

# Elucidation of the Principles of Development and Regeneration by Systematic Analysis of Genes

## 遺伝子の系統的・網羅的解析による 発生・再生原理の解明



プロジェクトリーダー 上野直人

岡崎国立共同研究機構  
基礎生物学研究所 教授

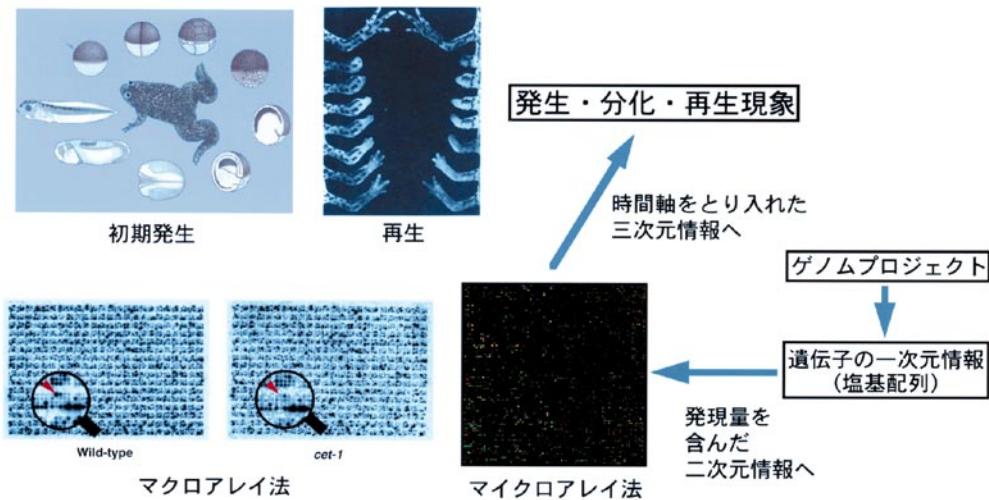


図 1. 発生・分化・再生研究の系統的・網羅的視点

各生物種で同定されているすべての遺伝子を高密度でナイロン膜、あるいはスライドガラスに配列させ、それぞれのスポットに対して同時にハイブリダイゼーションを行うため、従来のノーザンプロットに比べ効率よく遺伝子動態を解析できる。発生・器官形成・再生過程で時々刻々と変化する遺伝子の変化を系統的・網羅的に解析し、詳細に記載することによって、プログラムとして表すことを試みる。図の一部は Wolpert "Principles of Development" および Gilbert "Developmental Biology" から改変して使用。

### 1. 研究の目的

初期発生は未分化で全能性をもった初期胚が時間の進行とともに多種多様な細胞に運命を決定されていく過程であり、同時に胚細胞は徐々にその多分化能を失っていくと考えられている。未分化な状態から分化した状態への遷移、そして再び未分化な生殖細胞への回帰は個体発生の普遍的な原理ともいえる。しかしながら、初期胚における未分化性の維持を支える分子的背景や分化に伴う細胞の変化の詳細については不明な点が多い。脊椎動物の初期胚では細胞分化に細胞増殖因子など液性因子を介したいわゆる細胞間相互作用が必須であると考えられており、「中胚葉誘導」、「神経誘導」といった現象として知られている。こういった誘導現象も限られた遺伝子マーカーの発現動態をもって「誘導」あるいは「分化」と見なされているのが現状である。しかし、近年のゲノム生物学の進歩は、限られた遺伝子の解析から、原理的には発現するすべての遺伝子についてその動態を観察することを可能にした。本研究ではアフリカツメガエル正常発生やプランナリア幹細胞分化のプロセスを系統的・網羅的に記載し、細胞間相互作用を含む初期発生における諸現象の包括的解析、全能性を持った幹細胞の性質解明によって、発生・再生の原理に迫ることを目的とする。幹細胞における全能性の付与および維持の分子機構解明は、失われた組織・器官を人工的に再生させる再生医療の基盤となるであろう。



図 2. 研究に用いる 2 種類のカエル  
左の大きなカエルは従来研究に使われてきたアフリカツメガエル *Xenopus laevis*、右は *Xenopus tropicalis*。 *laevis* は偽 4 倍体であるのに対し、 *tropicalis* は 2 倍体でゲノムサイズが小さく、しかも性的成熟までに 4-5 ヶ月と成長が早い。

## 2. 研究の内容

### 1. 初期発生・再生 DNA アレイを用いた解析

アフリカツメガエル初期胚や再生組織で発現する cDNA を収集するために、初期発生、器官形成・再生期の各ステージから mRNA を調製し、cDNA ライブラリーを作成する。その際、重複するクローンを排除するためにサブトラクション法により平均化する。平均化したライブラリーより独立したコロニーを単離・回収し、PCR によって増幅した後にナイロン膜上に 9,600 スポット / 8X12cm の密度に配列させたマクロアレイを作成する。このマクロアレイに対し、発生・再生ステージ別に胚あるいは組織から調製した mRNA を放射線同位元素で標識したプローブをハイブリダイズすることにより、発現量の変化を網羅的に解析する。現状では発現量の低いものについては無視せざるを得ないため、発現量が高く検出可能なものについては再び配列させる（リアレイ）によってミニアレイを作成する。ミニアレイを検出に用い、分化誘導によって、あるいは組織再生過程で発現動態に変化を生ずる遺伝子を発現時期に応じて分類するなど、細胞分化に伴う分化遺伝子マーカーの整備を行う。とくに興味深い動態を示す遺伝子については塩基配列を決定し、機能解析を行うなどさらに詳細な検討を加える。また、多分化能をもったアフリカツメガエルの予定外胚葉細胞（アニマルキャップ）をさまざまな分化誘導因子で刺激したり、内在の誘導シグナルを遮断することによって起こる遺伝子動態の変化を、細胞増殖因子やその標的遺伝子のレベルで系統的に解析することによって、正常胚発生や胚移植など胚操作における遺伝子動態の変化と誘導因子による変化との質的な違いを明らかにするほか、遺伝子カスケードの構築を試みる。平成 13 年度からはマクロアレイからスライドガラス上に高密度に cDNA を配列させ、蛍光標識した DNA プローブを用いて検出するマイクロアレイ法へと発展させる計画である。

### 2. プラナリア幹細胞の分離

プラナリアは再生能力が極めて高い扁形動物であり、個体を小片に切断しても各断片から個体を再生することができる。その再生能力は体全体に散在する全能性をもった幹細胞に依存していると考えられている。すなわち、個体を切断するとその切断面に増殖能力の高い幹細胞が速やかに集合し、再生芽を形成することによって再生を開始する。その幹細胞の性質や全能性の分子基盤については長い間不明であったが、最近、幹細胞にはクロマチドボディと呼ばれる電子密度の高い RNA 複合体が電子顕微鏡で確認されることや、いくつかの細胞表面抗原や選択的遺伝子マーカーが同定され、幹細胞を他の細胞と区別することが可能になってきた。したがって、本研究ではこれらの性質に基づいて幹細胞を体細胞と分離、精製することを試みる。分離した幹細胞の全能性の確認は、幹細胞を消失し再生能力を失うことが知られている X 線照射プラナリア個体に、上述の方法で単離した幹細胞を凝集塊として移植することによって、再生能力が回復するか否かによって検討する。こうして単離された幹細胞と体細胞での遺伝子発現動態をプラナリア DNA アレイなどで比較する。差異的に発現する遺伝子については、最近プラナリアに応用可能になった RNAi 法を用い遺伝子機能を阻害することによって全能性の付与に必須の遺伝子を同定する計画である。全能性の維持に必須の遺伝子については脊椎動物の相同遺伝子を探索したいと考えている。

## 3. 研究の体制等

期 間：2000 年 4 月～2005 年 3 月

構 成：プロジェクトリーダー：上野直人（岡崎国立共同研究機構・基礎生物学研究所・教授）

コメンター：高橋淑子（奈良先端大学・バイオサイエンス研究科・助教授）

研究協力者：阿形清和（岡山大学・理学部・助教授）

餅井 真（姫路工業大学・理学部・助教授）

実施場所：岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所形態形成研究部門

奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科

岡山大学理学部生物学科分子発生生物学講座再生発生研究室

姫路工業大学理学部生命科学科細胞生物学 1 講座

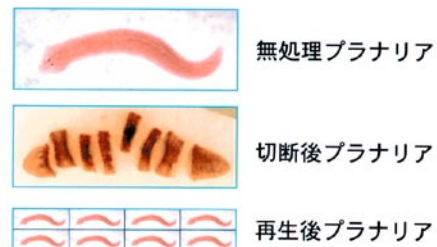


図 3. プラナリアの再生能力  
扁形動物であるプラナリアの再生能力は驚異的で、切断してもそれぞれの断片から完全な個体を再生することができる。これはプラナリアの幹細胞の全能性によるものであると考えられている。



図 4. DNA アレイ作成ロボット  
cDNA をナイロン膜上に配列させたマクロアレイを作成するための装置。8X12cm の膜に 9,600 個の cDNA を配列させる。