて確立した(このレポーターコンストラクトを用いたトランスジェニック動物の作製を現在計画中である)。



#### <国内外での成果の位置づけ>

上記の研究について2008年8月にスペインで開催された“10th International Conference on Limb Development and Regeneration”および10月にスペインで開催された“The EMBO Conference on the Molecular and Cellular Basis of Regeneration and Tissue Repair.”に出席・発表を行い、好評を得た。また、9月に神戸で開催された“第16回CDBミーティング”Cis-sequence Regulation and its Evolution”および11月に岡崎市で開催された“第8回NIBB-EMBL 合同シンポジウム”Evolution: Genomes, cell types and shapes”では招待講演を行い、ここでも好評を得ている。さまざまな成果発表を通して、これらの成果は国内外の当該研究分野の研究者に世界に先駆けた研究成果と考えられる。またこれらの成果が評価され、Development Growth and Differentiation および Seminars in Cell and Developmental Biology から執筆依頼を受け、本分野の最先端の知見をまとめると共に上記の成果の一部を公表するに至った(研究今日表リスト1、2)。

ここ数年の間に器官再生研究は世界各地で分子レベルでの解析が盛んにおこなわれ飛躍的に進んでいるが、本研究成果は其中でも大きな影響を与える成果と考えることができる。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

アフリカツメガエルを用いたトランスジェニック動物の作製系の確立に時間がかかった。新たな技法(メガヌクレアーゼ法)を用いた効率よい作製系の確立を目指し、結果的に成功したが予想

外に期間が長くなり、この系を用いた研究成果に遅れが生じた。これについてはすでに問題点等を克服しており、今後の成果が期待される。

また、5アザシチジン添加による脱メチル化の誘導によるMFCS1の活性の変化をin vivoで解析する実験を行ったが、さまざまな条件検討を行ったにもかかわらず薬剤処理によって動物がしんでしまう状況を脱せずin vivoを用いた実験を断念せざるを得なかった。しかしこれに関しては、in vitro細胞培養系を用いた実験に切り替えて解析を行いすでに研究成果を上げるにいった。

#### <今後の課題>

トランスジェニック動物を用いた各種解析が進行中であるものの、大きな成果が期待できる研究内容でもあり今後の大きな課題となる。とくに、マウスPrx1四肢エンハンサーが、マウス創傷治癒過程で活性をもつかどうか、同エンハンサーがゼブラフィッシュの尾再生過程においても活性をもつか、が重要なポイントとなる。

#### <成果公表リスト>

##### 1) 論文/プロシーディング

- 0901101024  
Yakushiji, N., Yokoyama, H., and Tamura, K. (2009) . Repatterning in amphibian limb regeneration: a model for study of genetic and epigenetic control of organ regeneration. Seminars in Cell and Developmental Biology, in press.
- 0806201855  
Tamura, K., Yonei-Tamura, S., Yano, T., Yokoyama, H., and Ide, H. (2008) . The autopod: its formation during limb development. Development Growth and Differentiation 50, Suppl 1, S177-187.
- 0901152321  
Noro, M., Uejima, A., Abe, G., Manabe, M., and Tamura, K. (2009) . Normal developmental stages of the Madagascar ground gecko Paroedura pictus with special reference to limb morphogenesis. Developmental Dynamics, 238 (1) , 100-109.