

神奈川大学総合理学研究所2000年度共同研究報告書

○. 尾(尾鰭)から肢(他の鰭)への分化転換個体の作出を目標とした、有尾両生類の肢ならびに魚類の鰭の再生現象に関する研究

・研究組織 豊泉 龍児、小笠原 強(理学部応用生物科学科)

【本研究の目的】

最近、ヒトの体の組織に内在する再生能力に着目し、これを上手く引き出すことで高度な組織修復や器官再生を行わせようという医療分野が注目され、再生医学と呼ばれるようになった。ヒトの場合、幼児であれ成人であれ、手足はおろか指ですら決して再生することはない。ところが両生類の場合は、幼生の四肢や尾などが強い再生力を持っている。特にイモリなどの有尾両生類は、脊椎動物中で最強の再生力を持つ動物であるとされ、例えばイモリ成体の肢や尾を切断しても、驚くべきことに完全に再生する。

有尾両生類が何故、他の四肢動物とは異なり、成体になっても完全に四肢や尾を再生することが出来るのかについて実験発生学的/個体生物学的に追求することによって、ヒトの手足の再生の研究の基礎的知見を得よう、というのが本研究課題の目的である。肢の再生力について系統発生学的な見地から知見を得るために、硬骨魚類の鰭の再生現象についても有尾両生類のそれと比較検討する。

【現在までの研究状況】

上述のように、両生類の幼生の尾は強い再生力を持っていることが知られており、尾を切断すると、処理個体が死亡しない限り、元通りの尾が同じ長さで再生する。1992年、インドのMohanty-Hejmadiらは、marbled balloon frogという無尾両生類の幼生(カエルのオタマジャクシ)の尾を切断した後に、高濃度のレチノイン酸溶液に浸しながら飼育すると、尾の再生初期に形成される再生芽と呼ばれる細胞塊から、数本の完全な肢が見事に生えてくることを発見している。Mohanty-Hejmadiらの報告した現象は、再生生物学の常識を覆すもので、脊椎動物においても尾から肢への器官レベルでの大規模な分化転換(homeotic transformation)が単一の分子で誘導され得たことを示している。

(無脊椎動物の場合には、ショウジョウバエにおいて、触覚から肢、平均棍から羽へ等の分化転換が生じ得ることが、Lewisらの研究によって古くから知られている。)

marbled balloon frogの研究成果を、他の脊椎動物種に転用出来るものならば、将来、同じ脊椎動物門に属するヒトの手足にも再生能力を与えることが出来ると期待される。筆者らは、再生力の強い有尾両生類のイモリならば、尾から肢への分化転換が容易に起こるのではないかと予想し、Mohanty-Hejmadiの実験条件を参考に、イモリ成体の尾を切断した後の再生芽を高濃度のレチノイン酸溶液で暴露処理した。尾の切断は肛門と尾端との中間の位置で行い、再生芽の形成される4日後から8日間もしくは16日後から4日間、1-50 μ Mのレチノイン酸溶液に個体ごと浸した(それぞれn=11, n=14)。結果としては、切断後の尾はレチノイン酸処理下でも元通り再生するばかりで、尾から肢は生えてこなかった。有尾両生類のイモリは再生力が強すぎて、レチノイン酸存在下でも正確な再生の

みが遂行されたと考えられる。尾を切断し再生芽を生じたstage 56-57のイモリ幼生を3-10 μ Mのレチノイン酸溶液に浸しながら飼育した場合には、外鰓の分岐パターンに異常が認められたが、切断した尾の再生芽から肢が生えてくることはなかった(n=11)。

実験動物として頻用される無尾両生類ピバ科のアフリカツメガエルの幼生の場合、切断した尾の再生芽を0.1-1 μ Mレチノイン酸で3日間処理すると、尾が海老反りになるなどの奇形が生じたが再生芽から肢は生えてこなかった(n=97)。アフリカツメガエルの成体の四肢は再生力がほとんどないとされ、幼生の肢の再生力も、変態が進むにつれ徐々に消失していくとされる。実験に用いた幼生の発生段階(stage 52-59)が進みすぎていることが失敗の原因かもしれない。イモリと再生力や分化転換能力の違いを比較検討する実験材料としてウシガエルの幼生を用い、同種の実験を行うことを試みた。しかしながら、ウシガエルの幼生の尾は肉質で血管が太く、尾を切断した個体がしばしば失血死してしまい、十分な例数を得られなかった(n=10)。外科的な止血も試みたが、Mohanty-Hejmadiらの実験にならい尾の半分の位置で切断した場合には、再生現象を観察する前に悉く死亡してしまった。今後は他の無尾両生類幼生を実験材料に用いてみたい。

一般に、下等な動物ほど再生力が強いと言われるが、四肢の再生や分化転換は、両生類のみに特異的な現象であるのか否かについては、よく分かっていない。魚類の鰭は、四肢動物の肢と相同な器官であり、遺伝子発現(例えば後述の*Tbx*遺伝子など)にも深い共通性がみられることが近年判明してきている。硬骨魚の胚魚、成魚の尾鰭などの再生力と分化転換能力についても、今後は調査検討を行いたい。竹内と大川(1994)は、キングヨ成体の鰭をレチノイン酸溶液に浸すと、処理後2-3ヶ月を経過してから鰭の大部分が消失することを発見し、その原因は鰭の幹細胞がレチノイン酸の影響で変化したためであると解釈した。鰭の再生現象の研究をレチノイン酸処理によるhomeosisと絡めて行う場合、この報告がヒントになると考えている。レチノイン酸は、両生類四肢の切断面の再生芽細胞を基部化する(再生芽細胞の位置値を、切断面の細胞のそれから肢の付け根の細胞のそれにシフトさせること)と一般に言われているが、Mohanty-Hejmadiの実験は、体の末端にある尾の再生芽の位置値を、体の重心に近い後肢のそれに"中心化"したと考えるべきかもしれない。

* * *

近年、ペプチド性シグナル分子であるFGF(繊維芽細胞成長因子)の仲間が、四肢動物の肢形成に重要な働きをする鍵分子であることが判明しつつある。FGF-10遺伝子のノックアウトマウスは、手足が付け根から欠損する表現型を示すことから、FGF-10は、側板と呼ばれる体の側面の中胚葉由来組織から「肢が生える」ことに必須の遺伝子であるとされている。また、FGF-8遺伝子は肢芽の先端で発現し、(肢芽が伸長しながらパターン形成を行う時に形成中心となる)進行帯と呼ばれる領域の維持に必要であるとされている。FGF-4遺伝子は、分泌性蛋白質をコードする*Sonic hedgehog*と共に、肢芽の前後軸形成に重要な役割を果たしていることが知られている。

筆者らは、FGF-4タンパク質やFGF-10タンパク質を肢芽を生み出す起源組織である側板中胚葉に注射し、注射した領域に「過剰肢が生える(専門用語でdasoku=蛇足と言う)」か否かについて検討した。stage 26のイモリ胚の側面中央に25 μ g/mlのFGF-4を

25nl注射した場合も、stage34-36のイモリ胚の同領域に同量注射した場合も、何も起こらなかった(それぞれn=3, n=15)。次に、100 μ g/mlの濃度のFGF-10を5nlまたは15nl, stage 27-40のイモリ胚の側面中央に皮下注射した(n=21)。注射から2-5日を経過した時点で、注射部位に肢芽のような突起が生えた胚が4例得られた。突起は、発生が進むにつれて約5日後に消失した。今後は、一定の間隔で同じ領域にFGF-10タンパク質を投与するなどして、連続したFGF-10刺激を与えることで、得られた突起構造が肢芽(dasoku)形成に至るのか否かについて、更に実験を重ねたい。

イモリ成体, イモリ幼生やツメガエル幼生の尾の切断後の再生芽に、高濃度のFGF-4タンパク質(25 μ g/mlを10-220nl)を注入する実験も行ったが、再生芽に何の変化も生じなかった(それぞれn=11, n=3, n=6)。この時、色素マーカーと共にFGF-4を注入したが、色素マーカーがすぐに消失したことから、再生芽に局在させるべく注射したFGF-4が、幼生の発達した血流に乗って拡散し、すぐに濃度が下がってしまったことが変化が生じなかった原因かも知れない。現在、タンパク質を表面に吸着させる素材、例えば金コロイド粒子の表面にFGF-4, -8, -10を静電的に吸着させて再生芽に与えることを計画し、予備実験を開始している。魚類を対象にした実験としては、FGF-10やFGF-8をメダカ胚やゼブラフィッシュ胚の側板中胚葉領域に微量注入することで、異所的な鰭を誘導出来るか否かについて実験することを計画している。

【今後の展望】

当初の研究目的である、尾から肢への分化転換の実験系の作出については手がかりが得られなかった。しかしながら、イモリ胚の側板へFGF-10を皮下注射する実験では、肢芽様の突起構造が得られた。今後は実験の中心を「5本目の過剰肢を生やす」ことに置く予定である。肢芽様の突起を肢形成にまで誘導するために、FGF-4, FGF-8, FGF-10の混合溶液をカクテルで微量注入することや、レトロウイルスベクターを用いて持続的にFGFを発現させることを考えている。

ごく最近、ニワトリ胚において、転写調節因子である*Tbx5*が前肢芽特異的に発現し、同じ*Tbx*ファミリーに属する*Tbx4*が後肢芽特異的に発現することが、Cliff Tabinらのグループによって報告された。*Tbx5*遺伝子を組み込んだウイルスベクターを後肢芽に注射すると、ニワトリの脚(後肢)から羽毛が生え、翼をもった前肢になることが示された。これらの結果から、前肢と後肢のidentityは、*Tbx*ファミリーの遺伝子群によって規定されていると予想されている。イモリの*Tbx*遺伝子もいくつかクローニングされているので、dasoku(実験的に誘導された五本目の肢芽)が安定して得られる実験条件を見いだした後に、これが前肢なのか後肢なのかを、それぞれに特異的な*Tbx*遺伝子(前肢なら*Tbx5*, 後肢なら*Tbx4*)をプローブにwholemound *in situ* hybridizationの技法で組織染色することで検討したい。魚類の胸鰭にも*Tbx5*遺伝子が発現し、腹鰭には*Tbx4*遺伝子が発現することが田村ら(1999)によって報告された。レチノイン酸処理等をしたメダカやゼブラフィッシュ稚魚・成魚で、尾鰭再生芽から他の鰭が生える可能性について、これらの分子マーカーを利用して検討したい。□