

脊椎動物の四肢再生能力に種差をもたらすメカニズムの研究 Analysis of molecular mechanisms underlying the species differences in Vertebrate limb regeneration

長浜バイオ大学 川口 茜
派遣期間 2015年11月1日～2016年4月30日
研究機関 CRTD / DFG-Forschungszentrum für Regenerative Therapien Dresden
研究指導者 Professor Dr. Elly Margaret Tanaka

Higher vertebrate cannot regenerate when they lost organs like limbs due to limitation of regeneration capacity. On the other hand, amphibians such as newt and axolotl can regenerate their lost organs with perfect shape and function. However, it is unclear the mechanisms defining regeneration capacity of amphibians. I hypothesized that the differences of regeneration ability between animal species are based upon the differences of epi-genome transcriptional regulation mechanisms. In order to analyze epi-genome regulation in amphibian, perfect genome information of this species is needed. The laboratory where I stay in this study abroad, is the only one having axolotl (one of amphibians) genome information. However, the whole consecutive genome sequences had not been assembled yet. Thus, I first tried to assemble multiple genome fragments to complete whole axolotl genome sequence. Actually, I had contributed to establish High-throughput Chromatin Conformation Capture method (HiC) to assemble the genome pieces as one of genome project members. Now I had established the method and I had tried to assemble the genome using the HiC results. Finally, the axolotl genome is almost assembled and there are just 65 scaffolds. This success of the axolotl genome project would be great help for the future regeneration research.

研究目的

脊椎動物の再生能力は種間で大きく異なる。例えば、哺乳類は失った手足を再生できないが、イモリやアホロートルといった有尾両生類はとりわけ再生能力が高く、失った手足のみならず、心臓すら再生することができる。一方で、同じ両生類でもツメガエルの成体は、失った手足を部分的にしか再生せず、スパイクとよばれる極性のない構造を再生する (Endo H., et al., 2000)。この種による再生現象の違いは、一つは遺伝子の発現制御機構の違いに依存すると考えられている。全指揃った手足を再生するアホロートルでは、再生肢芽において手のひらのパターン形成を支配する *Sonic hedgehog (Shh)* 遺伝子が適切な箇所に発現する。しかしながら、1本指しか再生しないツメガエル成体では *Shh* が発現せず (変態後、発現しなくなる)、このツメガエルの一本指再生肢芽に *Shh* 蛋白質を付与すると複数の指が形成されることが明らかになっている (Yakushiji N., et al., 2009)。また腕の基部先端を司る遺伝子群である *HoxA/D* 遺伝子群の発現が乱れることが報告されている (Ohogo Y., et al., 2011)。この遺伝子発現制

御の違いはどのような分子基盤の違いによって生じているのか、未だ明らかではない。この再生能力の種差を生み出す仕組みを解明することは、ヒトの隠された再生能力を明らかにする突破口となる課題である。そこで申請者は、アホロートルの四肢再生における位置情報を司る遺伝子群のクロマチンレベルでの発現制御に注目し、完全な三次元器官を可能にするメカニズムを明らかにすべく、派遣先研究室において解析を開始した。

派遣当初、モデルとするアホロートルのゲノム情報は未だ明らかでなく、派遣先研究室で世界に先駆けて解読が試みられている最中であった。そのため、申請者は本課題を遂行するために、アホロートルのゲノムプロジェクトに参加し、財団による支援をいただいている期間では、研究基盤の立ち上げを行うことを目的に研究を行った。

研究経過と考察

まず、派遣時点では、アホロートルのゲノム情報は平均 25000bp 約 200,000 断片からなる PACBIO (Pacific Bioscience sequencing) によるゲノム情報

に限られていた。アホロートルのゲノム長は、マウスや哺乳類のゲノム長の 10 倍と予測されており (Unpublished data)、研究モデルとして利用可能な状態にするためには、この断片集を正しく繋げる必要がある。そのために、申請者は *de novo* ゲノムアセンブリを目的とした HiC/High-throughput chromatin conformation capture の立ち上げを行なった。実験開始当初、アホロートルの肝臓細胞を用いた HiC 法の確立を試みた。肝臓は細胞数が多く、大きな臓器であるため、一個体からの細胞数が確保できると考えた (1×10^7 細胞が必要である)。しかしながら、実験を進めるうちに、(1) 肝臓が脂質を多く含むサンプルであること、また肝臓に存在する脂質を除くステップはクロマチンの相互作用を変化させてしまうこと、(2) 肝臓に含まれる赤血球が非特異的な解析シグナルを生み出すこと、がわかった。まず、(1) の問題を解決するために、脂質を取り除く方法を取り入れたが、核染色の結果から、核が肥大したような形に変化していることがわかった。そのことから、クロマチンの本来の相互作用を変化させている可能性が高く、サンプルから脂質を除くことはできないと判断した。(2) についてであるが、両生類の赤血球は我々と異なり有核で、ホルムアルデヒド固定による細胞回収の際に、赤血球も同時に固定される。この時、赤血球が多く含んでいる特徴的な細胞骨格 (スペクトリン) はホルムアルデヒドによって強く架橋されることがわかった。HiC 解析で用いる核サンプルは、ホルムアルデヒドで均一に佳境される必要がある。しかしながらいくつかのホルムアルデヒド架橋についての条件検討から、肝臓を構成する細胞の一つであるヘパトサイトなどの細胞と赤血球細胞はホルムアルデヒドに対する膜の浸透性とタンパク質が適切に架橋される濃度が異なることがわかった。また、Percoll による生細胞分画によってヘパトサイトと赤血球の細胞を分離することも試みた。その結果、赤血球とヘパトサイトの分離には成功したが、ヘパトサイトと脂質は同じ比重の層に分画されることがわかった。そのため、肝臓をマテリアルとして用いることは難しいと判断した。

次に、アホロートルの上腕再生部由来の培養細胞である AL1 細胞株を用いて条件検討を行なった。実験当初から培養細胞を用いなかった理由であるが、(1) 樹立されてから時間が経過しており、継代が進んでいる培養細胞系統であるため、個体から回収

したサンプルとは異なるクロマチン状態を示す可能性がある、(2) 基礎研究などによく用いられる哺乳類の培養細胞 (NIH3T3 細胞株や Cos7 細胞株等) と比較すると AL1 細胞は細胞周期が遅い、(3) AL1 細胞の直径は、これらの細胞と比べて約 3-4 倍あり、フラスコ単位当たりで回収できる細胞数が約 1/10 程度であること、などの点があげられる。(1) についてであるが、AL1 細胞はキャラクタリゼーションが行われていない細胞株である。そのため、クロマチンの解析モデルとして用いるには不確定要素が多い。(2) と (3) は、HiC 法に必要な 1×10^7 の細胞を回収することを困難にする要因である。その細胞周期の遅さゆえ、コンフルエントに到るまでに 2-3 週間かかる上、1 フラスコあたりに回収できる数が 0.3×10^6 細胞であることから、実質 30 枚程度のフラスコが必要となる。一度の試行実験で 2-3 週間かかり、またこのフラスコの数字は現実的な数ではなかったため、最初の試行ではマテリアルとして不適切として判断していた。しかし、その一方で、この細胞を使う最大の利点は、細胞集団がある程度均一なポピュレーションであると予想されることである。つまり、AL1 細胞は上腕の再生部位から樹立された細胞株であるため筋幹細胞や骨芽細胞など多くの細胞種を含むと予想されるが、樹立後長らく継代されてきたため、優位に分裂能力を持った結合組織由来の細胞に選択されていると考えた。肝臓をマテリアルとした際に生じた、ヘパトサイト、脂質、赤血球などの多くの細胞種が夾雑する可能性は低い。結果として、AL1 細胞をマテリアルとして用いた HiC 法では、ホルムアルデヒド佳境の濃度と時間、また細胞や核抽出物の延伸速度の条件検討など、全ての反応の効率と精度を既存のプロトコルから改変することに成功し、秀でたデータを生み出した。解析データのゲノムアノテーション精度は、90%を超えるものであり、*de novo* ゲノムアセンブリを進める上では十分である。現在までに、約 200,000 存在した短い断片を、62 のスキヤフォールドにまでアセンブリすることに成功した。本来のアホロートルの染色体数は 22 本と予想されていることから、ほと

んどの染色体のアッセムブリに成功していると考えられる。現在は、ここまでに構築したゲノム情報を基盤として、申請者の本来の研究課題である位置情報の三次元再構築の分子機構の解析を開始したところである。加えて、非モデル動物においてHiC法を確立したことから、ウィーン大学の研究者から共同研究の申請を受け、ヒメイカ（学名：*Idiosepius paradoxus*）のHiC法の確立と解析を行っている。これまでの研究成果は、申請者及びインフォマティクスの共同研究者を筆頭著者としたゲノムプロジェクト論文、及びアホロートルのHiC法についての記述論文として投稿準備中である。

研究の発表

口頭発表

該当なし

誌上発表

1. *Currie D. J., **Kawaguchi A.**, Ricardo M. T., Maritta S., Chara O., *Tanaka M. E.,

Live Imaging of Axolotl Digit Regeneration Reveals Spatiotemporal Choreography of Diverse Connective Tissue Progenitor Pools. *Developmental Cell*, 39: 411–423 (2016)

引用論文

1. Endo H. Tamura K. *Ide H., “Analysis of gene expressions during *Xenopus* forelimb regeneration” *Developmental Biology*, 220 (2): 296-306. (2000)
2. Yakushiji N. Suzuki M. Satoh A. Ide H. *Tamura K., “Effects of Activation of Hedgehog Signaling on Patterning, Growth, and Differentiation in *Xenopus* Froglet Limb Regeneration” *Developmental Dynamics*, 238: 1887-1896 (2009)
3. Ohgo S. Itoh A. Suzuki M. Satoh A. Yokoyama H. *Tamura K. “Analysis of *hoxa11* and *hoxa13* expression during patternless limb regeneration in *Xenopus*” *Developmental Biology*, 338 (2): 148-157. (2011)