

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	ゼブラフィッシュの再生応答エンハンサーの同定と制御メカニズムの解析
Title(English)	
著者(和文)	田牧輝久
Author(English)	Teruhisa Tamaki
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12332号, 授与年月日:2023年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:川上 厚志,山口 雄輝,立花 和則,田中 幹子,白木 伸明
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12332号, Conferred date:2023/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

令和3年度博士論文

ゼブラフィッシュの再生応答エンハンサーの同定と
制御メカニズムの解析

東京工業大学大学院 生命理工学院

生命理工学コース 生命理工学系 川上研究室

田牧 輝久

指導教官 川上厚志 准教授

目次

1. 緒言	4
1-1 生物の組織再生	4
1-2 ゼブラフィッシュの尾ヒレの構造及び再生過程	5
1-3 再生時における遺伝子発現の制御	6
1-4 傷害に応答したエンハンサーによる遺伝子の発現制御	6
1-5 AP-1による再生応答への影響	7
1-6 本研究の目的と結果の概要	7
2. 材料及び方法	9
2-1 ゼブラフィッシュの系統および飼育方法	9
2-2 ヒレの切断	9
2-3 顕微鏡観察	9
2-4 ゲノム配列のクローニングとベクターの作製	9
2-5 ゼブラフィッシュトランスジェニックラインの作製	12
2-6 凍結切片の作製	12
2-7 配列比較・分析	12
2-8 whole mount <i>in situ</i> hybridization (ISH)	13
2-9 免疫染色	13
2-10 Dominant negative <i>lef1</i> (<i>dnlef1</i>)	14
2-11 アフリカツメガエルの飼育及び再生応答	14
3. 結果	15
3-1 再生応答遺伝子の周囲には高度に保存された配列が存在する	15
3-2 保存配列 E1-E6 はトランスポゾン由来とした配列である	15
3-3 <i>fn1b</i> の上流配列に再生応答エンハンサーが存在する	16
3-4 トランスポゾンおよび非トランスポゾン領域に存在する RRE	17
3-5 再生応答エンハンサーには E-box と AP-1 モチーフが共通している	18
3-6 E-box と AP-1 モチーフの両方が再生応答に必要である	19
3-7 E-box / AP-1 による再生応答は様々な組織で機能する	20
3-8 アフリカツメガエルでも E-box / AP-1 に再生応答が機能する	20
3-9 AP-1 と E-box のシグナル活性が再生応答エンハンサーの機能に必要な る	21
4. 考察	22
4-1 E-box と AP-1 は協働することにより再生エンハンサーとして機能する	22
4-2 組織や種を超えて E-box / AP-1 による再生応答が機能する。	23

4-3 E-box と AP-1 は周辺配列の差により発現誘導する組織が異なる.....	23
4-4 トランスポゾンの配列が再生応答エンハンサーとして機能する.....	24
5. 参考文献.....	26
6. 図表.....	30

1. 緒言

1-1 生物の組織再生

再生とは、失った組織や器官、付属器官を体細胞の増殖、成長や再パターン形成により元通りに修復する現象である。多細胞生物は、組織再生により失った組織の構造と機能を回復し、個体全体としての完全性を維持している。しかし、組織の再生能力は生物種や組織などにより大きく異なる。

無脊椎動物のプラナリアやヒドラなどは、ごく小さな体の断片からでも個体全体への再生（全身再生）が可能である (Chandebois, 1976)。プラナリア、ヒドラにおける再生は、細胞分裂と成長をほとんど伴わずに残存組織が再パターン形成することによって再生するものであり、再編再生と呼ばれる (Hichlin & Wolpert 1973)。例えば、ヒドラでは体内に多能性幹細胞が広く分布しており、この既存の細胞が分化し、欠損した器官を新たに構成し修復する (Bosch, 2007)。その後、細胞分裂、成長により元の大きさへと回復する。

プラナリア、ヒドラなどに比べると、ヒトやマウスを始めとした哺乳類の再生能力は限定的である。全身の再生や四肢の付加再生は起こらないが、哺乳類でも肝臓や指の先端など限られた組織で再生は可能である (Carlson, 2005; Han et al., 2005)。哺乳類の肝臓では、全体の70%を失っても肝細胞や胆管の細胞が分裂することで元の大きさへ回復し機能を回復する (Michalopoulos, 2007)。一方で、四肢やその他の臓器ではこのような再生メカニズムをもっておらず、大きな損傷を受けると再生できない。

一方で、脊椎動物でもサンショウウオを始めとした有尾両生類やゼブラフィッシュなどの硬骨魚類は高い組織再生能力をもつ。尾や肢の再生をはじめとして、多くの内蔵器官、神経組織なども完全に再生できる (Carlson, 2003)。特に、有尾両生類や硬骨魚における四肢やヒレの再生は、失った部位から新たな成長によって、正常なパターンを持った完全に新しい構造が再構成される再生であり、付加再生と呼ばれる。このように、生物種や組織により再生能力の有無（多少）や再生の過程は異なっている。再生能力が高い生物モデルを用いて再生メカニズムを解明することにより、ヒトなどの哺乳類における臓器や四肢の再生能力の活性化、再生医療への応用が期待される。

このような生物種による再生能力の差について、進化の過程により徐々に失われたという見方がある。四肢やヒレの再生において硬骨魚類や両生類が再生能をもっているのに対し、哺乳類、鳥類、爬虫類などは再生することができない。また、同じ両生類でもイモリなどの有尾両生類が生涯に渡り四肢再生が可能であるのに対し、カエルなどでは幼生の成長過程でのみ四肢の再生が可能であることが知られている (Darnet et al., 2019)。

一方で再生能力の差には進化的な種分化とは一致しないことから、個々の種におい

でそれぞれ獲得したものであるという見方もある。例えば Acoela や棘皮動物、プラナリアなどの生物種では全身再生による再生が可能であることが知られている(Bely et al., 2010)。だが、全身再生が行える Lophotrochozoa と近縁に当たる Ecdysozoa は全身再生ができないことが報告されている。また、同じ全身再生であっても生物群により制御メカニズムが大きく異なることも報告されている(Ramirez et al., 2020)。このように、再生能力の獲得や損失の詳細な過程ははっきりしておらず、その解明のために様々な種における組織再生の能力やメカニズムの比較解析などが必要である。

1-2 ゼブラフィッシュの尾ヒレの構造及び再生過程

硬骨魚類であるゼブラフィッシュは様々な組織で高い再生能力を有しており、ヒレ、心筋、脊髄、脳、網膜など様々な組織において付加再生が可能である (Hata et al., 2007; Kawakami, 2010; Nakatani et al., 2007; Witten & Huysseune, 2009)。この中でもヒレは、(1) 透明で生きた状態の観察が容易なこと、(2) 約2週間の短期間で再生できることなどにより (Gemberling et al., 2013)、付加再生のメカニズム解明の極めて優れたモデルとなっている。

ゼブラフィッシュの尾ヒレは、16-18本の鰭条 (fin ray) と呼ばれる放射状の骨組織と、その間を埋める鰭条間 (inter ray) および鰭条の間葉組織、さらに血管、神経繊維と、それらを覆う上皮により構成される。鰭条は、円柱を縦に2つに割ったような骨が、一定間隔で存在するジョイント (節) によって一列につながって存在している

(Fig. 1)。それぞれの鰭条の内側には動脈が通り、線維芽細胞または間葉細胞で満たされている。尾ヒレは、陸上脊椎動物の四肢とは異なり筋組織を持たず、骨芽細胞、線維芽細胞、色素細胞と血管、神経から形成される比較的単純な組織である (Tu and Johnson, 2011)。また、幼生の時期は、骨組織をもたない膜ヒレと呼ばれる組織であり、成体の尾ヒレと構造が異なっている。この膜ヒレも損傷後、組織再生が可能であり、約3日で再生が完了する (Kawakami et al., 2004)。

前述の通り、膜ヒレ及び尾ヒレの再生は付加再生と呼ばれる再生様式により進行する。その過程は以下の3つの過程により進む (Akimenko et al., 2003; Kawakami, 2009; Poss et al., 2003) (Fig. 2)。

- (1) 傷上皮形成: 損傷直後に上皮が傷口を覆い、傷上皮と呼ばれる肥厚した上皮組織 (傷上皮) が形成される。傷上皮は傷周辺の上皮細胞が移動した組織であることが示唆されている (Kragl et al., 2009; Shibata et al., 2018)。
- (2) 再生芽形成: 再生芽とは、傷上皮で覆われた内部に形成される増殖細胞集団であり、傷断面付近の間葉細胞が再生部位に移動することで形成される (Poleo et al., 2001)。
- (3) 組織の伸長・パターンの再構成: 再生芽の細胞分裂によって組織は伸長し、細胞の分化と形態形成を経て組織は再形成される。

1-3 再生時における遺伝子発現の制御

生体内の現象の分子基盤の解析には、特定の遺伝子に着目しその発現組織や機能の解析が広く行われている。その際には、マイクロアレイ解析やRNA シークエンスなどにより、発現する遺伝子を同定することや、それらの遺伝子の mRNA を *in situ* hybridization (ISH) 法により検出したり、タンパク質を染色したりすることにより、発現細胞の種類や発現量を調べることが行われている。また、遺伝子をノックアウトもしくは過剰発現させることにより、機能を調べることなどのアプローチも行われる。

ゼブラフィッシュを用いた研究をはじめとした様々な再生モデルにおいて、再生にตอบสนองして発現する多数の遺伝子が報告されている。これらの遺伝子の発現解析により、再生組織内の細胞ごとに発現が誘導される遺伝子が多数同定されている (Poss et al., 2003)。

例えば Fibroblast growth factors (Fgfs) は、先端再生芽の形成を促進することが示唆されている (Poss et al., 2000; Lee et al., 2005; Shibata et al., 2016)。その他にも、レチノイン酸 Retinoic acid や Wnt/B-catenin シグナル, Hedgehog, Notch, Bone morphogenic protein, Activin, インスリン様成長因子 Insulin-like growth factor など、多数のシグナルが付加再生に必要であることが示唆されている (Wehner and Weidinger, 2015)。また、最近では、当研究室をはじめとした研究により、Interleukin 1 beta (*il1b*) による炎症応答が再生に関与することも報告されている (Hasegawa et al., 2017)。

このように再生に寄与する遺伝子の発現組織や機能、制御メカニズムについて詳細な解析が行われている。しかし、再生そのものを開始させるトリガーはわかっておらず、再生そのものを開始させる要因は明らかになっていない。

1-4 傷害にตอบสนองしたエンハンサーによる遺伝子の発現制御

遺伝子の発現の制御は、遺伝子の周辺に存在する転写エンハンサー配列により制御されることが知られている。再生にตอบสนองした発現も同様に再生応答転写エンハンサー (Regeneration response element, RRE) によって制御されていると考えられ、傷害にตอบสนองする転写エンハンサーの同定もいくつか報告されている。Kang らは、ゼブラフィッシュの *leptin b* の周囲から尾ヒレと心臓の再生に関する RRE の同定を報告している (Kang et al., 2016)。彼らは、尾ヒレと心臓再生でそれぞれエンハンサーとして働く短いゲノム配列を明らかにした。また、この RRE は哺乳類でも指先の損傷にตอบสนองして転写活性化を誘導することができた。このことは遺伝子の傷害への応答機構そのものは再生能力をもたない組織、種においても保存されていることを示唆している。

また、Wang らは *inhba* の周辺にヒレ再生の RRE が存在することを示した (Wang et al., 2020)。この RRE は African killifish とゼブラフィッシュの種間で共通して機能するエンハンサーであった。このことは特定の再生応答エンハンサーが種間で保存されてい

ることを示している。

魚類以外でも再生エンハンサーは報告されており，Harrisらは，ショウジョウバエを用いて1 kb未満のエンハンサーが再生時にWntの特異的な発現部位を制御していることを示した（Harris et al., 2016）。別の研究では，Suzukiらはアフリカツメガエルを用いて，*LIM homeobox (lhx1)*の上流に腎臓の再生に必要な応答エンハンサーが存在していることを示している（Suzuki et al., 2019）。

このように様々な生物種において再生エンハンサーが報告されており，再生能力をもたない生物種・組織と比較することにより，再生能力の有無を決定する分子メカニズムが明らかになることが期待できる。また，各生物種間でこの再生の制御メカニズムを比較・解析することによって，再生能の差が発生するメカニズムや再生能を獲得・損失した進化的なプロセスの解明にもつながる。

1-5 AP-1による再生応答への影響

RREにはどのような転写因子とその結合モチーフが働き，活性化をおこなっているのでしょうか。上記のSuzukiらのアフリカツメガエルの再生エンハンサーでは，転写因子としてimmunoglobulin heavy chain (IgH)エンハンサーでの機能が報告されているArid3aの結合モチーフが遺伝子の発現誘導に関与していることが示唆されている（Suzuki et al., 2019）。また，*leptinb*や*inhibina*のRREではAP-1結合配列が再生エンハンサーとしての機能に必要なことが示唆されている。

AP-1モチーフは，ロイシンジッパー型転写因子のJUNとFOSが結合し（AP-1ファミリー転写因子），Jun N-terminus kinase (JNK)によってJUNがリン酸化を受けることにより活性化される（Fig. 3）。AP-1は傷害やストレスなどに応答して活性化することが知られており，細胞の分化や細胞周期，アポトーシスなどの制御にも必要なことが示唆されている（Hess et al., 2004）。AP-1はヒレの再生応答において必要な働きをしていると考えられるが，一方で，AP-1は非常に広範囲の傷害やストレス応答，生命現象に関与しており，AP-1のみでRREの活性化に必要な十分かどうかなど，再生応答の制御メカニズムは明らかになっていない。

1-6 本研究の目的と結果の概要

複数の生物種においてRREや転写因子の結合モチーフが報告されてきたが，まだ詳細な制御メカニズムは解明されていない。特に，RREが共通したメカニズムを持っているのかなども明らかになっていない。

本研究ではゼブラフィッシュのヒレ再生をモデルとし，トランスジェニック（Tg）を用いたエンハンサーのレポーターアッセイを行い，新たな再生応答エンハンサーの同定と解析から，再生応答に共通したメカニズムを解明することを目的とした。

その結果、本研究では以下のことを明らかにした。

1. ゼブラフィッシュのヒレ再生において発現誘導される *fn1b* 遺伝子上流から、300~400 bp の保存されている配列を発見した。
2. これらの保存配列は、いずれもトランスポゾン由来であり、ゼブラフィッシュのゲノム中に、極めて多数存在していた。
3. 2つのトランスポゾンと1つの非トランスポゾン配列が RRE として機能することを示した。
4. RRE には、AP-1 と E-box の転写因子結合モチーフが両方必要であることを明らかにした
5. この RRE は、多様な組織の切断や、アフリカツメガエル幼生の肢芽再生でも応答した。E-box/AP-1 による再生応答が様々な組織や種において保存されていることを示した。

以上から、E-box と AP-1 モチーフが協働で機能することにより再生応答エンハンサーを形成すること、この RRE による応答は種々の組織や種間で保存されていることが示された。トランスポゾンによってゲノム中に作られた多数の E-box, AP-1 モチーフによって、再生能が形成、維持されてきたと考えられる。

2. 材料及び方法

2-1 ゼブラフィッシュの系統および飼育方法

野生型ゼブラフィッシュとして、当研究室において 10 年以上の交雑によって維持されている Tübingen 野生型に由来する系統を用いた。また、トランスジェニックライン BAC Tg (*msxc:egfp*) (横田, H27 年度修士論文; 川上ら, 未発表), BAC Tg (*fn1b:egfp*) (Shibata et al., 2016) は、当研究室で作製されたものである。ゼブラフィッシュは循環水槽システムにより維持し、照明は明 14 時間、暗 10 時間の周期で行った。成体・解析ともに水温 28.5 °C で飼育した。胚の飼育には egg water (0.06 % artificial marine salt, 0.0002 % methylene blue) を用いた。すべての動物実験は東京工業大学における実験動物に関する指針に則って行った。

2-2 ヒレの切断

尾ヒレの再生実験には、幼生の場合は受精後 2~4 日、成体では 3~10 ヶ月齢のゼブラフィッシュを使用した。0.05 % tricaine (Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt, Sigma) で麻酔し、実体顕微鏡下で解剖用メスを用いて背腹軸方向に尾ヒレを切断した。切断後は、幼生は egg water、成体は飼育水に直ちに戻し、28.5 °C で再生を進行させた。

2-3 顕微鏡観察

蛍光顕微鏡で観察する際は、0.05 % tricaine で麻酔した魚を 2 % アガロースで作成した観察台に乗せて観察し、写真を撮影した。実体顕微鏡は AF6000 (Leica) を用いた。観察後は直ちに飼育水に戻した。取得した画像は Leica LAS AF software (version 3.1) を用いて処理を行った。

2-4 ゲノム配列のクローニングとベクターの作製

ゼブラフィッシュの *fn1b* の転写開始点上流の 4.5 kb, 3.2 kb プロモーター配列を持つコンストラクト, *pT2(4.5k:egfp)*, *pT2(3.2k:egfp)* は、BAC CH73-401 から、XhoI および AgeI をそれぞれ末端に付加したプライマーペアによって PCR を行ってクローニングした。PCR 断片は、クローニングベクター pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen) に、いったんクローニングし、Tol2 トランスポゾン配列を含む pT2KXIGDin ベクター (Kawakami et al., 2004) の XhoI, AgeI サイトの間へ挿入した。

fn1b 上流 1.8 kb プロモーター配列は、上記の 3.2 kb コンストラクトを XhoI, PflMI サイトで切断し、上流 3.2 kb~1.8 kb の範囲を除いて作製した。その後、 α -*crystallin alpha a (cryaa)*:GFP カセットを EcoNI サイトに挿入し、トランスジェニックキャリアーのマーカースとした。

E1 をもつ *pT2(E1-miniP;cryaa:egfp)* は、PCR により E1 配列をクローニングし、同様に、TOPO ベクターに一度クローニングし、*pT2(TCF-miniP:d2egfp)* (Shimizu et al., 2012) の *Aval*, *Sbfl* の間へ挿入して *pT2(E1-miniP:d2egfp)* とし、さらに E1+mini 配列を *XhoI* と *AgeI* で切りだし、*pT2KXIGDin* の *XhoI*, *AgeI* サイトの間へクローニングした。*α-crystallin alpha a (cryaa):EGFP* カセットは、*EcoNI* サイトに挿入し、トランスジェニックキャリアーのマーカースとして。

E2L, E4, E5, E6 は、PCR によりクローニングし、同様に TOPO ベクターにクローニングした後、*pT2(E1-miniP:egfp;cryaa:egfp)* の *XhoI*, *Sall* サイトに挿入した。その後、上流 0.7 kb をクローニングし、E2L, E4, E5 の下流の *Sall*, *BamHI* サイトに挿入した。E2, E2S, E2, E2S, E2S(dA), E2S(dE) は、*KOD-Plus-Mutagenesis Kit* を用いて、E2L から一部領域を Deletion させて作製した。

E-Box または AP-1 のリピートを持つコンストラクトは、以下の合成オリゴ DNA をアニールさせて、miniP または 0.7 k 上流の制限酵素サイトへ挿入した。アンダーラインは、それぞれのモチーフのコア配列を示す。

6xA repeat 5'-

TCGAGTTAGTIGAGTAATGATTAGTIGAGTAATGATTAGTIGAGTAATGATCATTACTC
ACTAATCATTACTCACTAATCATTACTCACTAAC -3'

6xE repeat Fw 5'-

TCGAGACAGCTGGAGGACAGCTGGAGGACAGCTGGAGGCCTCCAGCTGTCCTCC
AGCTGTCCTCCAGCTGTCCTGCA -3'

6xE repeat Rv 5'-

GGACAGCTGGAGGACAGCTGGAGGACAGCTGGAGGCCTCCAGCTGTCCTCCAG
CTGTCCTCCAGCTGTC -3'

6xE(m) repeat Fw 5'-

CATAACTGAATGATAACTGAATGATAACTGAATGCATTCAGTTATCATTCAGTTATCAT
TCAGTTATC-3'

6xE(m) Rv 5'-

TCGAGATAACTGAATGATAACTGAATGATAACTGAATGCATTCAGTTATCATTCAGTT
ATCATTCAGTTATGGGCC-3'

HE1_DR1 (m) は、ゼブラフィッシュゲノムをテンプレートとして PCR を行った。PCR 産物を pCR-Blunt II-TOPO にクローニングしてコンピテントセルに挿入後、固形培地にて培養したうちの 1 クローンをランダムに選んで、シーケンスを行いコンストラクト作成に用いる配列の選出を行なった。その次に、*pT2(E1-miniP:egfpP;cryaa:egfp)* に *XhoI*, *Sbfl* サイトで挿入した。その後 *Sall*, *BamHI* サイトで上流 0.7kb を挿入した。

以上の全てのコンストラクトは、シーケンスによって、正しく挿入されていることを確認した。

以下は、クローニングに用いたプライマー配列である（下線部は制限酵素部位）。

Name		Primer sequences
XhoI-f4.5kb F	F	<u>CTCGAGGGG</u> TTCAGCTGGAAGAGCATGTGGTGCG
AgeI-f4.5k R	R	<u>ACCGGTCACCCG</u> CGTTATGGAGAGCAGCTTCTGGC
XhoI-f3.2k F	F	<u>CTCGAGCATCCCCA</u> ACAGCACACAAGGGTTAAACC
AgeI-f3.2k R	R	<u>ACCGGTCACCCG</u> CGTTATGGAGAGCAGCTTCTGGC
AvaI-E1 F	F	<u>CTCGAGCCCCC</u> CTGAATTATTAGCGCCCCTGTT
SbfI-E1 R	R	<u>CCTGCAGGGG</u> TTTAACCCTTGTGTGCTGTTGGGGA
XhoI-E2L F	F	<u>CTCGAGCCC</u> ATGACAGTTCATATTATTTGACTAGA
Sall-E2L R	R	<u>GTCGACCGG</u> CCTCTACATGCCTGCGCCTCCAGCTG
XhoI-E4 F	F	<u>CTCGAGGCTAG</u> GCCAGTTGGCATTCTGTGTGGAG
Sall-E4 R	R	<u>GTCGACTGAGA</u> AGTCGTTGGGGGTGGTGGGGAGGG
XhoI-E5 F	F	<u>CTCGAGCC</u> ATGTTGTGGATGCTAATGGCCGCCGAT
Sall-E5 R	R	<u>GTCGACCAAA</u> ACAGTTCTGTTTGGATCTTGAATCT
XhoI-E6 F	F	<u>CTCGAGCACCC</u> ATCACAAATTTCTCATTAAATTA
Sall-E6 R	R	<u>GTCGACATAG</u> TGCTCAGCATAAATGAGTACACCCC
0.8k_F_Sall_sbfl fn1b pro BamHI	F	<u>CCTGCAGGTCGAC</u> TTAGTGAGTAATGAAGGCAAATCTGGAGCTCATC
	R	<u>GGATCCCACCCG</u> CGTTATGGAGAGCAGCTTCTGG
HE1 DR1 F Xh	F	<u>CTCGAGGGG</u> CGACACGGTGGCTCAGTGG
HE1 DR1 R Sb	R	<u>CCTGCAGGAT</u> TCATTCATTCATTTTCCTTCGGCTTAG
E2 F XhoI	F	<u>CACGAGTCGAC</u> TCTAGAGGATCCGGCGAATTCA
E2 R	R	AATTATTGGCTCCCCTGTGAATTTTTTTGAAATATTTCC
E2S F EcoRI	F	<u>GAATTC</u> TTGACTTCAATTGTACATTACAGATGTGATGAGTCTG
E2S R	R	GCCTGTGTTTCAGACACCAGGGAG
E2S dAP1 BglI F	F	<u>AGATCTCAG</u> TATTAGCAGTGAATGTACAGGGAAACAGCTGGAG
E2S dAP1 R	R	TCACATCTGTAATGTACAATTGAAGTCAAGAATTCGCCT
BglIII-E2S dEbox F	F	<u>AGATCTGCGC</u> AGGCATGTAGAGGCCGG
E2S dEbox R	R	AATTATTGGCTCCCCTGTGAATTTTTTTGAAATATTTCC

2-5 ゼブラフィッシュトランスジェニックラインの作製

作製したコンストラクトは、以下の組成の溶液に調整して、受精卵へインジェクションを行った。ゼブラフィッシュの受精卵は、2 mg/ml のアクチナーゼ E (Nacalai Tesque) により卵膜を取り除き、1 細胞から 2 細胞で、マイクロインジェクションを行なった。受精後 1 日、2 日で蛍光を観察し、多くの EGFP 陽性細胞が観察された、モザイク率の高い個体を成体まで成長させ、これらを掛け合わせるにより、F1 トランスジェニックラインを得た。

インジェクション溶液

20~50 ng/μl Tol2 プラスミド
25 ng/μl transposase mRNA
0.2 M 塩化カリウム
0.25 % (w/v) フェノールレッド

2-6 凍結切片の作製

4 % PFA/PBS (PFA: Paraformaldehyde; PBS: Phosphate buffered saline) で 4 °C、一晩固定したゼブラフィッシュの尾ヒレを、20 %スクロース/PBS 溶液に置換し、Tissue-Tek compound (Miles) で凍結包埋した。クリオスタットを用いて 10-20 μm の切片を作製した。作製した凍結切片は 80 %グリセロールでマウントし、共焦点顕微鏡 (Fluoview FV1000) による写真撮影を行なった。

2-7 配列比較・分析

ゼブラフィッシュゲノムや BAC・プラスミドコンストラクトの比較、分析には Genetyx_Ver. 10 プログラムを用いて行った。それぞれの BAC の塩基配列は、Genetyx によりホモロジー検索を行った。*msxc* を含む CH211-217G15 と *fn1b* を含む CH73-4017 間で保存されている配列のうち、100 bp 以上にわたり、70%以上のホモロジーをもち、かつ繰り返し配列ではない領域を、高度保存配列と判断した。

転写因子の結合配列の分析は、オープンアクセスのデータベースである JaspAr ver. 7 (Fornes et al.,2019) を用いて転写因子の結合配列を検索した。検索に用いた配列を relative score 0.8 以上の条件で検索を行い、score 10 以上のものを検出した。

また、トランスポゾンの解析は、東京工業大学生命理工学院、西原秀典 先生との共同研究で行った。トランスポゾンとの比較には UCSC Genome Browser を用いて行なった。ゼブラフィッシュゲノム内 (GRCz10) における特定の配列の分布や数の検索は Repeat Masker analysis (<http://www.repeatmasker.org>) を用いた。検索には CENSOR (Jurka et al. 2005) を用いて、Repbase (Bao et al. 2015) に登録されている情報を元に行なった。

2-8 whole mount *in situ* hybridization (ISH)

ISHはThisseらの方法に沿って行った(Thisse and Thisse, 2008)。以下に具体的な方法を示す。採取したサンプルは4% PFA/PBSで浸漬し、4℃にて一晩以上固定した。その後、0.1% Tween 20/PBS (PBT)で洗浄し、MeOHに置換して脱水した。脱水したサンプルは100% MeOH中-30℃で保存した。サンプルを室温に戻したのち、段階的にPBTに置換して再水和させ、10 µg/ml ProK/PBTで20分間処理し、その後PBTで洗浄した。その後、Hybridization Buffer (HB, 50% formamide, 5xSSC (pH 7.0), 500 µg/ml torula (yeast) RNA or tRNA 50 µg/ml heparin, 0.1% Tween 20, 9mM citric acid to pH 6.0-6.5)に置換し、65-70℃で2時間以上プレハイブリダイゼーションを行った。用いた20x Saline Sodium Citrate (20xSSC, Nacalai Tesque)の組成は、3 M NaCl, 0.3 M Sodium Citrate, pH 7.0である。続いてDigoxigenin (DIG) 識したアンチセンスRNAプローブ約1 µg/mlを含むHBに置換し、65-70℃でハイブリダイゼーションを一晩行った。その後、HB/2xSSC混合溶液(75% HB, 50% HB, 25% HB)で各10分間洗浄し、続いて2xSSCと0.2xSSCによる洗浄を行った。以後はサンプルを室温に戻し、0.2xSSC/PBT混合溶液(75% 0.2xSSC, 50% 0.2xSSC, 25% 0.2xSSC)で各5分間洗浄を行い、続けてPBTに置換した。さらに、Blocking buffer (2 mg/ml BSA, 5% Fetal Bovine Serum /PBT)で室温にて2時間以上のブロッキングを行った後、Alkaline Phosphatase (AP) 標識抗DIG抗体をBlocking bufferに4000倍希釈し、4℃で一晩抗体反応を行った。その後、PBTで洗浄を行い、NTMT buffer (50 mM MgCl₂, 0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 0.1% Tween 20)で5分間、3回洗浄を行った後、450 µg/ml nitro blue tetrazolium (NBT), 175 µg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP)を含むNTMT bufferに置換し、室温・遮光条件下で発色反応を行った。発色後は、PBTにより数回洗浄し、4% PFA/PBSに置換することで発色反応を停止した。染色したサンプルは80% glycerolに置換し、光学顕微鏡を用いて観察した。組織切片を作製する際は、80% glycerolをPBTにより洗い流し、20% sucrose /PBSに置換して4℃で一晩置き、Tissue-Tek® O.C.T. Compound (サクラファインテックジャパン)で包埋したのち切片作成を行なった。

2-9 免疫染色

凍結切片は、最初にPBS、次にPBTに浸しO.C.T. Compoundを洗い流した。次にブロッキングバッファー(5% Fetal Bovine Serum / PBT)とともに、湿潤箱中で乾かないように室温2時間ブロッキングを行なった。一次抗体をブロッキングバッファーで希釈し、室温で2時間反応させた。PBTで10分3回洗浄したのちに、二次抗体を4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 0.1 µg/ml in PBTx; Invitrogen)と併にブロッキングバッファーで希釈し置換した。さらに室温2時間反応させた。PBTで10分間3回洗浄

し、25 mg/ml DABCO (1,4-diazabicyclo-[2,2,2,]octane, Nacalai Tesque) を含む 80 % グリセロールでマウントして、共焦点顕微鏡を用いて観察を行なった。

用いた抗体の詳細は以下のとおりである。

抗体名	動物種	希釈倍率	メーカー
anti-GFP	rabbit	1/1000	MBL
anti-Zns5	mouse	1/50	ZIRC
anti-rabbit Alexa 488	goat	1/1000	Invitrogen
anti-mouse Alexa 568	goat	1/1000	Invitrogen

2-10 Dominant negative *lef1* (*dnlef1*)

石谷太 先生 (大阪大学) から供与された *dnlef1* プラスミド *pTol2(hsp70l:mKO2-2a-dnlef1)* (Akieda et al., 2019) をゼブラフィッシュ胚に導入して系統を確立した。

ヒートショック誘導は恒温槽を用いて行い 38 °Cにて 2 時間行なった後、28.5°Cの飼育水に戻して再生を進行させた。なお、最初のヒートショックは切断 6 時間前に行ない、再生進行中は毎日 2 時間ヒートショックを行った。

2-11 アフリカツメガエルの飼育及び再生応答

山形大学の越智陽城 先生との共同研究で行った、*Tg(E2L-miniP:egfp)*, *Tg(6xE-0.7k:egfp)* のコンストラクトをアフリカツメガエル胚に導入した。その後、24°Cにて飼育し、stage 52-54 の個体を 0.05 % tricaine で麻酔したのち、後脚を実体顕微鏡下で切断した。切断後、直ちに飼育水に戻し再生を進行させた。観察は、0.05 % tricaine で麻酔したのちアガロース台に乗せ、蛍光実体顕微鏡下で行なった。

3. 結果

3-1 再生応答遺伝子の周囲には高度に保存された配列が存在する

先行研究では, bacterial artificial chromosome (BAC) を用いて, ゼブラフィッシュの尾ヒレの再生組織で発現が上昇する遺伝子の蛍光 Tg の作製が行われ, いくつかの遺伝子で再生に応答した遺伝子発現の再現に成功している (Shibata et al., 2016; Ando et al., 2017)。これら BAC Tg では, 遺伝子の周辺の非常に長い領域の配列がゼブラフィッシュ胚に導入されている。

再生誘導される遺伝子の周辺には, 共通した制御配列があると考え, 再生応答が再現できた Tg ライン BAC Tg(*msxc:egfp*) (横田, H27 年度修士論文; 未発表) および BAC Tg(*fn1b:egfp*) (Shibata et al., 2016) の配列比較を行った。*fn1b* は傷上皮, 主にその基底層で発現し, *msxc* は先端再生芽で発現する。これらの 2 つの遺伝子は発現組織が異なるが, 再生に応答するという点においては共通している。

2 つの BAC の配列を比較し共通配列のサーチを行った。配列の比較には Genetyx_Ver.10 プログラムを用いて, 塩基配列のホモロジー検索を行なった。その結果, *fn1b* 遺伝子の転写開始点の上流 3 カ所とイントロンに 1 カ所, *msxc* 遺伝子上流 4 カ所と下流 1 カ所によく保存された 0.4 kb 前後の配列が見つかった (Fig. 4)。それらの向きは遺伝子に対し一定ではなかった。*fn1b* 上流に存在する配列を, 下流からそれぞれ E1, E2, E3 と命名した。E1~E3 の結果を比較したところ, E1~E3 の中央部は高度に保存され, これらは同種のエンハンサー様配列であると推測された (Fig. 5)。

また, E1~3 とは相同性のない別の保存配列 E4 も, 2 つの BAC 上にそれぞれ 5 カ所ずつ見つかった (Fig. 4)。これらの向きも, 遺伝子に対して一定ではなかった。

E1, E4 が *fn1b* と *msxc* 以外の再生遺伝子の周囲にも保存されているかどうかを調べるために, さらに, 他の再生遺伝子の BAC 配列との比較も行った。*junb* (Yoshinari et al., 2009) を含む CH211-145G9 (161 kb), *junbl* (Ishida et al., 2010) を含む CH73-348N11 (107 kb), *fibroblast growth factor 20a (fgf20a)* (Shibata et al., 2016) を含む DKEY-109M11 (89 kb), *distal-less homeobox 5a (dlx5a)* (Kawakami et al., 2004) を含む CH211-57N23 (162 kb) に対して, それぞれホモロジー検索を行なった。その結果, E1, E4 の両方の配列が, 上記すべての再生関連遺伝子の周辺に多数あることが示された。さらに, E1, E4 と異なる配列が, *fn1b* 上流と *junb*, *dlx5a* 近傍にも保存されていることがわかった。これら 2 つの配列をそれぞれ E5, E6 と命名した (Fig. 4)。

3-2 保存配列 E1-E6 はトランスポゾン由来とした配列である

E1~E6 は, 高度に保存されていることから, トランスポゾンなどのゲノム中で増幅・分散する配列であることが予想された。そこで, 報告されているゼブラフィッシュのトランスポゾンとの配列の比較を行った。その結果, すべての保存配列が short

interspersed element (SINE) や non-autonomous DNA transposon (MITE) などのトランスポゾンに由来していることがわかった。E1~E3 は hAT-N21B_DR (Fig. 6), E5 は DNA-X-4_DR (Fig. 7), E6 は TDR7 MITEs (Fig. 8) の配列の一部であることが明らかとなった。E4 は HE1_DR1 と 79 %の類似性が見られたことからこの配列を由来としていると推測される (Fig. 9)。さらに, E2, E4, E5, E6 配列は、それぞれのトランスポゾンのコンセンサスから 18~26%, あるいは 12~15%配列が分岐していることがわかった。ヒトのトランスポゾンの 7%の変異は 5000 万年前の挿入に相当すると推定されるため (Lander et al., 2001), これらのトランスポゾンは少なくとも数千万年前に挿入されたと考えられる。

さらに, E2, 4, 5, 6 についてゲノム中における個数を調べると, 95%以上の一致が見られるものが, E2 は 16,314, E4 は 43,848, E5 は 11,394, E6 は 11,394 コピー存在し, これらの多くは 10%以上変異していた (Fig. 10)。さらにこれらの配列のゲノム中の配置をプロットしたところゲノム全体に分散していることが明らかとなった (Fig. 11)。

3-3 *fn1b* の上流配列に再生応答エンハンサーが存在する

E1, E4, E5, E6 を含む *fn1b* 上流 4.5 kb プロモーターを持つ EGFP 蛍光トランスジェニックを作製し, 再生組織での EGFP の発現を観察した。*pT2(4.5k:egfp)* プラスミドコンストラクトをゼブラフィッシュ胚に導入し, 受精 2 日目に F0 個体の膜ヒレを切断し, 24 時間後に EGFP の発現を観察した。すると, ヒレを切断していない個体でも広範囲で異所性の強い EGFP の発現が観察されたため, F0 におけるトランジェントアッセイでは, 再生応答を見ることは難しいことがわかった。そこで, 安定にトランスジェンを保持した F1 個体を同定し, F1 以降の世代での解析を試みた。

F1 のスクリーニングには, F0 を野生型と交配し採取した胚を受精後 3 日まで観察し F1 を同定した。約 20 匹の F0 をスクリーニングし, そこから 2 系統の F1 を同定した。確立した *Tg(4.5k:egfp)* の膜ヒレを切断すると, ヒレを切断した個体の切断部付近で EGFP の発現が誘導された (Fig. 14)。このことから, 幼生の再生にตอบสนองするエンハンサー配列が上流 4.5 kb の範囲に含まれていることが示唆された。なお, 確立した F1 の 2 系統どちらにおいても発現に違いは見られなかった。

次に, 成体のヒレ再生時における EGFP の発現誘導を観察した。尾ひれを切断後, 切断部付近で EGFP の発現が, *fn1b* と同様の発現パターン (傷上皮) で見られ始めた (Shibata et al., 2018) (Fig. 15 矢印)。凍結切片を作製し, EGFP の発現を観察すると, 上皮の特に基底層で強い EGFP の発現が観察された。

BAC *Tg(fn1b:egfp)* における発現と比較すると, 切断後 4 日目では非常に強く, 切断後 4 日目以降 EGFP の発現が減少し, 7 日目ではほぼ見られなくなり, *Tg(fn1b:egfp)* と一致していた (Fig. 17)。さらに, *egfp* の発現細胞を ISH 法にて染色したところ, 鱗

条間において EGFP の発現が同様に観察された (Fig.16)。さらに、凍結切片を作製し発現組織を詳細に観察したところ、いずれにおいても上皮の基底層に発現が観察された。以上のことから *Tg(4.5k:egfp)* は、再生過程における *fn1b* の応答を再現していることが示された。

E1, E4, E5, E6 を含む 4.5 kb プロモーターで *fn1b* の発現が再現できることが示されたので、次は上流からこれらの配列を除いて再生応答に変化を観察した。まず、E1 配列を含まない *fn1b* 上流 3.2 kb, E5 を含まない上流 1.8 kb のコンストラクトを同様に作製し、このプラスミドをゼブラフィッシュ胚に導入した。

Tg(3.2k:egfp) では、*Tg(4.5k:egfp)* と同様の傷上皮基底細胞で応答が観察されたが (Fig. 18, 19)、それに対し、*Tg(1.8k:egfp)* では、非切断での発現はほとんど見られず、幼生のステージにおいては膜ヒレ切断に反応した EGFP の発現が観察された (Fig. 20, 21)。また、成体の尾ひれでは、鰭条において EGFP の発現が観察された (Fig. 22)。これらのことから、E5, E6 を含む 1.8 kb プロモーター配列に再生応答に必要な十分な配列が含まれることが示された。従って、3.2-1.8 kb の範囲に *fn1b* の組織特異性を決定する情報が含まれていると考えられる。

さらに、EGFP の発現組織を詳細に観察するために、凍結切片を作製し、核を DAPI で、骨芽細胞を anti-Zns5 抗体により染色し、EGFP の発現細胞と比較した。すると、EGFP の発現は Zns5+ の骨芽細胞とは一致しないことがわかった。骨芽細胞とは異なる間葉細胞が EGFP を発現していることが示された (Fig. 22)。

さらに、E6 のみを含む 0.8 kb のコンストラクト、E6 を含まない 0.4 kb も作製したが、これらは、成体、幼生いずれにおいても再生応答は観察されなかった (Fig. 23)。このことから *fn1b* の上流 1.8 kb から 0.8 kb の範囲に少なくとも再生応答に必要な配列が含まれていることが示唆される。

3-4 トランスポゾンおよび非トランスポゾン領域に存在する RRE

上記で 1.8 kb から 0.8 kb の範囲に RRE を含むことが示されたが、この領域は E5 を含んでいる。そのため再生応答に対して E5 が活性を持っているかどうかを調べるために 0.7 kb のプロモーターの上流に直に E5 を挿入したコンストラクトを作製し、蛍光 Tg を作製して解析することにした。

まず、幼生のステージでは、切断に応じて EGFP の発現細胞が観察された (Fig. 24-26)。また、成体でも、いくらかの傷上皮の表層細胞でも発現が見られたが、主に鰭条において EGFP の発現が観察された (Fig. 25, 27)。2 dpa において切片を作製し Zns5 抗体による染色を行うと、鰭条での発現は間葉細胞で、1.8 kb と同様に、EGFP を発現している間葉組織は骨芽細胞とは異なることも明らかとなった。つまり、E5 は RRE を含んでいることが示された

しかし、一方で、0.7 kb のプロモーターの代わりに、最小プロモーター-miniP (Shimizu et al., 2012) をもつ E5 コンストラクトを作製したところ、EGFP の発現応答は観察できなかった (Fig. 24)。このことから、0.7 kb に含まれる配列 (ヘルパーエンハンサー) が E5 による再生応答に必要であることがわかった。

別のトランスポゾン由来とする E4 についても E5 と同様の実験を行ったところ、E4 についても RRE 活性を示すためには、0.7 kb 上流にあるヘルパーエンハンサーが必要であることがわかった (Fig. 28-30)。発現細胞については、E5 で見られた上皮の発現は見られなかったが、骨芽細胞でない間葉細胞で EGFP が観察され、E5 と同様の細胞が応答していると考えられた。

さらに、E2 についても RRE 活性のアッセイを行った。E2 は隣り合う非トランスポゾン領域 100 bp を一緒にクローニングしたが (E2L) (Fig. 24)、E2L は、最小プロモーター-miniP のみで、幼生と成体両方のステージにおいて再生に応答した (Fig. 24, 31-33)。また、成体での再生過程における発現に関して詳細に解析したところ、4.5 kb と同様に傷上皮で応答していた。

ところが、トランスポゾンと相同な領域 E2 だけを用いてアッセイすると、F0 で幼生と成体いずれにおいても再生に応答した EGFP の発現は観察されなかった (Fig. 24)。それに対し、隣接するゲノム配列 100 bp のみをもつ E2S では、E2L と同様、再生に応答した EGFP の発現誘導が観察された (Fig. 24, 34-36)。さらに E2S について F1 を確立し、再生に対する応答を調べた。その結果、E2L と類似した *fn1b* に類似した発現が観察された。以上から、E2 自体には再生応答に関する機能はなく、その挿入位置に隣接する非トランスポゾン配列である E2S に RRE が含まれることが示された。

3-5 再生応答エンハンサーには E-box と AP-1 モチーフが共通している

上記により、E2S, E4, E5 は RRE としての活性をもち、さらに、0.7 kb 上流には、E4, E5 と共に働くヘルパーエンハンサーが含まれることが示唆された。これらに共通する転写因子結合モチーフの探索を行った。解析には公開されている転写因子の結合配列のデータベースである JASPAR 2020 (<https://jaspar.genereq.net/>) を用いて行った。解析の結果、E4, E5, E2S には共通して E-box 転写因子結合モチーフが含まれていることが明らかとなった (Fig. 37, 38, 40)。E-box は CAGCTG or CACCTG からなるモチーフであり、*tcf*, *myoD*, *mesp*, *twist*, *clock*, *myc* などの basic helix-loop-helix (bHLH) ファミリーに属する転写因子が結合する (Jones, 2004; Wang & Baker, 2015)。

さらに E2S と E6 に関しては、AP-1 の結合配列が共通して存在した (Fig. 37, 39, 40)。AP-1 は TGASTCA のモチーフによって構成され、*Fos*, *Jun*, *Atf*, *Jdp* などの転写因子が結合する (Gazon et al., 2018)。報告されている *leptinb* や *inhibina* の再生応答エンハンサーにおいても、発現誘導に必要であることが示唆されている。以上のことから、RRE 活性を示すためには、AP-1 と E-box の転写因子結合モチーフが両方含まれることが必

要と考えられた。

また、これまで報告されていた RRE である *leptinb*, *inhibina*, *ctgfa* のエンハンサーについても転写因子結合モチーフの探索を行うと、いずれの RRE においてもスコアの高い AP-1 と E-box のモチーフが共通して含まれていることが明らかとなった (Fig. 41)。

3-6 E-box と AP-1 モチーフの両方が再生応答に必要である

E-box, AP-1 それぞれが、実際に再生応答に十分かを調べるために、E2S から E-box, AP-1 配列をそれぞれ除いたコンストラクトを作製し、これらを用いて同様の解析を行った。なお、E-box を除いたものは E2S (dE), AP-1 を除いたものは E2S (dA) と表記する。E2S (dE), E2S (dA) を導入した F0 個体はいずれも再生に応答した EGFP 発現が観察されなかった (Fig. 24)。このことから E2S による再生応答には E-box と AP-1 の両方が必要であることが示された。

続いて、ゲノムから E4 タイプのトランスポゾン HE1_DR1 を PCR で増幅して、ランダムに選んだ 1 クローン HE1_DR1 (m) の再生応答をアッセイした。このクローンでは、E-box のリピートを含む領域の配列が E4 とは大きく異なっていた (Fig. 43)。その結果、-0.7 kb と miniP, どちらをプロモーターとして用いた場合にも再生に応答した発現誘導は観察されなかった (Fig. 44, 45)。

以上の結果は、RRE 活性には、E-box, AP-1 モチーフの配列が共に必要であることを支持している。

次に E-box と AP-1 モチーフ配列そのものに RRE としての活性があるかどうか調べるために、E-box と AP-1 モチーフを 6 回タンデムに繰り返した配列を、miniP または 0.7kb プロモーターの上流に挿入した (Fig. 42)。その結果、E-box, AP-1 のうち片方しかもたない 6xA-miniP, 6xE-miniP では再生に応答した EGFP の発現は観察されなかった。一方で、E-box, AP-1 の両方を含む 6xE-6xA-miniP や 6xE-0.7k では再生に応答した EGFP の発現が観察された (Fig. 45, 46)。また、E-box リピートを変異させた 6xE (m) -0.7k コンストラクトでは、再生応答は著しく低下した (Fig. 42)。

6xE-6xA-miniP の成体でヒレ再生過程を観察したところ、1 dpa で再生組織の先端部の傷上皮にまばらに EGFP の発現細胞が観察できた (Fig. 46-49)。その後、2dpa 以降では、上皮における EGFP の発現は弱くなり、4 dpa にて発現が観察されなくなった。

他方、6xE-0.7k では、幼生で切断したところ、1 dpa で 6xE-6xA-miniP と同様の細胞で発現が観察された (Fig. 45, 50-52)。この上皮の発現は 2 dpa では消えたが、一方で鰭条における間葉細胞での発現誘導が 2 dpa 以降で観察された (Fig. 49)。

以上より、AP-1 モチーフの配列 (6xA タンデムリピートか、0.7 kb 領域由来か) により、発現組織が一部異なるが、E-box と AP-1 の両方を含むことで、RRE として働くためには必要かつ十分であることが示された。

3-7 E-box / AP-1 による再生応答は様々な組織で機能する

以降の確立した RRE Tg 系統を使った応答機構の解析は、当研究室、吉田貴文（修士 2 年）と共同で行った。

ここまでで、E-box/AP-1 が、ヒレの再生における RRE であることが示された。次に、この RRE が、尾ひれ以外の組織においても RRE として機能するかを調べた。第一に、幼生のステージで、膜ヒレではなく、さらに前方の胴部で切断して、応答を観察した。上皮基底で応答する E2L と間葉で発現する E4 を用いて観察を行なった結果、E2, E4 いずれも切断部で EGFP の発現が観察された (Fig. 53, 54)。

また、尾ヒレ以外のヒレ、胸鰭では、E2L, E4 のいずれも、尾ヒレと同様に E2L は鰭条間で、E4 は鰭条の間葉組織において EGFP の発現が観察され (Fig. 55)、尾ヒレ以外のヒレ組織においても同様の応答をすることが明らかとなった。

さらに、ヒレ以外の組織である鱗でも再生過程を観察した。鱗に隣接する線維組織内に骨芽細胞が含まれており、骨芽細胞を可視化することにより、透明である鱗の再生過程の観察が可能となる (Iwasaki et al., 2018)。そのため、骨芽細胞のマーカー遺伝子である *sp7* の発現細胞を mCherry によって可視化した *Tg(sp7:mCherry)* を、E2L と E4 の Tg と交配させることで鱗の再生過程における EGFP の発現を観察した。すると E2L にて再生に応答した EGFP の発現が観察された (Fig. 56)。これによりヒレ以外の組織の再生でも応答することが明らかとなった。

次に、再生を伴わないような傷害への応答を調べるために、鰭条を貫通する様な穴をあけて再生させた場合と、鰭条間組織にスリットを入れた再生を伴わない傷害を加えた場合を比較した (Wang et al., 2020)。その結果、穴をあけた再生の誘導では、EGFP 発現が観察されたのに対し、再生芽の形成を伴わないスリットを加えた場合は EGFP の発現が観察されなかった (Fig. 57)。このことは RRE が再生にのみ応答することを示している。

3-8 アフリカツメガエルでも E-box / AP-1 に再生応答が機能する

さらに、E-box / AP-1 RRE がゼブラフィッシュだけでなく、生物種を超えて一般に保存されているかどうかを検証するために、アフリカツメガエルを用いて再生応答能をテストした。ゼブラフィッシュの成体の再生組織において、上皮が応答する *Tg(1.8k:egfp)* と、間葉細胞が応答する *Tg(6xE-0.7k:egfp)*、それぞれのコンストラクトを、アフリカツメガエルの受精卵に導入して、stage 52-54 で肢芽を切断して F0 アッセイを行った (Fig. 58a)。その結果、いずれにおいても再生に応答した EGFP の応答が観察された (Fig. 58b)。このことから、E-box / AP-1 RRE は種を超えて機能することが示された。

3-9 AP-1 と E-box のシグナル活性が再生応答エンハンサーの機能に必要である

次に、E-box や AP-1 を介したシグナルが、再生応答や再生に必須の役割を果たしているかどうか検証した。AP-1 の構成因子である Jun は、JNK (Jun N-terminal kinase) によってリン酸化され、活性化される (Gazon et al., 2018)。ゼブラフィッシュの先行研究においても、JNK による Junb ファミリータンパクの活性化が、再生に必要であることが示されている (Ishida et al., 2010)。AP-1 を介したシグナルが RRE 活性化に必要なかどうかを調べるために、JNK の阻害剤である SP600125 を *Tg(E2L:egfp)* と *Tg(E4-0.7k:egfp)* に投与し、再生過程の変化を観察した。その結果、どちらの Tg でも、EGFP の誘導が著しく低下すると共に (特に、E4 では再生に応答した EGFP の発現は観察されなかった)、再生も抑制された (Fig. 59)。

さらに、E-box を介したシグナルのノックダウンを試みた。RRE における E-box モチーフは、*tcf3/12* の結合配列に最も近かった。Tcf ファミリー-bHLH 転写因子は、N 末端のドメインを欠失したドミナントネガティブ (dn) Lef1 によって、 β カテニンとの結合が阻害されることが示されている (Vacik & Lemke, 2011)。dnLef1 を熱ショックプロモーター下に発現する Tg を作製し、実際に、胚における効果を調べると、尾部の形成に異常が見られた (Fig. 60)。これは報告されている β カテニン阻害の表現型と一致していることから (Ishitani et al., 2005)、dnLef1 が Tcf ファミリーの E-box への作用を阻害していることが示された。

次に、E2L, E4 の RRE Tg を用いて再生への応答を調べると、EGFP 誘導は阻害され、再生も進まないことが明らかとなった (Fig. 61, 62)。このことから、Tcf/Lef ファミリー因子の E-box モチーフへの作用は、RRE 活性化とともに再生に必須であることを示している。

4. 考察

4-1 E-box と AP-1 は協働することにより再生エンハンサーとして機能する

ゼブラフィッシュや killifish における再生エンハンサーの分析により、特定の RRE の機能に AP-1 のモチーフが必須であることが報告されている (Kang et al., 2016; Wang et al., 2020)。しかし、AP-1 モチーフが再生応答に必要な十分な配列であるか、また AP-1 モチーフが再生応答エンハンサーを制御する分子メカニズムは明らかになっていなかった。本研究では、再生応答エンハンサーを新たに複数同定し、これまで報告されてきた再生応答エンハンサーを含めて配列を比較し、E-box と AP-1 が共通して含まれていることを示した。また、Tg を用いたレポーターアッセイにより、この二つが再生応答エンハンサーの機能に必要なことが示された。

AP-1 は傷害やストレスなどに応答してアポトーシスや細胞分化の制御に関わることが知られており (Hess et al., 2004)、組織の恒常性の維持に重要なモチーフである。一方で、非常に広範囲の働きをもつ転写因子であり、役割や時期に応じた複数の制御メカニズムが存在することが予想される。実際、AP-1 の上流の JUN をリン酸化する JNK の制御因子として、ストレスに応答して活性化することが知られている MKK4/7 などが知られている (McCubrey, et al., 2007)。また、JUN, FOS の発現制御に関しても、上流シグナルとして p38 や ERK などの MAPK が TCF や ATF2 などの転写因子をリン酸化させることにより転写が活性化することが報告されている (Mendelson, et al., 1996)。このように AP-1 モチーフの活性は複数のシグナルによって複雑に制御されることが知られている。

本研究により AP-1 が周囲に存在する他の転写因子結合モチーフと協働することにより再生に応答した遺伝子発現を制御することが示された。このことは、AP-1 による遺伝子発現の誘導の制御が上流のシグナルに当たる JNK などの活性以外にも、AP-1 モチーフが周囲の配列の違いによっても制御されることを示している。このことは、AP-1 や JUN などによる複雑な遺伝子発現の制御メカニズムを詳細に解明するうえで重要な見解であるといえる。

また、ゼブラフィッシュのヒレ再生において JNK の上流シグナルに当たる *junb* や *junbl* が再生の初期に機能するシグナルであり、これら JUN ファミリーの機能を阻害することにより再生が阻害されることは報告されていたが (Ishida et al., 2010)、これらが遺伝子の転写に関わる具体的なメカニズムは分かっていない。本研究において、阻害剤を用いて JNK シグナルを阻害することによって E-box / AP-1 による再生応答が阻害されることが示された (Fig. 62)。このことはいまままで明らかになっていなかった *junb*, *junbl* の下流のシグナル経路が、RRE 内部の AP-1 モチーフの活性を制御することにより、直接的に再生応答遺伝子の転写に関与することで再生に寄与していることを示している。

4-2 組織や種を超えて E-box / AP-1 による再生応答が機能する。

これまでの報告されてきた RRE の発現誘導や分子メカニズムの解析において、RRE の同定や解析は特定の遺伝子に着目したものであり (Kang et al., 2016; Suzuki et al., 2019; Wang et al., 2020), 再生応答遺伝子間で共通するエンハンサーや分子メカニズムについてはわかっていない。

本研究により複数の再生応答遺伝子の周辺配列において保存されている再生応答エンハンサーを新たに同定した (Fig. 4)。これは再生応答が共通の分子メカニズムにより制御されている可能性を示すものである。組織の損傷後の再生初期にて、再生応答遺伝子もしくは RRE を直接活性化させ、再生を開始させるメカニズムは明らかになっていない。再生を開始させる要因として、ROS や細胞、損傷組織における電位の変化など様々な要因が予想されているが (Gauron et al., 2013; Kennard & Theriot, 2020), 明らかになってはいない。そのため、遺伝子間で共通する制御機構である RRE の上流シグナルや制御メカニズムを今後明らかにすることにより、再生そのものを開始させる要因が明らかになることが期待される。

また、遺伝子間で共通する再生応答エンハンサーが尾ひれ以外の組織や (Fig. 53-56), アフリカツメガエルで機能することも示された (Fig. 58)。このことは種間で再生応答の仕組みが共通している可能性を示しており、再生能の獲得の経緯を知るうえで重要な手がかりであるともいえる。本研究ではアフリカツメガエルの stage 52-54 のみを材料に実験を行っているが、アフリカツメガエルは幼生の一時期に組織再生ができなくなる不応期や成体など特定のステージにおいて組織再生の能力が大きく減少することが知られている (Phipps et al., 2020)。こうした再生能力を持たないステージでは、本研究で行った鰭条間の再生を伴わない損傷のように (Fig. 57), 損傷に応じた遺伝子の発現誘導が機能しないことが予想できる。アフリカツメガエルを用いたステージごとの比較実験は、同一個体内で同じ方法で損傷を与えることができるため、ゼブラフィッシュを用いて損傷方法を変更するよりもより詳細な再生能力の有無を決定する分子メカニズムの解析が期待できる。また、高い付加再生能力をもつ魚類、両生類だけでなく再生能力の低い哺乳類や全身再生を行うヒドラやプラナリアなどでも同様の実験・比較を行うことにより生物間で共通する恒常性維持機構が明らかになることが期待できる。

4-3 E-box と AP-1 は周辺配列の差により発現誘導する組織が異なる

本研究により RRE が E-box / AP-1 モチーフにより機能することを明らかにした。一方で、同じ E-box / AP-1 モチーフによる再生応答でもエンハンサー配列により再生を誘導する組織が大きく異なることが本研究で示されている。例えば、E2S による再生応答は *fn1b* に近い鰭条間での上皮基底層によるものであるのに対し (Fig. 36), 6xE-0.7k では鰭条における間葉細胞での発現が誘導される (Fig. 49)。

このように発現組織の差が生じる要因として、1) 組織特異的なエンハンサーが再生

エンハンサーと別に存在する, 2) エンハンサーの周辺の配列の違いによりモチーフに結合する転写因子が異なる。以上の2つのことが考えられる。

1) については本研究においても *Tg(3.2kb:egfp)* では *fn1b* の発現を再現した上皮基底層での発現が誘導されたのに対し (Fig. 19), それより範囲を狭めた *Tg(1.8kb:egfp)* では間葉細胞や再生芽で発現が観察された (Fig. 22)。このことは 3.2-1.8 kb の範囲に *fn1b* に類似した上皮基底層での発現を誘導するのに必要な情報が含まれていることを示しており, これが組織特異的エンハンサーであると考えられる。2) に関しては, 本研究において, dnLef1 の強制発現による実験により今回同定した RRE のコアとなっている E-box の機能に Tcf/Lef1 のシグナルが関与していることを示した (Fig. 62)。一方で, E-box モチーフは今回必要であることが示された Tcf 以外に myc や twist などの様々な bHLH 転写因子が結合するモチーフであることが知られている (Jones, 2004; Wang & Baker, 2015)。そのため, 今回検証した Tcf 以外の転写因子が結合し, 発現を制御していることも予想できる。シグナル経路を分析した E2L や 6xE-0.7k はともに発現誘導組織が異なる RRE ではあり (Fig. 33, 52), 共通して dnLef1 により発現誘導が阻害されている (Fig. 62)。しかし, 6xE-6xA-miniP のようにこの二つとは異なるパターンで遺伝子の発現を誘導する RRE も存在しており (Fig. 49), こうした発現ステージの異なる RRE では Tcf 以外の bHLH が結合して機能していることが期待できる。以上のことから, 今後ゲノム中に存在する E-box / AP-1 モチーフの詳細な分子メカニズムをさらに解析することにより, 再生過程において遺伝子発現の組織や時期などの違いが生じる要因が明らかになることが期待できる。

4-4 トランスポゾンの配列が再生応答エンハンサーとして機能する

トランスポゾン由来とした配列がエンハンサーとしての機能を持つ場合があることは知られている。例えばマウスのトランスポゾンである AmnSINE1 が発生期マウスを用いた実験にて組織特異的なエンハンサーとして機能することを示している (Nishihara et al., 2006)。このことから, 進化の過程において遺伝子が特定の機能を獲得するのにトランスポゾンの拡散が関与していることが予想される。RRE が再生応答遺伝子形成される経緯は明らかになっていないが, 同様にトランスポゾンが関与していることは十分に期待できる。

本研究で RRE として同定した E4, E5, E6 はトランスポゾン由来のものであり (Fig. 7, 8, 9), このことはトランスポゾンが再生応答遺伝子の特異的な発現の制御に関わっていることを示している。

本研究で報告したいくつかの再生応答エンハンサーや E-box / AP-1 モチーフはトランスポゾン由来のものであった。現在進化の過程において再生能を獲得した経緯はわかっていないが, トランスポゾン由来する配列が再生エンハンサーとしての機能を有していたことから, ゲノム中における E-box / AP-1 モチーフを含むトランスポゾン

の増幅・分散によって各遺伝子の周囲に広がることにより、再生機能の獲得に関わっていることが推測できる。本研究における分析でも実際に再生応答エンハンサーに類似したトランスポゾンが多数保存されていた (Fig. 6-9)。一方で、HE1_DR1 の配列を用いた実験よりゲノム中のトランスポゾンを由来とする配列の一部には、RRE としての機能を失っているものが存在することが示された (Fig. 44)。このことから、トランスポゾンを由来とする配列の中にはエンハンサーとしての機能を失っているものが多数存在すると予想される。

以上のことから、進化の過程で再生能の獲得の経緯として以下の仮説が考えられる。まず、AP-1 は進化上古い起源をもつモチーフであり (Nishihara, 2019), そのため、E-box との組み合わせ以外でも、独自に損傷に対して応答した機能を持つ可能性が高い。実際、AP-1 は再生以外でもストレスなどの外部の刺激に対して活性化することが報告されており (Hess et al., 2004), 再生に対する応答は後から追加されたものと予想できる。もともと外部からの刺激に対して機能していた AP-1 の近傍に E-box を含んだトランスポゾンが増幅・転移することにより E-box と AP-1 のモチーフの組み合わせができた と推測できる。こうして E-box と AP-1 の組み合わせを獲得した遺伝子が再生に対する応答能をもったと考える (Fig. 63)。その後、進化の過程で、本研究で見られた HE1_DR1 (m) のように、挿入されたトランスポゾンやその内部の E-box に変異が生じることにより E-box / AP-1 の組み合わせが失われ、再生能が失われていったものと考えられる。本研究で見つかったトランスポゾンを由来とする配列は多くが 12~15 % の変異が生じており、上記で述べたように哺乳類では約 7 % の変異が生じることから、数千万年前から長くとも 2 億年前より以前に挿入されたものと推定できる (Lander et al., 2001)。ゼブラフィッシュが含まれる硬骨魚類に分化したのが 3 億年以上前であり、ヒレの付加再生の能力に明確な差が見られる軟骨魚類との分化が 4 億 5 千万年以上前のことであることを踏まえると (Darnet et al., 2019), 本研究で報告したトランスポゾンを由来とする RRE が進化の過程における付加再生の直接的な起源になっているとは考えにくい。現在のところ、硬骨魚類の種間で再生能力の差に関する知見はないが、能力や分子メカニズムに違いが見られた場合、その再生能力の違いについて説明するのに今回発見された RRE が重要となることが期待できる。

また、トランスポゾンを由来とする配列以外にも RRE としての機能をもつ配列が存在することが示された。本研究で再生応答への活性がみられた E2S はトランスポゾンに隣接しているが、トランスポゾンとは異なる配列である (Fig. 24)。進化の過程で再生能の獲得の過程について詳細に調べるために、今後トランスポゾン以外を由来とした RRE の解析も進めていく必要がある。

5. 参考文献

1. Akieda, Y. et al. Cell competition corrects noisy Wnt morphogen gradients to achieve robust patterning in the zebrafish embryo. *Nat. Commun.* **10**, 4710 (2019).
2. Akimenko, M.A., Marí-Beffa, M., Becerra, J., & Géraudie, J. Old questions, new tools, and some answers to the mystery of fin regeneration. *Dev. Dyn.* **226**, 190–201 (2003).
3. Ando, K., Shibata, E., Hans, S., Brand, M. & Kawakami, A. Osteoblast Production by Reserved Progenitor Cells in Zebrafish Bone Regeneration and Maintenance. *Dev. Cell* **43**, 643-650 (2017).
4. Bao, W., Kojima, K. K., & Kohany, O. Repbase Update, a database of repetitive elements in eukaryotic genomes. *Mob. DNA* **6**, 11 (2015).
5. Bely, A. E. & Nyberg, K. G. Evolution of animal regeneration: re-emergence of a field. *Trends Ecol. Evol.* **25**, 161-170 (2010).
6. Bosch, T. C. Why polyps regenerate and we don't: towards a cellular and molecular framework for Hydra regeneration. *Dev. Biol.* **303**, 421-433. (2007).
7. Carlson B. M. Muscle regeneration in amphibians and mammals: passing the torch. *Dev. Dyn.* **226**, 167-181 (2003).
8. Carlson, B. M. Some principles of regeneration in mammalian systems. *Anat. Rec. B. New Anat.* **287**, 4-13 (2005).
9. Chandebais, R. Histogenesis and morphogenesis in planarian regeneration. Monogr. *Dev. Biol.* **11**, 1-182 (1976).
10. Darnet, S. et al. Deep evolutionary origin of limb and fin regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **116**, 15106-15115 (2019).
11. Fornes, O. et al. JASPAR 2020: update of the open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res.* **48**, D87-D92 (2020).
12. Gauron, C. et al. Sustained production of ROS triggers compensatory proliferation and is required for regeneration to proceed. *Sci. Rep.* **3**, 2084 (2013).
13. Gazon, H., Barbeau, B., Mesnard, J. M. & Peloponese, J. M. Jr. Hijacking of the AP-1 Signaling Pathway during Development of ATL. *Front Microbiol.* **8**, 2686 (2017).
14. Gemberling, M., Bailey, T.J., Hyde, D.R., & Poss, K.D. The zebrafish as a model for complex tissue regeneration. *Trends Genet.* **29**, 611–620 (2013).
15. Han, M., Yang, X., Taylor, G., Burdsal, C. A., Anderson, R. A., & Muneoka, K., Limb regeneration in higher vertebrates: developing a roadmap. *Anat. Rec. B. New Anat.* **287**, 14-24 (2005).

16. Harris, R. E., Setiawan, L., Saul, J., & Hariharan, I. K. Localized epigenetic silencing of a damage-activated WNT enhancer limits regeneration in mature *Drosophila* imaginal discs. *Elife* **3**, 5 (2016).
17. Hasegawa, T. et al. Transient inflammatory response mediated by interleukin-1 β is required for proper regeneration in zebrafish fin fold. *Elife* **23**, 6(2017).
18. Hata, S., Namae, M., & Nishina, H. Liver development and regeneration: from laboratory study to clinical therapy. *Dev. Growth Differ.* **49**, 163-170 (2007).
19. Hess, J., Angel, P., & Schorpp-Kistner, M. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J. Cell Sci.* **117**, 5965-5973 (2004).
20. Hicklin, J. & Wolpert L. Positional information and pattern regulation in hydra: the effect of γ -radiation. *J. Embryol Morphol* **30**, 741-752 (1973).
21. Ishida, T., Nakajima, T., Kudo, A. & Kawakami, A. Phosphorylation of Junb family proteins by the Jun N-terminal kinase supports tissue regeneration in zebrafish. *Dev. Biol.* **340**, 468-479 (2010).
22. Ishitani, T., Matsumoto, K., Chitnis, A. B. & Itoh, M. Nrarp functions to modulate neural-crest-cell differentiation by regulating LEF1 protein stability. *Nat. Cell Biol.* **7**, 1106-1112 (2005).
23. Iwasaki, M., Kuroda, J., Kawakami, K., & Wada, H. Epidermal regulation of bone morphogenesis through the development and regeneration of osteoblasts in the zebrafish scale. *Dev Biol.* **437**, 105-109 (2018).
24. Jones, S. An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biol.* **5**, 226 (2004).
25. Jurka, J. et al. Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. *Cytogenet. Genome Res.* **110**, 462-467 (2005).
26. Kang, J. et al. Modulation of tissue repair by regeneration enhancer elements. *Nature* **532**, 201 (2016).
27. Kawakami, A. Stem cell system in tissue regeneration in fish. *Dev. Growth Differ.* **52**, 77-87 (2010).
28. Kawakami, A., Fukazawa, T. & Takeda, H. Early fin primordia of zebrafish larvae regenerate by a similar growth control mechanism with adult regeneration. *Dev. Dyn.* **231**, 693-699, (2004).
29. Kawakami, K, et al. A transposon-mediated gene trap approach identifies developmentally regulated genes in zebrafish. *Dev. Cell* **7**, 133-144 (2004).
30. Kennard, A. S. & Theriot, J. A. Osmolarity-independent electrical cues guide rapid response to injury in zebrafish epidermis. *Elife* **9**, e62386 (2020).

31. Kragl, M., & Tanaka, E. M. Grafting axolotl (*Ambystoma mexicanum*) limb skin and cartilage from GFP+ donors to normal hosts. *Cold Spring Harb. Protoc.* **8**, prot5266 (2009).
32. Lander, E. S. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921. (2001).
33. Lee, Y., Grill, S., Sanchez, A., Murphy-Ryan, M. & Poss, K. D. Fgf signaling instructs position-dependent growth rate during zebrafish fin regeneration. *Development* **132**, 5173-83 (2005).
34. McCubrey, J. A. et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta.* **1773**, 1263-1284 (2007).
35. Mendelson, K. G., Contois, L. R., Tevosian, S. G., Davis, R. J., & Paulson, K. E. Independent regulation of JNK/p38 mitogen-activated protein kinases by metabolic oxidative stress in the liver. *Proc. Natl. Acad Sci. USA.* **93**, 12908-12913 (1996).
36. Michalopoulos, G. K. Liver regeneration. *J. Cell Physiol.* **213**, 286–300 (2007).
37. Nakatani, Y., Kawakami, A., & Kudo, A. Cellular and molecular processes of regeneration, with special emphasis on fish fins. *Dev. Growth Differ.* **49**, 145-154 (2007).
38. Nishihara, H. Transposable elements as genetic accelerators of evolution: contribution to genome size, gene regulatory network rewiring and morphological innovation. *Genes Genet. Syst.* **94**, 269–281 (2019)
39. Nishihara, H., Smit, A. F. & Okada, N. Functional noncoding sequences derived from SINEs in the mammalian genome. *Genome Res.* **16**, 864-874 (2006).
40. Phipps, L. S., Marshall, L., Dorey, K., & Amaya, E. Model systems for regeneration: *Xenopus*. *Development* **147**, dev180844 (2020).
41. Poleo, G., Brown, C. W., Laforest, L., & Akimenko, M. A. Cell proliferation and movement during early fin regeneration in zebrafish. *Dev. Dyn.* **221**, 380-90 (2001).
42. Poss, K. D. et al. Roles for Fgf signaling during zebrafish fin regeneration. *Dev. Biol.* **222**, 347-58 (2000).
43. Poss, K.D., Keating, M.T., & Nechiporuk, A. Tales of regeneration in zebrafish. *Dev. Dyn.* **226**, 202–210 (2003).
44. Ramirez, A. N. Loubet-Seneor K. & Srivastava M. A Regulatory Program for Initiation of Wnt Signaling during Posterior Regeneration. *Cell Rep.* **32**, 108098 (2020).
45. Shibata, E. et al. Fgf signalling controls diverse aspects of fin regeneration. *Development* **143**, 2920–2929 (2016).

46. Shibata, E., Ando, K., Murase, E., & Kawakami, A. Heterogeneous fates and dynamic rearrangement of regenerative epidermis-derived cells during zebrafish fin regeneration. *Development* **145**, dev162016 (2018).
47. Shimizu, N. Kawakami, K. & Ishitani, T. Visualization and exploration of Tcf/Lef function using a highly responsive Wnt/beta-catenin signaling-reporter transgenic zebrafish. *Dev. Biol.* **370**, 71-85 (2012).
48. Suzuki, N., Hirano, K., Ogino, H. & Ochi, H. Arid3a regulates nephric tubule regeneration via evolutionarily conserved regeneration signal-response enhancers. *Elife* **8**, e43186 (2019).
49. Thisse, C. & Thisse, B. High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat. Protoc.* **3**, 59-69 (2008).
50. Tu, S. & Johnson, S.L. Fate restriction in the growing and regenerating zebrafish fin. *Dev. Cell* **20**, 725–732 (2011).
51. Vacik, T. & Lemke, G. Dominant-negative isoforms of Tcf/Lef proteins in development and disease. *Cell Cycle* **10**, 4199-4200 (2011).
52. Wang, L. H. & Baker, N.E. E Proteins and ID Proteins: Helix-Loop-Helix Partners in Development and Disease. *Dev. Cell* **35**, 269-280 (2015).
53. Wang, W. et al. Changes in regeneration-responsive enhancers shape regenerative capacities in vertebrates. *Science* **369**, eaaz3090 (2020).
54. Wehner, D. & Weidinger, G. Signaling networks organizing regenerative growth of the zebrafish fin. *Trends Genet.* **6**, 36-43 (2015).
55. Witten, P. E., & Huysseune, A. A comparative view on mechanisms and functions of skeletal remodelling in teleost fish, with special emphasis on osteoclasts and their function. *Biol. Rev. Camb. Philos Soc.* **84**, 315-346 (2009).
56. Yoshinari, N., Ishida, T., Kudo, A. & Kawakami, A. Gene expression and functional analysis of zebrafish larval fin fold regeneration. *Dev. Biol.* **325**, 71-81 (2009).

6. 図表

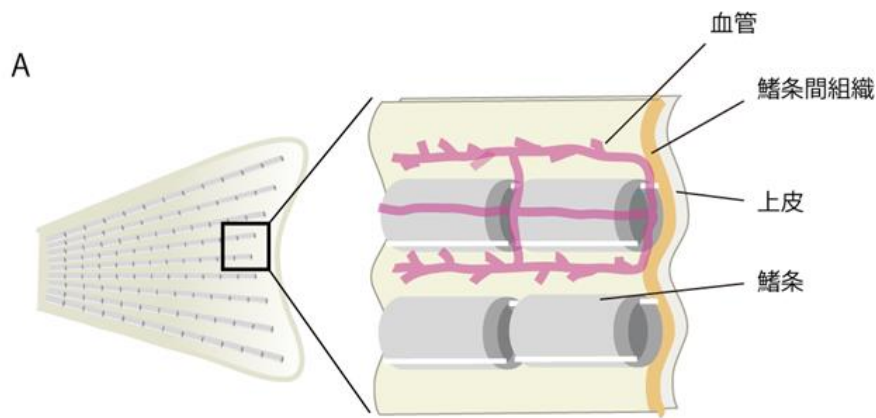


Fig. 1 ゼブラフィッシュの成体の尾ヒレの構造

ゼブラフィッシュ成体の尾ヒレとその拡大図。

2枚の瓦状の骨からなる鱗条とその間の鱗条間組織から構成される。

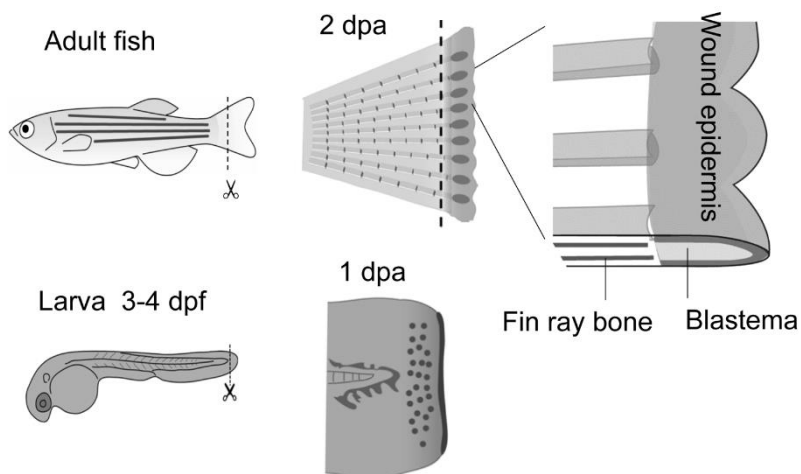


Fig. 2 ゼブラフィッシュのヒレ、膜ヒレの再生

ゼブラフィッシュの成体(上)と幼生(下)の全身と再生過程。切断後、成体では2 dpa, 幼生では1 dpa までに再生組織が形成される。

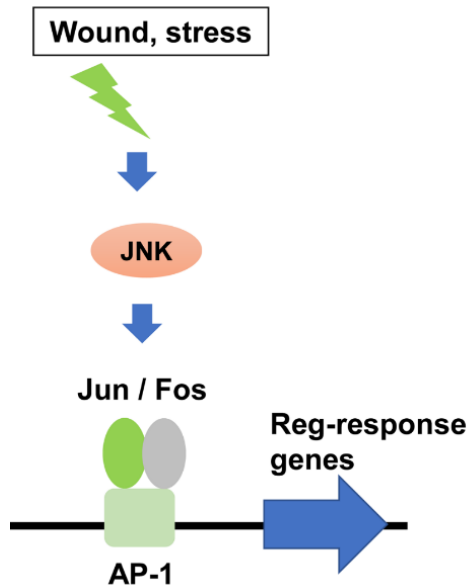


Fig. 3 AP-1 モチーフによる再生応答遺伝子の活性化

傷害やストレスなどに対応して JNK が活性化し、JUN がリン酸化され、標的遺伝子の発現を誘導する。

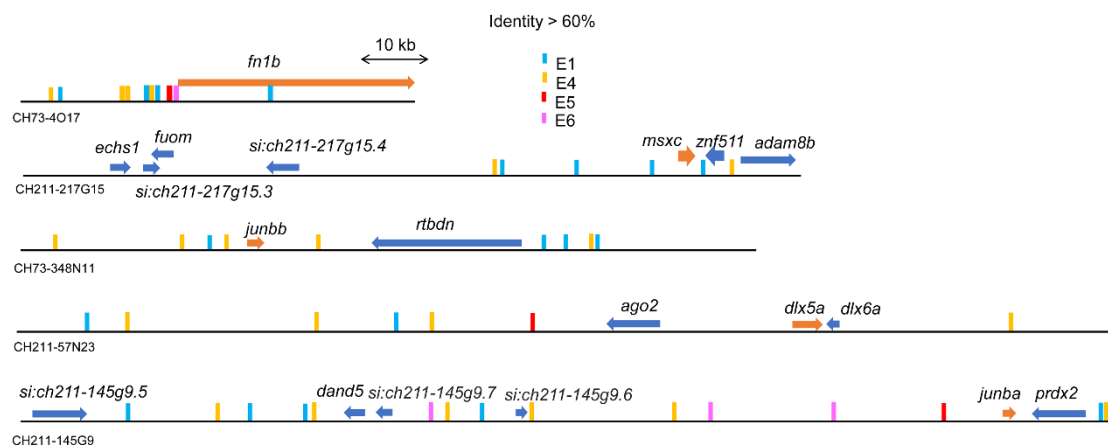


Fig. 4 BAC 配列中における E1, E4, E5, E6 の分布

再生応答遺伝子である *fn1b*, *msxc*, *junbb*, *dlx5a*, *junba* を含んだ BAC。橙色の矢印は再生応答遺伝子の位置と向きを示しており、青の矢印はその他の遺伝子の位置を示している。配列上の四角は 60 %以上の相動性が保存されている保存配列の位置を示している。

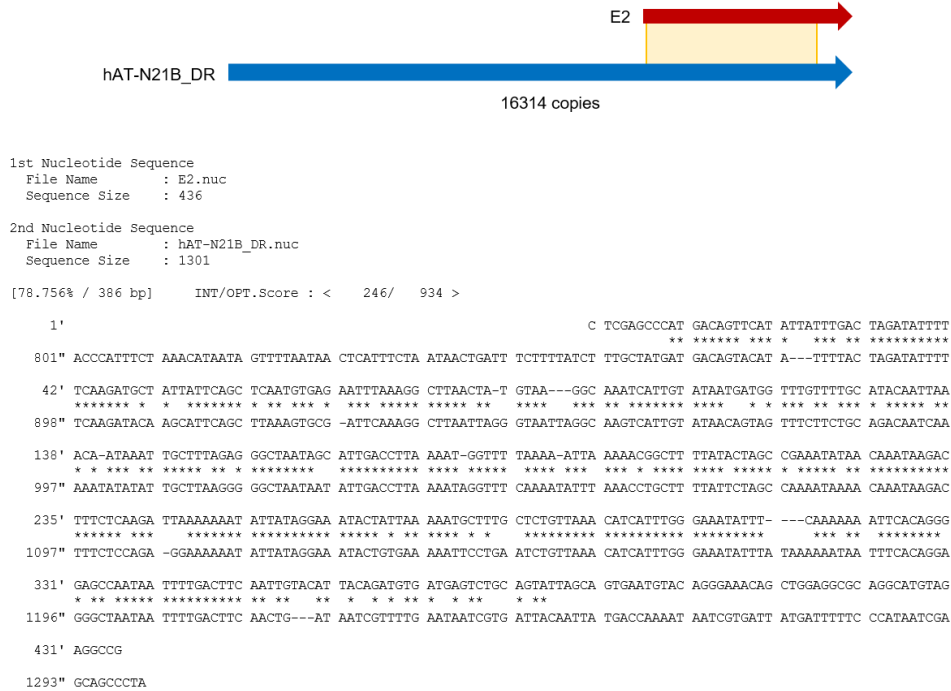


Fig. 6 E2 と hAT-N21B_DR の配列比較

hAT-N21B_DR と E2 間のホモロジー検索の結果、hAT-N21B_DR の一部と E2 と高い相同性を持っている。



Fig. 7 E5 と DNA-X-4_DR の配列比較

DNA-X-4_DR の一部と E5 が高い相同性を持っている。

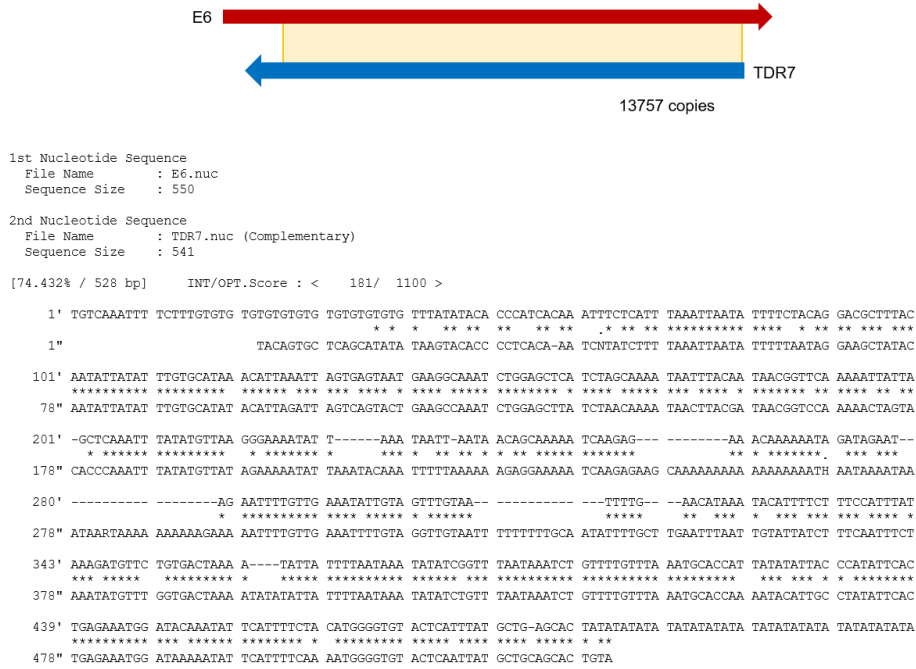


Fig. 8 E6 と TDR7 の配列比較
TDR7 の一部と E6 が高い相同性を持っている。

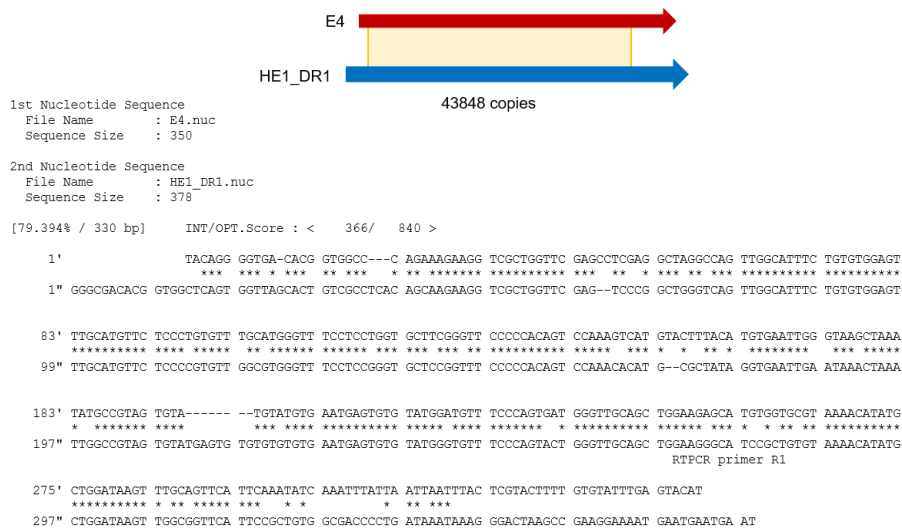


Fig. 9 E4 と HE1_DR1 の配列比較
HE1_DR1 と E4 間のホモロジー検索の結果。E4 は HE1_DR1 を由来とした配列である。

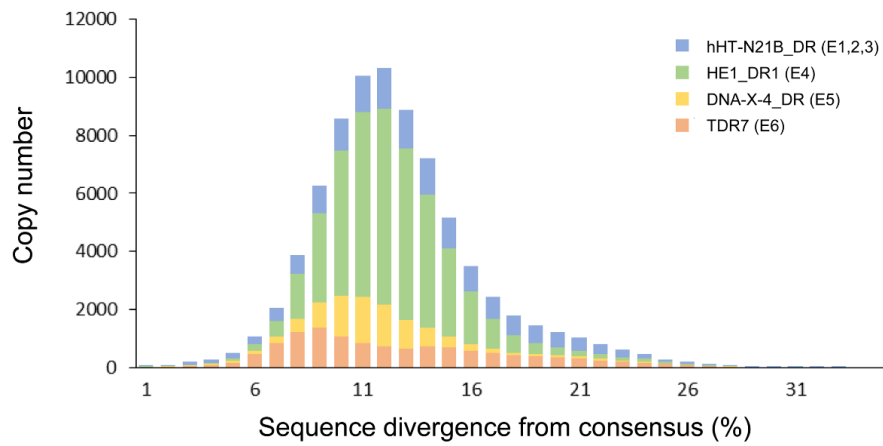


Fig. 10 トランスポゾンの変異の分布

横軸はトランスポゾンの配列中の変異の割合，縦軸はトランスポゾンの個数を示している。12~15%の変異が生じているものが多数であることが示された。

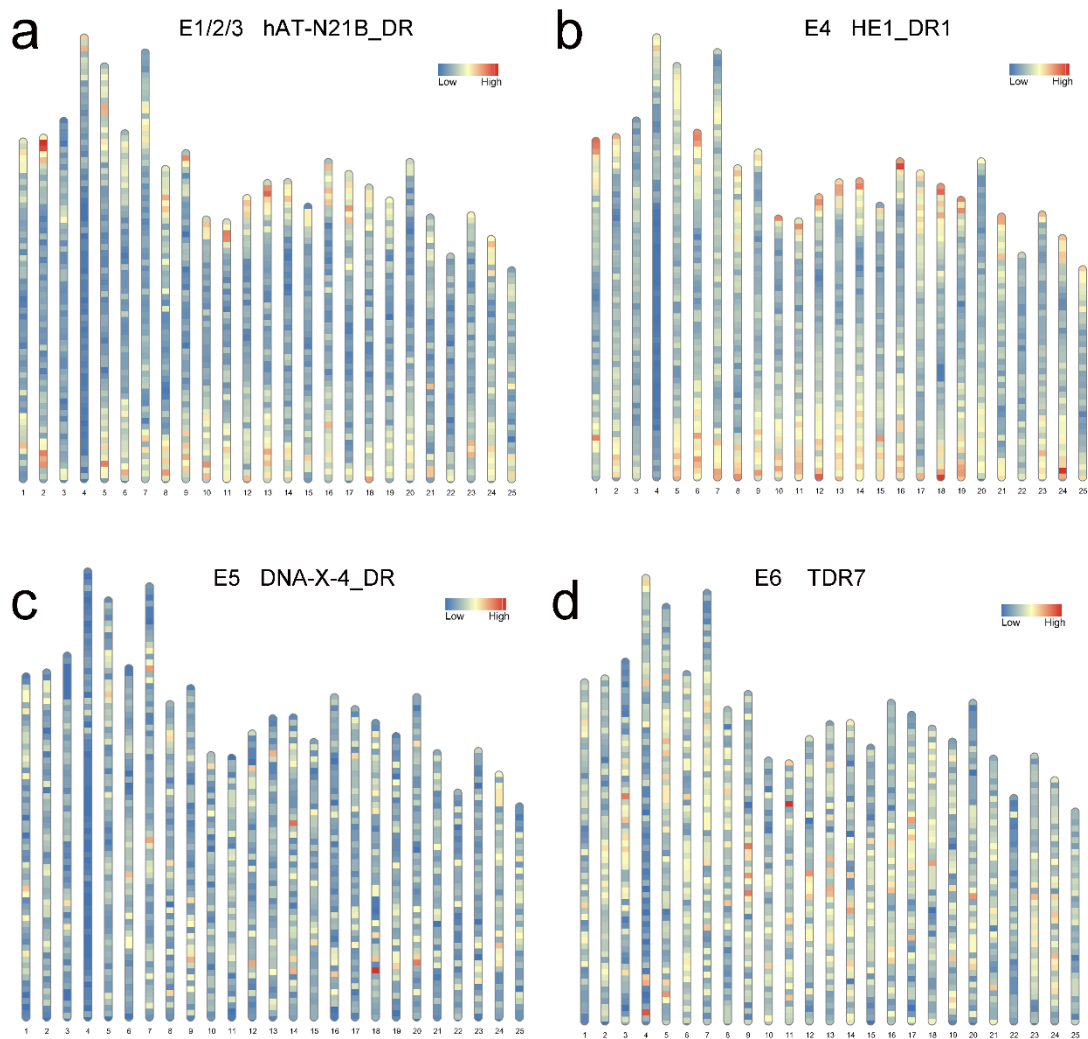


Fig. 11 ゼブラフィッシュゲノム内におけるトランスポゾンの分布

(a) hAT-N21B_DR, (b) HE1_DR1, (c) DNA-X-4, (d) TDR7 のゼブラフィッシュゲノム内における分布のヒートマップ。赤色は各トランスポゾンが多く保存されている領域を示している。

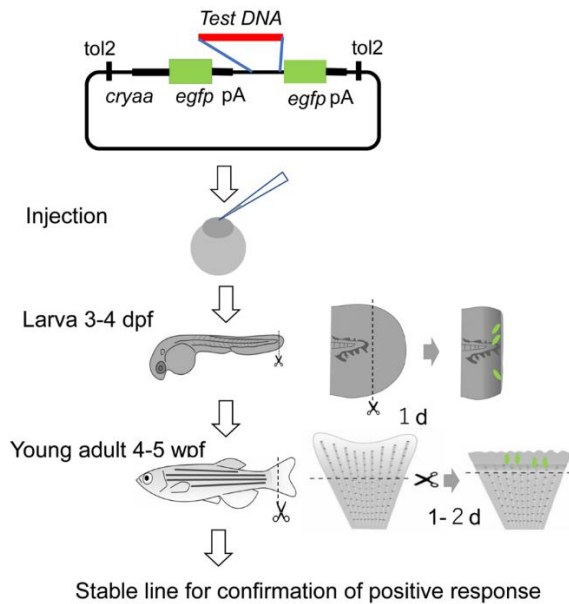


Fig. 12 Tg を用いた再生応答のアッセイ

プラスミド内の *egfp* 遺伝子の直前に目的となる配列を挿入し、コンストラクトをゼブラフィッシュ胚に導入する。その後、3-4 dpf の幼生と成体のステージでヒレを切断し、EGFP の発現の再生応答を観察する。応答したと考えられたものは、Tg 系統を確立して、応答を確認する。

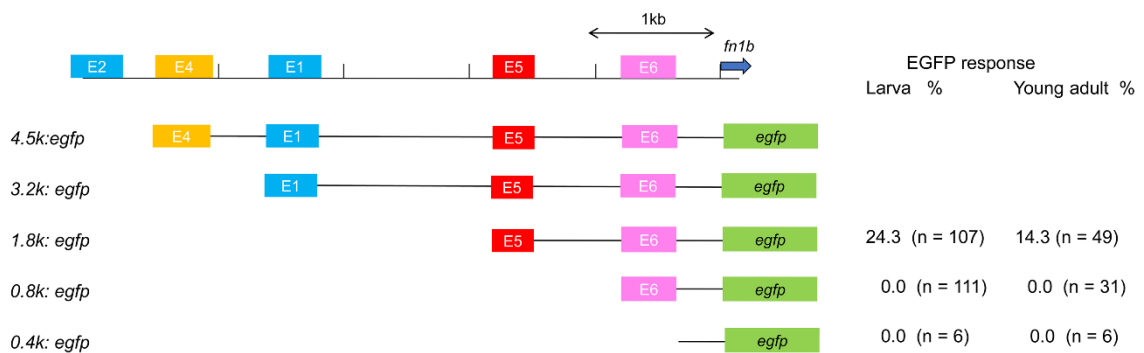


Fig. 13 *fn1b* のプロモーターコンストラクト模式図と F0 アッセイの結果

再生応答の活性を調べた *fn1b* プロモーター領域を含むコンストラクトの模式図。右側の数字は、*cryaa* : *egfp* の蛍光が強い F0 の中で、観察された EGFP 発現の比率を示す。n は、*cryaa* : *egfp* が発現した個体数。

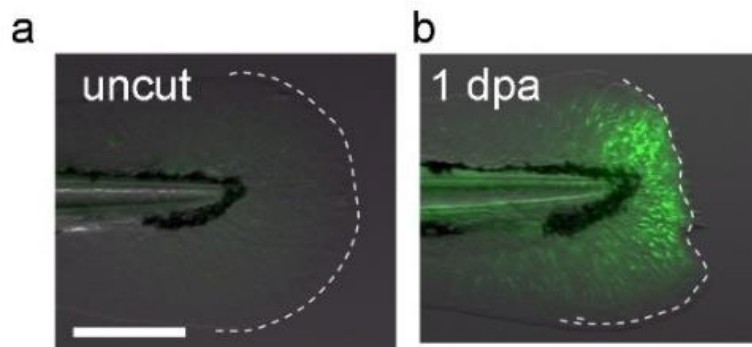


Fig. 14 *Tg(4.5k:egfp)* の幼生での再生応答

Tg(4.5k:egfp) の未切断ヒレ(a), および 1 dpa ヒレ(b) における EGFP の発現。白線は 50 μ m。点線は膜ヒレの輪郭。n > 5

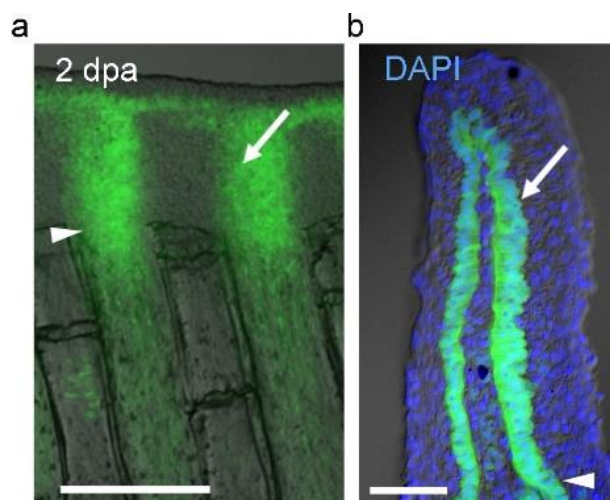


Fig.15 *Tg(4.5k:egfp)* の成体での再生応答

(a) ホールマウントと(b) 凍結切片。凍結切片は DAPI で核を染色している。矢印は EGFP の発現位置, 矢頭は切断箇所を示す。白線は(a) 500 μ m, (b) 100 μ m, n > 5

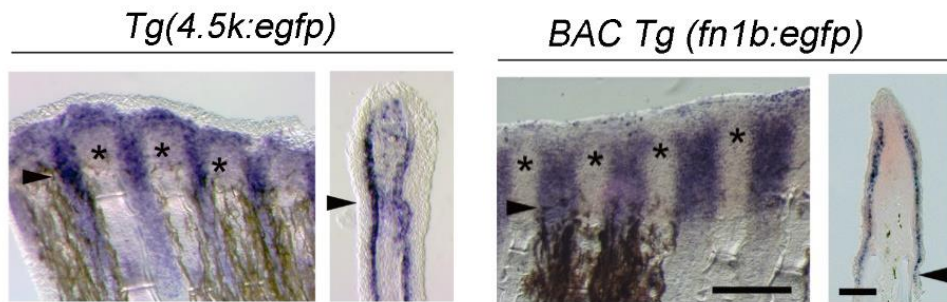


Fig. 16 *Tg(4.5k:egfp)*と*Tg(fn1b:egfp)*の成体ヒレでの*egfp*プローブISH
Tg(4.5k:egfp) (左)と*Tg(fn1b:egfp)* (右)。それぞれ左はヒレの全体像，右はその切片。
 矢頭は切断箇所，アスタリスクは鰭条の位置を示す

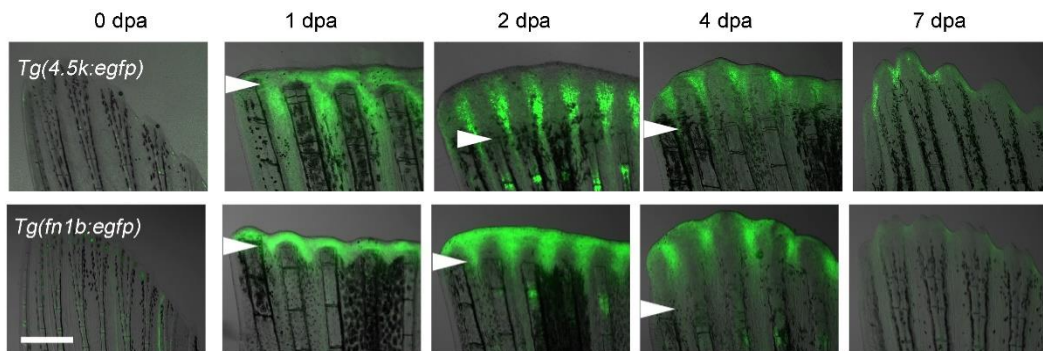


Fig. 17 *Tg(4.5k:egfp)* と *Tg(fn1b:egfp)* 成体におけるEGFPの再生応答発現
 (上) *Tg(4.5k:egfp)* と (下) *Tg(fn1b:egfp)* の0-7 dpaまでのEGFPの発現。白矢頭は切断箇所を示す。いずれも1 dpaから発現が上昇し，7 dpaにはEGFPの発現が弱くなっていることが観察された。白線は500 μ m

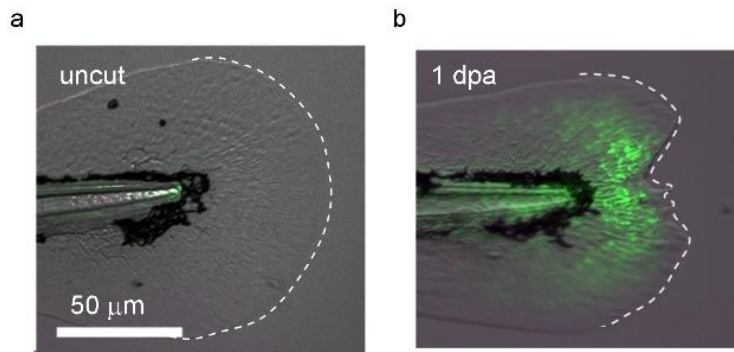


Fig. 18 *Tg(3.2k:egfp)* における幼生ステージでの再生応答による EGFP 発現誘導
Tg(3.2k:egfp) の未切断膜ヒレ (a), および 1 dpa 膜ヒレ (b) における EGFP の発現。白線は 50 μm を示しており、点線は膜ヒレの輪郭を示す。n > 5

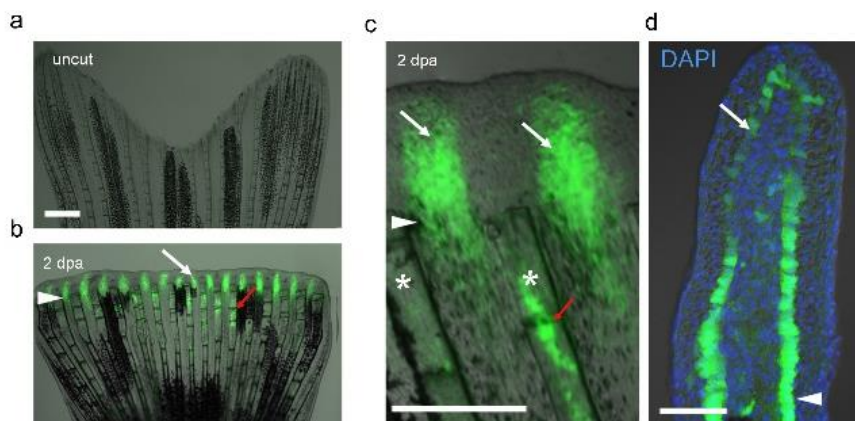


Fig. 19 *Tg(3.2k:egfp)* の成体ヒレにおける EGFP の発現誘導
Tg(3.2k:egfp) の成体ヒレの (a)未切断, (b)2 dpa 全体, (c)2 dpa 拡大, (d)2 dpa の凍結切片
 白矢印は EGFP の発現箇所, 赤矢印は鰭条内における EGFP の発現箇所, アスタリスクは鰭条の位置, 白矢頭は切断位置を示す。白線は (a, c) 500 μm , (d)100 μm , n > 5

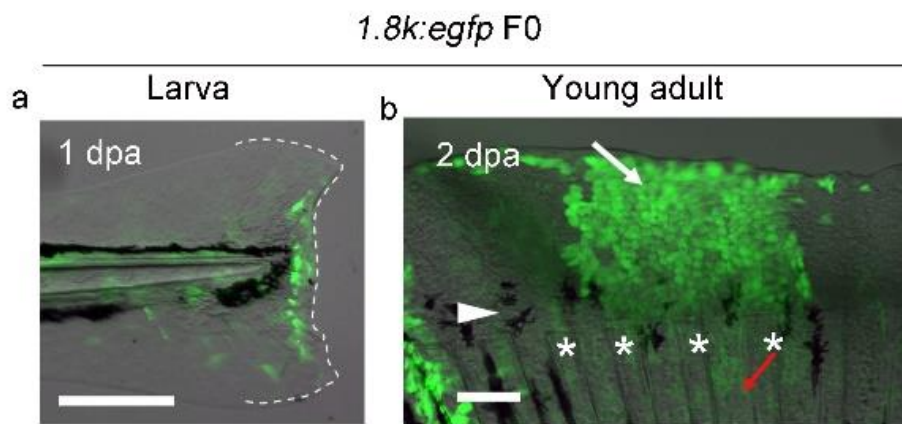


Fig. 20 *Tg(1.8k:egfp)* (F0) における再生応答による EGFP 発現誘導

Tg(1.8k:egfp) (F0)の幼生膜ヒレ 1 dpa (a), および成体 2 dpa ヒレ(b) における EGFP の発現。白線は 50 μm を示しており、点線は膜ヒレの輪郭、白矢印は再生組織内の EGFP 発現、赤矢印は鰭条内の EGFP 発現、アスタリスクは鰭条の位置、白矢頭は切断位置をそれぞれ示す。

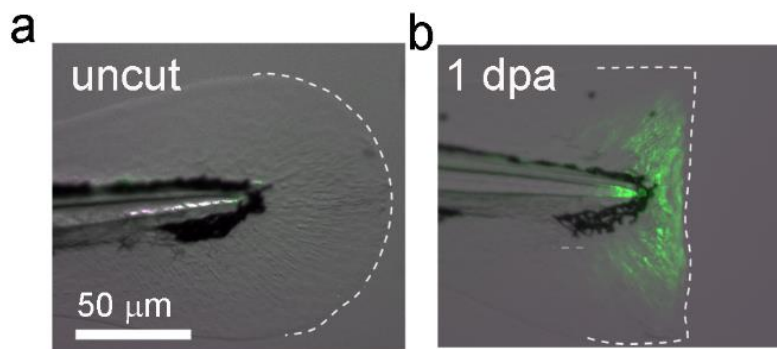


Fig. 21 *Tg(1.8k:egfp)* 幼生における再生応答

*Tg(1.8k:egfp)*の未切断膜ヒレ (a), および 1 dpa 膜ヒレ (b) における EGFP の発現。白線は 50 μm を示しており、点線は膜ヒレの輪郭を示す。n = 35

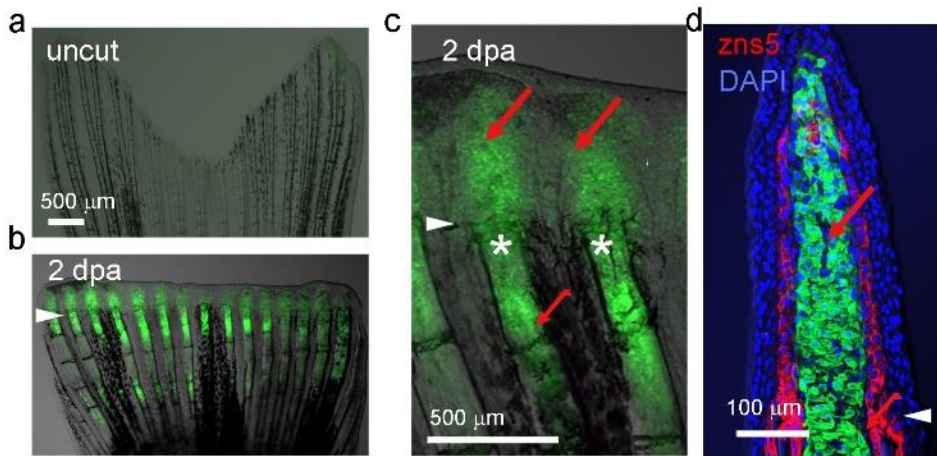


Fig. 22 *Tg(1.8k:egfp)* の成体ヒレにおける再生応答

Tg(1.8k:egfp) の成体ヒレの (a)未切断, (b) 2 dpa 全体, (c) 2 dpa 拡大, (d) 2 dpa の凍結切片。白矢印はEGFPの発現箇所, 赤矢印は鰭条内におけるEGFPの発現箇所, アスタリスクは鰭条の位置, 白矢頭は切断位置を示す。n = 16

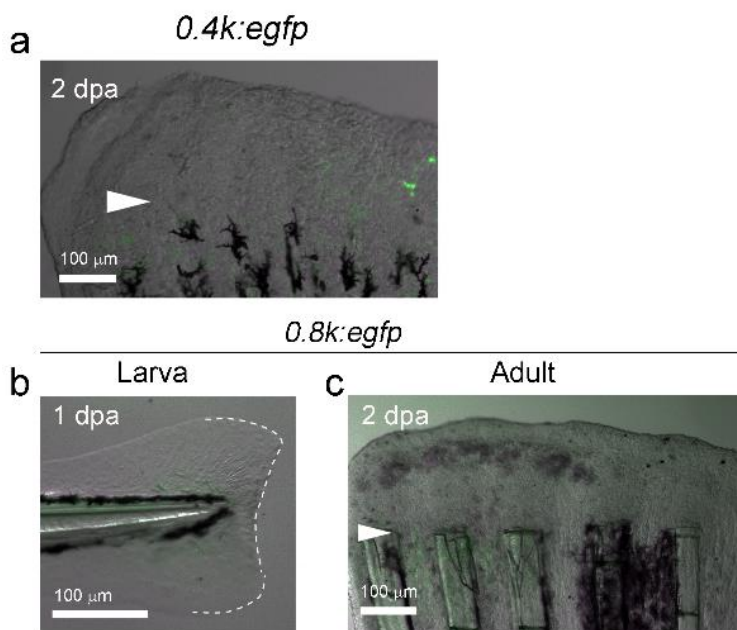


Fig. 23 *Tg(0.4k:egfp)*, *Tg(0.8k:egfp)* (F0) における再生応答

Tg(0.4k:egfp) (F0) の成体 2 dpa (a), および *Tg(0.4k:egfp)* (F0)の膜ヒレ 1 dpa (b) と成体 2 dpa ヒレ (c) におけるEGFPの発現。白線 100 μm を示しており, 点線は膜ヒレの輪郭, 白矢頭は切断位置をそれぞれ示す。

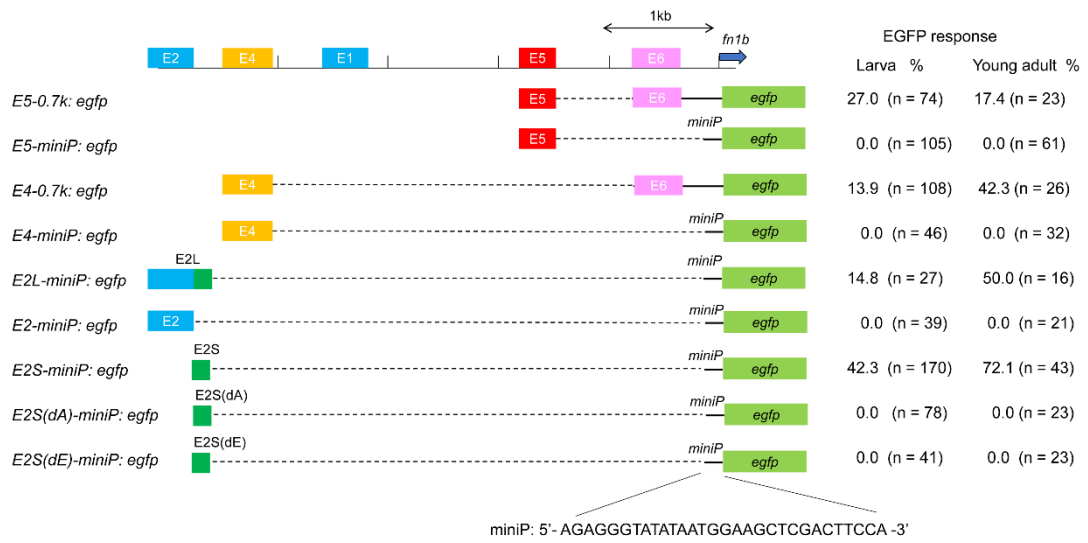


Fig. 24 E4, E5, E2 を含むコンストラクトと F0 アッセイの結果

再生応答の活性を調べた *fn1b* プロモーター領域を含むコンストラクトの模式図。右側の数字は、*cryaa:egfp* の蛍光が強い F0 の中で、観察された EGFP 発現の比率を示す。n は *cryaa:egfp* が発現した個体数。

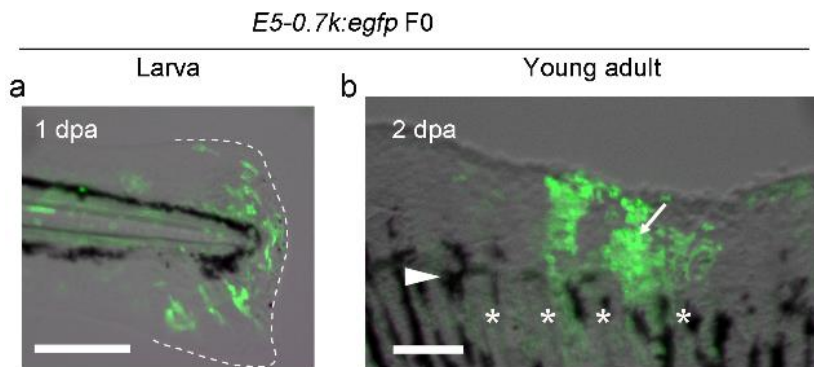


Fig. 25 *Tg(E5-0.7k:egfp)* (F0) における再生応答

Tg(E5-0.7k:egfp) (F0) の幼生膜ヒレ 1 dpa (a), および成体 2 dpa ヒレ (b) における EGFP の発現。白線は 50 μ m を示しており、点線は膜ヒレの輪郭、白矢印は再生組織内の EGFP 発現、赤矢印は鰭条内の EGFP 発現、アスタリスクは鰭条の位置、白矢頭は切断位置をそれぞれ示す。

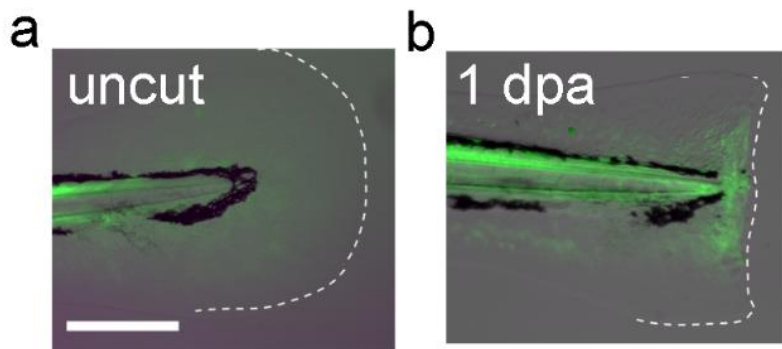


Fig. 26 *Tg(E5-0.7k:egfp)* における幼生での再生応答

Tg(E5-0.7k:egfp) の未切断膜ヒレ (a), および 1 dpa 膜ヒレ (b) における EGFP の発現。白線は 50 μm を示しており、点線は膜ヒレの輪郭を示す。n = 7

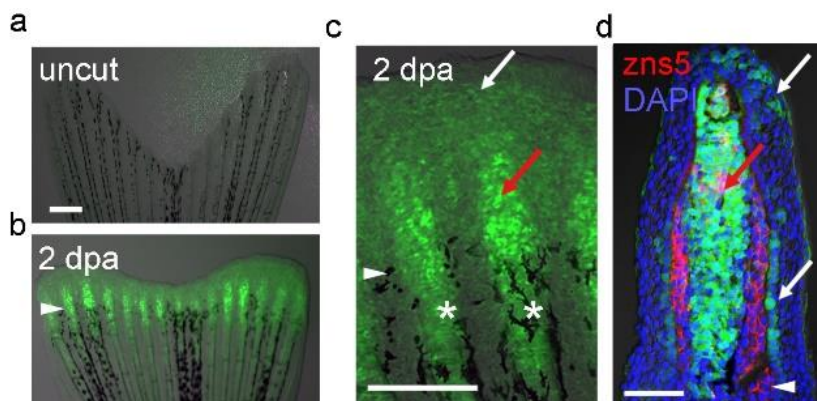


Fig. 27 *Tg(E5-0.7k:egfp)* の成体ヒレにおける EGFP の発現誘導

Tg(E5-0.7k:egfp) の成体ヒレの (a) 未切断, (b) 2 dpa 全体, (c) 2 dpa 拡大, (d) 2 dpa の凍結切片白矢印は EGFP の発現箇所, 赤矢印は鰭条内における EGFP の発現箇所, アスタリスクは鰭条の位置, 白矢頭は切断位置を示す。白線は(a, c) 500 μm , (d)100 μm を示す。n = 6

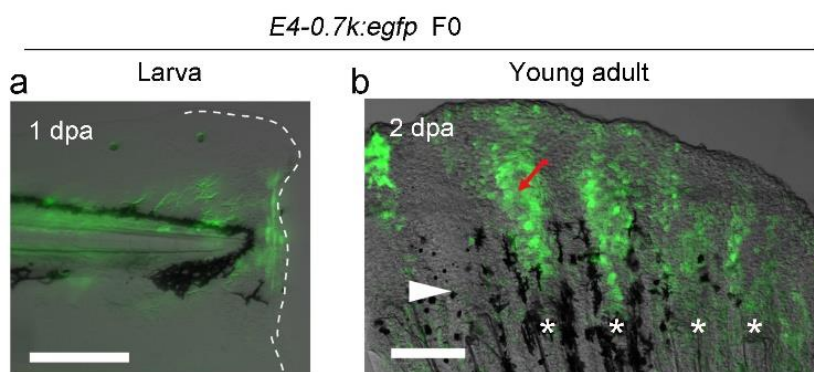


Fig. 28 *Tg(E4-0.7k:egfp)* (F0) における再生応答

Tg(E4-0.7k:egfp) (F0) の幼生膜ヒレ 1 dpa (a), および成体 2 dpa ヒレ (b) における EGFP の発現。白線は 50 μm を示しており、点線は膜ヒレの輪郭、白矢印は再生組織内の EGFP 発現、赤矢印は鰭条内の EGFP 発現、アスタリスクは鰭条の位置、白矢頭は切断位置をそれぞれ示す。

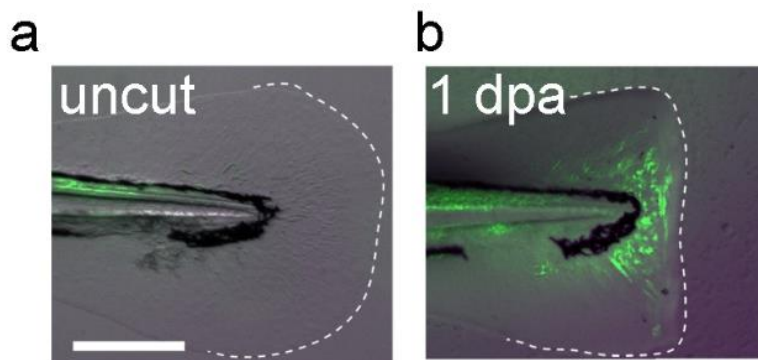


Fig. 29 *Tg(E4-0.7k:egfp)* における幼生ステージでの再生応答による EGFP 発現誘導
Tg(E4-0.7k:egfp) の未切断膜ヒレ (a), および 1 dpa 膜ヒレ (b) における EGFP の発現。白線は 50 μm を示しており、点線は膜ヒレの輪郭を示す。n = 51

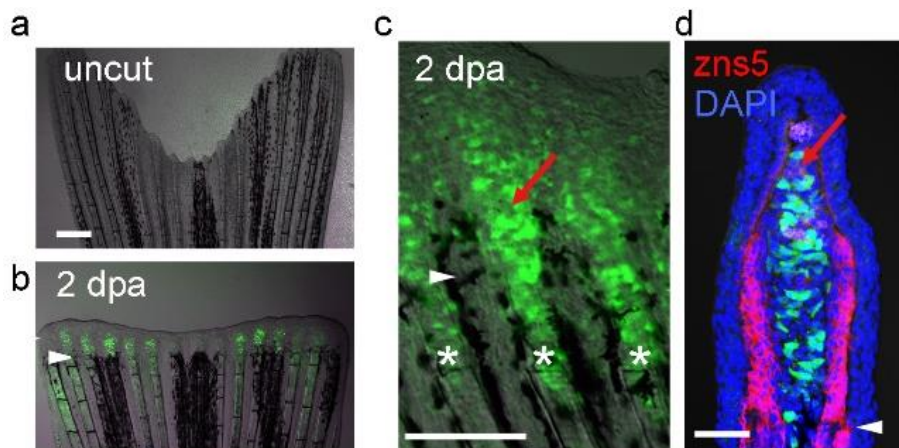


Fig. 30 *Tg(E4-0.7k:egfp)* の成体ヒレにおける EGFP の発現誘導

Tg(E4-0.7k:egfp) の成体ヒレの (a) 未切断, (b) 2 dpa 全体, (c) 2 dpa 拡大, (d) 2 dpa の凍結切片白矢印は EGFP の発現箇所, 赤矢印は緒条内における EGFP の発現位置, アスタリスクは緒条の位置, 白矢頭は切断箇所を示す。白線は(a, c) 500 μ m, (d) 100 μ m を示す。n = 8

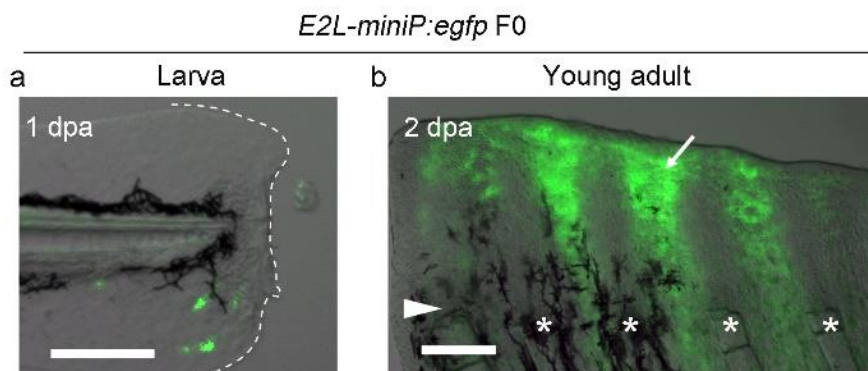


Fig. 31 *Tg(E2L-miniP:egfp)* (F0) における再生応答

Tg(E2L-miniP:egfp) (F0) の幼生膜ヒレ 1 dpa (a), および成体 2 dpa ヒレ (b) における EGFP の発現。白線は 50 μ m を示しており, 点線は膜ヒレの輪郭, 白矢印は再生組織内の EGFP 発現, 赤矢印は緒条内の EGFP 発現, アスタリスクは緒条の位置, 白矢頭は切断位置をそれぞれ示す。

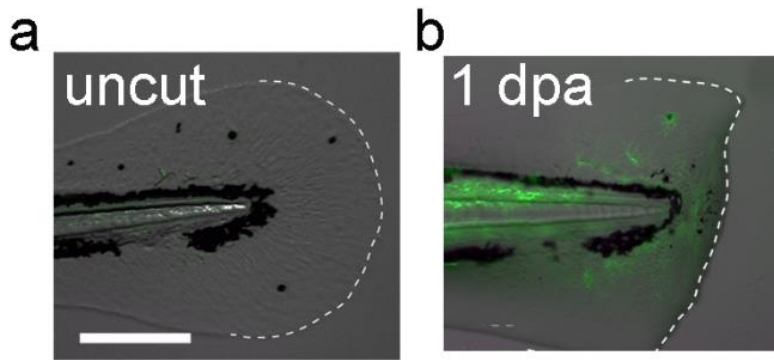


Fig. 32 *Tg(E2L-miniP:egfp)* の幼生ステージでの再生応答

Tg(E2L-miniP:egfp) の未切断膜ヒレ (a), および 1 dpa 膜ヒレ (b) における EGFP の発現。白線は 50 μm を示しており、点線は膜ヒレの輪郭を示す。n = 24

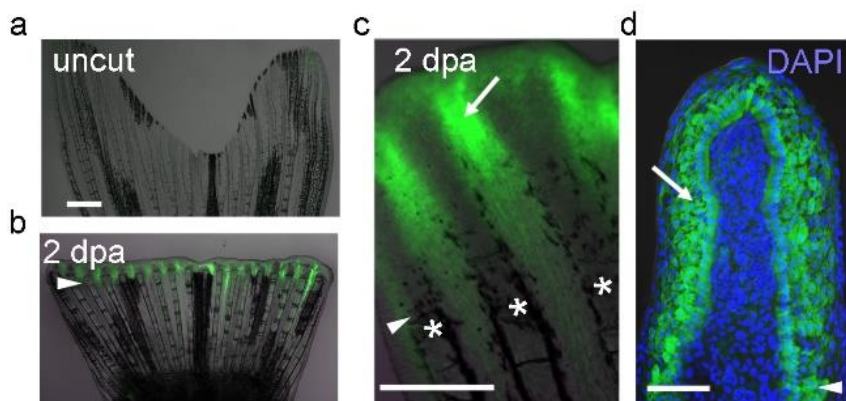


Fig. 33 *Tg(E2L-miniP:egfp)* の成体ヒレにおける EGFP の発現応答

Tg(E2L-miniP:egfp) の成体ヒレの (a) 未切断, (b) 2 dpa 全体, (c) 2 dpa 拡大, (d) 2 dpa の凍結切片白矢印は EGFP の発現箇所, アスタリスクは鰭条の位置, 白矢頭は切断位置を示す。凍結切片は核が DAPI で染色されている。白線は(a, c) 500 μm , (d) 100 μm を示す。n = 6

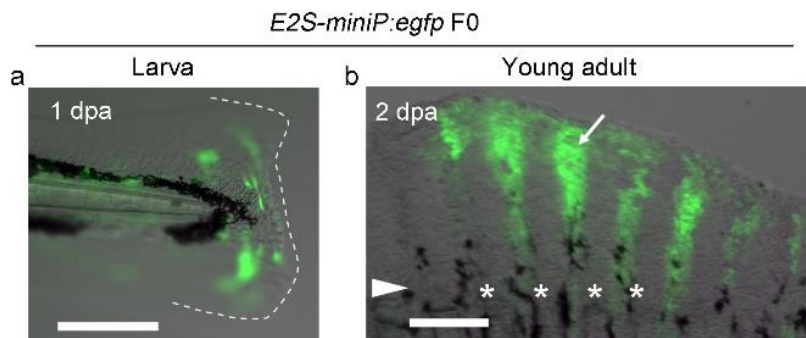


Fig. 34 *Tg(E2S-miniP:egfp)* (F0) における再生応答

Tg(E2S-miniP:egfp) (F0) の幼生膜ヒレ 1 dpa (a), および成体 2 dpa ヒレ (b) における EGFP の発現。白線は 50 μm を示しており、点線は膜ヒレの輪郭、白矢印は再生組織内の EGFP 発現、赤矢印は鰭条内の EGFP 発現、アスタリスクは鰭条の位置、白矢頭は切断位置をそれぞれ示す。

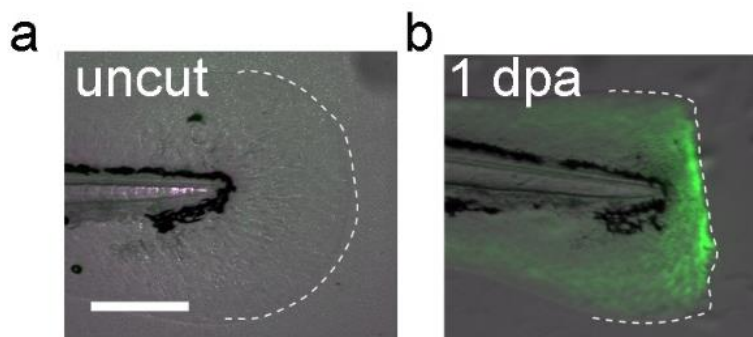


Fig. 35 *Tg(E2S-miniP:egfp)* の幼生での再生応答

Tg(E2S-miniP:egfp) の未切断ヒレ (a), および 1 dpa ヒレ (b) における EGFP の発現。白線は 50 μm を示しており、点線は膜ヒレの輪郭を示す。n = 10

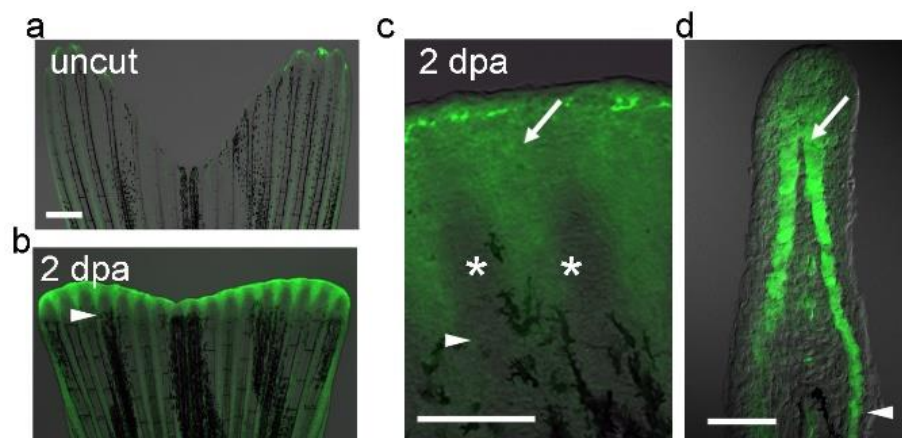


Fig. 36 *Tg(E2S-miniP:egfp)* の成体ヒレにおける EGFP の発現応答

Tg(E2S-miniP:egfp) の成体ヒレの (a) 未切断, (b) 2 dpa 全体, (c) 2 dpa 拡大, (d) 2 dpa の凍結切片。白矢印は EGFP の発現箇所, アスタリスクは鰭条の位置, 白矢頭は切断箇所を示す。白線は(a, c) 500 μ m, (d) 100 μ m を示す。n = 6

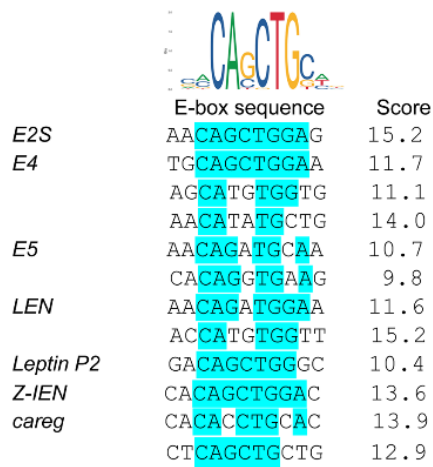


Fig. 38 様々な RRE に含まれる E-box モチーフ

水色は共通部分を示す。Score は JASPAR 2020 を用いて検索による値を示す。

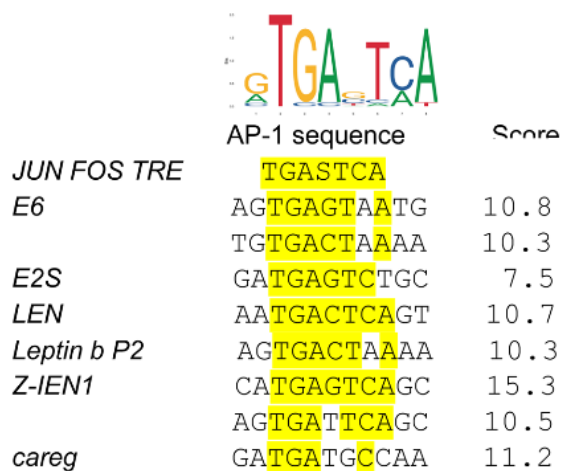


Fig. 39 様々な RRE に含まれる AP-1 モチーフ

黄色は共通部分を示す。Score は JASPAR 2020 を用いて検索による値を示す。

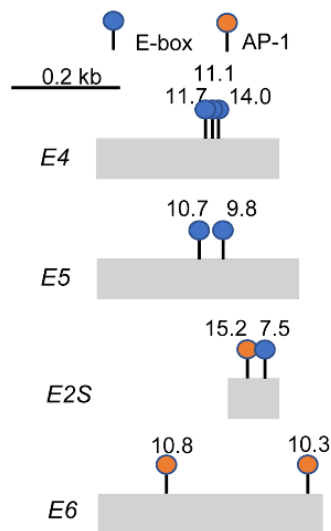


Fig. 40 E4, E5, E2S, E6 における E-box, AP-1 モチーフ

青は E-box モチーフの、橙は AP-1 モチーフの箇所を示す。各モチーフの数値は JASPAR の検索による Score を示す。各配列に高 score の E-box, AP-1 モチーフが保存されている。

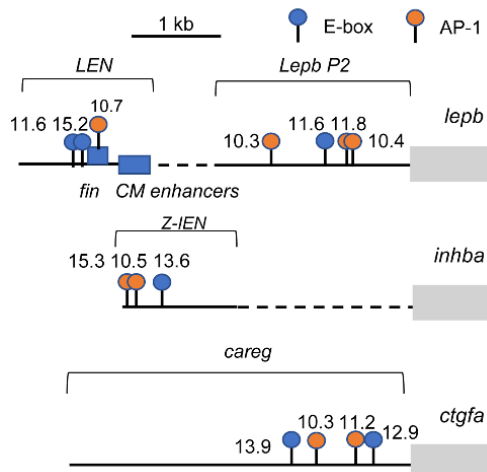


Fig. 41 先行研究で同定された RRE における E-box, AP-1 モチーフ

青は E-box モチーフの、橙は AP-1 モチーフの箇所を示す。各モチーフの数値は JASPAR の検索による Score を示す。様々の RRE に高 score の E-box, AP-1 モチーフが保存されている。

		EGFP response	
		Larva %	Young adult %
6xE-miniP:egfp		0.0 (n = 40)	0.0 (n = 26)
6xA-miniP: egfp		0.0 (n = 19)	0.0 (n = 8)
6xE-0.7k: egfp		67.7 (n = 62)	42.4 (n = 33)
6xE-6xA-miniP: egfp		12.5 (n = 80)	36.4 (n = 77)
6xE(m)-0.7k: egfp		6.9 (n = 73)	5.3 (n = 38)

Fig. 42 6xE, 6xA コンストラクトと F0 アッセイの結果

6xE-miniP, 6xA-miniP, 6xE-0.7k, 6xE-6xA-miniP, 6xE(m)-0.7k のコンストラクト。右の数字は F0 を用いたアッセイの結果を示す。n は *cryaa:egfp* の発現が観察された個体数を示す。

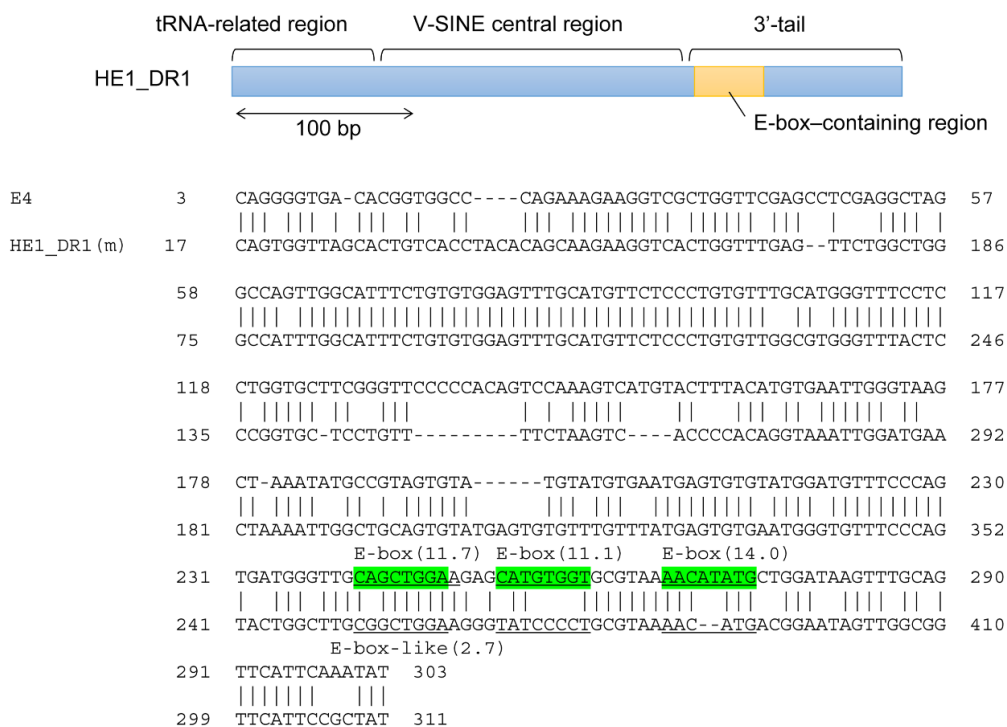


Fig. 43 E4 と HE1_DR1 (m) の配列比較

緑が E-box のモチーフ、括弧内の数字は JASPAR による score を示す。

HE1_DR1 (m) では E-box モチーフが大きく変異している。

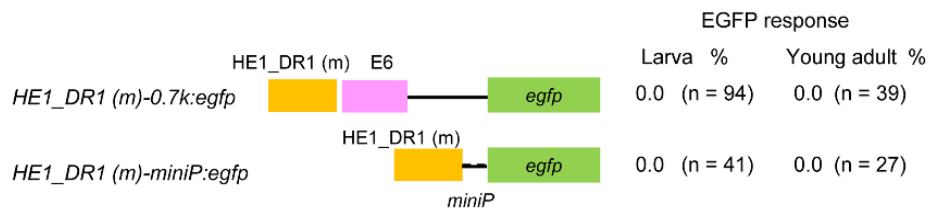


Fig. 44 HE1_DR1 (m) コンストラクトと F0 アッセイの結果

HE1_DR1 (m) を用いたコンストラクトの模式図。右の数字は F0 を用いたアッセイの結果を示す。n は *cryaa:egfp* の発現が観察された個体数を示す。

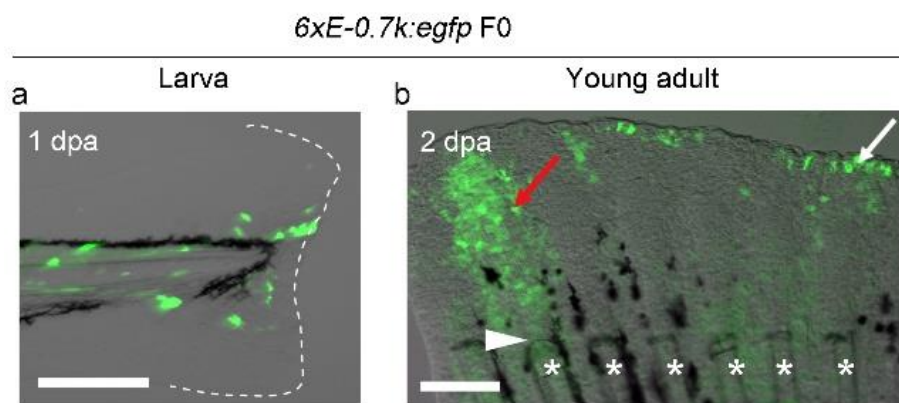


Fig. 45 *Tg(6xE-0.7k:egfp)* (F0) における再生応答

Tg(6xE-0.7k:egfp) (F0) の幼生膜ヒレ 1 dpa (a), および成体 2 dpa ヒレ (b) における EGFP の発現。白線は 50 μ m を示しており、点線は膜ヒレの輪郭、白矢印は再生組織内の EGFP 発現、赤矢印は鰭条内の EGFP 発現、アスタリスクは鰭条の位置、白矢頭は切断位置をそれぞれ示す。

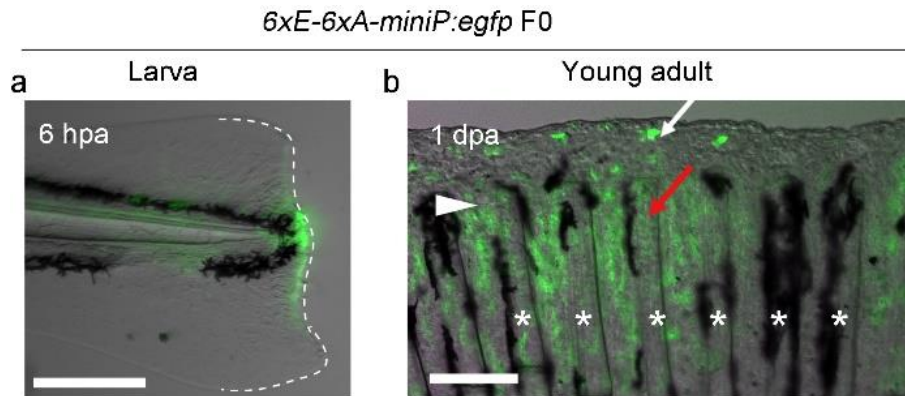


Fig. 46 *Tg(6xE-6xA-miniP:egfp)* (F0) における再生応答

Tg(6xE-6xA-miniP:egfp) (F0) の幼生膜ヒレ 1 dpa (a), および成体 2 dpa ヒレ (b) における EGFP の発現。白線は 50 μ m を示しており、点線は膜ヒレの輪郭、白矢印は再生組織内の EGFP 発現、赤矢印は鰭条内の EGFP 発現、アスタリスクは鰭条の位置、白矢頭は切断位置をそれぞれ示す。

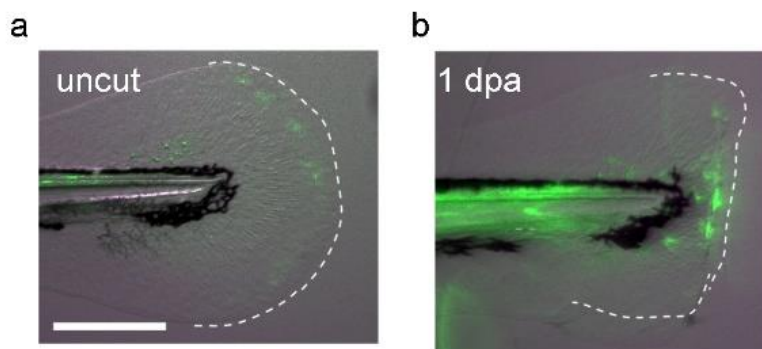


Fig. 47 *Tg(6xE-6xA-miniP:egfp)* における幼生ステージでの再生応答

Tg(6xE-6xA-miniP:egfp) の未切断ヒレ (a), および 1 dpa ヒレ (b) における EGFP の発現。白線は 50 μ m を示しており、点線は膜ヒレの輪郭を示す。n = 19

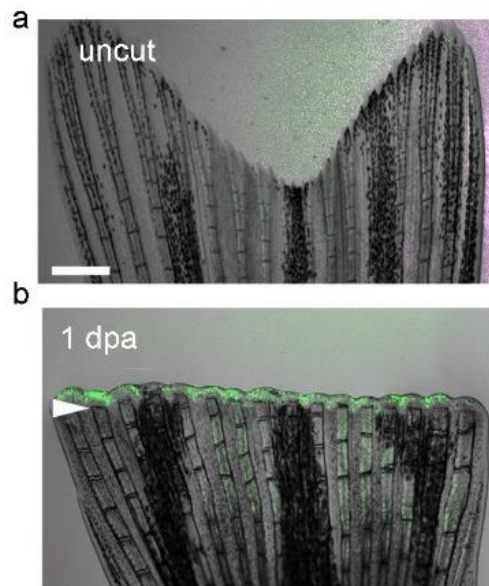


Fig. 48 *Tg(6xE-6xA-miniP:egfp)* における成体での再生応答

Tg(6xE-6xA-miniP:egfp) の未切断ヒレ (a), および 2 dpa ヒレ (b) における EGFP の発現。

矢印は切断面を白線は 500 μm を示す。n = 11

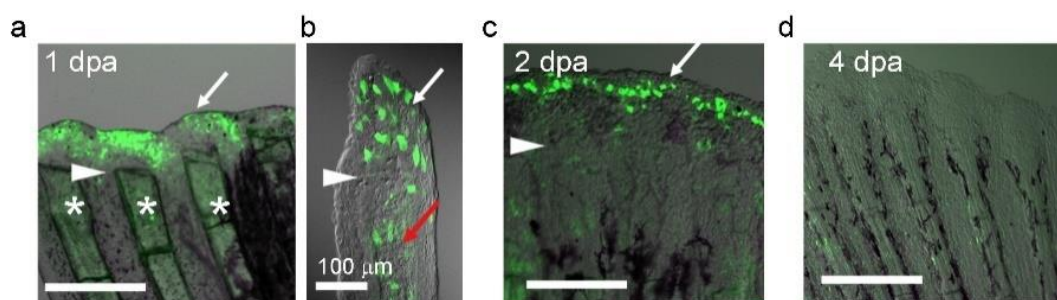


Fig. 49 *Tg(6xE-6xA-miniP:egfp)* における成体での再生応答

Tg(6xE-6xA-miniP:egfp) の 1 dpa (a), 1 dpa の凍結切片 (b), 2 dpa (c), 4 dpa (d) における EGFP の発現。白矢印は傷上皮中の EGFP 発現, 赤矢印は間葉細胞の EGFP 発現をそれぞれ示す。

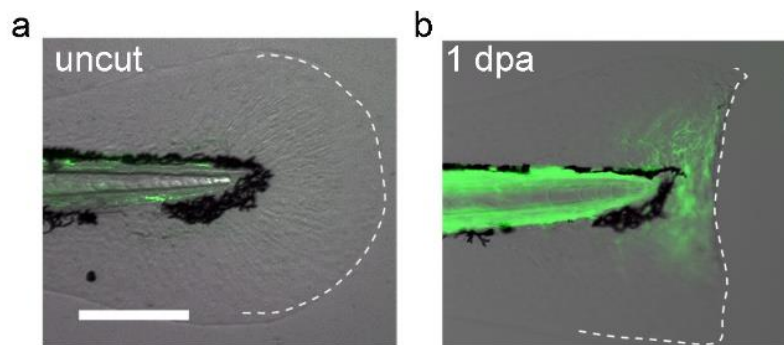


Fig. 50 *Tg(6xE-0.7k:egfp)* における幼生ステージでの再生応答

Tg(6xE-0.7k:egfp) の未切断ヒレ (a), および 1 dpa ヒレ (b) における EGFP の発現。白線は 50 μm を示しており, 点線は膜ヒレの輪郭を示す。n = 13

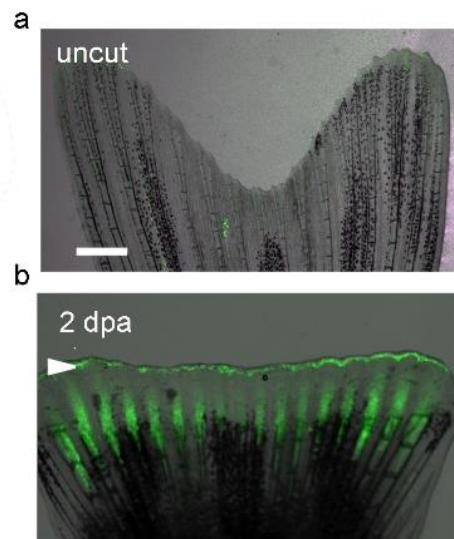


Fig. 51 *Tg(6xE-0.7k:egfp)* における成体での再生応答

Tg(6xE-0.7k:egfp) の未切断ヒレ (a), および 2 dpa ヒレ (b) における EGFP の発現。白線は 500 μm を示す。

n = 8

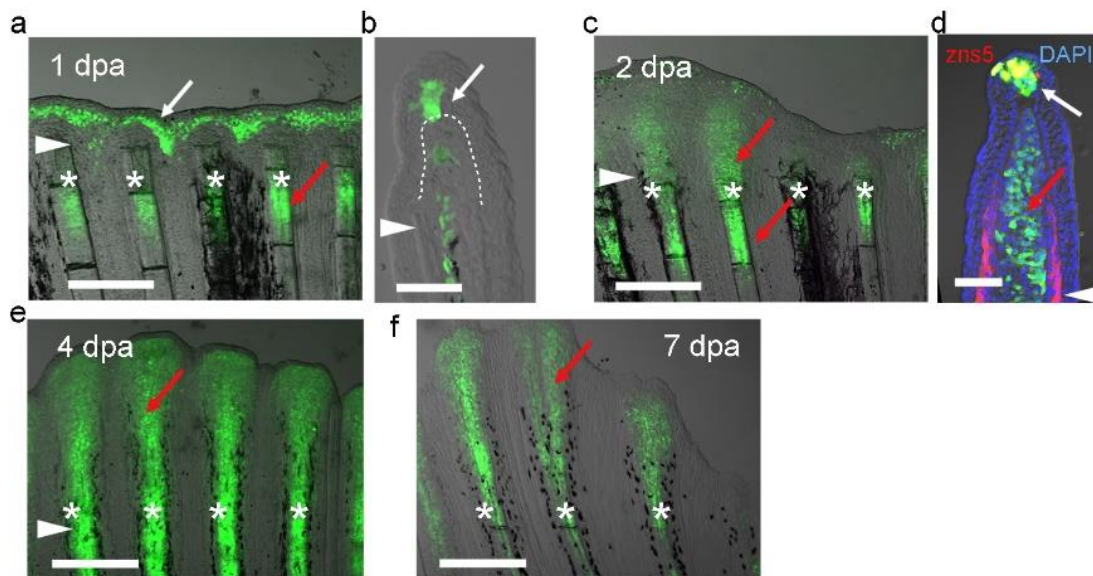


Fig. 52 *Tg(6xE-0.7k:egfp)* における成体での再生応答

Tg(6xE-0.7k:egfp) の 1 dpa (a), 1 dpa の凍結切片 (b), 2 dpa (c), 2 dpa の凍結切片(d), 4 dpa (e), 7 dpa (f) における EGFP の発現。

点線は再生芽の輪郭, 白矢印は傷上皮中の EGFP 発現, 赤矢印は間葉細胞の EGFP 発現をそれぞれ示す。白線は(a, c, e, f) 500 μm, (b, d) 100 μm を示す。

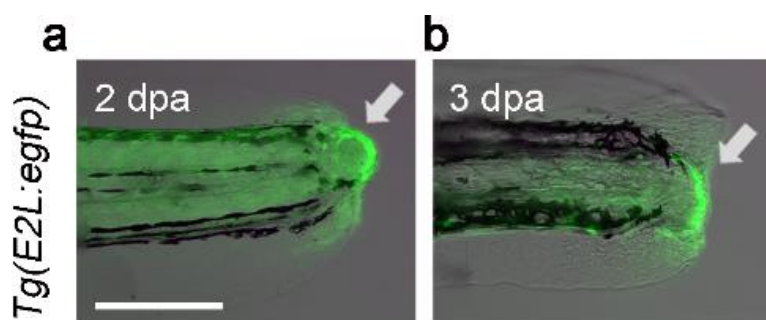


Fig. 53 *Tg(E2L:egfp)* の notochord 再生

Tg(E2L:egfp) の幼生における notochord 再生の 2 dpa (a), 3 dpa (b) の EGFP 発現誘導。白線は 500 μm を示す。n = 40

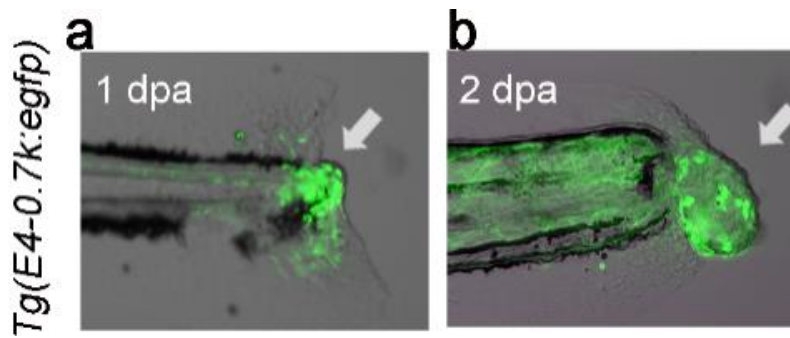


Fig. 54 *Tg(E4-0.7k:egfp)* の notochord 再生による EGFP の発現誘導

Tg(E4-0.7k:egfp) の幼生における notochord 再生の 2 dpa (a), 3 dpa (b) の EGFP 発現誘導 n = 30

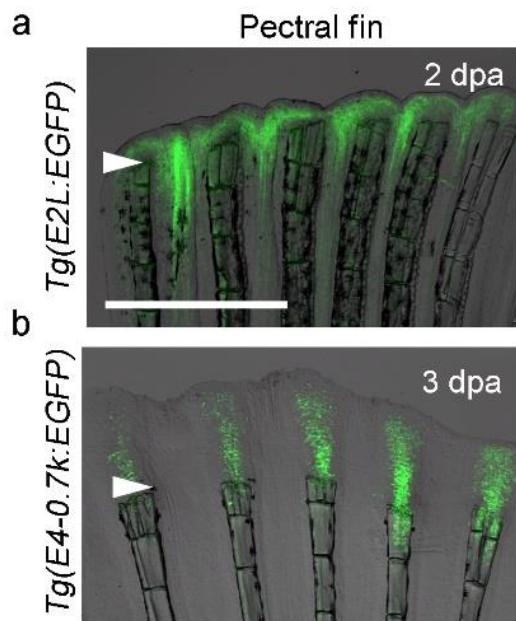


Fig. 55 *Tg(E4-0.7k:egfp)*, *Tg(E2L:egfp)* の胸鰭再生における EGFP の誘導

Tg(E2L:egfp) (a) と *Tg(E4-0.7k:egfp)* (b) の胸鰭切断後の EGFP 発現量。矢印は切断面。白線は 1 mm。n > 5

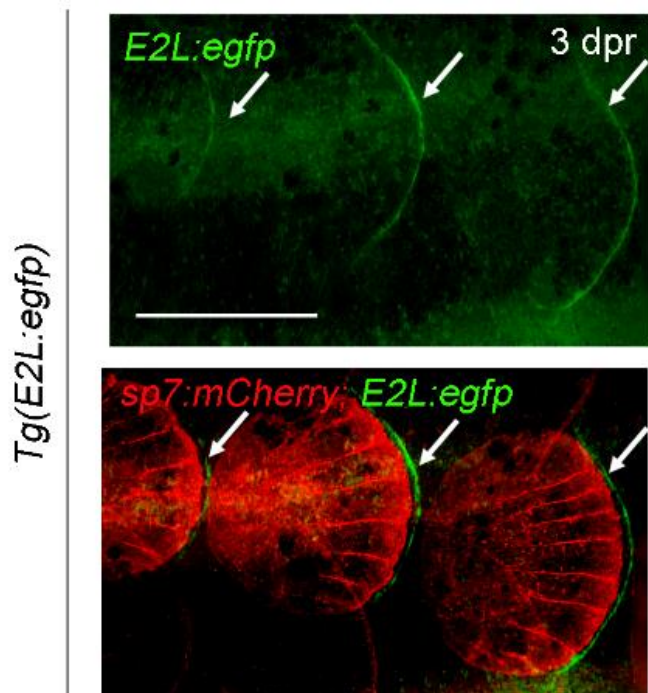


Fig. 56 *Tg(E2L:egfp)* の鱗再生による EGFP の発現誘導

Tg(E2L:egfp) における鱗再生時の EGFP 発現。上段は EGFP、下段は骨芽細胞を示す *sp7:mCherry* との併合画像。白線 : 100 μ m, n = 10

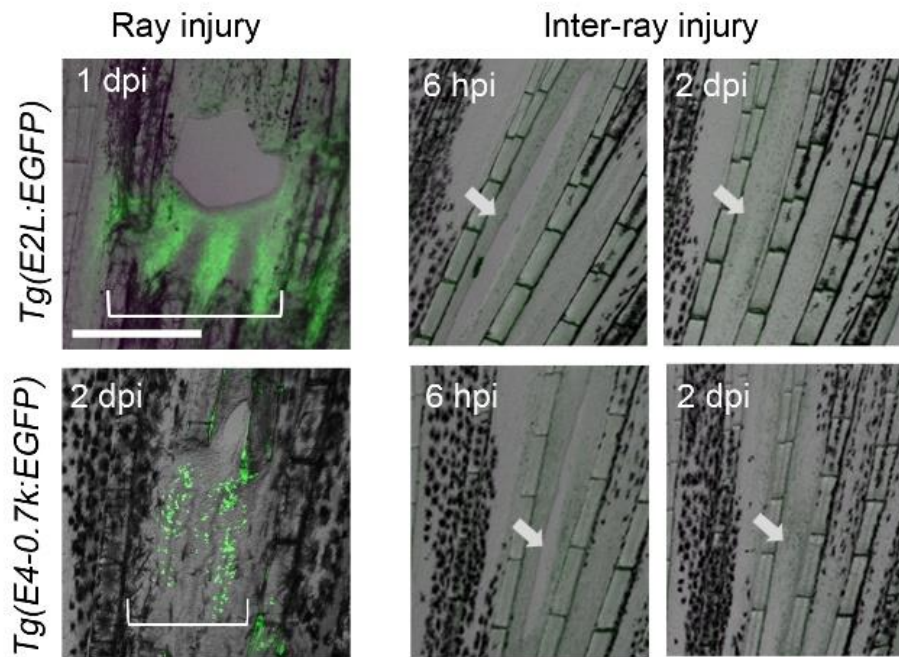


Fig. 57 *Tg(E4-0.7k:egfp)*, *Tg(E2L:egfp)* の尾ひれの穴あけ再生・傷害による EGFP の発現誘導

Tg(E4-0.7k:egfp) (上), *Tg(E2L:egfp)* (下) は鰭条を損傷すると EGFP が誘導されたが、鰭条間の損傷では EGFP が発現しなかった。

矢印は損傷箇所を、白線は 500 μm を示す。n > 5

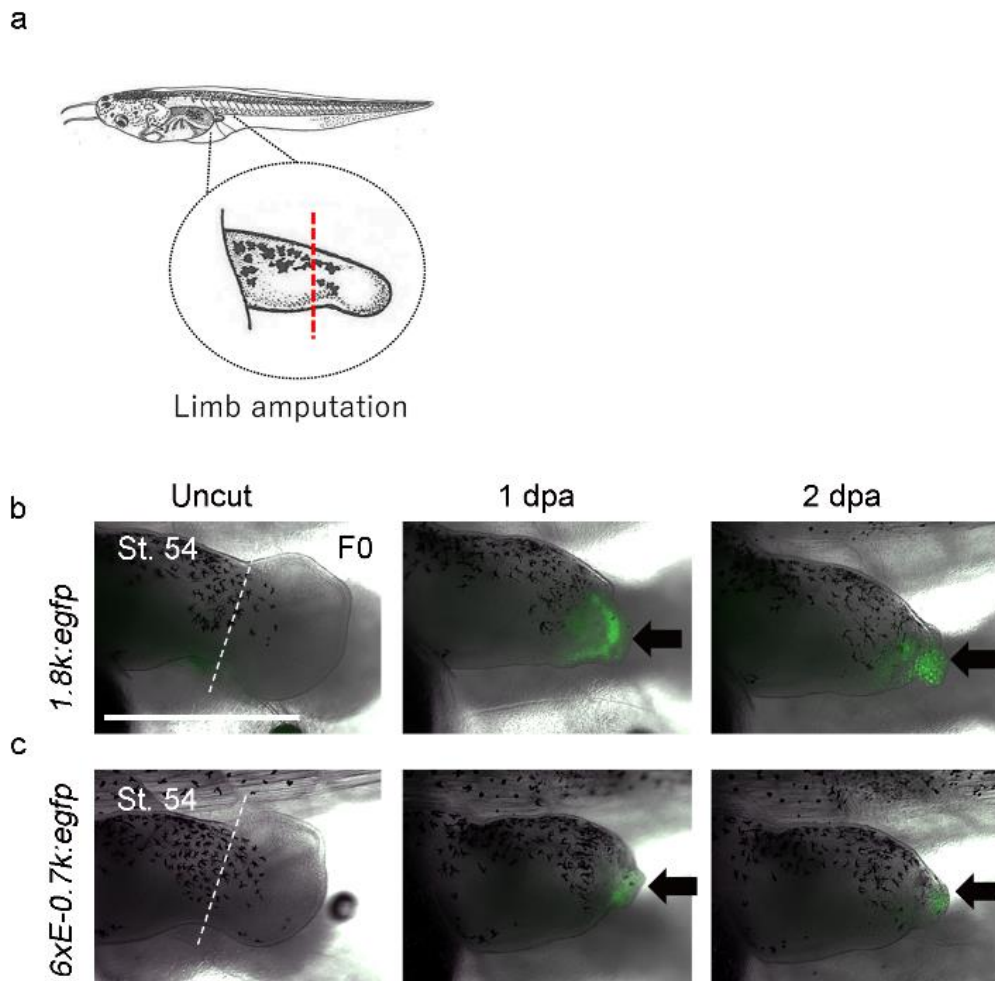


Fig. 58 アフリカツメガエルの後脚再生による EGFP の発現誘導

1 細胞期にそれぞれのコンストラクトを注入した *Xenopus laevis* の切断されたの肢芽における EGFP の発現の検出。矢印は誘導された EGFP の発現。点線は切断された部位。間葉系細胞:1.8k:egfp (b; n = 12) および上皮系細胞:6xE-0.7k:egfp (c; n = 8) の遠位端でそれぞれ EGFP 応答が観察された。スケールバー, 1 mm

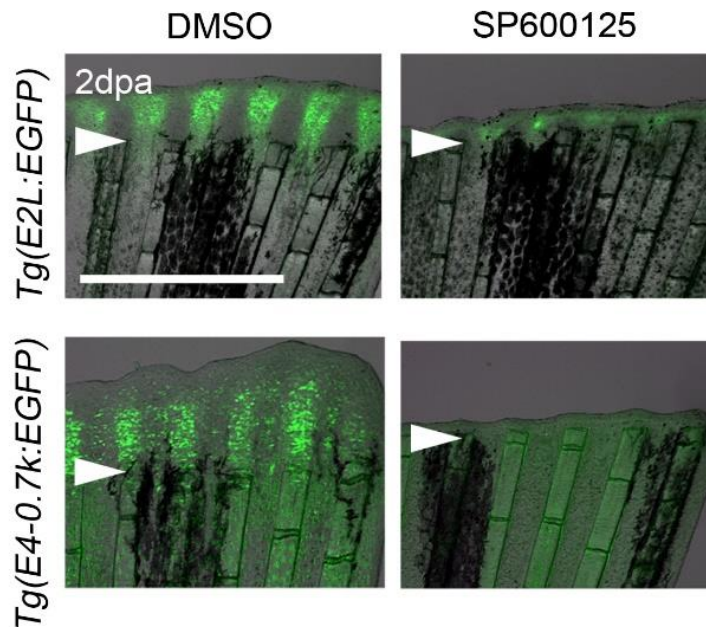


Fig. 59 SP600125 投与による再生異常

JNK 阻害剤 SP600125 による、それぞれの Tg における AP-1 を介した EGFP の発現のノックダウン。矢印は切断面。スケールバー：1 mm, n > 5

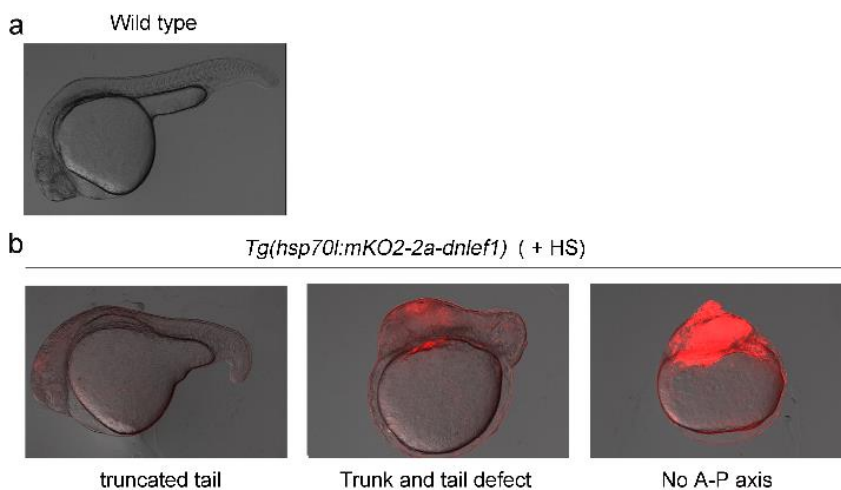


Fig. 60 *Tg(hsp70l:mKO2-2a-dnlef1)* の幼生における HS による発生異常

発生過程で HS を加えた野生型 (a) と *Tg(hsp70l:mKO2-2a-dnlef1)* (b) *dnlef1* の発現により発生に異常が見られた。N = 100

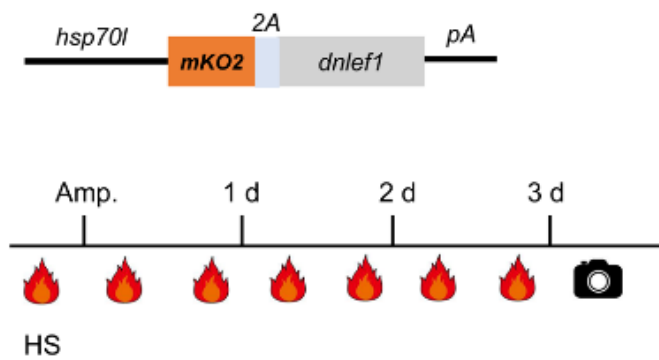


Fig. 61 ヒートショック (HS) による *dnlef1* の発現実験

切断6時間前に最初のHSを行ない、切断後1日2度ずつHSを行なった。

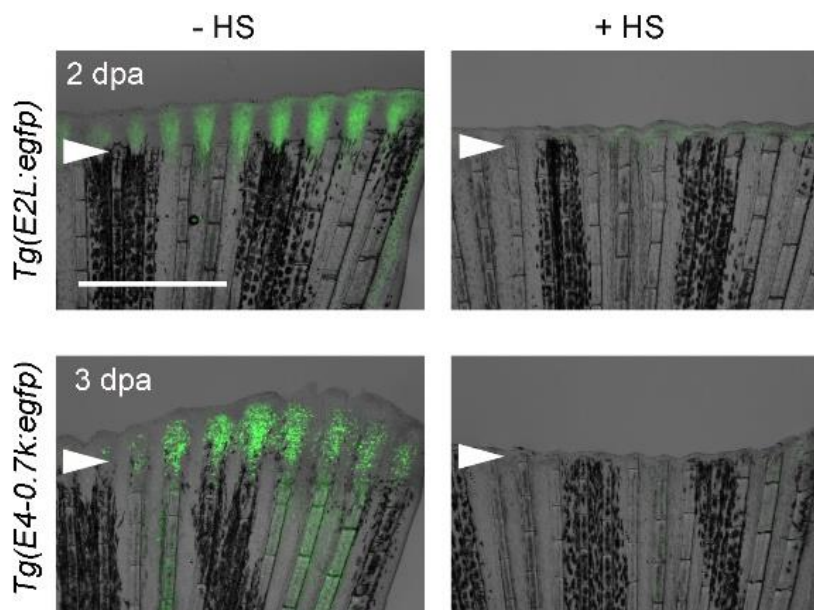


Fig. 62 *Tg(hsp70l:mKO2-2a-dnlef1)* の成体におけるHSによる再生異常

hsp 制御下での *dnLef1* 発現による E-box を介した EGFP 発現のロックダウン。矢印は切断面。スケールバー, 1 mm。

(上) n=3, (下) n=6

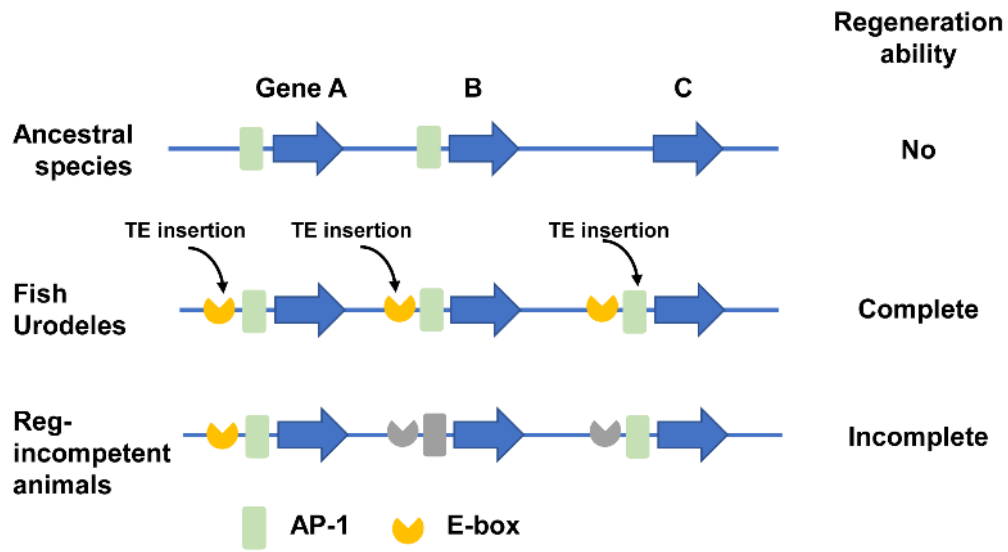


Fig. 63 TE 挿入による組織再生能の獲得

RRE と再生能力の進化的変化に関する仮説の模式図。

AP-1 の近傍に TE が挿入されたことにより，再生能を獲得した。その後，変異が生じ再生能力が失われた。

謝 辞

本研究にあたり、数多くのご指導、ご鞭撻頂いた川上厚志先生に心から感謝申し上げます。研究面での助言に加えて、研究生活でも数多くお世話になった猪早敬二先生に深く感謝致します。研究室の先輩として、実験や仕事を丁寧に教えてくださり、研究を進めるにあたり多くの指導や助言を頂いた安藤和則さん、柴田恵里さんに心より感謝申し上げます。さらに共同研究の形で協力いただいた山形大学の越智先生、生命理工学院の西原先生、プラスミドを提供していただいた大阪大学の石谷先生にも感謝いたします。

また、様々な点でご迷惑をおかけしました、川上研究室の諸先輩方、ならびに後輩のみなさまに感謝いたします。

最後に、経済的にも精神的にも支え続けてくれた、家族親戚のみなさまにこの場を借りて感謝申し上げます。

田牧輝久