

進化再生研究グループ

Evolutionary Regeneration Biology Group

グループディレクター 阿形 清和
AGATA, Kiyokazu

〈プラナリア全能性幹細胞システムの細胞、遺伝子レベルでの解析〉

幹細胞システムを進化的に位置付けると、幹細胞システムはもともと個体の再生産システムの根源をなすものとして構築されていたことに気付く。すなわち、プラナリアやホヤの fission, ヒドラの budding などの個体の再生産（いわゆる無性生殖）は、全能性幹細胞や多能性幹細胞の幹細胞システムによって支えられている。特に再生能力の高いプラナリアでは、有性生殖は全能性の生殖細胞によって実行し、無性生殖は全能性の幹細胞システムによって実行している。逆の言い方をすれば、この全能性の幹細胞システムの存在によって、プラナリアはどのような切り方に対しても断片から完全な個体を再生することができる。このような驚異的な再生の能力は我々ヒトを含めたほとんどの動物では失われている。プラナリアの高度な再生能力の秘密に幹細胞の役割という視点から迫ることによって、我々ヒトが失った再生の本質に迫ることができると期待される。

当研究グループでは、全能性幹細胞を自由自在に扱っているプラナリアの幹細胞システムを細胞、遺伝子レベルで理解し、マウスやヒトの全能性幹細胞を自由に操作するためのアイデアを提供することを目指している。

〈細胞の多様化、脳の進化〉

プラナリアでは、単一の視細胞が光受容から光刺激の情報を視覚の中枢まで伝達しているが、ヒトでは約 10 種類近くの多様化した細胞で分担して行っている。視細胞にしても 4 種類の異なる波長に反応する細胞が存在する。光情報を処理するという機能は同じだが、この細胞の多様化と機能分担、そしてそれらの細胞の間での協調作業によってより高度な情報の獲得と処理が可能である。進化的な視点から見た場合、もともとは 1 種類の細胞がしていた作業を、進化の過程で何種類もの細胞に分化して、かつ専門化、精鋭化することによって、より複雑な情報処理が可能な脳を獲得してきたと考えられる。また、その結果として複雑な体制を構築することに成功したのだろう。

当研究グループでは神経系を例に、進化の根元に近い生物の神経細胞は多機能であったものが、進化の過程で細胞ごとに機能を分担し、より精鋭化していったプロセスを、単一の神経細胞における遺伝子発現プロファイルを解析することによって明らかにする。またその発現プロファイルを他の生物種、特に、高度な脳を持つマウスやショウジョウバエ、脳や神経節をもたないクラゲなどの神経細胞における発現プロファイルと比較することで、どのように複雑な脳の構造や神経細胞の機能分化が獲得されてきたのかについても明らかにして行く。

1. プラナリア全能性幹細胞の単離と培養系の確立（林）

プラナリアは高い再生能を有しているが、このしなやかさは自在にコントロールされた幹細胞システムによって司られている。プラナリアの幹細胞を理解することは高等生物の幹細胞の制御機構を解明するために非常に有益な情報になると期待される。そこで幹細胞の性質を明らかにするための第一段階として、FACS（Fluorescence-Activated Cell Sorter）を用いたプラナリアの生きた幹細胞の単離を試みた。まず、FACS を用いたプラナリア細胞の分取条件を検討した。モデル細胞種として神経細胞と筋肉細胞を選び、分取を試みた。神経細胞については頭部と体幹部の細胞分布を比較することにより、頭部に特異的に存在する細胞集団を分離した。分取した細胞は神経マーカー遺伝子である *DjPC2・Djsyt* を発現しており、それらを培養した結果、約 7 割の細胞に軸索の伸長が観察された。また、筋肉細胞については Hoechst 33258・Calcein AM の蛍光分布と細胞の長さから、筋肉細胞を多く含む細胞集団を分取することが

可能となった。このように、細胞表面の特異的マーカーの無いプラナリアにおいても、簡単な蛍光色素の組み合わせにより上記のように FACS による細胞種の分取が可能であることが分かった。

今後は、この手法をもとにプラナリアの幹細胞の単離を試みる予定である。これまでの知見から、X 線照射によってプラナリアの幹細胞を破壊することができ、その結果として再生能を失うことが分かっている。実際、再生能を失う条件の X 線照射によって、消滅・減少する細胞集団が確認されており、このことから X 線照射したプラナリアと正常なプラナリアの解離細胞の分布の比較から得られる細胞集団は幹細胞集団の候補と考えられる。現在これらについて細胞のキャラクタリゼーションを行っている。さらに、このようにして得られた幹細胞の *in vitro* 条件下での培養条件を確立する。幹細胞の *in vitro* での培養が可能となることで、ラベルした幹細胞の移植実験、細胞外シグナル分子のアッセイ系として活用できるほか、遺伝子導入が容易に

なり、幹細胞システムを理解する上で強力なツールとなるであろう。さらには幹細胞の制御を担うシグナル伝達物質の同定を行うことができ、これらの結果から幹細胞の性質について考察したい。

2. プラナリア全能性幹細胞の全能性および幹細胞としての性質を担う遺伝子群の単離 (樽井, 牧, 林)

現在のところ、幹細胞にはどのような種類が存在し、またどのような過程を経て神経や筋肉など細胞に分化してゆくのかについてほとんど分かっていない。幹細胞システムの分子・細胞学的性質を理解することは再生医療を進歩させる上で重要な鍵となる。我々は再生能力の高いプラナリアをモデル生物として用い、幹細胞の性質を遺伝子レベルで解明したいと考えている。これまでに我々は単一の細胞から mRNA を抽出し、そこから cDNA を PCR 法によって増幅することで、細胞レベルでの遺伝子発現を解析する方法 (single cell PCR 法) を確立している。上記のように FACS によって分取した幹細胞集団から single cell PCR 法によって cDNA データベースを構築し、さらに個々の幹細胞や分化途中の細胞から得られた cDNA をプローブとし、DNA chip 解析を駆使して幹細胞特異的に発現する遺伝子群の単離を試みる予定である。分化過程の細胞と未分化状態の幹細胞 1 個の遺伝子プロファイルと比較することでシングルかつクリアーに遺伝子群の単離を行えることが期待される。

3. プラナリアの脳形成に関する遺伝子プログラムの解析と RNAi を用いた機能解析 (Cebria, 樽井, 小林)

プラナリアの脳で発現する遺伝子を単離するために、我々はプラナリアの EST プロジェクトから得られたクローンをを用いて DNA chip を作成し、頭部と尾部から得られた cDNA をプローブとしてハイブリダイゼーションさせることで、頭部で強い発現を示す遺伝子を網羅的に探索した。(遺伝学研究所 五條堀研究室との共同研究) 約 200 のクローンを単離、同定し、それらの遺伝子の発現パターンを詳細に調べた。その結果、これらの遺伝子はその発現パターンから、大きく分けて 7 種類のカテゴリー ((1) 中枢神経系全体に発現しているもの、(2) 中枢神経系全体に発現しているが、腹側神経節で少し発現が低いもの、(3) 脳突起のみに発現しているもの、(4) 脳神経のみで発現しているもの、(5) 頭部末端で発現しているもの、(6) 視細胞、および視神経で発現しているもの、(7) 脳と腹側神経に附随した他の細胞で発現するもの) に分けられた。単純であると思われた脳の構造が実際は細かな領域に分けることができるということが明らかになり、このことから、それぞれのドメインが独自の機能をもつことが考えられる。プラナリアの脳にもショウジョウバエや脊椎動物などと同様にドメイン構造が存在することは興味深い。先の 7 つのグループで特異的に発現する遺伝子の機能を調べることで、より詳細にプラナリアの脳の機能別領域地図を作製することが可能である。来年度は RNAi 法を用いてこれらの遺伝子の機能を詳細に解析し、これらの領域がそれぞれどのような機能を担い、またどのようにしてこれらの領域が形成されるのかについて解析をする予定である。さらには RNAi 法と DNA chip を組み合わせることにより脳形成におけるカスケードを明らか

にし、プラナリアの脳形成における遺伝的プログラムについても考察していきたいと考えている。

4. 進化的に根元にちかい動物の神経細胞の遺伝子セットの解明 (小林, 樽井)

脳を持たないクラゲのプラヌラ幼生期の神経系と脳を持つプラナリアの神経系を、遺伝子、細胞レベルで比較し、脳がどのように進化したのかの初期段階を明らかにすることを目的として実験を行った。まずプラヌラの cDNA ライブラリーを作成し、そのシーケンスを網羅的に行った。その結果、enolase, synaptogyrin など、神経細胞で機能する遺伝子の同定に成功した。神経細胞特異的な遺伝子は依然網羅できていないため、来年度も引き続きシーケンスを行い、クラゲのプラヌラに対する遺伝子発現プロファイルを作成し、プラナリアのものと比較したいと考えている。また同定された遺伝子に関して、*in situ* ハイブリダイゼーション法により発現場所、時期を詳細に解析することで、クラゲプラヌラ幼生期の神経系の構造や神経細胞の種類、分布を明らかにして行く予定である。また、神経細胞のサブタイプごとの機能の違いなどを明らかにするために、エレクトロポレーション法による遺伝子導入、および RNAi 法による遺伝子欠損技術を用いた機能解析も行っていく予定である。

さらにはセルソータを用いて単離した種々の動物の神経細胞からシングルセルライブラリーを作成、EST プロジェクトを行い、種々の動物間の神経細胞の遺伝子プロファイルを比較することで、神経細胞の細胞種としての進化を考察したいと考えている。

Research Subjects and Members of Evolutionary Regeneration Biology Group

1. Molecular Characterization of the Totipotent Stem Cell
2. Establishment of Culture System for Totipotent Stem Cell
3. Analysis of Genetic Programs for Planarian Brain Formation
4. Cell Type Diversification of Neurons During Evolution

Group Director

Dr. Kiyokazu AGATA

Research Scientists

Dr. Francesc CEBRIA

Dr. Hiroshi TARUI

Dr. Nobuyasu MAKI

Dr. Chiyoko KOBAYASHI

Technical Staffs

Mr. Tetsutaro HAYASHI

Assistants

Ms. Midori NAKAYAMA