

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	ゼブラフィッシュヒレ再生における再生応答エンハンサーと再生応答機構に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	吉田貴史
Author(English)	Takafumi Yoshida
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京科学大学, 報告番号:甲第242号, 授与年月日:2025年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:川上 厚志,田中 幹子,廣田 順二,糸 昭苑,立花 和則
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Institute of Science Tokyo, Report number:甲第242号, Conferred date:2025/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

令和6年度 博士論文

ゼブラフィッシュヒレ再生における
再生応答エンハンサーと再生応答機構に関する研究

Study of the Regeneration-Response Enhancer and
Their Response Mechanism to Injuries
in Zebrafish Fin Regeneration

東京科学大学 生命理工学院

生命理工学系 生命理工学コース 川上研究室

吉田貴史

指導教官 川上厚志 准教授

目 次

目 次	2
1, 序 論	5
(1) 生物が持つ再生能力とその多様性	5
(2) 生物における組織の再生様式	5
(3) ゼブラフィッシュのヒレにおける付加再生	6
(4) 付加再生の分子メカニズム	6
(5) 蛍光トランスジェニックを用いた遺伝子発現の可視化	7
(6) 蛍光トランスジェニックによる再生応答の再現	7
(7) 再生応答エンハンサー	8
(8) <i>fn1b</i> 上流からの再生応答エンハンサーの同定	9
(9) 再生応答エンハンサーに含まれる転写因子結合配列	10
(10) RRE を介した再生応答の全体像	10
(11) RRE は実際に bZIP・bHLH 転写因子カスケードを通じて活性化されるのか	11
(12) RRE はヒレ以外の組織や異なる種の再生時にも活性化されるのか	11
(13) RRE 活性化を誘導するキューは何なのか	11
2, 材料と方法	13
(1) 実験動物の飼育	13
(2) トランスジェニック系統	13
(3) ゼブラフィッシュ組織への傷害	14
(4) ゼブラフィッシュへの熱ショック	15

(5) ゼブラフィッシュの薬剤処理	15
(6) ゼブラフィッシュの Cre-loxP による細胞標識	15
(7) アフリカツメガエルの肢芽の切断	16
(8) 凍結切片の作製	16
(9) 切片の免疫組織化学	16
(10) In situ hybridization (ISH)	17
(11) TUNEL 染色	18
3, 結 果	19
(1) TRE を介した RRE 活性化における Jun N-terminal kinase (JNK) による Jun/Fos のリン酸化の機能	19
(2) E-box を介した RRE 活性化における β カテニンと Tcf/Lef の機能	19
(3) E-box/TRE の上流シグナルの活性化による RRE 応答の誘導	20
(4) ゼブラフィッシュの多様な組織における RRE の活性化	21
(5) アフリカツメガエルにおけるゼブラフィッシュ RRE の活性化	22
(6) 再生応答を誘導できる傷害の探索	23
(7) 組織の分断や再生芽形成を伴わない新たな傷害モデルの開発	25
(8) 低温傷害による再生応答の誘導	27
4, 考 察	29
(1) β カテニン-Tcf/Lef と JNK-Jun/Fos の転写因子カスケードが E-box/TRE RRE の上流で機能している	29
(2) E-box/TRE RRE の機能は組織や種を超えて保存された普遍的なシステムである	30
(3) 再生応答を誘導できる穴開け傷害では再生遺伝子によって発現領域に差異がある	31
(4) 新たな低温傷害法は組織へのダメージが非常に少ない傷害手法である	31

(5) 再生応答のキューとして組織の分断や再生芽形成は必要ではない.....	32
(6) まとめ・今後の展望.....	33
5, 参考文献.....	34
6, 図 表.....	40
7, 謝 辞.....	79

1, 序 論

(1) 生物が持つ再生能力とその多様性

生物は単細胞生物から多細胞生物への進化の過程で、からだの恒常性を維持する能力を獲得してきた。なかでも、損傷を受けた組織や器官を元通りに回復する“再生”は恒常性維持におけるドラスティックな例である (Hasegawa et al., 2015; Cano-Martinez et al., 2024)。しかし、多細胞生物の全てが同じような再生能力を持っているわけではなく、生物種や組織によって再生能力には大きな差が存在している (Akimenko et al., 2003; Kumar et al., 2007; Poss, 2010; Tanaka, 2016; Darnet et al., 2019)。

例えば、魚類のゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) や有尾両生類のアホロートル (*Ambystoma mexicanum*) は、高い再生能力を持つことが知られており、皮膚や四肢・ヒレなど多様な組織に傷害を負ってもほとんど元通りに再生することができる (Joven et al., 2019; Marques et al., 2019)。また、無尾両生類のアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) も高い再生能力を持つが、四肢の再生能力については限定的で、成長の過程で低下していく (Phipps et al., 2020)。これらの生物に対して、我々ヒトは非常に限定的な再生能力しか持たない生物種である。もし皮膚に深い傷を負ってしまえば傷跡 (瘢痕) が残ってしまい、もし指を切断してしまえばもう元通りの姿形を回復することはできない。ところが、ヒトと同じ哺乳類にもアフリカトゲネズミ (*Acomys cahirinus*) のように、皮膚の真皮などのヒトには再生できない組織を再生できる種も一部存在している (Maden and Varholick, 2020)。

このように、再生能力には種や組織によって大きな差が存在しているが、優れた再生能力を持つ生物がどのように組織を再生しているのか、そのメカニズムの詳細は未だに不明な点が数多く残っている。再生メカニズムの解明にアプローチするために、現在ではゼブラフィッシュやアホロートル、アフリカツメガエルをはじめとしたモデル生物を用いて、様々な組織や器官の再生についての研究が世界中で進んでいる。再生メカニズム研究のゴールの一つは、再生能力に劣るヒトの再生医療の発展に寄与することである。ヒトが通常は再生できない手や足のような組織の再生治療へと研究で得られた知見を活用することで、画期的な医療を実現できる可能性を秘めている。

(2) 生物における組織の再生様式

生物の再生には、大きく分けて2つの様式が存在している。生物の中でもとりわけ再生能力が高い無脊椎動物のプラナリアやヒドらは、わずかな断片からでもからだ全体を再生することができる (Ivankovic et al., 2019; Vogg et al., 2019)。この際に、残存した組織の断片は細胞分裂や細胞の成長ではなく、主に再パターン化によって再生を進行させる。このような再生様式のことを“再編再生”と呼ぶ (Hichlin and Wolpert, 1973)。これとは異なる再生様式は、“付加再生”と呼ばれる。付加再生は、主に四肢

やヒレの再生で見られる。脊椎動物の中でも、特に再生能力が高い生物として知られるイモリの四肢の再生過程では、切断された四肢の残存部で細胞増殖が活発に起こり、その後組織の再パターン化や伸長を経て再生が完了する (Goss, 1969)。付加再生のメカニズム解明によって、ヒトの組織再生、特に手足の再生への手がかりを得ることができるであろう。

(3) ゼブラフィッシュのヒレにおける付加再生

ゼブラフィッシュはインド原産の硬骨魚類で、現在ではモデル生物として幅広い研究に用いられている。ゼブラフィッシュは様々な組織に高い再生能力を持っている。四足動物の四肢の相同器官にあたるヒレをはじめとして、心筋・脊髄・脳・網膜など、多様な組織を再生することができる (Hata et al., 2007; Nakatani et al., 2007; Huysseune et al., 2009; Kawakami, 2010)。特に、ヒレは切断されてもわずか2週間という短期間のうちに再生が完了する (Gemberling et al., 2013)。ゼブラフィッシュの尾ヒレは16-18本の放射状に並んだ骨組織である鰭条 (Fin ray) と、間葉組織 (Mesenchyme)、そして血管や神経線維とそれらを覆う上皮 (Epidermis) から構成されている (Fig. 1a)。鰭条は縦に二分割された円柱状の骨組織が等間隔に並んだ節 (Joint) で一列につながった構造をしている。鰭条の内側、そして鰭条間 (Inter-ray) の領域は間葉細胞で満たされている。このように、ゼブラフィッシュの尾ヒレは陸棲の脊椎動物の四肢とは異なり、骨芽細胞・間葉細胞・血管・神経から構成されており、筋肉を持たない非常に単純な組織となっている (Tu and Johnson, 2011)。このようにシンプルな細胞構成であり、さらには透明な組織であることから、ゼブラフィッシュの尾ヒレは再生メカニズムの研究に適した系である。

ゼブラフィッシュのヒレ再生は、付加再生の様式を辿って進行することが知られている。このヒレの再生プロセスは、①傷上皮形成→②再生芽形成→③組織伸長・パターン再構成という3つのステップから成る (Fig. 1b) (Akimenko et al., 2003; Poss et al., 2003; Kawakami, 2010)。ヒレが切断されると、はじめに傷口を上皮が覆い、肥厚した上皮組織である傷上皮 (Wound Epidermis) が形成される (Kragl and Tanaka, 2009; Shibata et al., 2018)。続いて、傷の断面部から再生部へと間葉細胞が移動し、傷上皮の内部に再生芽 (Blastema) と呼ばれる、増殖性の細胞集団が形成される (Poleo et al., 2001)。最後に、再生芽の細胞分裂によって組織の伸長が促され、細胞分化と形態形成によって組織パターンが再構成されて再生が完了する。付加再生のメカニズム解明において、ゼブラフィッシュのヒレ再生プロセスは有用な研究対象となっている。

(4) 付加再生の分子メカニズム

再生など、生体で起こる様々な現象の分子メカニズムを明らかにするために、遺伝子の発現やその機能について広く解析が行われている。具体的には、RNA シーケンス

による発現遺伝子の網羅的な探索、*in situ hybridization* (ISH) や抗体染色による組織内での遺伝子の mRNA やタンパクの可視化といった手法が一般的にはよく用いられている。さらに、CRISPR/Cas9 システムを用いたノックアウトや、熱ショックプロモーターを用いた強制発現のように、遺伝子の *loss of function* や *gain of function* による機能的な解析も行われている。ゼブラフィッシュをはじめとしたモデル生物を用いた研究においては、再生時に特異的な発現を示すような遺伝子が多数報告されており、これらの遺伝子の発現領域の解析から、再生組織内の様々な場所や細胞タイプで発現する固有の遺伝子も同定されてきている (Poss et al., 2003)。

ゼブラフィッシュのヒレ再生の過程に関与しているシグナル経路や分子メカニズムも、近年の研究から明らかになってきている。一例として、線維芽細胞増殖因子 FGFs (Fibroblast Growth Factors) は先端再生芽の形成を促進することが示されている (Poss et al., 2000; Lee et al., 2005; Shibata et al., 2016)。他にも、レチノイン酸や Wnt/ β カテニン、Hedgehog, Notch, BMPs (Bone Morphogenic Proteins), Activin, IGFs (Insulin-like Growth Factors) などの多様なシグナルが付加再生に必須の寄与をしていることが知られている (Wehner and Weidinger, 2015)。これらの多様なシグナルは、再生過程において時空間的に複雑に組み合わせられて機能することで、細胞の脱分化や増殖、組織や形態の再形成などを正確に制御していると考えられる (Stoick-Cooper et al., 2007)。しかし、これらの詳細な分子メカニズムには、未だに不明な点が数多く残っている。

(5) 蛍光トランスジェニックを用いた遺伝子発現の可視化

生物の体内で引き起こされている遺伝子の発現や分子メカニズムについて詳しく調べるためには、生物を生きたままの状態 (*in vivo*) で長期的に観察できるツールが必須である。ゼブラフィッシュを用いた *in vivo* 研究においては近年、蛍光トランスジェニック (Tg) が非常に有用なツールとして利用されている。蛍光 Tg は、特定の遺伝子の制御配列の下流に、蛍光タンパクの遺伝子を配置した DNA コンストラクトを受精卵に導入することで作製される。作製された Tg 個体では、遺伝子の発現を生きたままの状態、蛍光によって可視化することができる。さらに、異なる Tg 同士を掛け合わせて作製したダブル Tg で別々の遺伝子の発現を同一個体内で同時に観察したり、Cre/loxP システムと組み合わせて標識した細胞を長期間にわたって生体内で系譜追跡したりすることも可能となっている (Ando et al., 2017)。このように、蛍光 Tg を用いることによって遺伝子発現のタイミングや、発現する細胞まで詳細に同定することが可能になった。

(6) 蛍光トランスジェニックによる再生応答の再現

ゼブラフィッシュにおいては、マイクロアレイスクリーニングや RNA シーケンスなどから、ヒレ切断によって *fn1b* や *msxc* といった遺伝子の発現が誘導され、再生組織

で発現が上昇することが明らかになっている。例えば、*fn1b* は傷上皮の基底層において、*msxc* は再生芽の先端部において強い発現を示す (Fig. 2a) (Akimenko et al., 1995; Shibata et al., 2018)。蛍光 Tg の手法は、再生メカニズムの研究にも利用されている。当研究室では、これらの遺伝子の制御配列に *egfp* 遺伝子を繋いだ DNA コンストラクトを導入した Tg 系統が作製されており、Tg 個体ではヒレ切断後に EGFP タンパクの蛍光で再生応答遺伝子の発現が再現される (Fig. 2b) (Shibata et al., 2018; 横田, H27 年度修士論文)。

また、遺伝子プロモーターだけでなく、転写因子の結合配列によって再生応答を蛍光 Tg で可視化した例もある。Shimizu らは、タンデムに並べた Tcf/Lef ファミリーの転写因子結合領域の下流に蛍光タンパクの遺伝子を配置したコンストラクトを導入して Tg を作製し、再生に応じた発現誘導を示している (Shimizu et al., 2012)。このように、蛍光 Tg を利用することによって、遺伝子発現のみならず、再生応答の根底にある制御メカニズムの詳細まで迫っていくことが期待できる。

(7) 再生応答エンハンサー

多くの遺伝子の転写は、アクチベーター (転写活性化因子) の機能によって活性化されることが知られている。アクチベーターは遺伝子周辺のゲノム上の特定のシス調節領域 (プロモーター) に結合して遺伝子発現を制御するものや、エンハンサーと呼ばれる領域に結合して組織やステージに特異的な遺伝子の転写を活性化させるものがある。エンハンサー配列については、距離・位置・方向に関係なく機能するために、対象の遺伝子から非常に離れた箇所に存在している場合もある。

遺伝子発現の制御におけるプロモーターやエンハンサーの機能について調べるために、レポーターアッセイと呼ばれる手法が用いられている。対象のプロモーターやエンハンサー配列の下流に蛍光タンパクの遺伝子を配置したコンストラクトを生物に導入して、蛍光遺伝子の発現の有無によってプロモーターやエンハンサーの転写活性化能を判別することができる (Kvon, 2015)。しかし、傷害を受けてから再生に至るまでのプロセスのような、複雑な生命現象における遺伝子の活性化機構の解析には、*in vivo* でのアッセイが必須である。再生のプロセスにおいては、傷害が引き起こした何らかのシグナルが、その下流の転写因子を誘導し、転写因子がエンハンサー配列に対して結合することによってエンハンサーを活性化、最終的に再生特異的な再生応答遺伝子の発現が誘導されていると考えられる (Fig. 3)。この一連のプロセスの中で、傷害に応じて再生応答遺伝子の発現を制御するエンハンサー配列が、“再生応答エンハンサー (Regeneration Response Enhancer = RRE)” である。しかし、その実体や詳細な活性化メカニズムについては不明な点が多い。

しかし近年では、複数の再生応答遺伝子の周囲から RRE が同定されており、その機能についての検証も行われてきた (Kang et al., 2016; Pfefferli and Jazwińska, 2017; Wang

et al., 2020)。Kang らは、*leptin b (lepb)* 遺伝子の周辺から尾ヒレと心臓で傷害に応答する RRE (*LEN*) を同定し、この RRE は再生できない哺乳類の心臓や指への傷害においても活性化されることを示した (Fig. 4a)。Pfefferli らは、*connective tissue growth factor a (ctgfa)* 遺伝子の上流から RRE (*careg*) を同定した。この RRE は複数の傷害法によって活性化されることが示された (Fig. 4b)。また、Wang らは、エピゲノムプロファイリング・シングルセルシーケンスのデータをゼブラフィッシュとキリフィッシュの間で比較し、*inhibin beta a (inhba)* 遺伝子の周囲に RRE (*IEN*) を同定した。この RRE をゲノム編集で欠失させると、ヒレと心臓の再生が低下することが示された (Fig. 4c)。このように、RRE は再生応答遺伝子の周囲に存在していることが複数の遺伝子で明らかになってきたが、RRE の正確な実体やその共通性については未だに謎が多い。

(8) *fn1b* 上流からの再生応答エンハンサーの同定

当研究室でもこれまでに、再生応答遺伝子である *fibronectin 1b (fn1b)* 遺伝子の上流から新たな RRE を同定した (Tamaki et al., 2023)。当研究室では、2 つの再生応答遺伝子、*fn1b* と *msxc* の蛍光 Tg が作製されており、再生応答による遺伝子の発現が再現されている (Fig. 2b) (Shibata et al., 2018; 横田, H27 年度修士論文)。これらの Tg を作製する際には、遺伝子発現の制御配列であるエンハンサーが遺伝子から離れた場所に位置している可能性を考慮して、細菌人工染色体 BAC が用いられた。これらの蛍光 Tg が傷害によって活性化を示すことから、作製に用いた BAC 配列の中には、再生応答を司るエンハンサー配列が含まれていると予想された。*fn1b* と *msxc* 遺伝子の BAC 配列を比べると、共通して高度に保存されている 300-500 bp の配列 *E1*・*E4* が見出された (Fig. 5)。さらに、再生応答遺伝子 *junbb*, *dlx5a*, *junba* の BAC 配列との比較から、*E1*・*E4* に加え、別の配列 *E5*・*E6* が発見された (Fig. 5)。これらはいずれも、別々のトランスポゾンに由来する配列であり、ゲノム中に 1 万コピー以上存在することが明らかになった。

これらの配列が RRE として機能し、再生応答に寄与しているのか明らかにするため、一連の *egfp* レポーターアッセイが行われた (Fig. 6)。はじめに、*fn1b* 遺伝子上流 4.5 kb には上流から順に *E4*・*E1*・*E5*・*E6* の 4 種の共通保存配列が並んでいるため、上流から 1 つずつ削ったコンストラクトを作製して、これらを導入した Tg のヒレを切断し応答の検証を行った (Fig. 7a)。上流 4.5 kb (*E4+E1+E5+E6*)・上流 3.2 kb (*E1+E5+E6*)・上流 1.8 kb (*E5+E6*) の 3 つの配列は、それぞれ再生ヒレで EGFP の発現、すなわち再生応答を示し、上流 0.8 kb (*E6*) は応答を示さなかった (Fig. 7b-e)。それぞれの Tg の再生応答細胞を切片で観察すると、*Tg(4.5k:egfp)* と *Tg(3.2k:egfp)* は上皮基底層の細胞、*Tg(1.8k:egfp)* は間葉細胞であった (Fig. 7b-d)。

さらに、*E4*, *E5*, *E6* それぞれの配列の機能を詳細に解析すると、*E4* と *E5* は単独では RRE として機能できないが、*E6* を含む *fn1b* の上流 0.7 kb の領域と組み合わせること

で応答を示した (Fig. 8a, b)。この *Tg(E5-0.7k:egfp)* と *Tg(E4-0.7k:egfp)* は間葉細胞で再生応答が見られた。さらに、*E2* (*E1* の類似配列) とその隣接配列からなる *E2L* は、機能を持たない最小プロモーター (*miniP*) との組み合わせでも応答を示したことから、単独でも機能できることが明らかになった (Fig. 8c)。この *Tg(E2L-miniP:egfp)* の応答細胞は上皮基底層の細胞であった。さらに *E2L* 配列内を解析すると、共通保存配列の *E2* ではなく、由来の異なるわずか 100 bp の隣接配列 (= *E2S*) が RRE として機能していることが明らかになった (Fig. 8d)。この *Tg(E2S-miniP:egfp)* も上皮基底層の細胞で応答が見られた。これらを総合すると、*E5* と *fn1b* 上流 0.7 kb の組み合わせ、*E4* と *fn1b* 上流 0.7 kb の組み合わせ、そして *E2S* が RRE として機能できる配列であることが示唆された。

(9) 再生応答エンハンサーに含まれる転写因子結合配列

RRE として機能できる配列が複数同定されたが、これらに共通する特徴を探るために、転写因子結合データベースを用いて各配列内に含まれる転写因子結合モチーフの検索を行った。すると、*E4*・*E5*・*E2S* に共通した結合モチーフとして E-box が、また *E6*・*E2S* に共通した結合モチーフとして TRE [12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) response element] がそれぞれ見出された (Fig. 9a)。このうち、TRE モチーフは過去同定された RRE においても、RRE の応答に関与することが示唆されている (Kang et al., 2016; Bageman et al., 2020; Wang et al., 2020; Cao et al., 2022)。また、*LEN*, *IEN*, *careg* の 3 種類の RRE 配列のいずれにも、この 2 種類の結合モチーフは含まれており、E-box と TRE は RRE に共通して含まれる結合モチーフである可能性が示された (Fig. 9b)。

実際に、田牧らによる先行研究によって、E-box と TRE のタンデム配列の組み合わせだけでも RRE 活性を示すこと (Fig. 10a, b)、これらの転写因子結合配列に変異を入れると活性が失われることが示されている。これらの結果から、RRE が E-box と TRE から構成されていることが示唆された。

(10) RRE を介した再生応答の全体像

ここまで、E-box と TRE が RRE を形作り、再生応答に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。しかし、あくまでもこれは組織再生プロセスにおけるほんの一部分に過ぎない。何がキューとなって再生応答がスタートし、どのようなシグナルを介して RRE が活性化して、実際の再生応答遺伝子の発現の誘導へと進んでいくのか、全体像はよく分かっていない。本研究では、特に以下の三点に着目して、傷害から再生に至るまでの RRE を介した再生制御メカニズムを理解することを目的とした。

(11) RRE は実際に bZIP・bHLH 転写因子カスケードを通じて活性化されるのか

まず一つ目の疑問は、RRE の上流ではどのようなシグナルが働いているのか、という点である。先行研究におけるレポーターアッセイから、E-box と TRE モチーフの組み合わせがヒレ再生において、RRE として機能していることが示唆された (Fig. 9, 10)。しかし、その上流でどのようなシグナルが機能して RRE 応答に寄与しているのか、その実体は分かっていない。E-box はコンセンサス配列として CAGCTG もしくは CACCTG を持ち、Tcf, MyoD, Myc, Twist といった bHLH (basic Helix-Loop-Helix) 型の転写因子と結合することが知られている。一方で TRE は、コンセンサス配列として TGASTCA を持ち (Hess et al., 2004)、c-Fos, c-Jun から成る AP-1, ATF, JDP など bZIP ファミリーのロイシンジッパー型転写因子の二量体が結合する。本研究では第一に、E-box と TRE それぞれに作用していると考えられるシグナルを、薬理的もしくは遺伝学的に阻害することによって、実際にこれらの転写因子が RRE 活性化に機能しているのか検証を行った。

(12) RRE はヒレ以外の組織や異なる種の再生時にも活性化されるのか

二つ目の疑問は、RRE の機能が組織や種を問わず普遍的なものなのか、という点である。これまで、ゼブラフィッシュの尾ヒレの再生における RRE の活性化を確認してきたが、同定した RRE が別の組織、あるいは別の動物でも RRE として機能できるかどうかは不明である。例えば、*LEN* はヒレ再生だけでなく心臓再生でも機能でき、さらにゼブラフィッシュから同定されたにも関わらず、マウスでも傷害によって活性化されることが示されている (Fig. 4a) (Kang et al., 2016)。我々が同定した RRE も、同様に組織や種を超えて傷害によって活性化されるのか、検証する必要がある。本研究では、ゼブラフィッシュの心臓をはじめとした尾ヒレ以外の組織への傷害や、アフリカツメガエルの組織への傷害において RRE の活性化が見られるのか検証した。

(13) RRE 活性化を誘導するキューは何なのか

三つ目の疑問は、どのような傷害が RRE 活性化のキュー (合図) となっているのか、という点である。Wang らは、傷害のタイプによって RRE の応答が異なることを示した。*IEN* は鰭条間組織への傷害にはほとんど応答せず、組織の喪失を伴う傷害には強く応答することを示している (Fig. 11a) (Wang et al., 2020)。また、ゼブラフィッシュではこれまでに、様々な傷害モデルが開発されてきた。例として、ヒレの穴開け (Puncture) モデルがある。Cao らはヒレの内部に穴を開ける手法を開発し、この傷害の後には基部側から先端側に向かって組織が伸長して穴を埋めていくこと、*msxc* や *andl* といった再生芽マーカー遺伝子の発現を伴う再生芽様の組織が形成されることを示している (Fig. 11b) (Cao et al., 2021)。また、ヒレの鰭条間組織への傷害や上皮の擦過傷といったモデルも報告されている (Kizil et al., 2009; Chen et al., 2016)。このような多様

な傷害モデルと、RRE の応答を組み合わせたアプローチは、再生応答のキューを探る上で有効な手段と考えられる。ただ、切断以外の傷害についての RRE 応答の解析はほとんどなく、再生応答が起こる条件、再生応答を誘導できる傷害は未だに不明瞭である。本研究では様々な傷害法と、複数の再生応答遺伝子の発現ならびに RRE の活性化を再生応答のインジケータとして組み合わせ、包括的な解析を行った。

2, 材料と方法

(1) 実験動物の飼育

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野生型のゼブラフィッシュとして用いた。ゼブラフィッシュ成魚は水温 28.5 °C の循環水槽システム中で飼育し、照明周期は明期 14 時間・暗期 10 時間に管理した。また、生後 14 日までのゼブラフィッシュ胚は 28.5 °C のインキュベーター内で Egg Water (1.5 mg/mL Artificial marine salt, 0.05 mg/mL Methylene blue) 中で飼育した。

アフリカツメガエルは山形大学の越智研究室で維持されている野生型系統を用い、24 °C のインキュベーター内で飼育した。

(2) トランスジェニック系統

本研究で使用した以下のゼブラフィッシュ Tg は、いずれも当研究室で維持されている系統を用いた。

RRE Tg (Tamaki et al., 2023)

Tg(4.5k:egfp)^{tyt216}, *Tg(3.2k:egfp)^{tyt217}*, *Tg(1.8k:egfp)^{tyt218}*,
Tg(E5-0.7k:egfp)^{tyt220}, *Tg(E4-0.7k:egfp)^{tyt219}*,
Tg(E2S-miniP:egfp)^{tyt222}, *Tg(E2L-miniP:egfp)^{tyt221}*,
Tg(6xEbox-0.7k:egfp)^{tyt223}, *Tg(6xEbox-6xTRE-miniP:egfp)^{tyt224}*

再生応答遺伝子 Tg

BAC Tg(msxc:egfp)^{tyt240} (横田, H27 年度修士論文),
BAC Tg(fn1b:egfp)^{tyt212} (Shibata et al., 2018)

組織マーカー遺伝子 Tg

Tg(sp7:mCherry)^{tyt209} (Ando et al., 2017),
Tg(itgb4:CreERT2; actb:loxP-dsRed2-loxP-egfp)^{tyt233} (Liu et al., 2024),
Tg(fli1:egfp)^{y1} (Fukui et al., 2009), *Tg(gata1:mRFP)^{ko06}* (Kitaguchi et al., 2009),
Tg(lysC:egfp)^{ko02} (Kitaguchi et al., 2009)

また、*Tg(hsp70l:mKO2-2a-dnlef1)^{tyt225}* と *Tg(hsp70l:mKO2-2a-βcatCA)^{tyt226}* は、大阪大学の石谷教授から分与していただいたプラスミド *pTol2(hsp70l:mKO2-2a-dnlef1)* と *pTol2(hsp70l:mKO2-2a-βcatCA)* (Akieda et al., 2019) を使用して作製した。このコンストラクトを、2 mg/mL の Pronase (アクチナーゼ E, Nacalai Tesque) によって卵膜を取り除いた 1-2 細胞期の受精卵へマイクロインジェクションした。受精後 3 日目以降に、*hsp70l* プロモーターが自律的に発現するレンズでの mKO2 (mKusabira-Orange2) 蛍光によってトランスジーンの高効率の導入効率の高い F0 個体を選抜し、成魚まで育てた。これらの

F0 個体同士を掛け合わせて、レンズでの mKO2 蛍光によって F1 キャリアを同定した。実験には F1 キャリアと他の Tg を交配して得られた F2 世代を使用した。

*インジェクション溶液

- 25 ng/μL Tol2 プラスミド DNA
- 25 ng/μL Transposase mRNA
- 0.2 M KCl
- 0.25 % Phenol Red

アフリカツメガエルへの *1.8k:egfp*, *6xE-0.7k:egfp* コンストラクトのインジェクションおよびアッセイは、山形大学の越智研究室と共同で行った。各コンストラクトをカエル卵へとマイクロインジェクションして導入し、Tg を作製した (Kroll and Amaya, 1996)。

(3) ゼブラフィッシュ組織への傷害

ゼブラフィッシュ組織への傷害実験はいずれも 0.05 % Tricaine (Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt, Sigma) で麻酔したのちに行った。実験操作を行った後はすばやく飼育水へと戻して麻酔から覚まし、その後は元の飼育環境で飼育して再生を促した。傷害実験には 2-10 月齢の成魚を使用した。

各組織への傷害、ヒレへの各傷害は以下の通り行った。

• ヒレ切断

解剖用メスを用いて背腹軸に沿ってヒレを切断した。

• 鱗の剥離 (De Simone et al., 2021)

ピンセットを用いて 1-3 枚程度の鱗を引き剥がした。

• 心筋の切除 (Poss et al., 2002; Ito et al., 2014)

魚の胸に剪刀で T 字に切れ込みを入れて開胸し、心臓を露出させる。その後、ピンセットで心臓を持ち上げながら、剪刀で心臓の下部 30 %を目安に切断した。

• 鰭条間組織への傷害 (Wang et al., 2020)

アガロースで作ったステージ上でヒレを広げ、針で鰭条間に切れ込みを入れた。

• 上皮へのスクラッチ傷害 (Chen et al., 2016)

綿棒を用いてヒレの表面を 5 回ほどこすり傷害を与えた。

• ヒレへの穴開け傷害 (Cao et al., 2021)

メスを用いてヒレの内部を一辺 300-500 μm の四角形に切り抜いた。

• ヒレへの低温傷害

先端がステンレス製の柄付き針を液体窒素に 90 秒間浸して冷却する。すぐにヒレの表面に針の先端を 15 秒間接触させて傷害を与えた。接触部分の周囲に同心円状に付いた霜で傷害の範囲は推定できる。

(4) ゼブラフィッシュへの熱ショック

熱ショック処理にはウォーターバスを用いた。受精後 6 時間の幼生は 50 mL チューブに Egg Water とともにに入れて 38 °C に温めたウォーターバス中で 1 時間ゆっくり振盪することで熱ショックをかけた。2-4 月齢の成魚は十分なエアレーションを与えながら 38 °C に温めたウォーターバス中に 1 時間おいて熱ショックをかけた。熱ショックは 12 時間おきに行い、ヒレを切断する場合はあらかじめ切断 6 時間前に熱ショックをかけておいた。Tg への熱ショックの効果は蛍光レポーターである mKO2 の発現によって確認した。

(5) ゼブラフィッシュの薬剤処理

JNK の阻害剤として SP600125 (Selleck) を、JNK のアゴニストとして Anisomycin (Selleck) を使用した。SP600125 と Anisomycin は DMSO (Dimethyl sulfoxide, Nacalai Tesque) 中に 10 mM の濃度で溶解し、-80 °C の冷凍庫で保存した。溶媒には E3 buffer (組成は以下に示す) を用い、SP600125 は終濃度 15 μ M, Anisomycin は終濃度 10 μ M となるようにストック溶液を加えて薬剤処理用の溶液とした。なお、0.1 % DMSO/E3 buffer をそれぞれのコントロールとした。

実験には 3-6 月齢の成魚を使用し、ヒレ切断を行う場合は 6 時間前に溶液に魚を入れて前もって薬剤処理を開始した。溶液は 1 日おきに交換した。

*E3 buffer

5 mM NaCl

0.17 mM KCl

0.33 mM CaCl₂

0.33 mM MgSO₄

50 mM Hepes pH 7.5

(6) ゼブラフィッシュの Cre-loxP による細胞標識

Cre-loxP システムは DNA 組換え酵素の Cre とその認識配列の loxP によって生じる遺伝子組換え反応である。本研究で使用した Tg(*Actb:loxP-dsRed2-loxP-EGFP[RSF]*) は β -actin プロモーターの制御下に、loxP で挟まれた dsRed2 が存在し、ほぼすべての細胞で dsRed2 が発現して赤色蛍光を持つ (Ando et al., 2017; Yoshinari et al., 2012)。Cre Tg と掛け合わせて組換えを誘導すると、loxP 部位に挟まれた dsRed2 のコード配列がほぼ不

可逆的に切り出され、代わりに下流にある *egfp* が転写翻訳されるようになる。その後は β -actin プロモーターによって組み換えた細胞では EGFP が発現され続ける。

Cre Tg で使用した融合タンパク質 Cre-ERT2 は DNA 組換え酵素 Cre と ERT2 (t2 変異をもった estrogen receptor) からなり、内在性の estrogen による非特異的活性化が抑えられている。代わりに、外部から投与する tamoxifen 依存的に ERT2 が活性化し、Cre とともに核内に移行することで遺伝子を組み換えることができる。

具体的には Tg(*itgb4:CreERT2;RSG*) を、終濃度 5 μ M になるように 4-hydroxytamoxifen (Sigma) を加えた egg water 内で 1 日間飼育し、組換えを誘導した。その後、蛍光顕微鏡下で体表の EGFP 蛍光によって上皮細胞における組換えを確認した。

(7) アフリカツメガエルの肢芽の切断

アフリカツメガエルの肢芽の切断実験は、0.05 % Tricaine (Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt, Sigma) で麻酔したのちに行った。

肢芽は発生ステージ 52 (Niekoop and Fever, 1994) で、マイクロシザーを用いて背腹軸に沿って切断した (Hayashi et al., 2015)。その後、すぐに飼育水へと戻して麻酔を覚まし、24 °C インキュベーター内で飼育して再生を促した。

(8) 凍結切片の作製

ゼブラフィッシュから採取したヒレあるいは心臓のサンプルは 4 % PFA (Paraformaldehyde) /1x PBS に入れて 4 °C で一晩振盪して固定した。固定したサンプルは PBS で洗浄したのち、20 % Sucrose /1x PBS 中で 4 °C にて一晩振盪することで平衡化した。その後、OCT compound (Tissue-Tek, Sakura Finetek) に包埋して -20 °C で保存した。凍結サンプルはクライオスタット (Leica) を用いて 16-20 μ m の厚さの切片にして、スライドガラスへと貼り付けた。作製した切片はよく乾燥させ、4 °C 冷蔵庫で保存した。

(9) 切片の免疫組織化学

はじめに、切片を貼り付けたスライドガラス表面を 1x PBS で満たして OCT compound を取り除いた。次に 1x PBT (0.1% Tween-20 (Nacalai Tesque) /1x PBS) へと置換し 15 分洗浄した。その後 Blocking Buffer (5% FBS (Fatal bovine serum) /1x PBT) へと置換し、乾燥を防ぐため湿箱内に入れて 30 分以上ブロッキングを行った。続いて Blocking Buffer で希釈した一次抗体へと置換し、1 時間以上抗体反応させた。抗体反応終了後は、湿箱から取り出し、染色瓶中で 1x PBT による洗浄を 10 分×3 回行った。次に Blocking Buffer で希釈した二次抗体および DAPI と反応、遮光しながら湿箱内で 1 時間以上抗体反応させた。その後は再度、染色瓶中で 10 分×3 回の洗浄を行った。最

後にスライドガラスに 2.5 mg/mL DABCO (Triethylenediamine) (Nacalai Tesque) 入りの 80 % Glycerol を適量のを、カバーガラスで封入した。封入の完了したサンプルは共焦点レーザー顕微鏡 (FV-1000, Olympus) もしくはベンチトップ蛍光顕微鏡 (APX100, Olympus) を用いて観察・撮影を行った。

なお、免疫組織化学の際に使用した抗体とその希釈率は以下の通りである。

- 一次抗体 ・ ラット由来抗 EGFP 抗体 (Nacalai Tesque): 1/500
- ・ マウス由来抗 mCherry 抗体 (Abcam): 1/500
 - ・ マウス由来抗 Zns5 抗体 (Zebrafish International Resource Center): 1/100
 - ・ マウス由来抗 MF20 抗体 (Invitrogen): 1/1000
- 二次抗体 ・ Alexa-488 標識抗ラット抗体 (Invitrogen): 1/500
- ・ Alexa-568 標識抗マウス抗体 (Invitrogen): 1/500
- 核染色剤 ・ DAPI (4', 6-diamino-2-phenylindole) (Invitrogen): 0.1 μ L/mL

(10) In situ hybridization (ISH)

Thisse らの手法を用いて ISH を行った (Thisse and Thisse, 2008)。ヒレサンプルを 4 % PFA/1x PBS に入れて 4 °C で一晩振盪して固定した。その後 1x PBT で洗浄し、MeOH に置換して脱水し-20 °C で保管した。サンプルは段階的に 1x PBT へと置換して再水和し、10 μ g/mL Proteinase K/1x PBT で 20 分間処理して再び 1x PBT で洗浄した。次に Hybridization Buffer (50 % Formamide, 5x SSC [Saline sodium citrate, pH7.0], 500 μ g/mL torula [yeast] RNA, 50 μ g/mL Heparin, 0.1 % Tween20, 9 mM Citric acid [pH6.0-6.5]) へ置換して 70°C にて 2 時間プレハイブリダイゼーションを行った。5x SSC は 20x SSC (3 M NaCl, 0.3 M Sodium citrate, pH7.0, Nacalai tesque) から調製した。その後、Digoxigenin (DIG) 標識したアンチセンス RNA プローブを約 1 μ g/mL の濃度になるよう加えた Hybridization Buffer へと置換して 70 °C にて一晩ハイブリダイゼーションを行った。続いて、70 °C のまま段階的に 2x SSC へと置換して 0.2x SSC で洗浄した。サンプルを室温に戻したのち、1x PBT へと段階的に置換した。その後 Blocking Buffer (2 mg/mL BSA [Bovine Serum Albumin], 5 % FBS [Fetal Bovine Serum]/1x PBT) で 2 時間のブロッキングを行い、Blocking Buffer で 4000 倍希釈した Alkaline Phosphatase 標識抗 DIG 抗体に置換して抗体反応を 4°C で一晩行った。1x PBT での洗浄後、NTMT Buffer (50 mM MgCl₂, 0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 0.1% Tween20) に置換し、最後に 450 μ g/mL NBT (Nitro Blue Tetrazolium), 175 μ g/mL BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphate) を含む NTMT Buffer へと置換して遮光しながら振盪して発色反応を行った。発色を確認したのち、1x PBT で洗浄し 4 % PFA/1x PBS に置換して発色を停止させた。Whole mount では、サンプルは 80 % glycerol で置換して実体顕微鏡で観察を行った。切片を作成する場合は、前述の通り凍結切片を作成して観察を行った。

DIG 標識 RNA プローブの作製に使用したプライマーは以下の通りである。T7 プロモーター配列を大文字、相同配列は小文字で示す。

junbl probe Fw 5'- atgagtacaaaaatggagcagccgttttac -3'

junbl probe Rv 5'- TAATACGACTCACTATAGGGaactctccgttggttccttcccaggtgatg -3'

krt4 probe Fw 5'- atgtcaaccaggtctatcacctactccageggtgg -3'

krt4 probe Rv 5'- TAATACGACTCACTATAGGGatagcgtttactgctgacgggtgacactgg -3'

msxc probe Fw 5'- atggccccctttatcatctatgatgaattctgaagg -3'

msxc probe Rv 5'- TAATACGACTCACTATAGGGcgttagtctgcccaccgaaaagtc -3'

fn1b probe Fw 5'- gcatgtgtcatggaccgcac -3'

fn1b probe Rv 5'- TAATACGACTCACTATAGGGagcgtacagtcaaggtattg -3'

(11) TUNEL 染色

ゼブラフィッシュから回収したヒレサンプルは 4 % PFA/1x PBS に入れて 4 °C で一晩振盪して固定した。固定したサンプルは PBTx (0.1 % TritonX-100 [polyethylene glycol tert-octylphenyl ether]/1x PBS) で洗浄し、メタノールに置換して脱水し-20 °C で保管した。サンプルは段階的に 1x PBTx へと置換して再水和し、10 µg/mL Proteinase K/1x PBTx で 20 分間処理して再び 1x PBTx で洗浄した。次に 0.1 % Sodium Citrate, 0.1 % TritonX-100/H₂O へ置換し 15 分反応させ、1x PBTx で洗浄した。最後に Labeling Safe Buffer: TdT Enzyme = 1: 9 溶液 (In situ Apoptosis Detection Kit, Takara) へと置換して 37 °C で 2 時間反応させた。反応後は 1x PBTx で洗浄し、反応を停止させた。Whole mount では、サンプルは 2.5 mg/mL DABCO 入りの 80 % Glycerol で置換して蛍光実体顕微鏡で観察を行った。切片を作成する場合は、前述の通り凍結切片を作成して観察を行った。

3, 結 果

(1) TRE を介した RRE 活性化における Jun N-terminal kinase (JNK) による Jun/Fos のリン酸化の機能

先行研究において同定された RRE には、E-box と TRE の 2 つの転写因子結合モチーフが含まれることが示唆されたが、E-box や TRE を含む *E2S, E4, E5, E6* は、*fn1b* 上流に複数存在しており、どの配列が RRE としてエッセンシャルなのか、またはすべてが貢献しているのか不明である。さらに、ゲノム中には潜在的な E-box や TRE を含む配列が無数に存在しており、RRE 配列をピンポイントでゲノムからノックアウトすることは不可能である。そのため、RRE 活性化において E-box と TRE が再生にとって機能的に重要な役割を果たしているかどうか、そしてどのようなシグナルが活性化に作用しているのかを調べるために、両モチーフの上流で機能していると考えられる転写因子やシグナルの阻害を試みた。

当研究室の先行研究では、再生過程で誘導される *Junba* や *Junbb* といった Jun タンパクは JNK によってリン酸化され、再生に必須の役割を果たしていることが示されている (Ishida et al., 2010)。Wang らは JNK 阻害剤である SP600125 の処理によってヒレ再生が阻害され、同時に *IEN Tg* の EGFP 発現、すなわち再生応答も低下することを示している (Wang et al., 2020)。よって、傷シグナルによる JNK の活性化が、早期誘導タンパク Jun をリン酸化し、これらが TRE モチーフに作用することで、RRE の活性化に寄与していると予想される (Fig. 12a)。

RRE の活性化が JNK 阻害剤 SP600125 の処理によって影響を受けるのかどうか、*Tg(E4-0.7k:egfp)* と *Tg(E2L-miniP:egfp)* を用いて検証した。あらかじめ薬剤処理を開始して JNK が阻害された状態にした個体のヒレを切断し、その後も薬剤処理を継続した (Fig. 13a)。その結果、過去の報告と同様に JNK 阻害剤によってヒレ再生の阻害が見られた。また、*Tg(E4-0.7k:egfp)* の間葉細胞における EGFP 発現はほぼ完全に消失し、*Tg(E2L-miniP:egfp)* の上皮基底層細胞における EGFP 発現は低下した (Fig. 13b, c)。つまり、JNK の阻害は再生と RRE 活性化を低下させることが示された。従って、JNK による Jun リン酸化が TRE を介した RRE の転写応答に必要であることが示唆された。

(2) E-box を介した RRE 活性化における β カテニンと Tcf/Lef の機能

TRE と同様に、E-box を介したシグナルも RRE 応答に必須なのかどうか、E-box の上流と予想されるシグナルを阻害することで検証を試みた。E-box モチーフは Tcf, Myc, Twist などの bHLH 型転写因子の標的であることが知られている (Jones, 2004; Wang and Baker, 2015)。E-box に結合する様々なタイプの bHLH 転写因子の中でも、RRE として最も保存されていたコア配列 CAGCTG は、Tcf/Lef ファミリーの *tcf3, tcf12* などの E2A サブグループの転写因子と最も高アフィニティで結合することが示唆され

ている (Cadigan and Waterman, 2012)。Tcf/Lef ファミリーは N 末端に β カテニンとの結合ドメインを持っており、 β カテニンは Tcf と複合体を形成して、標的 DNA 配列上へリクルートされることが示唆されている。N 末端を欠失した *lefl* は多くの Tcf/Lef に対してドミナントネガティブに働くことが示されている (Fig. 14a, b) (Vacik and Lemke, 2011; Cadigan and Waterman, 2012)。

そこで、本研究では *lefl* の N 末端の約 100 アミノ酸を欠失させた *dnlefl* (*dominant-negative lefl*) を *hsp70l* プロモーター下流につないだコンストラクトを導入したゼブラフィッシュ *Tg(hsp70l:mKO2-2a-dnlefl)* の系統を作製し、阻害実験に使用した (Fig. 14c) (Akieda et al., 2019)。この Tg では熱ショックによって *dnlefl* を強制発現させ、E-box への Tcf 転写因子の作用を競合的に阻害することが期待される。

作製した Tg の機能を検証するために、発生初期に熱ショックを与え、発生への影響を調べた。受精 6 時間後の胚に熱ショックを与えて *dnlefl* を発現させると、 β カテニンや Wnt シグナルの阻害を示す表現型である、尾部の縮小や欠損といった発生異常が観察された (Fig. 14d) (Hao et al., 2013; Lin et al., 2015)。従って、この Tg における *dnlefl* の強制発現は実際に β カテニン-Tcf/Lef の相互作用を阻害できていることが示唆された。

この *Tg(hsp70l:mKO2-2a-dnlefl)* と、*Tg(E4-0.7k:egfp)*, *Tg(E2L-miniP:egfp)*, *Tg(6xE-0.7k:egfp)* をそれぞれ掛け合わせてダブル Tg を作製し、ヒレ再生と RRE 活性化に対する *dnlefl* 強制発現の影響を調べた。あらかじめ熱ショックをかけて *dnlefl* の発現を誘導したのちにヒレを切断し、その後も 1 日 2 回の熱ショックを継続的に与え続けた (Fig. 15a)。その結果、いずれの Tg でもヒレ再生が阻害され、*Tg(E4-0.7k:egfp)* の間葉細胞における EGFP の発現はほぼ完全に消失し、*Tg(E2L-miniP:egfp)* の上皮細胞における EGFP 発現も低下した (Fig. 15b, c)。また、*Tg(6E-0.7k:egfp)* でも表層の傷上皮細胞の EGFP 発現が消失した (Fig. 15d)。このように、E-box の上流と考えられる、 β カテニン-Tcf/Lef 相互作用の *dnlefl* 強制発現による阻害は再生のみならず、RRE 活性化も低下させた。この結果は、Tcf/Lef 転写因子の E-box モチーフへの作用が、RRE の転写応答に必要であることを示している。

以上の結果から、TRE ならびに E-box モチーフは、それぞれ Jun ファミリーの bZIP 転写因子と Tcf などの bHLH 転写因子を介して活性化されており、両方のシグナルカスケードの協調した作用が、RRE の活性化ならびに組織再生に必須の役割を持っていることが示唆された。

(3) E-box/TRE の上流シグナルの活性化による RRE 応答の誘導

次に、RRE 上流シグナルの阻害とは反対に、上流シグナルを人為的に活性化した場合、RRE は切断のような上流シグナルを誘導する傷害がなくとも、活性化することができるのか検証した。

まず、TRE 上流の活性化には JNK のアゴニストである Anisomycin を使用した。Anisomycin は JNK を活性化することで Jun をリン酸化し、TRE シグナルを誘導すると考えられる (Fig. 12a)。Anisomycin 処理を行った個体の未切断ヒレを回収し、リン酸化された Jun を抗体染色で検出すると、処理個体では未切断のヒレ全体で一様な発現を確認できた (Fig. 12b)。よって、Anisomycin 処理はゼブラフィッシュ体内で Jun のリン酸化を引き起こすことが確認された。一方の E-box 上流の活性化には、*Tg(hsp70l:mKO2-2a-constitutively active β -catenin (β -catCA))* を使用した (Fig. 14c) (Akieda et al., 2019)。この Tg においては、ヒートショックによって constitutive-active フォームの変異型 β カテニン (β -catCA) を強制発現させて、下流の Tcf/Lef を常時活性化することができる (Fig. 14e) (Mavila and Thundimadathil, 2019)。そのため、切断を伴うことなく E-box 上流のシグナルが誘導できると考えられる。この Tg における β -catCA の発現誘導は、mKO2 蛍光によって確認した。これらの上流シグナル活性化を RRE Tg に対して行うことによって、傷害なしに RRE 活性化を誘導することができるのか検証した。

Tg(1.8k:egfp) と *Tg(hsp70l:mKO2-2a- β catCA)* のダブル Tg を作製し、実験に使用した。ヒレ切断時には、RRE 活性化による EGFP 発現は切断から約 2 日経過した時点でははっきりと確認できるようになる。そのため、2 日間にわたって薬剤処理あるいは熱ショック処理、もしくはその両方を行った (Fig. 16a)。その結果、熱ショックによる β -catCA 強制発現のみ、Anisomycin 処理のみの群では EGFP 発現は見られなかったが、2 つを組み合わせた群では EGFP 発現が誘導され、RRE の活性化が確認された (Fig. 16b)。応答細胞は鱗条上に存在しており、*Tg(1.8k:egfp)* のヒレ再生において切断面よりも基部側で見られるものとよく似ている (Fig. 7d)。2 つの操作によってはじめて RRE 活性化が誘導できたことは、 β カテニン-Tcf/Lef ならびに JNK-Jun/Fos のシグナルカスケードの両方が RRE の上流で機能しており、RRE 活性化には 2 つのシグナルカスケードが機能することが必要十分であることを示している。また、傷害なしに RRE 活性化を誘導できたことは、少なくとも切断が再生応答のキューとして、この 2 種類のシグナルカスケードを誘発させ、RRE 活性化に結びついていることを示唆している。

(4) ゼブラフィッシュの多様な組織における RRE の活性化

続いて、我々が同定した RRE が、普遍的に傷害に応答して機能できるシステムなのか、検証を行った。

はじめに、ゼブラフィッシュの他の組織でも再生時や傷害時に活性化が見られるのか、検証を行った。ゼブラフィッシュの胸ヒレは、陸上脊椎動物の前肢の相同器官であり、尾ヒレと同様に再生可能である (Darnet et al., 2019)。*Tg(1.8k:egfp)*, *Tg(E4-0.7k:egfp)*, *Tg(E2L-miniP:egfp)*, *Tg(6xE-0.7k:egfp)* の 4 種類の Tg の胸ヒレをそれぞれ切断して、再生の様子を観察した。すると、いずれの Tg においても再生してきた胸ヒレ

においてEGFPの発現が見られた (Fig. 17)。EGFPの発現は *Tg(1.8k:egfp)* と *Tg(E4-0.7k:egfp)* では鰭条とその延長上の間葉と再生芽、*Tg(E2L-miniP:egfp)* では鰭条間の上皮、*Tg(6xE-0.7k:egfp)* では表層の傷上皮と、尾ヒレで観察された発現パターンとおおむね一致していた (Fig. 7d, 8b, 8c, 10b)。このことから、ヒレ再生に関しては、対ヒレか正中ヒレかを問わずにRREは切断によって活性化され、EGFPの発現パターンも共通していることが示された。

さらに、ヒレとは別の組織の再生についても検証を行った。鱗は骨芽細胞を含む骨組織であり、魚類の体表を覆っている (Aman et al., 2018)。鱗は自然に脱落することもあるが、失ったとしても約2週間で完全に再生する (De Simone et al., 2021)。鱗の再生の様子を可視化するために、RRE Tg と、骨芽細胞を可視化する *Tg(sp7:mCherry)* とを掛け合わせたダブル Tg 系統を作製して使用した。鱗を剥離してから3日ほどすると、再生してくる鱗を縁取るように、上皮細胞で活性化する *E2L RRE* の応答が見られた (Fig. 18)。よって、鱗の再生でもRREは活性化されることが明らかとなった。

加えて、心臓における心筋再生時の活性化も検証した。ゼブラフィッシュの心臓は約30%を切除されても再生することが可能で、このプロセスでは失われた部分を瘢痕組織が一時的に埋め、やがてこの部分が心筋組織によって置き換えられることで再生が完了する (Poss et al., 2002)。この心筋再生のプロセスで、ヒレ再生において傷上皮で発現する *fn1b* は切断前から心外膜で発現しており、切断後には再生組織で発現が誘導された (Fig. 19a)。一方、ヒレ再生において間葉細胞で活性化する *1.8k RRE* は切断面よりも基部側に残された、筋細胞マーカー *MF20⁺* の心筋組織の部分で活性化が見られた (Fig. 19b)。このように心筋再生においても、RREの活性化は見られた。

以上の結果から、傷害に対するRREの活性化システムは、尾ヒレ再生に限定的なものではなく、ゼブラフィッシュの多くの組織においても同様に機能することが示唆された。

(5) アフリカツメガエルにおけるゼブラフィッシュ RRE の活性化

先行研究で報告されたRREである *LEN* は、哺乳類の指先の切断において、再生できない組織であるにも関わらず活性化されることが示されている (Fig. 4a) (Kang et al., 2016)。これは *LEN* の機能は種を超えて保存されており、RREの活性化メカニズム自体は再生能力の低い哺乳類にも存在することを示唆している。RREを構成するE-boxとTREは、*LEN*にも同様に含まれていることが示唆されている (Fig. 9b) (Tamaki et al., 2023)。しかし、我々が同定したRREが実際に他の生物種で機能するかどうか、その直接の証拠はない。他の生物種でも傷害によって活性化するのかどうか、アフリカツメガエルを用いて検証を行った。

無尾両生類に属するアフリカツメガエルは、ゼブラフィッシュと同様、様々な組織に高い再生能力を持つことで知られている。このうち、ゼブラフィッシュのヒレの相

同器官にあたる四肢は、発生段階によって再生能力が変化するという特徴がある (Dent, 1962)。変態前の幼生は四肢原基 (肢芽) を付加再生によって完全に再生することができるが、この能力は発生が進むにつれて失われていく (Keenan and Beck, 2016)。一定の発生ステージを過ぎると、切断された四肢は指や関節を持たない、軟骨性の一本の棒状の構造であるスパイクを形成することしかできなくなってしまう。本研究では、再生できる幼生の期間に、RRE 活性化の検証を行った。

アフリカツメガエルで RRE 活性化の検証を行うために、ゼブラフィッシュの *1.8k* と *6xE-0.7k* の DNA コンストラクトをアフリカツメガエル卵へと導入して Tg を作製し、F0 世代を使用してアッセイを行った (Fig. 20a)。再生可能な発生ステージの個体の肢芽を切断して、再生の様子を観察した (Fig. 20b)。すると、再生してきた組織において EGFP の誘導が観察された (Fig. 20c, d)。外見から判断する限り、*Tg(1.8k:egfp)* では間葉、*Tg(6xE-0.7k)* では表層の上皮と、ゼブラフィッシュヒレと応答細胞も一致していた。以上の結果は、我々が同定した RRE は種を越えて機能できることを示しており、RRE のシステムが幅広い組織や種に保存された、傷害に応じて活性化する普遍的なシステムである可能性を支持している。

(6) 再生応答を誘導できる傷害の探索

上流シグナルの操作実験を通して、RRE の上流で働くシグナルが明らかになってきたが、これらのシグナルは具体的に、どのような傷害がキューとなって誘起されているのか不明である。少なくとも切断は、再生応答のキューとなり得る要素を含む傷害であると考えられる。実際に、ゼブラフィッシュにおける RRE 活性化のアッセイには、これまで一般的にヒレ切断が用いられてきた。切断以外の傷害による RRE 活性化についても、わずかだが報告がある。Wang らが同定した RRE である *IEN* は、鰭条を含む組織の喪失を伴う傷害によって活性化する一方で、鰭条間組織への傷害によっては活性化しないことが示されている (Fig. 11a) (Wang et al., 2020)。ただ、RRE 活性化の有無を分けているもの、そしてキューとなり得る条件は何なのか、詳細は不明なままである。例えば、ROS (活性酸素種) の産生プロファイルは、鰭条間への傷害と切断によって異なっているという報告もあり、傷害の種類によって組織が置かれる状態は多様だと考えられる (Gauron et al., 2013)。しかし、異なる傷害によってもたらされる RRE 活性化の違いに焦点を当てた研究はこれまでになく、このテーマに関する知見はほとんどない。そこで本研究では、ゼブラフィッシュのヒレにおいて様々な種類の傷害を与えることによって、RRE 活性化ならびに再生遺伝子の発現を包括的に調査し、RRE 上流シグナルを誘導して、再生応答のキューと成り得る傷害を探索することとした。

本研究では、間葉が応答する *Tg(1.8k:egfp)* と上皮が応答する *Tg(E2S-miniP:egfp)* の 2 タイプの RRE を代表として使用し、これらの活性化を検証した。加えて、複数の再

生応答遺伝子の発現も検証した。再生芽マーカー遺伝子である *msxc*, 傷上皮マーカー遺伝子の *fn1b*, 再生芽などで発現が見られる *junbl* の3つの遺伝子の発現の誘導を、RRE 活性化と並ぶ再生応答のインジケータとして利用した (Ishida et al., 2010; Shibata et al., 2018)。なお、*msxc* と *fn1b* は Tg 系統を用いて EGFP の発現で、*junbl* は ISH による mRNA の検出でそれぞれの発現を評価した。

はじめに、①鰭条間の切れ込み傷害 (Inter-ray Incision), ②上皮の擦過傷 (Exfoliation Injury), ③ヒレ内部の穴開け傷害 (Puncture Injury) の以前報告されている3種類の傷害モデルをテストした。

1つ目の鰭条間の切れ込み傷害は、鰭条間組織に針で 2-3 mm のサイズのスリットを入れる手法である (Fig. 21a) (Kizil et al., 2016; Wang et al., 2020)。傷の修復は非常に早いスピードで進行し、2日後にはスリットは塞がった。この傷害では3つの再生応答遺伝子の発現はいずれも見られなかった (Fig. 21b)。また、2つの RRE の活性化も見られなかった (Fig. 21b)。これらの結果は過去の報告と一致しており、鰭条間への傷害は再生応答を誘導できないことを示唆している。

2つ目の上皮の擦過傷は、ヒレ表面を綿棒で擦ることで、上皮の外層に位置するケラチノサイトを物理的に除去する手法である (Fig. 22a) (Chen et al., 2016)。この傷害においても、再生応答遺伝子の発現ならびに RRE の活性化は見られなかった (Fig. 22b)。この傷害もまた、RRE 応答の誘導には不十分な傷害であると考えることができる。

3つ目のヒレ内部の穴開け傷害は以前、組織再生における極性の研究において用いられた手法である (Fig. 11b) (Cao et al., 2021)。鰭条を含むように、ヒレの内部をメスで一辺 300-500 μm ほどの四角形に切り抜く手法である (Fig. 23a)。切り抜かれた部分は再生芽様の組織によって速やかに埋められる。このプロセスは基部側から先端部へと方向性を持って進行することが特徴であり、再生芽様の組織では再生芽マーカー遺伝子 *msxc* や *andl* の発現が、穴の基部側でのみ観察されている (Fig. 11b) (Cao et al., 2021)。この報告と同様に、*msxc* の発現は再生芽様の組織、穴の基部側の領域でのみ見られることが確認された (Fig. 23b)。しかし、残りの再生応答遺伝子 *fn1b* と *junbl* は穴の基部側だけでなく、先端部側でも発現が見られた (Fig. 23b)。また、この傷害では RRE の活性化も見られた (Fig. 23b)。この際、*fn1b* や *junbl* で見られたように、穴の基部側のみならず、先端部側での応答がいずれの Tg でも見られた。2つの RRE については、穴が埋まっていくプロセスも追跡した。EGFP 発現のタイミングはヒレ切断時と類似しており、2-3 日後に強い応答が見られるようになった (Fig. 23c)。

以上の結果から、鰭条間の切れ込みと上皮の擦過傷は再生応答を誘導できない傷害であり、ヒレ内部の穴開けは RRE 応答を誘導できる傷害であることが、それぞれ明らかになった。よって穴開け傷害も切断と同様、RRE 活性化のキューを含む傷害といえる。また、穴開け傷害では、*msxc* の発現を伴う再生芽様の組織の形成が見られるこ

と、すなわち切断後の付加再生プロセスと非常に良く似た現象が起こっていると考えられる。

(7) 組織の分断や再生芽形成を伴わない新たな傷害モデルの開発

ここまでの結果から、ヒレ切断と穴開け傷害の2つは、RRE 応答を誘導できる傷害であることが明らかになった。この2つの傷害に共通する特徴を考えると、組織の分断による喪失、そして再生芽形成が起こっている。しかし、穴開け傷害では、再生芽組織が形成されない穴の遠位側でも RRE 応答が観察され、再生芽形成は RRE 応答には必須ではないことが示唆された (Fig. 23b, c)。そこで本研究では、組織の切断なしに RRE 応答が誘導されるかどうか検証するため、新たな傷害法を開発することとした。

そこで、低温傷害 (Cryoinjury) の手法に注目した。低温傷害ははじめ、ゼブラフィッシュの心筋再生の研究において、切断に代わる心臓への傷害法として開発された。心筋に冷却したプローブを当てて壊死を引き起こし、再生プロセスを誘導する手法である (Chablais et al., 2011)。低温傷害をヒレに適用した例もあるが、この手法では結果的に切断とよく似た再生プロセスが誘導される (Fig. 24) (Chassot et al., 2016)。具体的には、液体窒素で冷却した金属ブレードを、背腹軸に沿ってヒレ全体に当てることによって低温傷害を与えている。この傷害から1日後には、傷害部から先端側の組織は壊死を起こし始める。2日後になると壊死した細胞が脱落し、先端側の組織が失われた状態となる。その後、免疫細胞によるクリアランスを経た上で、切断時と同様に付加再生が始まる。この手法によって、*careg* RRE の活性化が誘導されることも示されている (Fig. 4b) (Pfefferli and Jazwińska, 2017)。しかし、この低温傷害の手法はヒレ先端部の大規模な喪失とそれに続く再生芽形成を誘導するゆえに、ヒレ切断と同様の結果がもたらされていると考えることができる。

このように、Chassot らのヒレ全体への低温傷害は、組織の大規模な壊死や喪失といった“シビア”なダメージをもたらす。これに対して、傷害範囲を局所的に限定することで組織の喪失を防ぎ、再生芽形成も誘導しない“マイルド”なダメージを与えることができるのではないかと考えた。本研究では傷害範囲を限定的にするために、先端がステンレス製の柄付き針をプローブとして、ブレードの代わりに使用した。この針の先端を液体窒素に浸して冷却し、ヒレに直接当てることで低温傷害を与えた (Fig. 25a)。冷却した針を当てた周囲のヒレ組織の表面には霜が着くため、組織が低温状態になっていること、また傷害の大まかな範囲も確認できた。

はじめに、“マイルド”な低温傷害法が、どのような変化や影響をヒレ組織に与えているのか調べた。まず、低温傷害後のヒレの外観を、通常、切断後にヒレ再生が完了する期間である2週間後まで継続的に観察した (Fig. 25b)。外観の観察で確認できた最も明確な変化は、ヒレの色素の消失である。傷害1日後 (1 dpi: day post injury) から色素が薄くなっていき、2 dpi では傷害部を囲むように円状に色素がほとんど見えなくな

った。この色素の消失は傷害範囲の特定にも有用であった。しかし、この色素の消失は一時的なもので、7 dpi では色素が再び徐々に見え始め、10 dpi までにはほとんど完全な色素のパターンが回復された。

続いて、低温傷害によるダメージを検証するため、傷害部における細胞死について調べた。傷害直後の 8 hpi (hours post injury) と、通常 RRE が活性化する 2 dpi の 2 つのタイミングでヒレを回収し、TUNEL 染色によってアポトーシス細胞を検出した。コントロールとしては傷害を与えていないヒレを使用した。傷害を与えないヒレではアポトーシスはほぼ検出できない (Fig. 26a)。8 hpi では、傷害部とその周辺に様にアポトーシス細胞が検出され、低温傷害によって細胞死が引き起こされていることが示された (Fig. 26b)。切片でこれらの細胞の局在を確認すると、上皮 (e) にも間葉 (m) にも存在していた。よって、低温傷害の影響は表面だけでなく、組織の内部にまで及んでいると考えられる。一方、2 dpi になると傷害部におけるアポトーシス細胞の数は有意に減少した (Fig. 26c, d)。したがって、低温傷害による細胞死は傷害直後の短期間の間に、傷害部位を中心に起こっていることが示された。

次に、低温傷害後には外観からも充血している様子が確認できたため、低温傷害は血流や血管に何らかの影響を与えていると予想した (Fig. 25b)。詳細な解析を行うために、赤血球のマーカ遺伝子である *gatal* と血管内皮細胞のマーカ遺伝子である *flil* の蛍光 Tg 系統を使用した (Fukui et al., 2009; Kitaguchi et al., 2009)。まず、*Tg(gatal:mRFP)* を用いて低温傷害後の血流の様子を観察した (Fig. 27a)。mRFP 発現細胞の動態に、特に変化が見られたのは 1-3 dpi の間である。1 dpi では傷害部の周囲で血流が観察されなくなった。しかし 2 dpi から徐々に血流が回復し始め、3 dpi になるとほとんど元通りの血流が取り戻された。この間の変化は主に 2 種類あり、血流が停止した箇所では血流の滞留の解消 (白)、血流が減少した箇所では血流量の回復 (黄) である。このように血流への影響は一時的であり、非常に短期間で回復された。続いて、*Tg(flil:egfp)* を用いて低温傷害後の血管の様子を観察した (Fig. 27b)。血管で EGFP 発現細胞の動態に変化が見られたのは 1-2 dpi の間である。傷害部では、体全体に広がっている血管網に穴が空いたように EGFP 発現が失われた。しかし、翌日になると、全方向から血管内皮細胞が伸びてくる。そして 3 dpi になると、穴は完全に埋め尽くされて元の血管網の状態が回復された。血流と同様に、血管も一時的に影響は受けるものの、短期間で回復した。

また、低温傷害のミエロイド細胞への影響も検証した。*Tg(lysC:egfp)* はミエロイド細胞のマーカ遺伝子である *lysozyme C (lysC)* の発現を可視化できる (Kitaguchi et al., 2009)。この Tg に低温傷害を与えると、アポトーシスが盛んな 8 hpi には多くの EGFP 発現細胞が傷害部に集積していることが分かった (Fig. 28)。これらの EGFP 発現細胞は時間経過とともに傷害部から分散していき、2 dpi には傷害部からほとんど無くなった。よって、低温傷害によるミエロイド細胞の集積も傷害直後にのみ見られた。

さらに、プローブが触れる上皮層への影響を調べるために、上皮の外側のケラチノサイト層で発現する *krt4* 遺伝子のプローブを用いた ISH を行い、傷害部の様子を観察した (Chen et al., 2011; Liu et al., 2024)。すると、*krt4* の発現は 8 hpi, 2 dpi いずれの時点でも維持されており、ケラチノサイト層の完全性は傷害を受けても維持されていることが示唆された (Fig. 29a)。また、上皮の内側の基底層で発現する *itgb4* の Cre Tg である *Tg(itgb4:CreERT2)* を用いて、傷害後の基底層細胞の様子も観察した (Liu et al., 2024)。組換えによって標識された *itgb4*⁺ 細胞は 8 hpi, 2 dpi とも基底層に位置し続け、こちらも特に変化は見られなかった (Fig. 29b)。2つの上皮細胞マーカーの観察から、プローブから近い距離にあるにも関わらず、上皮層の構造そのものは大きな影響を受けていないと考えられる。

これらの結果から、今回開発した“マイルド”な低温傷害は傷害を与えた直後には、色素・血管・ミエロイド細胞への影響や細胞死を引き起こすが、いずれも一時的なものにすぎず、長期間継続することはなかった。加えて、過去の“シビア”な低温傷害のように、組織の壊死や脱落といった大きなダメージをもたらさなかった。よって、非常に限定的なダメージを与えることができる傷害モデルといえる。

(8) 低温傷害による再生応答の誘導

開発した低温傷害モデルを用いて、はじめに、再生応答遺伝子 *msxc*、*junbl*、*fn1b* の発現を検証した。すると、*msxc* の発現は低温傷害によって全く誘導されなかった (Fig. 30a)。Tg における結果は、*msxc* の ISH によっても確認された。それとは対照的に、*junbl* と *fn1b* の発現は傷害部で誘導された (Fig. 30b, c)。切片で確認すると、*fn1b* の発現は再生ヒレと同様に上皮基底層で観察された (Fig. 30c)。*fn1b* の Tg における結果も、*fn1b* の ISH で確認された。再生芽マーカーの *msxc* の発現がないことから、低温傷害によって再生芽組織の形成は誘導されていないことが示唆された。

同様に、低温傷害による RRE 活性化の誘導を検証した。*Tg(1.8k:egfp)* では、傷害部の主に鰭条上で EGFP 発現が誘導された (Fig. 31a)。これは切断ヒレの基部側で見られるものと類似している (Fig. 7d)。実際に切片で確認すると、応答細胞は鰭条骨で挟まれた鰭条内部の間葉細胞であることが分かった (Fig. 31a)。よって、応答細胞のタイプもヒレ切断時と一致している。その一方で、*Tg(E2S-miniP:egfp)* では EGFP の発現は誘導されなかった (Fig. 31b)。しかし、*fn1b* が応答を示したことから、上皮細胞の活性化は低温傷害で誘導可能であると考えられる (Fig. 30c)。それにも関わらず、*E2S* が活性化を示さなかったのは、*E2S* RRE の傷害への応答性が低いことが原因であると予想される。

これらの結果を総合すると、低温傷害は再生芽形成を伴わない (*msxc*⁻) にも関わらず、一部の再生応答遺伝子や RRE の活性化を誘導できる (*fn1b*⁺, *junbl*⁺, *1.8k*⁺)。すなわち、低温傷害によって RRE 応答が再生芽形成や組織の分断がなくとも誘導されうるこ

と、つまり低温傷害によって RRE 活性化のキューが生じていることが示唆される。

4, 考 察

(1) β カテニン-Tcf/Lef と JNK-Jun/Fos の転写因子カスケードが E-box/TRE RRE の上流で機能している

fn1b 上流から発見された複数の RRE は、E-box と TRE という 2 つの配列を共通して含んでおり、これらが RRE の実体であることを示唆した (Fig. 9, 10) (Tamaki et al., 2023)。しかし、これらの配列は、ゲノム中に高度に類似した配列が無数に存在しているため、直接的に欠失させその機能を解析することは不可能である。そこで、RRE の機能的な重要性に対してアプローチするための手段、そして RRE 上流で働くシグナル経路を明らかにする手段として、E-box と TRE の上流シグナルそれぞれの阻害をテストした (Loss of function)。TRE に結合する bZIP 転写因子 Jun を活性化する JNK の阻害剤、そして、bHLH 転写因子の E-box への結合を阻害する *dnlef* の発現はそれぞれ、ヒレ再生と RRE 活性化の低下をもたらした (Fig. 13, 15)。よって、JNK-Jun/Fos カスケードの作用と、Tcf/Lef などの bHLH 因子の作用の両方が、RRE の活性化に必須の機能を果たしていること、そして RRE 活性化が実際にヒレ組織の再生に必要であることが示唆された。

加えて本研究では、阻害とは反対に両シグナルを人為的に活性化することで、再生応答を傷害なしに誘導することができるのかについてもテストした (Gain of function)。Tcf/Lef が E-box へ結合する際に相互作用する β カテニン強制発現と、Jun/Fos を活性化する JNK のアゴニストを組み合わせることで、切断傷害を与えることなく、RRE の応答を誘導することができた (Fig. 16)。よって、JNK-Jun/Fos および β カテニン-Tcf/Lef カスケードの両方の活性化は RRE の活性化に十分であることが示された。Loss of function と Gain of function の結果を総合すると、RRE 応答に必要な十分な機能を果たしている、E-box と TRE それぞれの上流シグナルが明らかとなった (Fig. 32)。両シグナルのカスケードが RRE で統合されて、再生遺伝子の発現、そして再生組織の形成へとつながっていくと考えられる。

過去の論文で示唆されているように、TRE に結合する Jun/Fos を含む AP-1 転写因子は進化的に古い起源を持ち、傷害への応答で祖先的な機能を持っていると考えられる (Wang et al., 2020)。つまり、AP-1 は普遍的に傷害、再生、ストレスなどに応じて細胞を活性化状態にすると考えられる。実際に Jun/Fos は Immediate early genes として知られ、種々のストレスや傷害によって迅速に遺伝子発現が誘導されることが知られている。その一方で、AP-1 は多様な生命プロセスに関わっているため、活発な細胞増殖を伴う再生プログラムが単純なシステムだけで開始されてしまうと、不必要で過剰な細胞増殖を招く恐れもある。これを防ぐためにも、さらに厳密な制御機構が必要であると予想される。そこで、TRE を介したシグナルに加えて、もう一つの制御機構として、E-box を介したシグナルが獲得されてきた可能性が考えられる。このような 2 つ

のシグナルを組み合わせた、より複雑化したシステムによって、適切な組織再生の制御を行うことが可能になってきたのかもしれない。

本研究では、RRE を介した再生シグナルの上流として JNK-Jun/Fos と β カテニン-Tcf/Lef のシグナルカスケードの存在が示唆されたが、両者以外にも、再生に寄与することが示唆されているシグナルは多数知られている (Wehner and Weidinger, 2015)。実際に、TGF β シグナルの阻害によって、*careg* RRE の活性化ならびにヒレ再生は低下することが示されている (Pfefferli and Jaźwińska, 2017)。このように、再生応答に関与するシグナルは多数存在しており、E-box/TRE RRE の上流や下流、あるいは並列に働いている可能性も考えられる。今後、多くのシグナルを網羅的に操作して再生応答への影響を調べ上げることができれば、再生応答の制御メカニズムの全体像をより詳細に捉えることが可能となるかもしれない。

(2) E-box/TRE RRE の機能は組織や種を超えて保存された普遍的なシステムである

ゼブラフィッシュが再生できる組織は尾ヒレ以外にも多岐にわたっており、尾ヒレ以外の組織でも再生現象は見られる。過去に同定された RRE は、尾ヒレの再生のみならず、心臓の心筋再生でも活性化することが確認されている (Fig. 5) (Kang et al., 2016; Pfefferli and Jaźwińska, 2017; Wang et al., 2020)。本研究では、我々が同定した RRE がゼブラフィッシュの心臓を含め、尾ヒレ以外の組織でも傷害によって活性化するのか検証した。

まず、尾ヒレとは異なるタイプのヒレである胸ヒレでも、切断後に RRE は活性化され、発現パターンも使用した全ての RRE Tg で尾ヒレとほとんど一致していた (Fig. 17)。また、骨芽細胞を含む組織である鱗の再生時にも RRE は活性化した (Fig. 18)。これらの結果は、RRE が異なるタイプのヒレ組織や、鱗のような外骨格組織にも高度に保存されていることを示している。

さらに、心筋再生における応答も検証した。過去同定された RRE と同様に、*1.8k* RRE も切断によって活性化された (Fig. 19b)。応答細胞は再生組織ではなく、切断位置よりも基部側の残存した心筋組織で観察されたが、これは *careg* において見られた応答と類似しており、再生部分で応答が見られた *LEN* や *IEN* とは異なる特徴である (Fig. 4) (Kang et al., 2016; Pfefferli and Jaźwińska, 2017; Wang et al., 2020)。*1.8k* と *careg* は心臓のみならず、ヒレ再生における発現パターンもよく似ていることから、近い特性を持った RRE である可能性が高いと予想することができる (Fig. 4b, 7b)。

また、*LEN* はゼブラフィッシュのみならず、マウスにおいても傷害によって活性化されること、すなわち、*LEN* の活性化機構が異なる動物種であっても保存されていることが示されている (Fig. 4a) (Kang et al., 2016)。本研究においては、種を越えた RRE の機能を検証するために、ゼブラフィッシュ RRE Tg のコンストラクトを導入したア

フリカツメガエルの RRE Tg を作製した。作製した Tg で枝芽を切断すると、再生組織で RRE の活性化が誘導された (Fig. 20)。これは、RRE の活性化機構がアフリカツメガエルにおいても保存されていることを示唆している。

以上のゼブラフィッシュの尾ヒレ以外の組織、アフリカツメガエルでの再生応答アッセイの結果から、RRE は組織や種を超えて再生応答に機能できることが確認された。*fn1* 遺伝子は多くの組織や種において、傷害やストレスによって誘導されることが知られている (Gomes et al., 2021)。このことは、我々が同定した RRE の機能や再生応答のシステムは生物間で普遍的に保存されたものである可能性を支持している。

(3) 再生応答を誘導できる穴開け傷害では再生遺伝子によって発現領域に差異がある

RRE を構成する E-box と TRE それぞれの上流シグナルが明らかになったが、それらのシグナルのキューとなる存在がある。少なくとも切断はキューとなり得るが、さらに詳細なキューの手がかりを得るために、本研究では様々な傷害手法を用いて、どのような傷害が再生応答を引き起こすことができるのか、RRE の活性化ならびに再生遺伝子発現の誘導を再生応答のインジケータとして利用し、検証を行った。鰭条間への切れ込み傷害と上皮の擦過傷は、用いた全ての再生遺伝子の発現ならびに RRE の活性化を誘導せず、再生応答を引き起こせない傷害であることが示唆された (Fig. 21, 22)。これは、*IENRRE* が鰭条間への傷害で活性化しなかったことと一致している (Fig. 11a) (Wang et al., 2020)。その一方で、ヒレへの穴開け傷害では、用いた全ての再生遺伝子の発現ならびに RRE の活性化が誘導された (Fig. 23)。これも穴開けによって再生遺伝子の発現が誘導されたことと一致している (Fig. 11b) (Cao et al., 2021)。しかし、遺伝子によって発現領域に違いが現れたことは、本研究での新たな発見である。Cao らは *msxc* をはじめとした再生芽マーカー遺伝子が、穴の基部側のみで発現が見られることを示し、本研究でもこれは確認された。だが、本研究で用いた *fn1b* と *jun1b* は基部側のみならず先端側でも発現が見られた。この発現の違いは、再生応答には再生芽形成の前段階となるプロセスがあることを示唆している。再生応答ははじめに、細胞のプライム化 (活性化) のフェーズがあり、その後、再生芽のような再生組織の形成を伴う次のフェーズへと移行していくと推測される (Fig. 33)。つまり、穴開け傷害における基部側での応答は再生芽形成を伴うフェーズを、先端側での応答は細胞のプライム化のフェーズを示しているのではないかと考えられる。*fn1b* と *jun1b* は細胞のプライム化という再生応答の初期のフェーズでも活性化するが、*msxc* や再生芽マーカー遺伝子は再生組織の形成を伴うフェーズになって初めて活性化すると考えられる。

(4) 新たな低温傷害法は組織へのダメージが非常に少ない傷害手法である

再生応答を誘導できる傷害を探索する中で、再生芽形成や組織の分断を伴わない傷害法として、本研究では新たに“マイルド”な低温傷害を開発した。この傷害法は過

去の低温傷害とは異なり、ヒレ組織の大規模な壊死や喪失が起こらない (Fig. 24, 25) (Chassot et al., 2016)。細胞死の誘導や血管系への影響を調べたところ、傷害直後には影響が見られたものの、いずれも短期間のうちに元の状態へと回復していく様子が観察された (Fig. 26-28)。また、上皮ではケラチノサイト層、基底層のいずれにも影響が見られなかった (Fig. 29)。よって、新たな低温傷害は、血管や血流へのダメージ・ミエロイド細胞の集積・細胞死の誘導を引き起こすものの、その影響は非常に短期間かつ軽度なものであると考えられる。よって、この低温傷害が組織に与えるダメージは非常に限定的なものであり、組織の喪失を伴わない、切断や穴開け傷害とは異なる特性を持った傷害として利用することができると考えられる。

(5) 再生応答のキューとして組織の分断や再生芽形成は必要ではない

開発した低温傷害は、組織の喪失を伴わないという特徴を活かして再生応答の誘導の検証に利用した。低温傷害によって、再生遺伝子のうち *fn1b* と *junbl* の発現が誘導され、*msxc* の発現は誘導されないという結果が得られた (Fig. 30)。組織の喪失がない低温傷害では、再生芽形成も誘導されないことが、再生芽マーカー *msxc* の発現がないことから確認できた。この低温傷害での結果と、穴開け傷害における先端側の結果を比較すると、いずれも *fn1b* と *junbl* の発現が誘導され、*msxc* は誘導されないという共通点を見出すことができる (Fig. 33)。これを踏まえると、低温傷害は細胞のプライム化という、再生応答の初期フェーズだけを誘導する傷害であると予想することができる。*msxc* の発現を伴う再生芽形成のような、次のフェーズが誘導されるためには、また別の何らかのシグナルが加わる必要があることも推測できる (Fig. 34)。再生応答の初期フェーズだけを選択的に誘導できるという特性から、低温傷害は新たな再生応答アッセイのツールとして、非常に有用なものとなり得るだろう。

この低温傷害で RRE 応答を検証すると、*1.8k* RRE では応答が誘導された (Fig. 31a)。よって、RRE の活性化は、組織の喪失や再生芽形成がなくても、再生細胞へのプライム化だけで起こることが示唆される。その一方で、*E2S* の応答は低温傷害で誘導できなかったが (Fig. 31b)、*fn1b* が低温傷害で活性化されたことから (Fig. 30c)、低温傷害に上皮細胞が応答できない可能性は排除される。穴開け傷害では、*E2S* が先端側でも活性化が見られたことから、*E2S* もプライム化細胞において活性化されると考えられる。では、なぜ低温傷害で *E2S* が活性化されなかったのか、その原因として *E2S* の RRE としての応答性の低さが考えられる。*1.8k*・*E2S* とともに E-box と TRE を持つ RRE だが、活性化を反映する EGFP 蛍光の強度にはかなりの差が見られる (Fig. 35)。

(6) まとめ・今後の展望

我々がゼブラフィッシュの *fn1b* 遺伝子周辺から同定した RRE は、その構成要素である E-box と TRE それぞれの上流の転写活性化シグナルカスケードを統合して、再生応答、そしてヒレ再生へと結びつくことが示された。そして、種や組織を超えて普遍的に機能できるシステムであることも示唆された。本研究では行うことができなかったゼブラフィッシュの網膜再生や、マウスでの傷害にも RRE は活性化するのか検証することができれば、RRE がどれほど広範に保存されたシステムなのか、より詳細に明らかになるだろう。

加えて、本研究では傷害の違いによる再生遺伝子と RRE の活性化の違いを明らかにした。これらの結果の比較から、再生応答が 2 段階のステップを経て起きているというモデルを提案した。ただ、このモデルを証明するためにはさらなる検証が必要である。既知の再生遺伝子の発現パターンを穴開け傷害と低温傷害で比較して、本研究のような結果が一貫して得られるのか解析する必要がある。また、穴開け傷害での再生芽形成には位置情報に関与するシグナルが影響することも示唆されている (Cao et al., 2021)。このようなシグナルと再生応答の関連性を探ることも興味深い。

また、新たに開発した低温傷害法と RRE Tg の組み合わせは、RRE 応答の具体的なキューを探る上で有用なツールとなり得る。低温傷害がもたらした影響の中で、何がクリティカルな要因となって再生応答を誘導しているのか、この点はさらなる検証が必要である。本研究でも示したように、低温傷害によってミエロイド細胞は一時的に活性化されている。例えば、ミエロイド細胞の機能を阻害すると、RRE 応答にはどのような影響が現れるのだろうか。仮に RRE 応答が低下すると、RRE 応答のキューとしてミエロイド細胞が重要な役割を果たしているといえるだろう。他にも細胞死や血管システムなども、具体的なキューとなる可能性が考えられる。具体的なキューとして挙げた要素を遺伝子やシグナルのレベルでさらに詳細に分析していくことで、キューの実体により迫ることができるのではないだろうか。

5, 参考文献

- Akieda, Y., Ogamino, S., Furuie, H., Ishitani, S., Akiyoshi, R., Nogami, J.,...Ishitani, T. (2019). Cell competition corrects noisy Wnt morphogen gradients to achieve robust patterning in the zebrafish embryo. *Nat Commun*, 10(1), 4710. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12609-4>
- Akimenko, M. A., Johnson, S. L., Westerfield, M., & Ekker, M. (1995). Differential induction of four *msx* homeobox genes during fin development and regeneration in zebrafish. *Development*, 121(2), 347-357.
- Akimenko, M. A., Mari-Beffa, M., Becerra, J., & Géraudie, J. (2003). Old questions, new tools, and some answers to the mystery of fin regeneration. *Dev Dyn*, 226(2), 190-201. <https://doi.org/10.1002/dvdy.10248>
- Aman, A. J., Fulbright, A. N., & Parichy, D. M. (2018). Wnt/ β -catenin regulates an ancient signaling network during zebrafish scale development. *Elife*, 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.37001>
- Ando, K., Shibata, E., Hans, S., Brand, M., & Kawakami, A. (2017). Osteoblast Production by Reserved Progenitor Cells in Zebrafish Bone Regeneration and Maintenance. *Dev Cell*, 43(5), 643-650.e643. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.10.015>
- Begeman, I. J., Shin, K., Osorio-Méndez, D., Kurth, A., Lee, N., Chamberlain, T. J.,...Kang, J. (2020). Decoding an organ regeneration switch by dissecting cardiac regeneration enhancers. *Development*, 147(24). <https://doi.org/10.1242/dev.194019>
- Cadigan, K. M., & Waterman, M. L. (2012). TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007906>
- Cano-Martínez, A., Rubio-Ruiz, M. E., & Guarner-Lans, V. (2024). Homeostasis and evolution in relation to regeneration and repair. *J Physiol*, 602(11), 2627-2648. <https://doi.org/10.1113/JP284426>
- Cao, Y., Xia, Y., Balowski, J. J., Ou, J., Song, L., Safi, A.,...Cao, J. (2022). Identification of enhancer regulatory elements that direct epicardial gene expression during zebrafish heart regeneration. *Development*, 149(4). <https://doi.org/10.1242/dev.200133>
- Cao, Z., Meng, Y., Gong, F., Xu, Z., Liu, F., Fang, M.,...Lu, H. (2021). Calcineurin controls proximodistal blastema polarity in zebrafish fin regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 118(2). <https://doi.org/10.1073/pnas.2009539118>
- Chablais, F., Veit, J., Rainer, G., & Jaźwińska, A. (2011). The zebrafish heart regenerates after cryoinjury-induced myocardial infarction. *BMC Dev Biol*, 11, 21. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-11-21>
- Chassot, B., Pury, D., & Jaźwińska, A. (2016). Zebrafish fin regeneration after cryoinjury-induced tissue damage. *Biol Open*, 5(6), 819-828. <https://doi.org/10.1242/bio.016865>
- Chen, C. F., Chu, C. Y., Chen, T. H., Lee, S. J., Shen, C. N., & Hsiao, C. D. (2011). Establishment of a transgenic zebrafish line for superficial skin ablation and functional

validation of apoptosis modulators in vivo. *PLoS One*, 6(5), e20654. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020654>

Chen, C. H., Puliafito, A., Cox, B. D., Primo, L., Fang, Y., Di Talia, S., Poss, K. D. (2016). Multicolor Cell Barcoding Technology for Long-Term Surveillance of Epithelial Regeneration in Zebrafish. *Developmental Cell*, 36(6), 668-680. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.02.017>

Darnet, S., Dragalzew, A. C., Amaral, D. B., Sousa, J. F., Thompson, A. W., Cass, A. N.,...Schneider, I. (2019). Deep evolutionary origin of limb and fin regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(30), 15106-15115. <https://doi.org/10.1073/pnas.1900475116>

De Simone, A., Evanitsky, M. N., Hayden, L., Cox, B. D., Wang, J., Tornini, V. A.,...Di Talia, S. (2021). Control of osteoblast regeneration by a train of Erk activity waves. *Nature*, 590(7844), 129-133. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03085-8>

Dent, J. N. (1962). Limb regeneration in larvae and metamorphosing individuals of the South African clawed toad. *J Morphol*, 110, 61-77. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051100105>

Fukui, H., Hanaoka, R., & Kawahara, A. (2009). Noncanonical activity of seryl-tRNA synthetase is involved in vascular development. *Circ Res*, 104(11), 1253-1259. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.191189>

Gauron, C., Rampon, C., Bouzaffour, M., Ipendey, E., Teillon, J., Volovitch, M., & Vriza, S. (2013). Sustained production of ROS triggers compensatory proliferation and is required for regeneration to proceed. *Sci Rep*, 3, 2084. <https://doi.org/10.1038/srep02084>

Gemberling, M., Bailey, T. J., Hyde, D. R., & Poss, K. D. (2013). The zebrafish as a model for complex tissue regeneration. *Trends Genet*, 29(11), 611-620. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.07.003>

Gomes, R. N., Manuel, F., & Nascimento, D. S. (2021). The bright side of fibroblasts: molecular signature and regenerative cues in major organs. *NPJ Regen Med*, 6(1), 43. <https://doi.org/10.1038/s41536-021-00153-z>

Goss, R.J. (1969). *Principles of Regeneration*. New York: Academic Press.

Hao, J., Ao, A., Zhou, L., Murphy, C. K., Frist, A. Y., Keel, J. J.,...Hong, C. C. (2013). Selective small molecule targeting β -catenin function discovered by in vivo chemical genetic screen. *Cell Rep*, 4(5), 898-904. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.07.047>

Hasegawa, T., Nakajima, T., Ishida, T., Kudo, A., & Kawakami, A. (2015). A diffusible signal derived from hematopoietic cells supports the survival and proliferation of regenerative cells during zebrafish fin fold regeneration. *Dev Biol*, 399(1), 80-90. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.12.015>

Hata, S., Nishida, M., & Nishina, H. (2007). Liver development and regeneration: from laboratory study to clinical therapy. *Dev Growth Differ*, 49(2), 163-170. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2007.00910.x>

Hayashi, S., Kawaguchi, A., Uchiyama, I., Kawasumi-Kita, A., Kobayashi, T., Nishida, H.,...Yokoyama, H. (2015). Epigenetic modification maintains intrinsic limb-cell identity in

- Xenopus limb bud regeneration. *Dev Biol*, 406(2), 271-282. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.08.013>
- Hess, J., Angel, P., & Schorpp-Kistner, M. (2004). AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci*, 117(Pt 25), 5965-5973. <https://doi.org/10.1242/jcs.01589>
- Hicklin, J., & Wolpert, L. (1973). Positional information and pattern regulation in hydra: the effect of gamma-radiation. *J Embryol Exp Morphol*, 30(3), 741-752.
- Huyseune, A., Sire, J. Y., & Witten, P. E. (2009). Evolutionary and developmental origins of the vertebrate dentition. *J Anat*, 214(4), 465-476. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01053.x>
- Ishida, T., Nakajima, T., Kudo, A., & Kawakami, A. (2010). Phosphorylation of Junb family proteins by the Jun N-terminal kinase supports tissue regeneration in zebrafish. *Dev Biol*, 340(2), 468-479. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.01.036>
- Ito, K., Morioka, M., Kimura, S., Tasaki, M., Inohaya, K., & Kudo, A. (2014). Differential reparative phenotypes between zebrafish and medaka after cardiac injury. *Dev Dyn*, 243(9), 1106-1115. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24154>
- Ivankovic, M., Haneckova, R., Thommen, A., Grohme, M. A., Vila-Farré, M., Werner, S., & Rink, J. C. (2019). Model systems for regeneration: planarians. *Development*, 146(17). <https://doi.org/10.1242/dev.167684>
- Jones, S. (2004). An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biol*, 5(6), 226. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-6-226>
- Joven, A., Elewa, A., & Simon, A. (2019). Model systems for regeneration: salamanders. *Development*, 146(14). <https://doi.org/10.1242/dev.167700>
- Kang, J., Hu, J., Karra, R., Dickson, A. L., Tornini, V. A., Nachtrab, G.,...Poss, K. D. (2016). Modulation of tissue repair by regeneration enhancer elements. *Nature*, 532(7598), 201-206. <https://doi.org/10.1038/nature17644>
- Kawakami, A. (2010). Stem cell system in tissue regeneration in fish. *Dev Growth Differ*, 52(1), 77-87. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2009.01138.x>
- Keenan, S. R., & Beck, C. W. (2016). Xenopus Limb bud morphogenesis. *Dev Dyn*, 245(3), 233-243. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24351>
- Kitaguchi, T., Kawakami, K., & Kawahara, A. (2009). Transcriptional regulation of a myeloid-lineage specific gene lysozyme C during zebrafish myelopoiesis. *Mech Dev*, 126(5-6), 314-323. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2009.02.007>
- Kizil, C., Otto, G. W., Geisler, R., Nüsslein-Volhard, C., & Antos, C. L. (2009). Simplex controls cell proliferation and gene transcription during zebrafish caudal fin regeneration. *Dev Biol*, 325(2), 329-340. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.09.032>

- Kragl, M., & Tanaka, E. M. (2009). Grafting axolotl (*Ambystoma mexicanum*) limb skin and cartilage from GFP+ donors to normal hosts. *Cold Spring Harb Protoc*, 2009(8), pdb.prot5266. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5266>
- Kroll, K. L., & Amaya, E. (1996). Transgenic *Xenopus* embryos from sperm nuclear transplantations reveal FGF signaling requirements during gastrulation. *Development*, 122(10), 3173-3183.
- Kumar, A., Godwin, J. W., Gates, P. B., Garza-Garcia, A. A., & Brockes, J. P. (2007). Molecular basis for the nerve dependence of limb regeneration in an adult vertebrate. *Science*, 318(5851), 772-777. <https://doi.org/10.1126/science.1147710>
- Kvon, E. Z. (2015). Using transgenic reporter assays to functionally characterize enhancers in animals. *Genomics*, 106(3), 185-192. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.06.007>
- Lee, Y., Grill, S., Sanchez, A., Murphy-Ryan, M., & Poss, K. D. (2005). Fgf signaling instructs position-dependent growth rate during zebrafish fin regeneration. *Development*, 132(23), 5173-5183. <https://doi.org/10.1242/dev.02101>
- Lin, K. Y., Kao, S. H., Lai, C. M., Chen, C. T., Wu, C. Y., Hsu, H. J., & Wang, W. D. (2015). Tumor Suppressor Lzap Suppresses Wnt/ β -Catenin Signaling to Promote Zebrafish Embryonic Ventral Cell Fates via the Suppression of Inhibitory Phosphorylation of Glycogen Synthase Kinase 3. *J Biol Chem*, 290(50), 29808-29819. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.669309>
- Liu, Z., Meng, Y., Ishikura, A., & Kawakami, A. (2024). Live tracking of basal stem cells of the epidermis during growth, homeostasis and injury response in zebrafish. *Development*, 151(2). <https://doi.org/10.1242/dev.202315>
- Maden, M., & Varholick, J. A. (2020). Model systems for regeneration: the spiny mouse, *Acomys cahirinus*. *Development*, 147(4). <https://doi.org/10.1242/dev.167718>
- Marques, I. J., Lupi, E., & Mercader, N. (2019). Model systems for regeneration: zebrafish. *Development*, 146(18). <https://doi.org/10.1242/dev.167692>
- Mavila, N., & Thundimadathil, J. (2019). The Emerging Roles of Cancer Stem Cells and Wnt/Beta-Catenin Signaling in Hepatoblastoma. *Cancers (Basel)*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/cancers11101406>
- Nakatani, Y., Kawakami, A., & Kudo, A. (2007). Cellular and molecular processes of regeneration, with special emphasis on fish fins. *Dev Growth Differ*, 49(2), 145-154. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2007.00917.x>
- Nieuwkoop, P. D., & Faber, J. (1994). *Normal Table of Xenopus laevis (Daudin)*. Garland Publishing.
- Pfefferli, C., & Jaźwińska, A. (2017). The careg element reveals a common regulation of regeneration in the zebrafish myocardium and fin. *Nat Commun*, 8, 15151. <https://doi.org/10.1038/ncomms15151>
- Phipps, L. S., Marshall, L., Dorey, K., & Amaya, E. (2020). Model systems for regeneration: *Xenopus*. *Development*, 147(6). <https://doi.org/10.1242/dev.180844>

- Poleo, G., Brown, C. W., Laforest, L., & Akimenko, M. A. (2001). Cell proliferation and movement during early fin regeneration in zebrafish. *Dev Dyn*, 221(4), 380-390. <https://doi.org/10.1002/dvdy.1152>
- Poss, K. D. (2010). Advances in understanding tissue regenerative capacity and mechanisms in animals. *Nat Rev Genet*, 11(10), 710-722. <https://doi.org/10.1038/nrg2879>
- Poss, K. D., Keating, M. T., & Nechiporuk, A. (2003). Tales of regeneration in zebrafish. *Dev Dyn*, 226(2), 202-210. <https://doi.org/10.1002/dvdy.10220>
- Poss, K. D., Shen, J., Nechiporuk, A., McMahon, G., Thisse, B., Thisse, C., & Keating, M. T. (2000). Roles for Fgf signaling during zebrafish fin regeneration. *Dev Biol*, 222(2), 347-358. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9722>
- Poss, K. D., Wilson, L. G., & Keating, M. T. (2002). Heart regeneration in zebrafish. *Science*, 298(5601), 2188-2190. <https://doi.org/10.1126/science.1077857>
- Shibata, E., Ando, K., Murase, E., & Kawakami, A. (2018). Heterogeneous fates and dynamic rearrangement of regenerative epidermis-derived cells during zebrafish fin regeneration. *Development*, 145(8). <https://doi.org/10.1242/dev.162016>
- Shibata, E., Yokota, Y., Horita, N., Kudo, A., Abe, G., Kawakami, K., & Kawakami, A. (2016). Fgf signalling controls diverse aspects of fin regeneration. *Development*, 143(16), 2920-2929. <https://doi.org/10.1242/dev.140699>
- Shimizu, N., Kawakami, K., & Ishitani, T. (2012). Visualization and exploration of Tcf/Lef function using a highly responsive Wnt/ β -catenin signaling-reporter transgenic zebrafish. *Dev Biol*, 370(1), 71-85. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.07.016>
- Stoick-Cooper, C. L., Weidinger, G., Riehle, K. J., Hubbert, C., Major, M. B., Fausto, N., & Moon, R. T. (2007). Distinct Wnt signaling pathways have opposing roles in appendage regeneration. *Development*, 134(3), 479-489. <https://doi.org/10.1242/dev.001123>
- Tamaki, T., Yoshida, T., Shibata, E., Nishihara, H., Ochi, H., & Kawakami, A. (2023). Splashed E-box and AP-1 motifs cooperatively drive regeneration response and shape regeneration abilities. *Biol Open*, 12(2). <https://doi.org/10.1242/bio.059810>
- Tanaka, E. M. (2016). The Molecular and Cellular Choreography of Appendage Regeneration. *Cell*, 165(7), 1598-1608. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.038>
- Thisse, C., & Thisse, B. (2008). High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat Protoc*, 3(1), 59-69. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.514>
- Tu, S., & Johnson, S. L. (2011). Fate restriction in the growing and regenerating zebrafish fin. *Dev Cell*, 20(5), 725-732. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.04.013>
- Vacik, T., & Lemke, G. (2011). Dominant-negative isoforms of Tcf/Lef proteins in development and disease. *Cell Cycle*, 10(24), 4199-4200. <https://doi.org/10.4161/cc.10.24.18465>

Vogg, M. C., Galliot, B., & Tsiairis, C. D. (2019). Model systems for regeneration: *Hydra*. *Development*, 146(21). <https://doi.org/10.1242/dev.177212>

Wang, L. H., & Baker, N. E. (2015). E Proteins and ID Proteins: Helix-Loop-Helix Partners in Development and Disease. *Dev Cell*, 35(3), 269-280. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.10.019>

Wang, W., Hu, C. K., Zeng, A., Alegre, D., Hu, D., Gotting, K.,... Sánchez Alvarado, A. (2020). Changes in regeneration-responsive enhancers shape regenerative capacities in vertebrates. *Science*, 369(6508). <https://doi.org/10.1126/science.aaz3090>

Wehner, D., & Weidinger, G. (2015). Signaling networks organizing regenerative growth of the zebrafish fin. *Trends Genet*, 31(6), 336-343. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.03.012>

Yoshinari, N., Ando, K., Kudo, A., Kinoshita, M., & Kawakami, A. (2012). Colored medaka and zebrafish: transgenics with ubiquitous and strong transgene expression driven by the medaka β -actin promoter. *Dev Growth Differ*, 54(9), 818-828. <https://doi.org/10.1111/dgd.12013>

横田裕輝 平成 27 年度 修士論文 「ゼブラフィッシュの付加再生における先端再生芽の解析」

6, 図 表

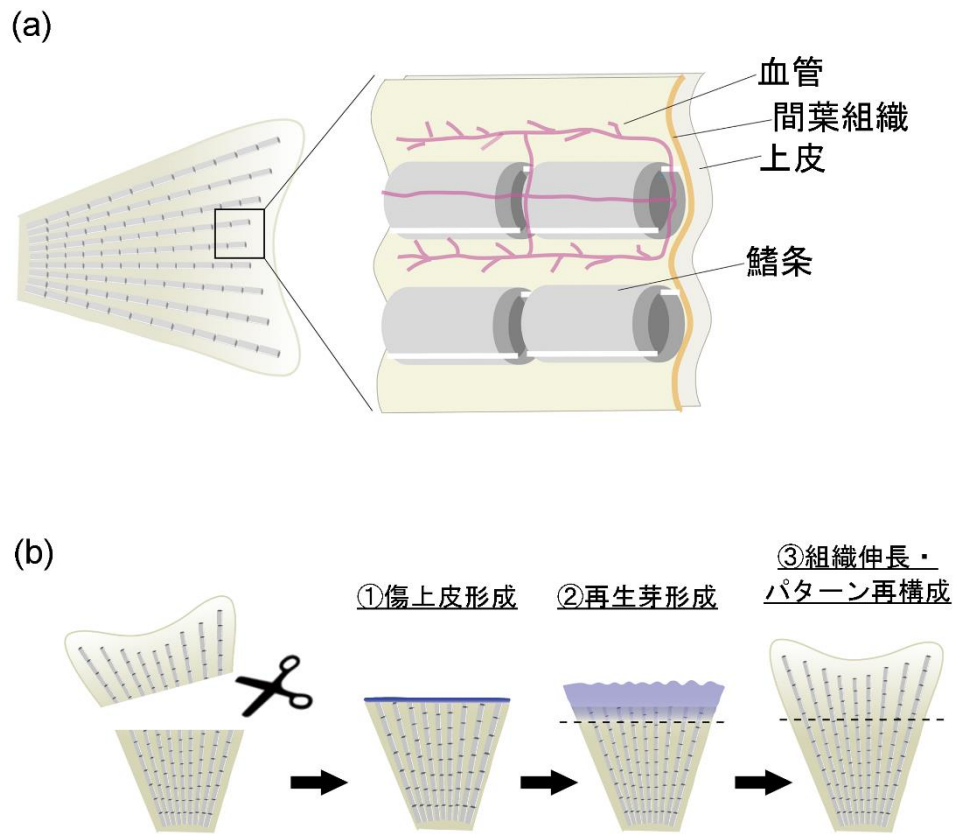


Fig. 1 ゼブラフィッシュの尾ヒレの構造とその再生過程

(a) 尾ヒレの構造の模式図。主に鰭条と間葉組織から構成されている。

(b) 尾ヒレの再生過程の模式図。ヒレは切断後、①傷上皮形成→②再生芽形成→③組織伸長・パターン再構成という付加再生の3ステップを経て再生される。

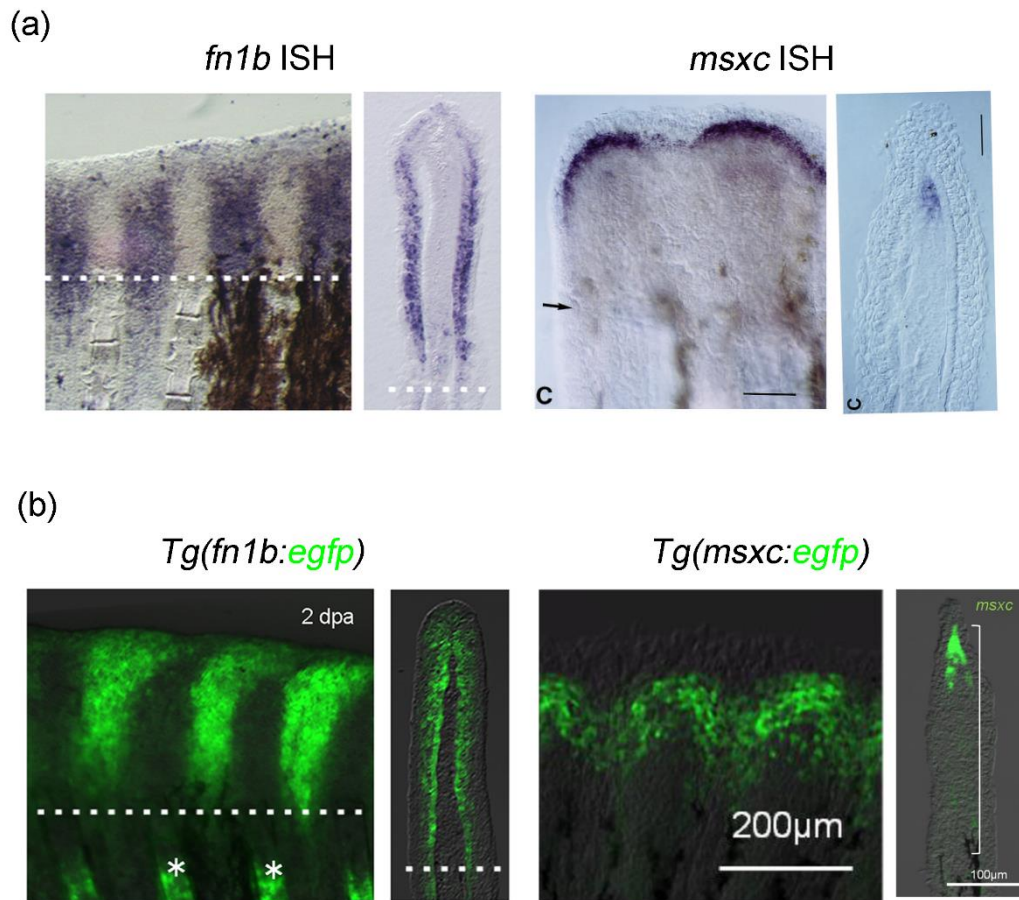


Fig. 2 蛍光トランスジェニック (Tg) による再生応答の再現

(a) 再生ヒレにおける *fn1b* と *msxc* の発現。In situ hybridization (ISH) によってそれぞれの遺伝子の発現は再生ヒレで検出された。

(左: Shibata et al., 2018; 右: Akimenko et al., 1995 より引用)

(b) *fn1b* と *msxc* の蛍光 Tg の再生ヒレにおける EGFP 発現。蛍光 Tg ではレポーターである EGFP の発現によって遺伝子の発現が可視化できる。2つの Tg の EGFP 発現パターンは ISH の結果をそれぞれ再現した。

(左: Shibata et al., 2018; 右: 横田, H27 年度修士論文より引用)

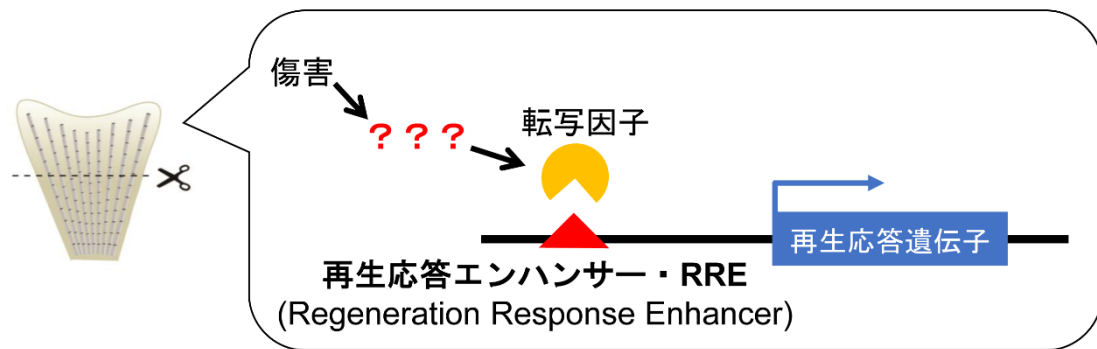
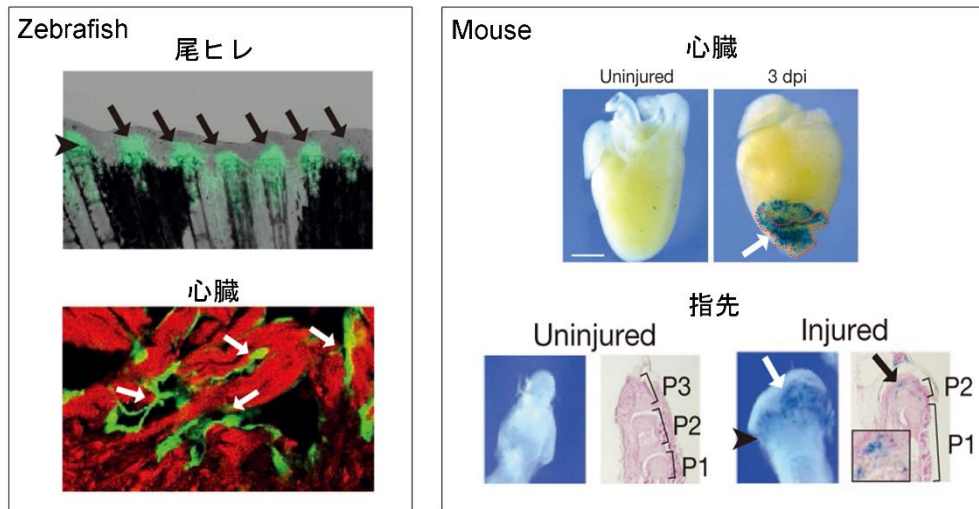


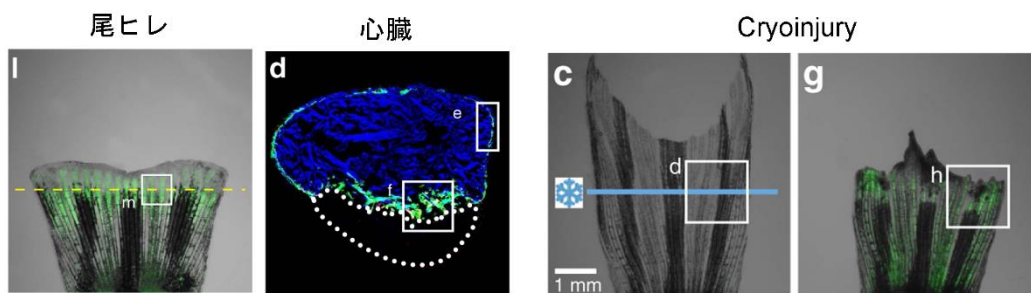
Fig. 3 再生応答エンハンサー (RRE) の概略

RRE を介した再生応答遺伝子の転写活性化システムの概略図。ヒレ切断のような傷害がキューとなって再生応答プロセスが開始され、何らかのシグナルを介し、最終的には RRE に転写因子が結合して活性化、遺伝子の転写応答・発現へとつながると考えられる。

(a) *LEN* (*lepb* enhancer)



(b) *careg* (*ctgfa* enhancer)



(c) *IEN* (*inhba* enhancer)

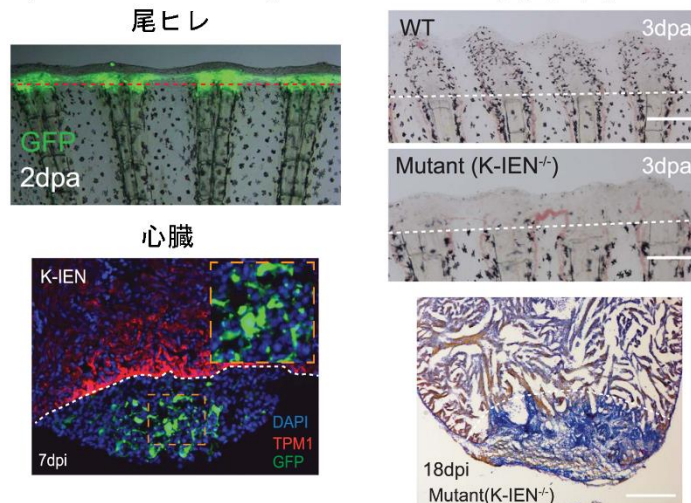


Fig. 4 近年の RRE に関する研究

これまで同定されてきた代表的な RRE は、いずれもゼブラフィッシュのヒレと心臓で傷害に応答して活性化されている。

(a) *leptin b (lepb)* 遺伝子周辺から発見された RRE (*LEN*) は、再生できないマウスの心臓や指先への傷害によっても活性化された。

(Kang et al., 2016 より引用)

(b) *connective tissue growth factor a (ctgfa)* 遺伝子上流から同定された RRE (*careg*) は、重度の低温傷害によっても活性化された。

(Pfefferli and Jaźwińska, 2017 より引用)

(c) *inhibin beta a (inhba)* 遺伝子周辺から同定された RRE (*IEN*) のゲノム編集による欠失は、ヒレや腎臓の再生の低下をもたらした。

(Wang et al., 2020 より引用)

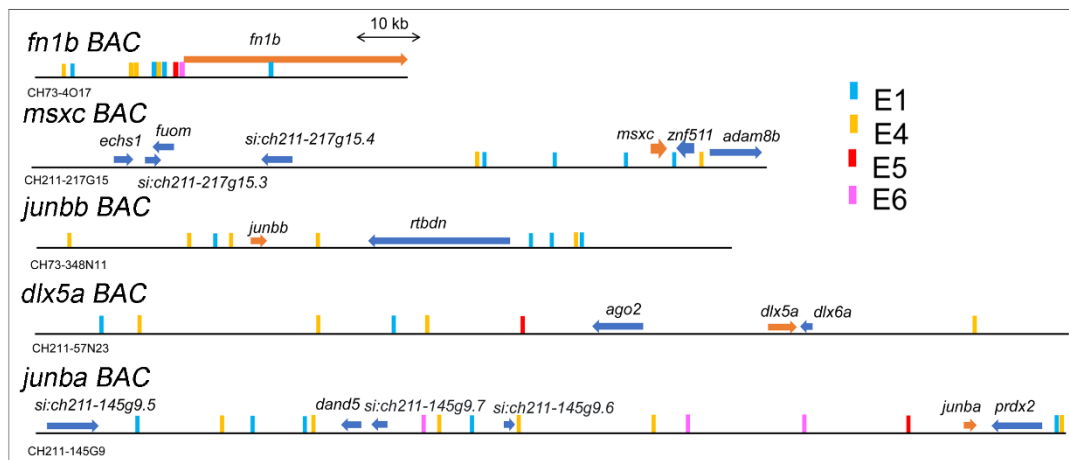


Fig. 5 BAC コンストラクトを用いた再生応答遺伝子の周辺配列の比較

RRE として機能する配列の探索のために、複数の再生応答遺伝子の周辺配列の比較を各遺伝子の BAC コンストラクトを用いて行った。その結果、E1, E4, E5, E6 の 4 種類の高度に保存された配列が見出された。*fn1b* 遺伝子の上流には、これら 4 種類が並んで保存されている。

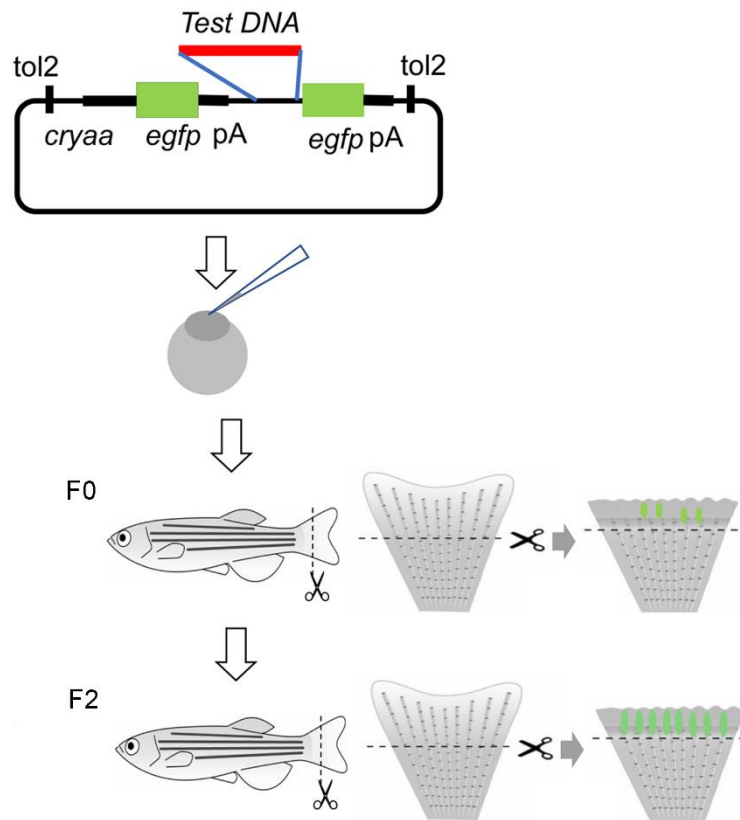


Fig. 6 ゼブラフィッシュのレポーターアッセイ

RRE の候補配列を *egfp* 配列の上流に組み込んだコンストラクトを作製し、受精卵へとインジェクションして F0 世代を得る。候補配列に RRE が含まれている場合、切断によって RRE の活性化を EGFP の発現によって可視化することができる。はじめに F0 世代の個体でアッセイを行い、再生応答が見られた Tg は stable な系統を単離し、F2 世代以降を EGFP 発現細胞の解析等の実験に使用した。

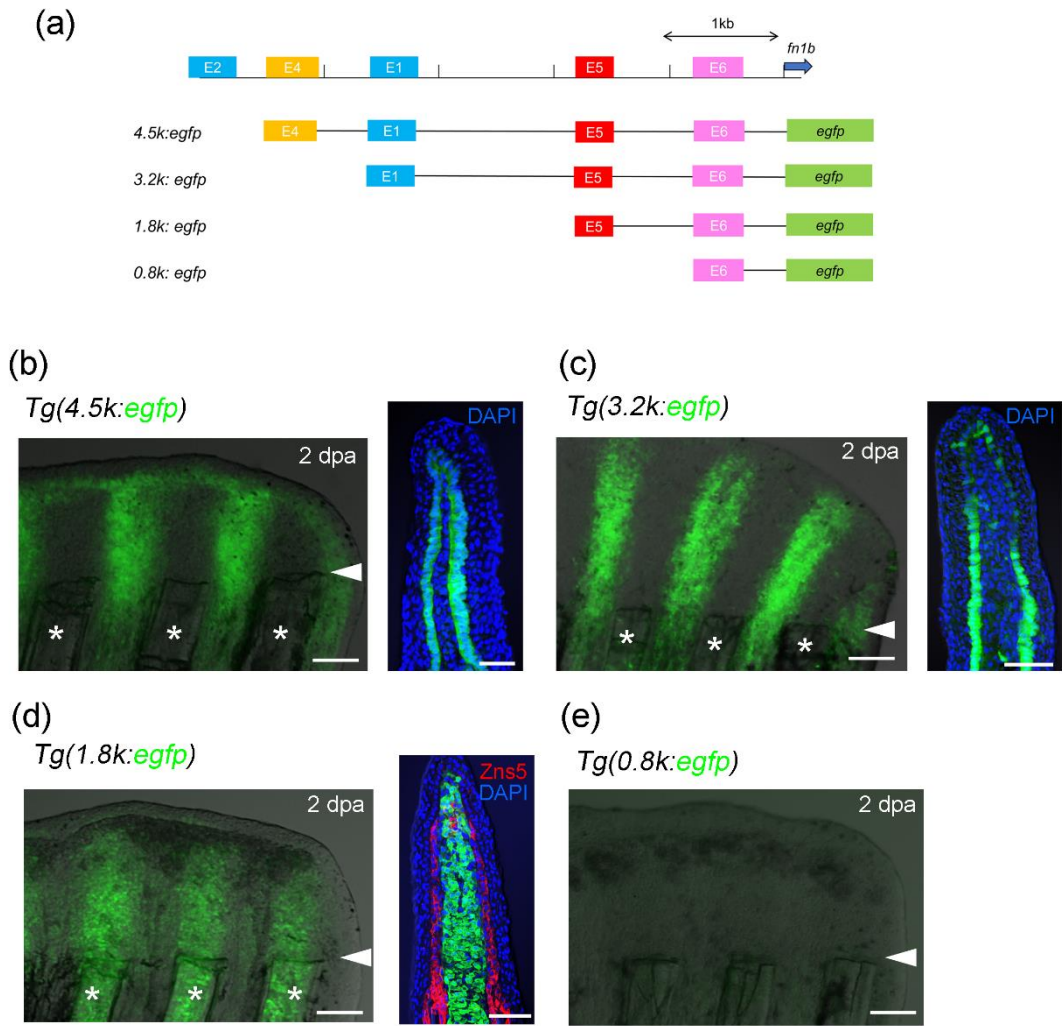


Fig. 7 *fn1b* 上流配列のレポーターアッセイ

(a) *fn1b* 上流の配列を用いてレポーターアッセイを行った。共通保存配列を上流から一つずつ削って、4種類の Tg を作製してアッセイを行った。

(b) E4/E1/E5/E6 を含む *fn1b* 上流 4.5 kb を用いた *Tg(4.5k:egfp)* のアッセイ。この配列は再生ヒレの鰭条間・上皮基底層で再生応答を示した。n > 20

(c) E1/E5/E6 を含む *fn1b* 上流 3.2 kb を用いた *Tg(3.2k:egfp)* のアッセイ。この配列も再生ヒレの鰭条間・上皮基底層で再生応答を示した。n > 10

(d) E5/E6 を含む *fn1b* 上流 1.8 kb を用いた *Tg(1.8k:egfp)* のアッセイ。この配列は再生ヒレの鰭条とその延長上の間葉組織で再生応答を示した。また、切断面よりも基部側の部分でも応答が見られる。応答細胞は *Zns5*⁺ の骨芽細胞とは重ならない。n > 20

(e) E6 のみを含む *fn1b* 上流 0.8 kb を用いた *Tg(0.8k:egfp)* のアッセイ。この配列は再生ヒレでの応答が見られなかった。n > 10

△切断面。* 鰭条。dpa: days post amputation. Bar: 100 μm (Whole), 50 μm (Section).

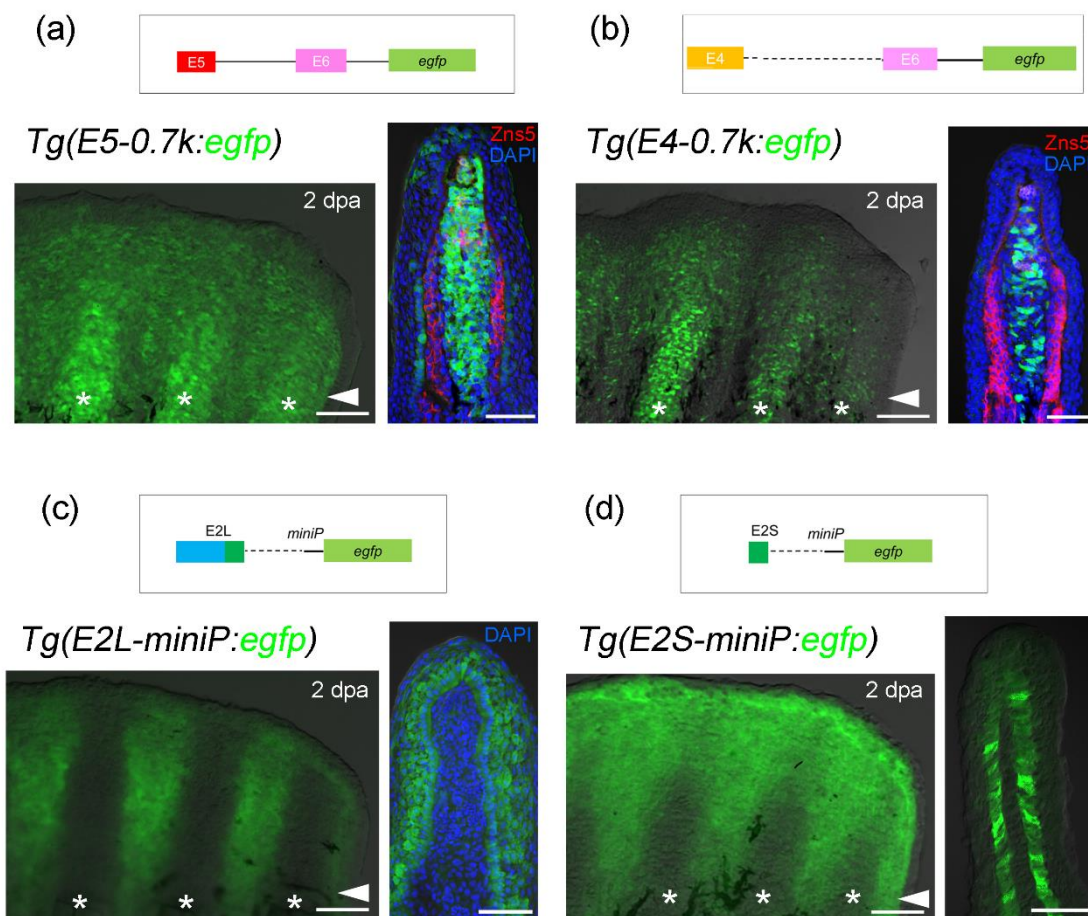


Fig. 8 共通保存配列を用いたレポーターアッセイ

- (a) 共通保存配列 *E5* を用いた *Tg(E5-0.7k:egfp)* のアッセイ。*E5* は *E6* を含む *fn1b* 上流 0.7 kb との組み合わせることで再生応答を示した。再生ヒレの鰭条上・間葉細胞で応答が見られた。*Zns5*⁺の骨芽細胞と応答細胞は重ならない。n > 10
- (b) 共通保存配列 *E4* を用いた *Tg(E4-0.7k:egfp)* のアッセイ。*E5* 同様、*E4* も *E6* を含む *fn1b* 上流 0.7 kb との組み合わせで再生応答を示し、再生ヒレの鰭条上・間葉細胞で応答が見られた。骨芽細胞とも重ならない。n > 20
- (c) *E2* と隣接した 100 bp (= *E2S*) の配列を含む *E2L* を用いた *Tg(E2L-miniP:egfp)* のアッセイ。この配列は、機能を持たない人工配列の最小プロモーター (*miniP*) との組み合わせでも再生応答を示したため、単独で機能できる。再生ヒレの鰭条間・上皮基底層で応答が見られた。n > 20
- (d) *E2* と隣接した 100 bp の配列 *E2S* を用いた *Tg(E2S-miniP:egfp)* のアッセイ。*E2* は再生応答能がないが、*E2S* が最小プロモーターとの組み合わせで再生応答を示し、*E2L* 同様に再生ヒレの鰭条間・上皮基底層で応答が見られた。n > 20
- △切断面。* 鰭条。dpa: days post amputation. Bar: 100 μm (Whole), 50 μm (Section).

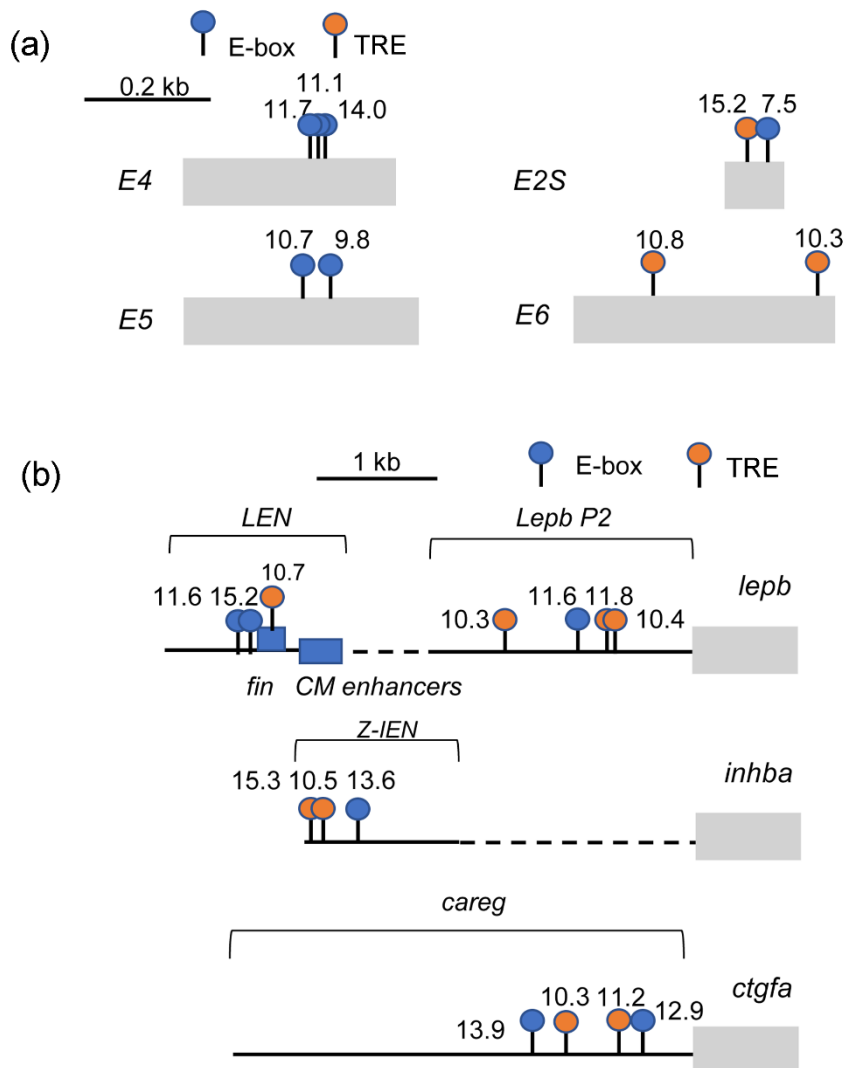


Fig. 9 再生応答を示す配列に含まれる転写因子結合モチーフ

- (a) 転写因子結合データベース JASPAR を用いた検索の結果、再生応答を示した配列には共通して、転写因子結合モチーフの E-box と TRE の 2 つが含まれていた。E4・E5・E2S には E-box が、E2S・E6 には TRE が、それぞれ見出された。
- (b) 過去報告された LEN, IEN, careg いずれの RRE 配列にも、E-box と TRE は含まれていた。

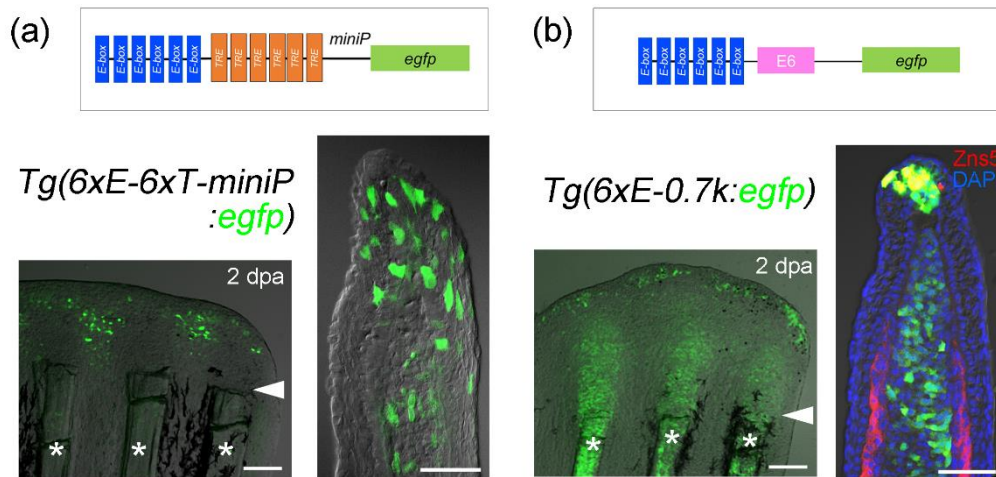


Fig. 10 E-box と TRE の組み合わせは RRE として機能

- (a) E-box を 6 つタンデムに並べた配列と、TRE を 6 つタンデムに並べた配列からなる *Tg(6xE-6xT-miniP:egfp)* を用いたアッセイ。最小プロモーターとの組み合わせのみで再生応答を示した。傷上皮先端で応答が見られた。n > 10
- (b) E-box を 6 つタンデムに並べた配列と、TRE 配列を含む *fn1b* 上流 0.7kb を組み合わせた *Tg(6xE-0.7k:egfp)* を用いたアッセイ。再生応答を示し、傷上皮先端に加えて鱗条上の間葉細胞でも応答が見られた。骨芽細胞と応答細胞は重ならない。n > 20
- △切断面。* 鱗条。dpa: days post amputation. Bar: 100 μm (Whole), 50 μm (Section).

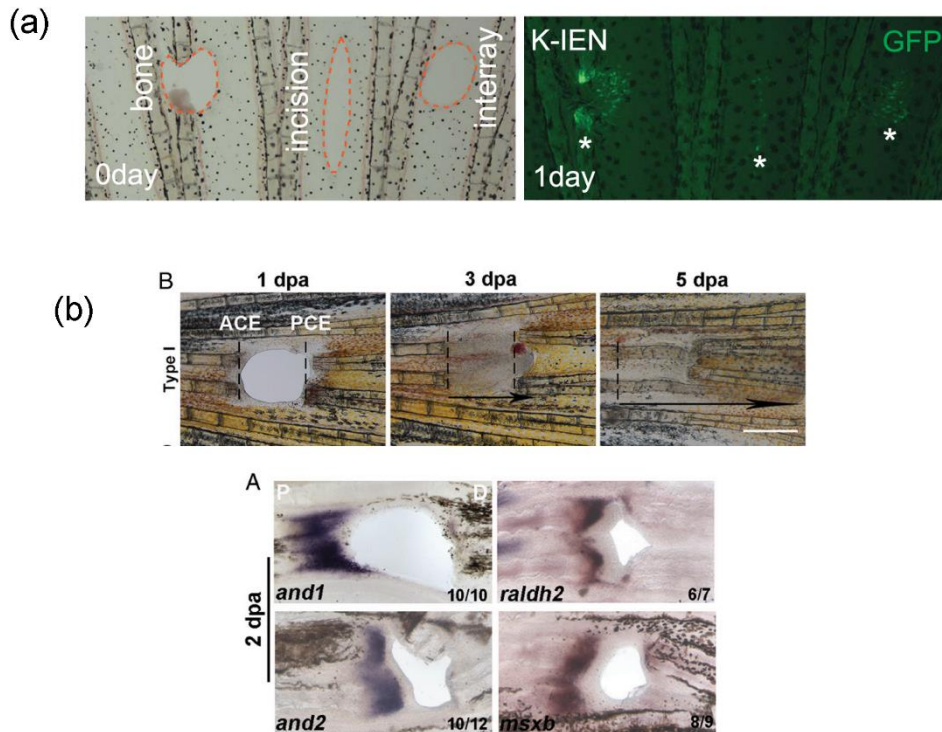


Fig. 11 傷害法による RRE 応答の違いや再生遺伝子発現の特性

(a) *IEN* RRE の傷害による応答の違い。鰭条間組織への傷害 (incision, interray) ではほとんど活性化せず、鰭条を含む組織の喪失を伴う傷害 (bone) では明確な活性化を示す。

(Wang et al., 2020 より引用)

(b) ヒレ内部への穴開け傷害。再生芽様の組織が基部側から先端部側に向かって伸長し、穴を埋める (上)。この過程では、幾つかの再生芽マーカー遺伝子の発現が基部側でのみ見られる (下)。

(Cao et al., 2021 より引用)

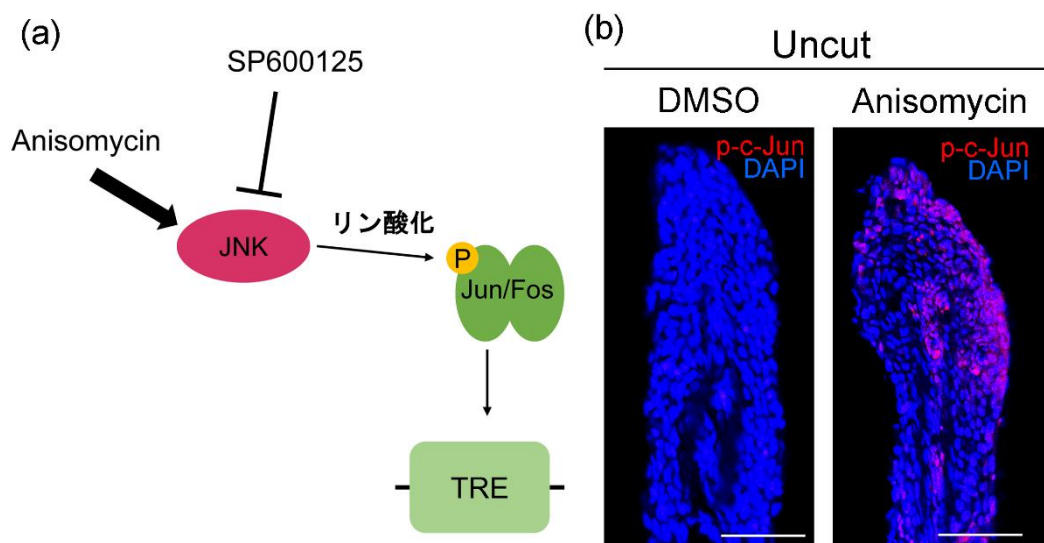


Fig. 12 TRE 上流シグナルの操作

- (a) TRE に作用すると考えられる Jun/Fos をリン酸化して活性化させる JNK をターゲットとした。JNK の阻害剤 SP600125 によって TRE 上流の阻害を、JNK のアゴニスト Anisomycin によって TRE 上流の活性化を試みた。
- (b) Anisomycin 処理個体によるリン酸化 Jun の検出。Anisomycin 処理個体ではリン酸化された Jun タンパクが未切断ヒレで全体的に検出された。各 n = 3 bar: 100 μ m

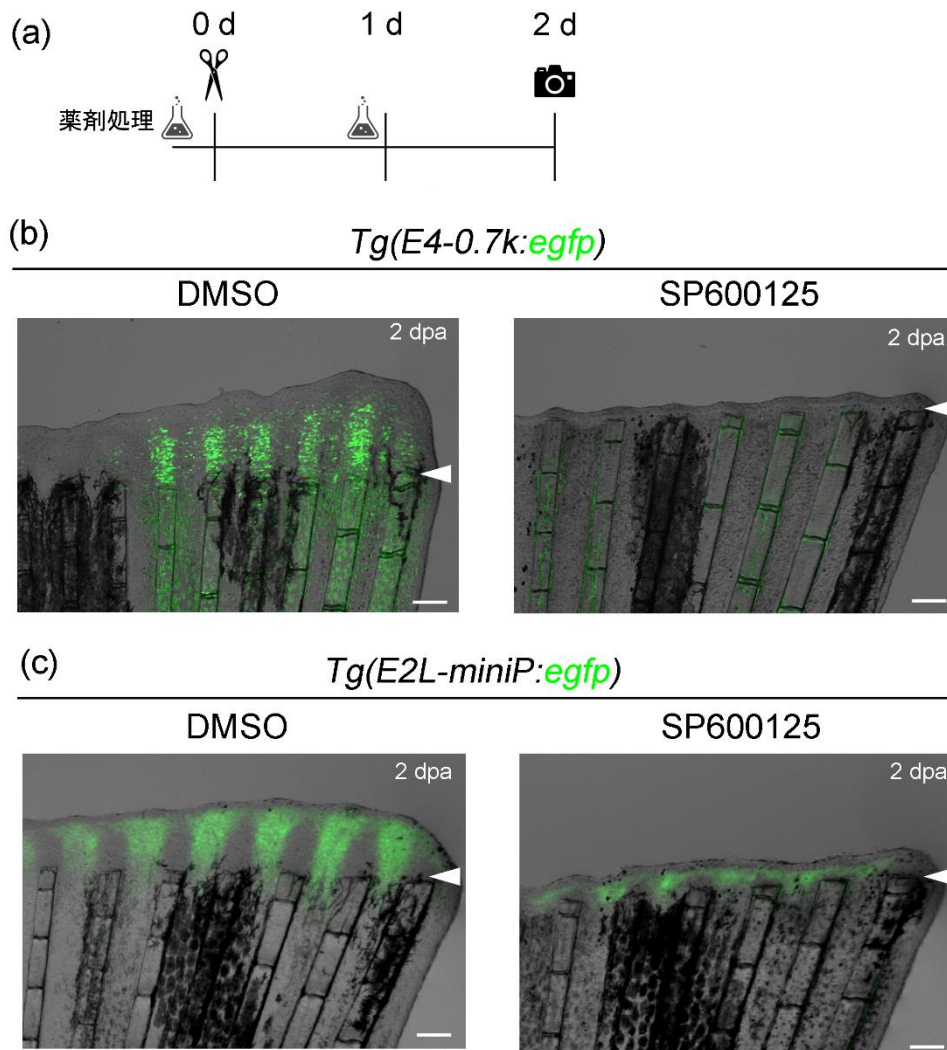


Fig. 13 JNK 阻害による RRE 応答の低下と再生の阻害

- (a) 切断前にあらかじめ SP600125 処理を開始した個体のヒレを切断し、その後も処理を続け、2 dpa の時点で RRE 活性化を観察した。薬剤は 1 日おきに交換した。
- (b) JNK 阻害によってヒレ再生は著しく阻害され、*Tg(E4-0.7k:egfp)* の再生応答による間葉の EGFP 発現はほとんど見られなくなった。
- (c) JNK 阻害によって、*Tg(E2L-miniP:egfp)* の再生応答による上皮の EGFP 発現は低下した。

各 n = 6 △切断面。dpa: days post amputation. Bar: 100μm.

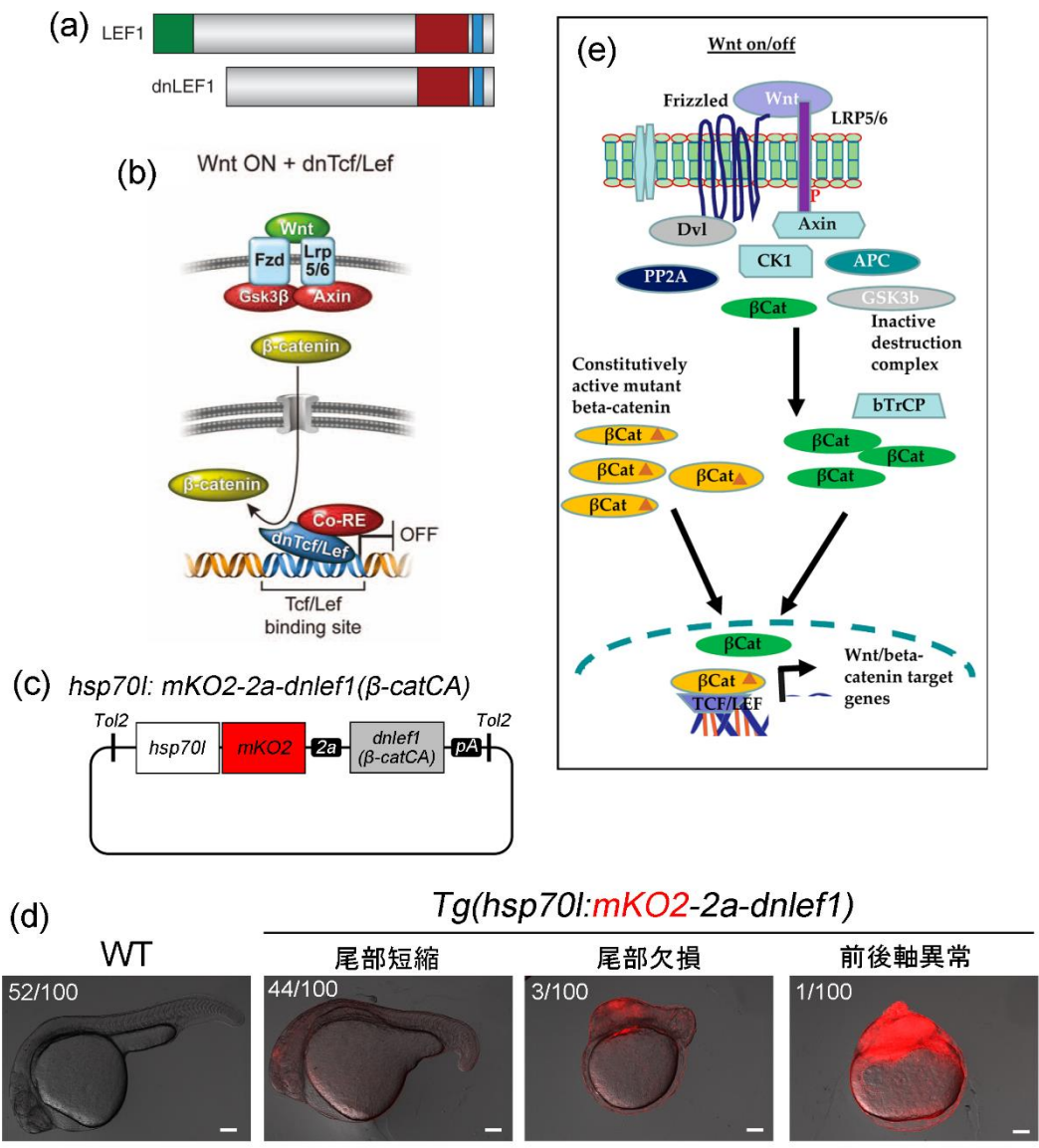


Fig. 14 E-box 上流シグナルの操作

E-box に結合すると考えられる Tcf/Lef とその上流の β カテニンをターゲットとした。

(a) *dnlefl* (*dominant-negative lefl*) は 5' 端の β カテニン結合ドメインが欠失している。

(Cadigan and Waterman, 2012 より引用)

(b) *dnlefl* の発現によって β カテニンは結合できず、シグナルが不活性化される。

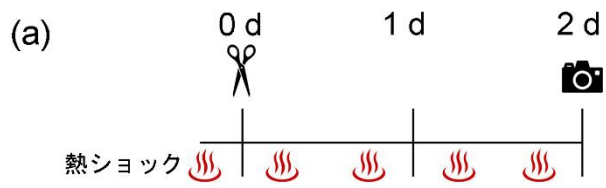
(Vacik and Lemke, 2011 より引用)

(c) 利用した Tg の DNA コンストラクト。熱ショックプロモーター下流に遺伝子を配置して、熱ショックによって強制発現させる。

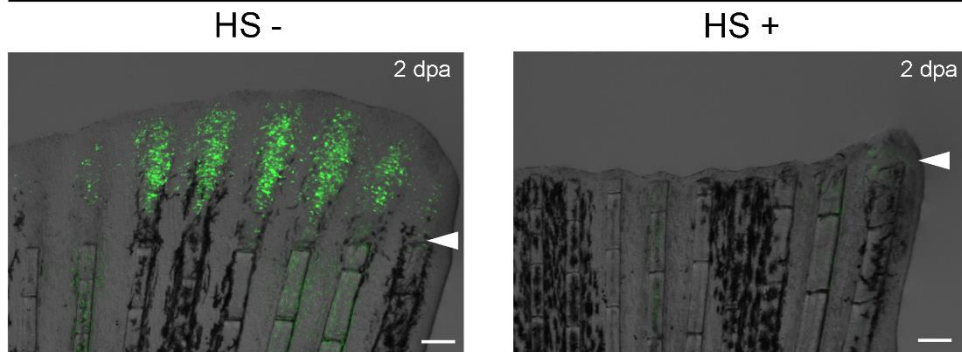
(d) *dnlefl* 発現を誘導した 30 hpf (hours post fertilization) 胚における発生異常。トランスジェーンをヘテロに持つ Tg を野生型とアウトクロスし、6 hpf で熱ショックをかけて *dnlefl* の発現を誘導すると、約半数が *mKO2* 発現を示した。ほとんどの個体は尾部が短縮しており、よりシビアな発生異常の表現型も見られた。n = 100 Bar: 1 mm

(e) *β -catCA* (*constitutive-active β -catenin*) の発現を誘導することで、常に下流の Tcf/Lef を活性化することができる。

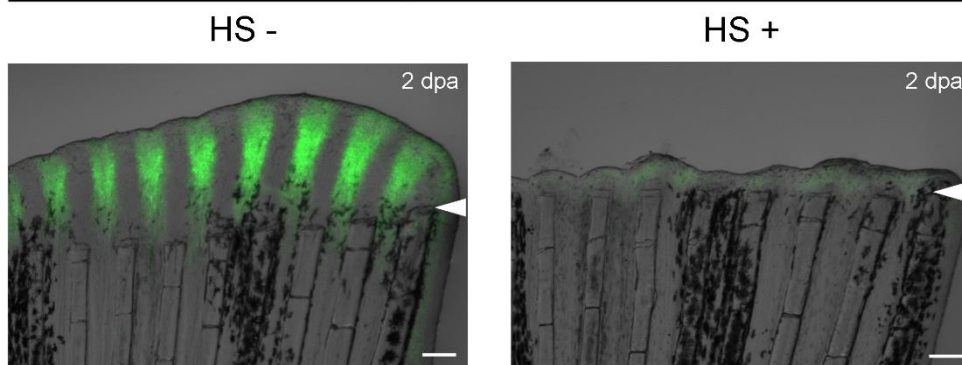
(Mavila and Thundimadathil, 2019 より引用)



(b) *Tg* (E4-0.7k:*egfp*; *hsp70l:mKO2-t2A-dnlef1*)



(c) *Tg* (E2L-miniP:*egfp*; *hsp70l:mKO2-t2A-dnlef1*)



(d) *Tg* (6xE-0.7k:*egfp*; *hsp70l:mKO2-t2A-dnlef1*)

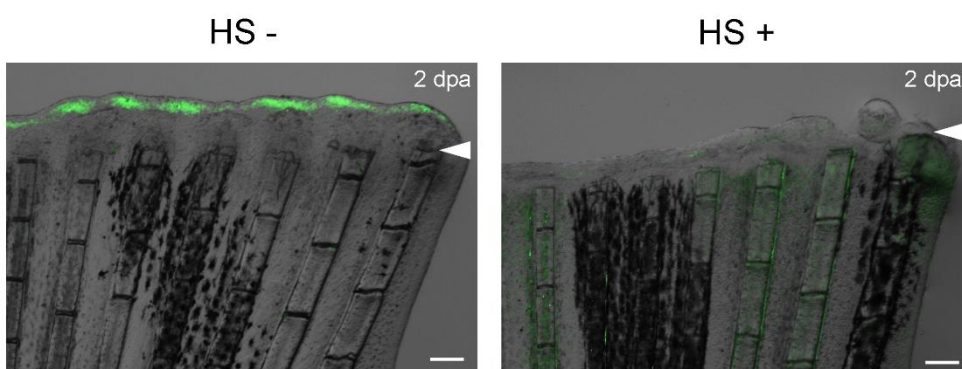


Fig. 15 *dnlefl* 強制発現による RRE 応答の低下と再生の阻害

- (a) 切断前にあらかじめ熱ショック処理を開始した個体のヒレを切断し、その後も熱ショック処理を1日2度行い、2 dpa の時点で RRE 活性化を観察した。
- (b) *dnlefl* 強制発現によってヒレ再生は著しく阻害され、*Tg(E4-0.7k:egfp)* の再生応答による間葉の EGFP 発現はほとんど見られなくなった。
- (c) *dnlefl* 強制発現によって、*Tg(E2L-miniP:egfp)* の再生応答による上皮の EGFP 発現は低下した。
- (d) *dnlefl* 強制発現によって、*Tg(6xE-0.7k:egfp)* の再生応答による先端傷上皮の EGFP 発現は消失した。

各 n = 6 △切断面。 dpa: days post amputation. Bar: 100µm.

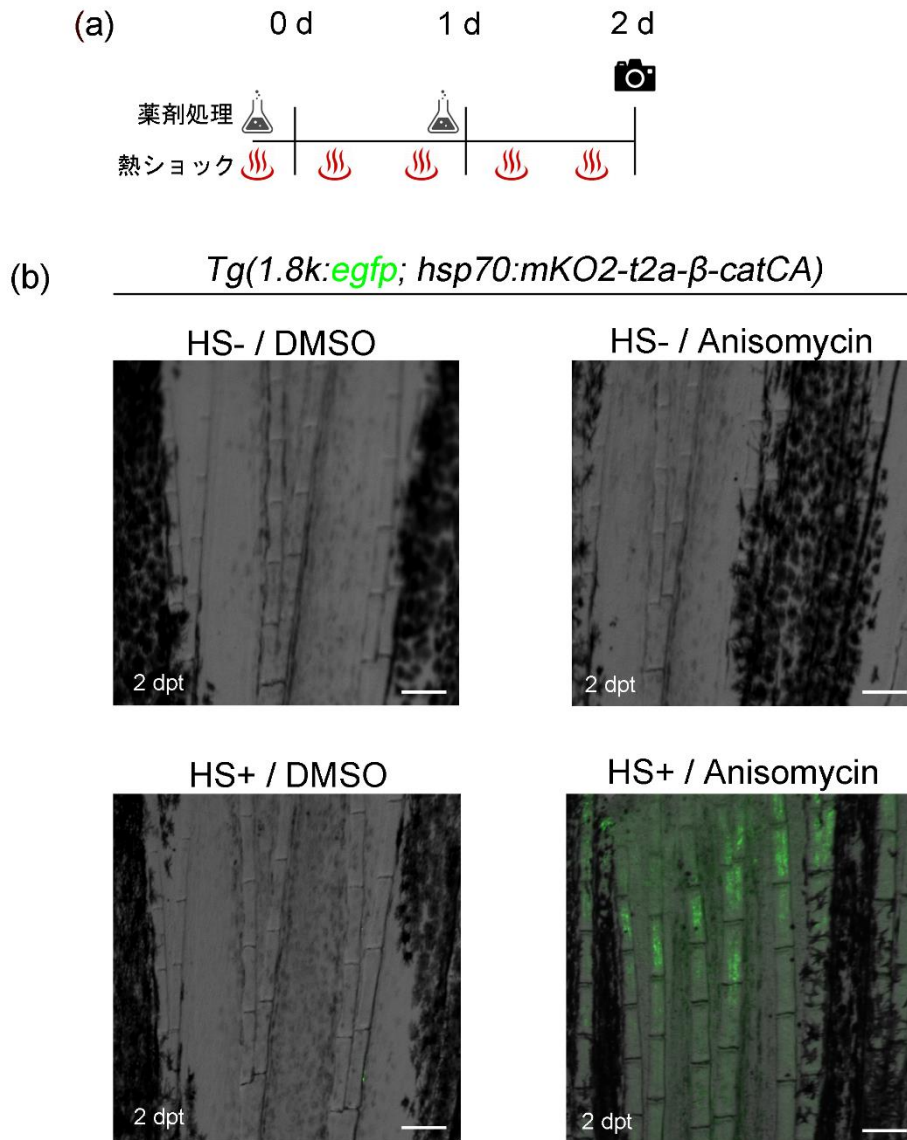


Fig. 16 JNK 活性化と constitutive-active β カテニン強制発現による RRE 活性化の誘導

- (a) JNK アゴニスト処理と 1 日 2 度の熱ショック処理を行い、2 dpt の時点で RRE 活性化を観察した。
- (b) いずれか片方のシグナル操作を行った *Tg(1.8k:egfp)* の個体では、再生応答の誘導は見られなかった。その一方で、両方の操作を行った個体では、再生応答が誘導された。

各 n = 3 dpt: days post treatment. Bar: 100 μ m.

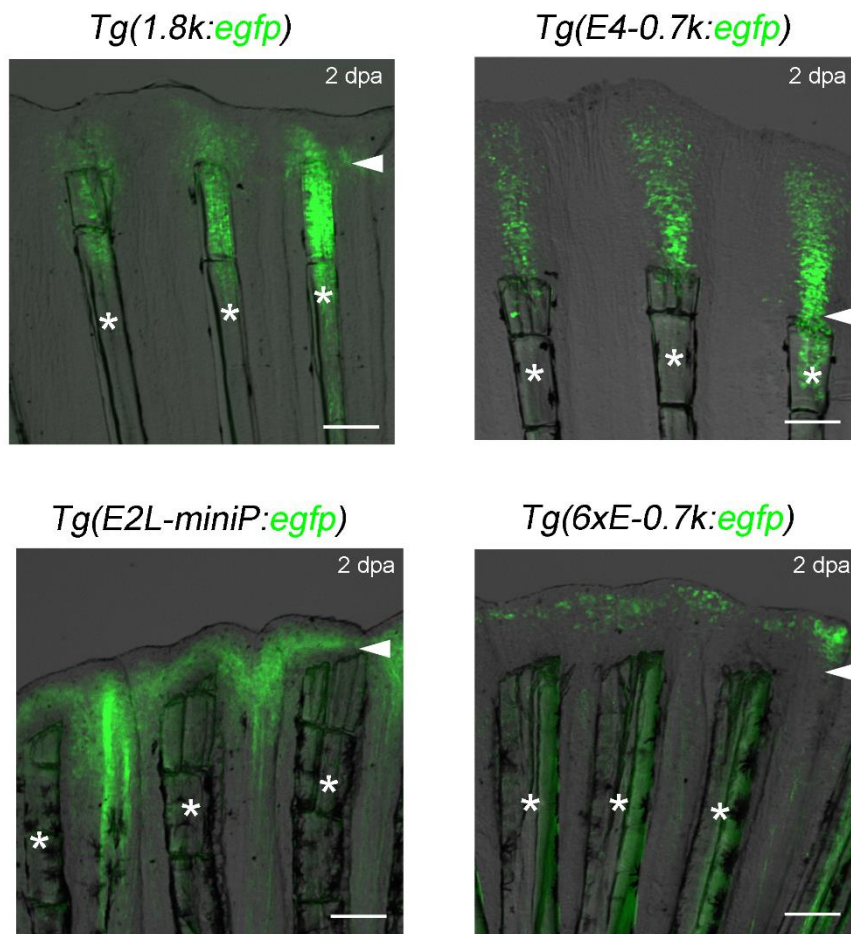


Fig. 17 胸ヒレの切断における RRE の活性化

切断後の胸ヒレにおいても、尾ヒレと同様に EGFP 発現が誘導され、発現パターンもほとんど一致していた。

各 n = 5 △切断面。* 鰭条。dpa: days post amputation. Bar: 100 μm.

Tg(E2L-miniP:egfp; sp7:mCherry)

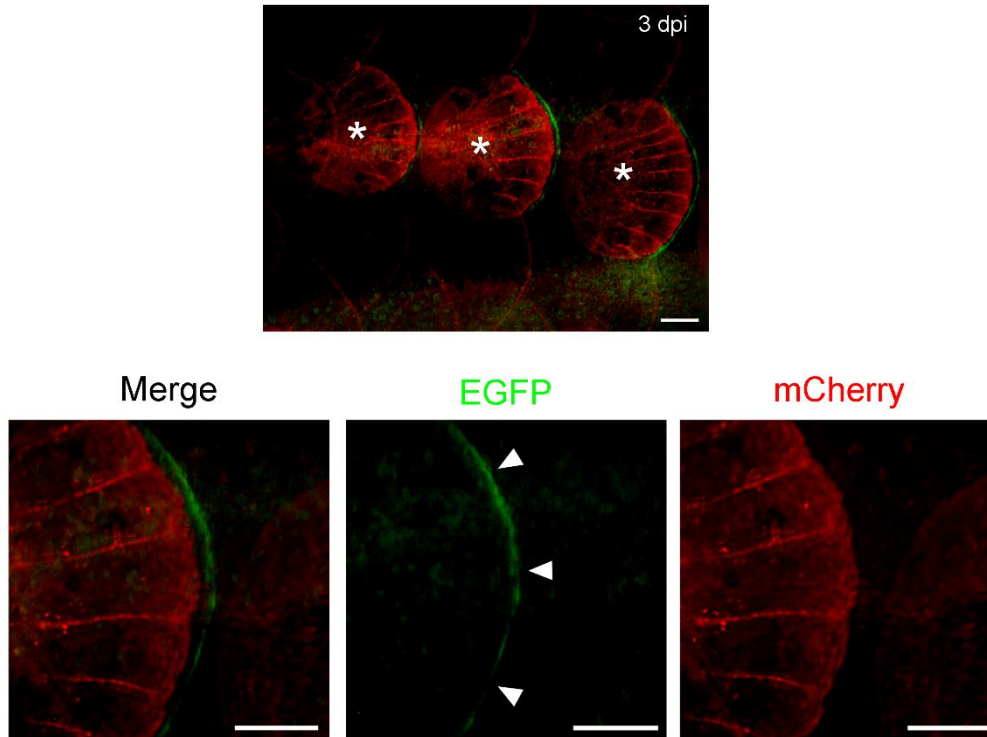


Fig. 18 鱗の再生における RRE の活性化

Tg(E2L-miniP:egfp; sp7:mCherry) における鱗再生時の EGFP 発現。 *sp7* は骨芽細胞で発現する。再生してきた鱗は *sp7* を強く発現する (*)。3 dpi になると再生してきた鱗を縁取るような EGFP 発現が現れた (Δ)。

n = 10 dpi: days post injury. Bar: 100 μm.

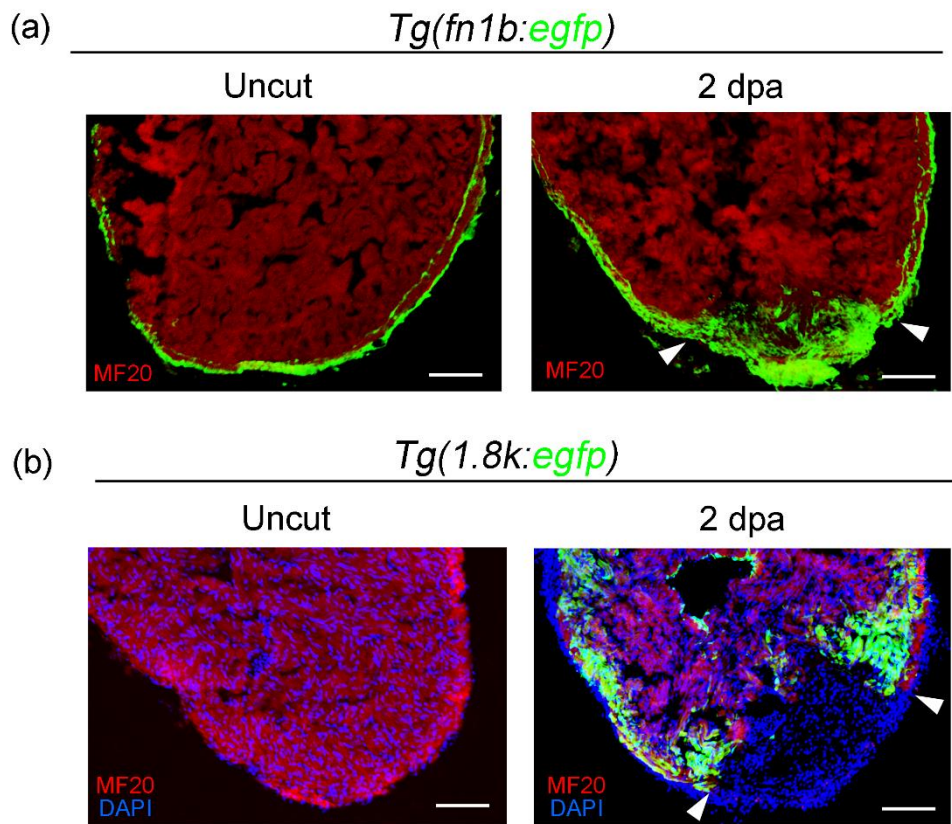


Fig. 19 心筋切除における再生遺伝子の発現と RRE の活性化

(a) *Tg(fn1b:egfp)* は切除前から心外膜で EGFP を発現していた。切除後には再生領域でも EGFP の発現が見られるようになった。

(b) *Tg(1.8k:egfp)* は切除前には EGFP 発現が全く見られなかった。切除後には特に残存した心筋組織の先端で EGFP の発現が見られるようになった。

各 n = 5 MF20: 心筋細胞。△切断面。dpa: days post amputation. Bar: 100 μ m.

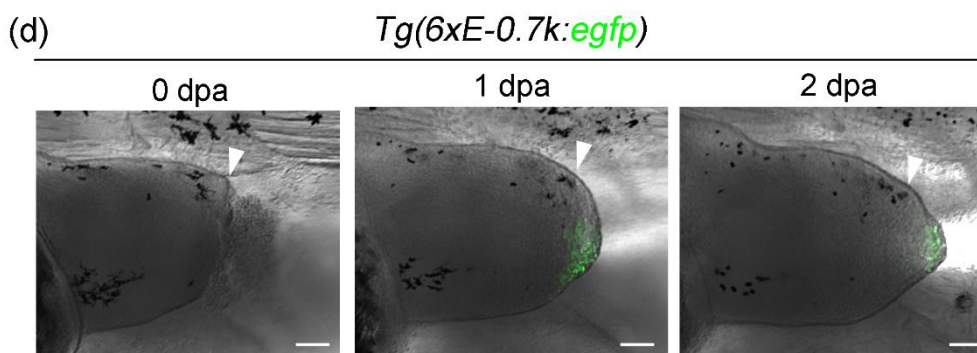
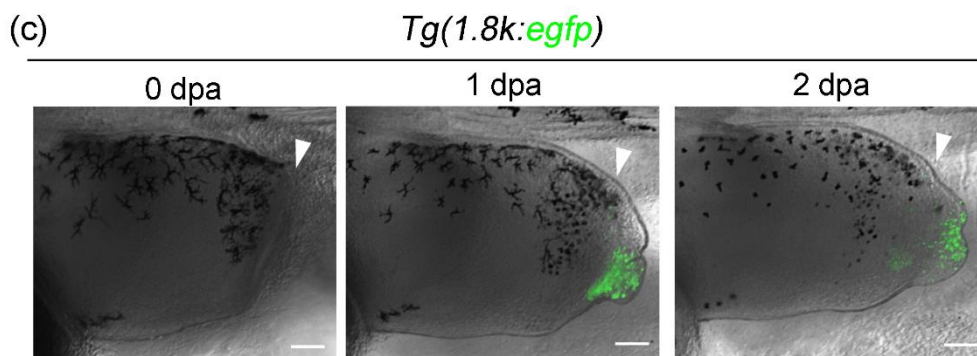
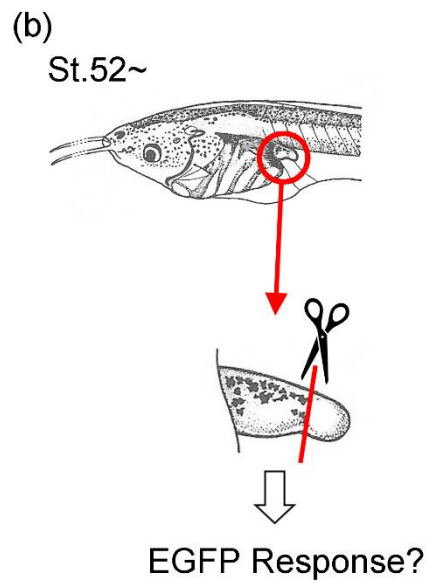
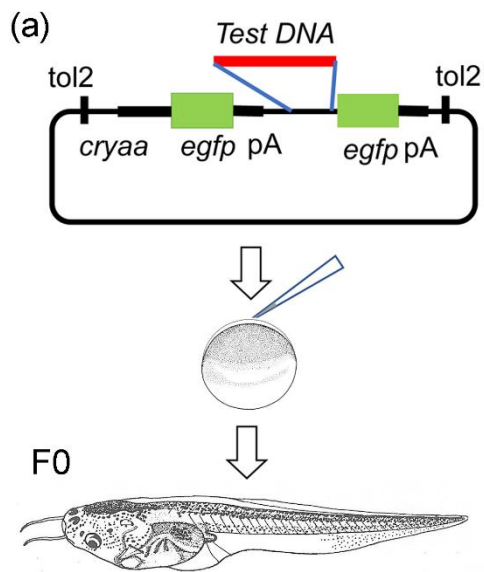


Fig. 20 アフリカツメガエルの肢芽再生における RRE の活性化

- (a) ゼブラフィッシュで再生応答を示したコンストラクトを導入して、アフリカツメガエルの RRE Tg を作製した。F0 世代の幼生をアッセイに使用した。
 - (b) 再生可能な発生ステージの肢芽（四肢原基）を切断し、RRE 活性化が見られるか検証した。
 - (c) *Tg(1.8k:egfp)* は 1 dpa から再生組織で応答が見られた。n = 12
 - (d) *Tg(6E-0.7k:egfp)* も 1 dpa から再生組織で応答が見られた。n = 8
- △切断面。dpa: day(s) post amputation. Bar: 100μm.

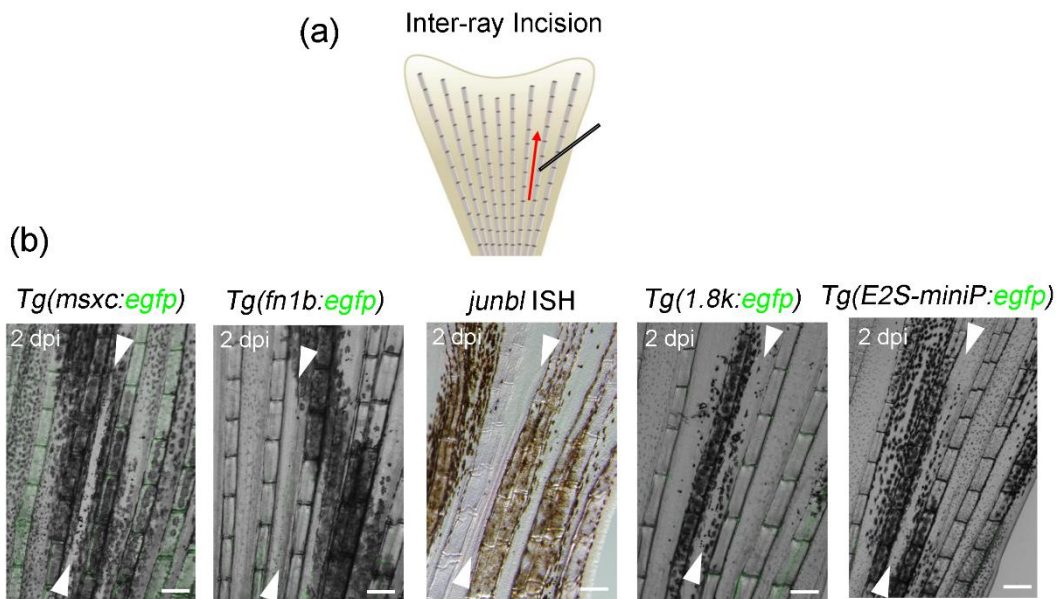
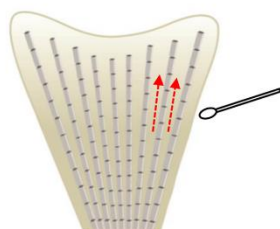


Fig. 21 鰭条間の切れ込み傷害への再生応答

- (a) 傷害方法の模式図。鰭条間組織に針の先端でスリットを入れた。
- (b) 傷害後の再生遺伝子の発現と RRE の応答。いずれも応答は見られなかった。
- 各 n = 5 △ 傷害部の両端。 dpi: days post injury. Bar: 100 μm.

(a) Exfoliation Injury



(b)

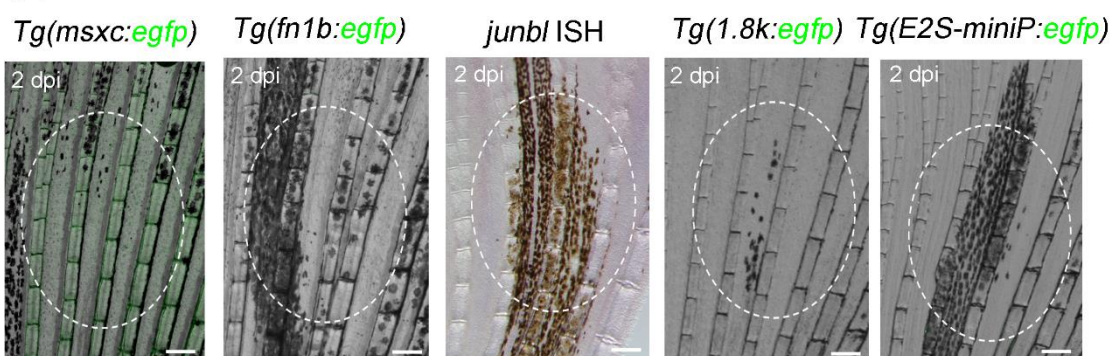


Fig. 22 上皮の擦過傷への再生応答

(a) 傷害方法の模式図。綿棒を用いてヒレの表面を擦ってケラチノサイトを除去した。

(b) 傷害後の再生遺伝子の発現と RRE の応答。いずれも応答は見られなかった。

各 n = 5 円は傷害範囲。dpi: days post injury. Bar: 100 μm.

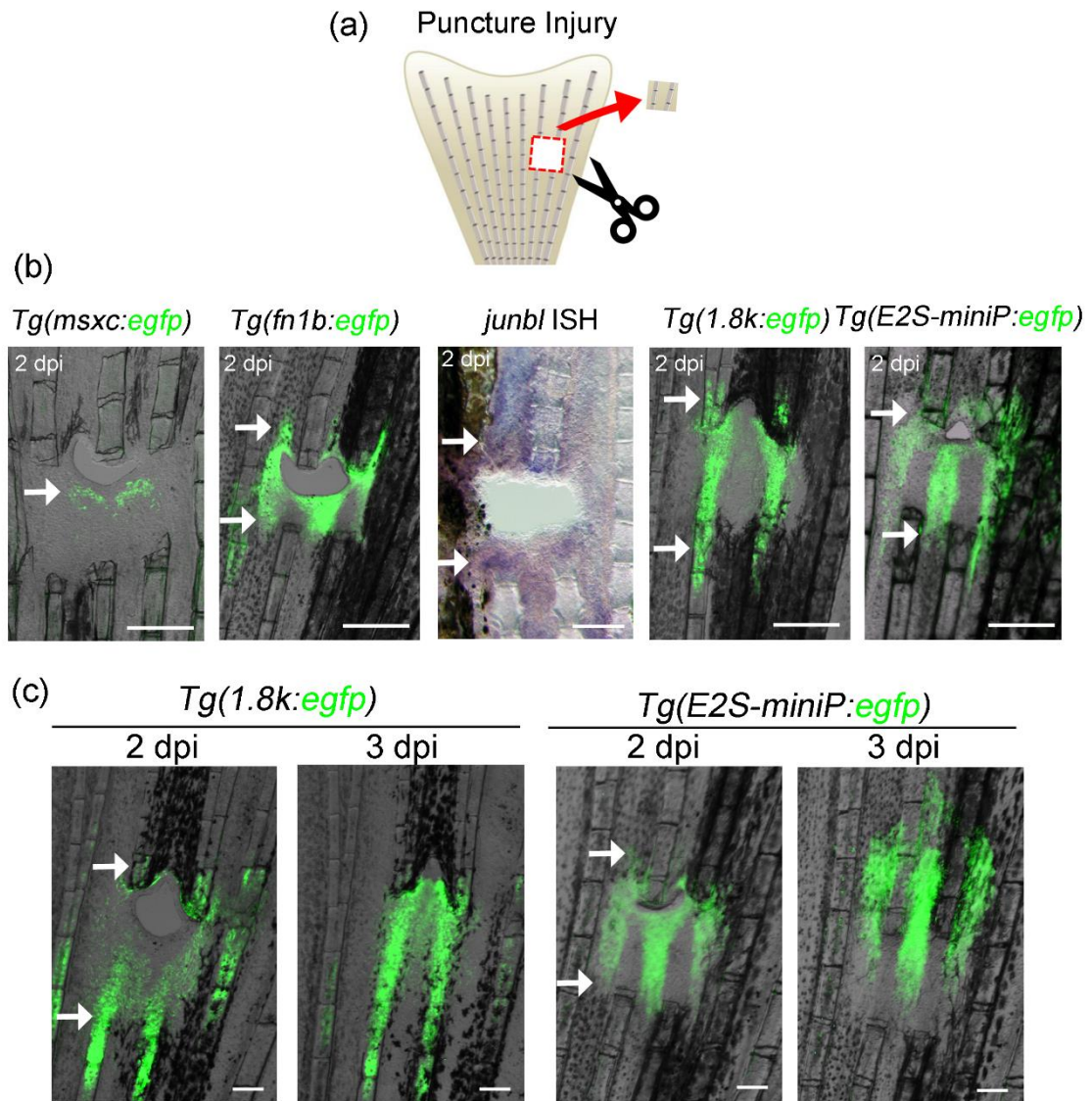


Fig. 23 ヒレ内部の穴開け傷害への再生応答

- (a) 傷害方法の模式図。メスを用いてヒレの内部を切り抜き、四角形の穴を開けた。
- (b) 傷害後の再生遺伝子の発現と RRE の応答。全てで応答が見られた。*msxc* では穴の基部側だけで応答が見られたのに対して、他は両端で応答が見られた (→)。
- (c) 傷害後の各 RRE Tg の応答。発現のパターンやタイミングは、ヒレ切断時と類似していた。

各 n = 5 dpi: days post injury. Bar: 100 μm.

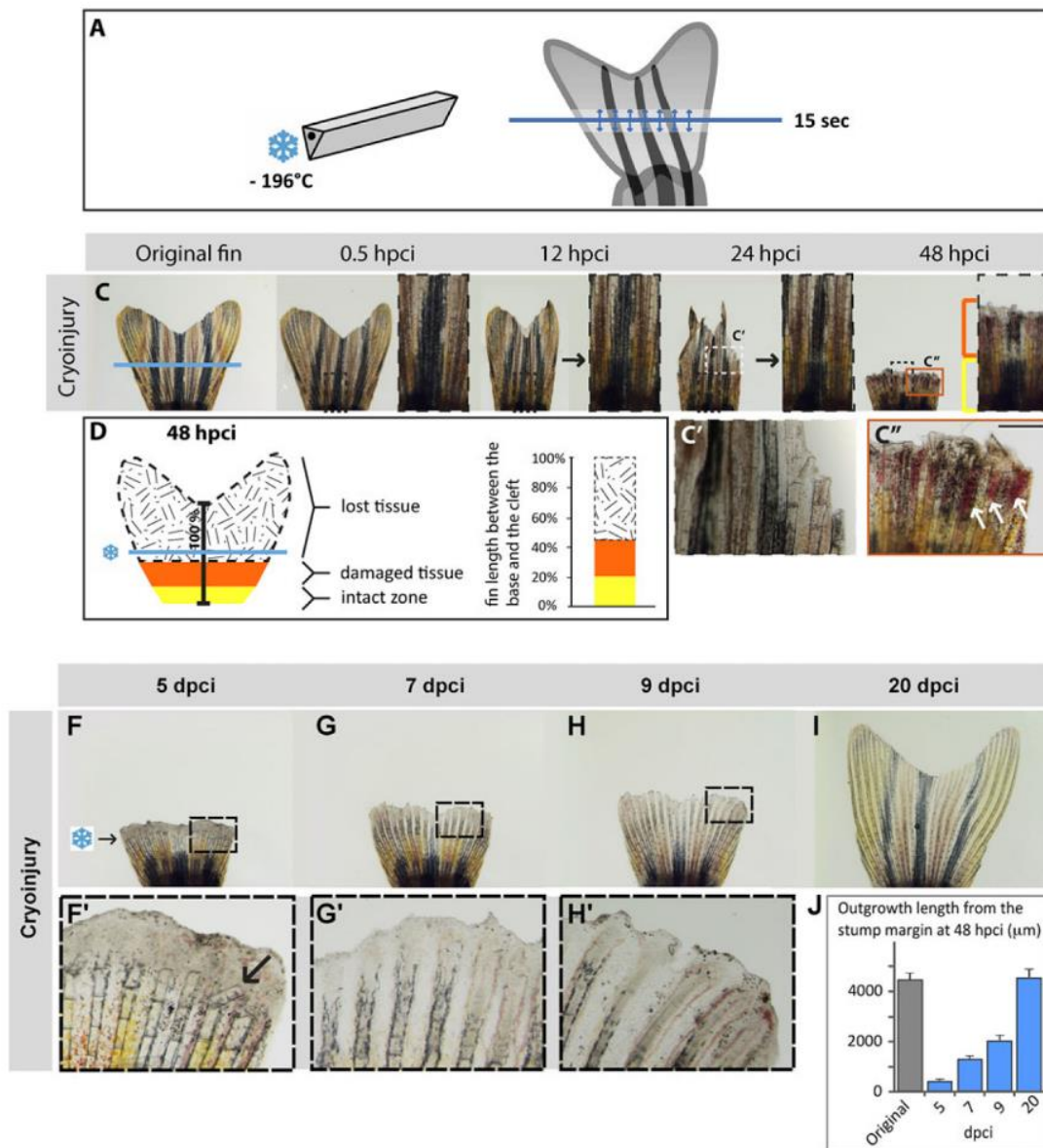


Fig. 24 過去のヒレへの低温傷害

これまでのヒレへの低温傷害の報告では、ブレードで広範囲に傷害を与えている。傷害後にヒレの先端側の部分は壊死して失われる。その後は切断後と同様に、付加再生によって再生芽の形成を経て組織は再生されていく。

(Chassot et al., 2016 より引用)

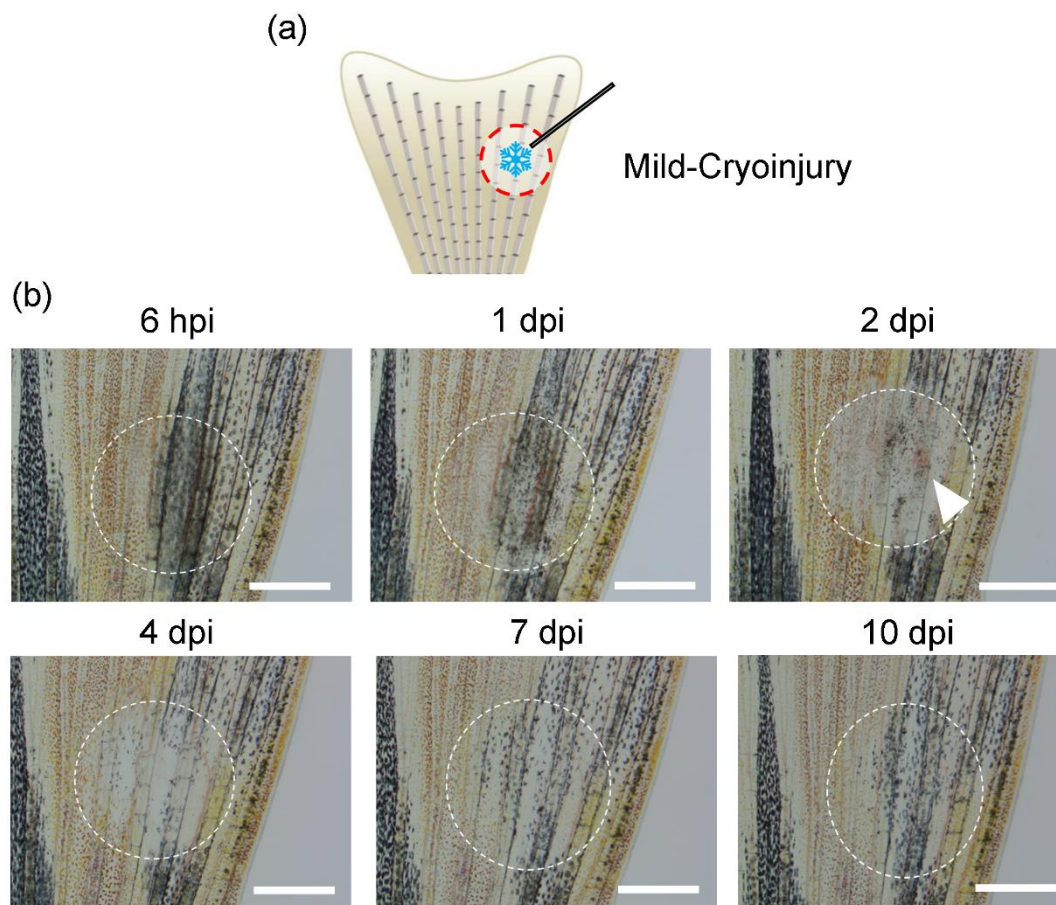


Fig. 25 新たな低温傷害後のヒレの外観

(a) 新たな低温傷害の模式図。液体窒素に浸して冷却した針をヒレに当て、狭い領域で傷害を与えた。

(b) 低温傷害後のヒレ表面の状態の追跡。充血 (Δ) や色素の消失が 2 dpi ごろから見られたが、10 dpi ごろには元の状態が回復された。

n = 10 円は傷害範囲。hpi: hours post injury, dpi: day(s) post injury. Bar: 100 μ m.

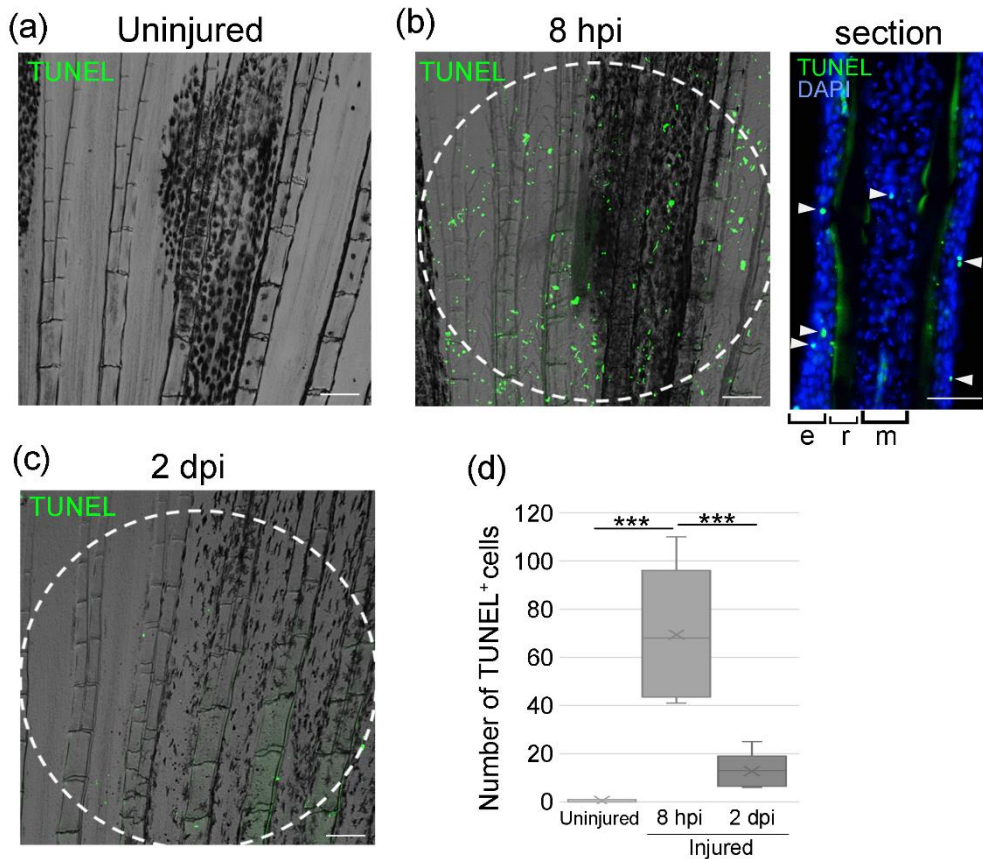


Fig. 26 低温傷害によるアポトーシスの誘導

TUNEL 染色によるアポトーシス細胞の検出。

- (a) 無傷の状態ではアポトーシス細胞はほとんど見られない。
 (b) 8 hpi では傷害部で全体的にアポトーシス細胞が分布していた。切片で観察すると、上皮 (e) と間葉 (m) の両方にアポトーシス細胞 (Δ) は存在した。r: 鰭条。
 (c) 2 dpi では傷害部でわずかにアポトーシス細胞が検出された。
 (d) 8 hpi から 2 dpi にかけてアポトーシス細胞の数は有意に減少した。*** $p < 0.001$
 各 $n = 5$ 円は傷害範囲。hpi: hours post injury, dpi: days post injury. Bar: 100 μm .

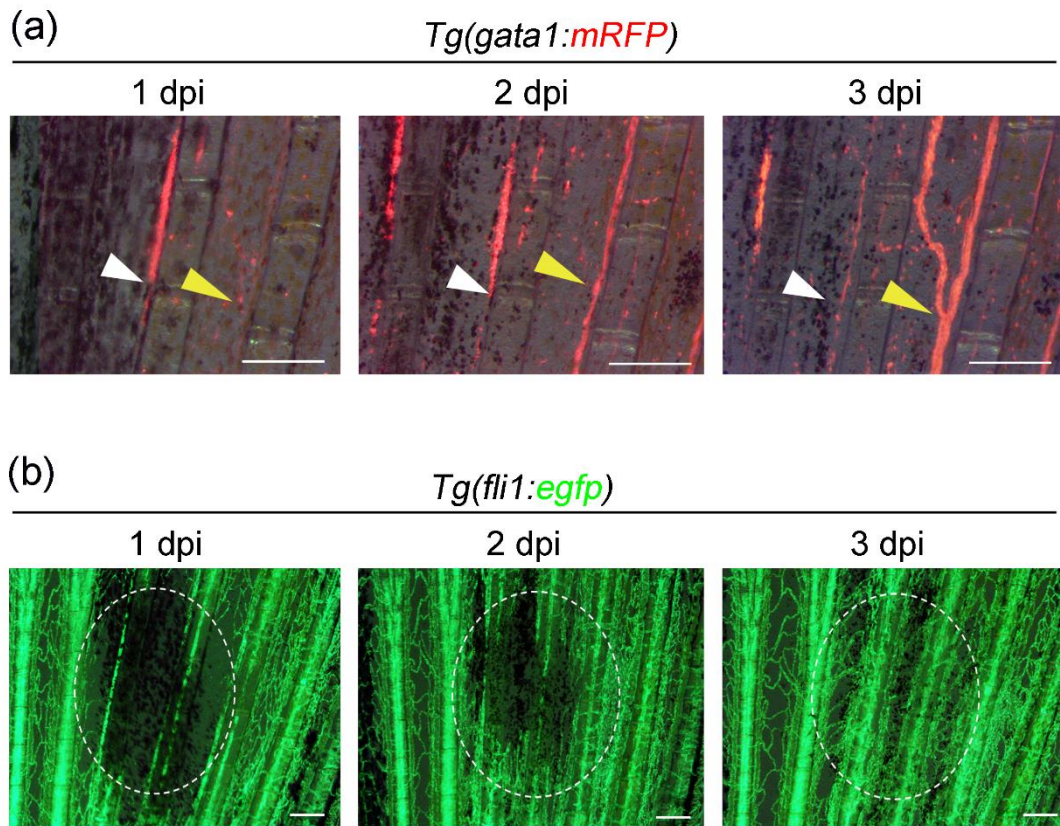


Fig. 27 低温傷害による血流・血管への影響

- (a) 赤血球マーカー*Tg(gata1:mRFP)* を用いた血流の観察。1 dpi では血流の滞留（白△）や減少（黄△）が見られた。しかし3 dpi ではこれらは解消、回復された。
- (b) 血管内皮細胞マーカー*Tg(fli1:egfp)* を用いた血管の観察。1 dpi では傷害部に穴が空いたようにEGFP発現が失われたが、3 dpi には完全性を取り戻した。円は傷害範囲を示す。

各 n = 6 円は傷害範囲。dpi: day(s) post injury. Bar: 100 μm.

Tg(lysC:egfp)

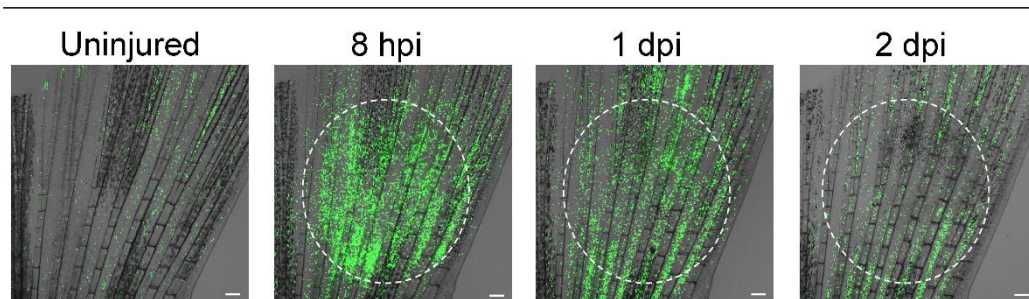


Fig. 28 低温傷害によるミエロイド細胞への影響

ミエロイド細胞マーカー*Tg(lysC:egfp)* を用いた観察。8 hpi には傷害部で顕著なミエロイド細胞の集積が見られたが、徐々に離散していき 2 dpi には傷害部からは見られなくなった。

n = 6 円は傷害範囲。hpi: hours post injury, dpi: day(s) post injury. Bar: 100 μ m.

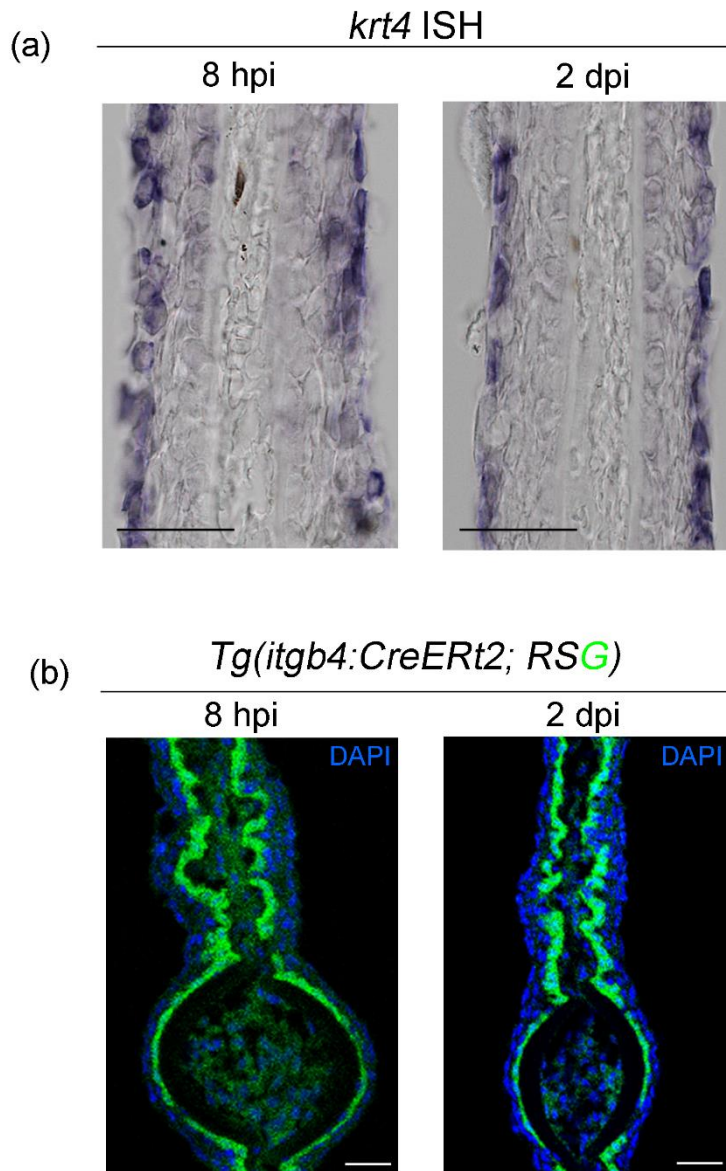


Fig. 29 低温傷害による上皮への影響

(a) 上皮ケラチノサイトマーカー*krt4*を用いたISH。傷害後もケラチノサイト層の完全性は保たれていた。

(b) 上皮基底層マーカー*itgb4*のCre Tgを用いた傷害後の基底層細胞の追跡。傷害後も基底層の細胞は元の位置に留まり続けた。

各 n = 5 hpi: hours post injury, dpi: days post injury. Bar: 50 μ m.

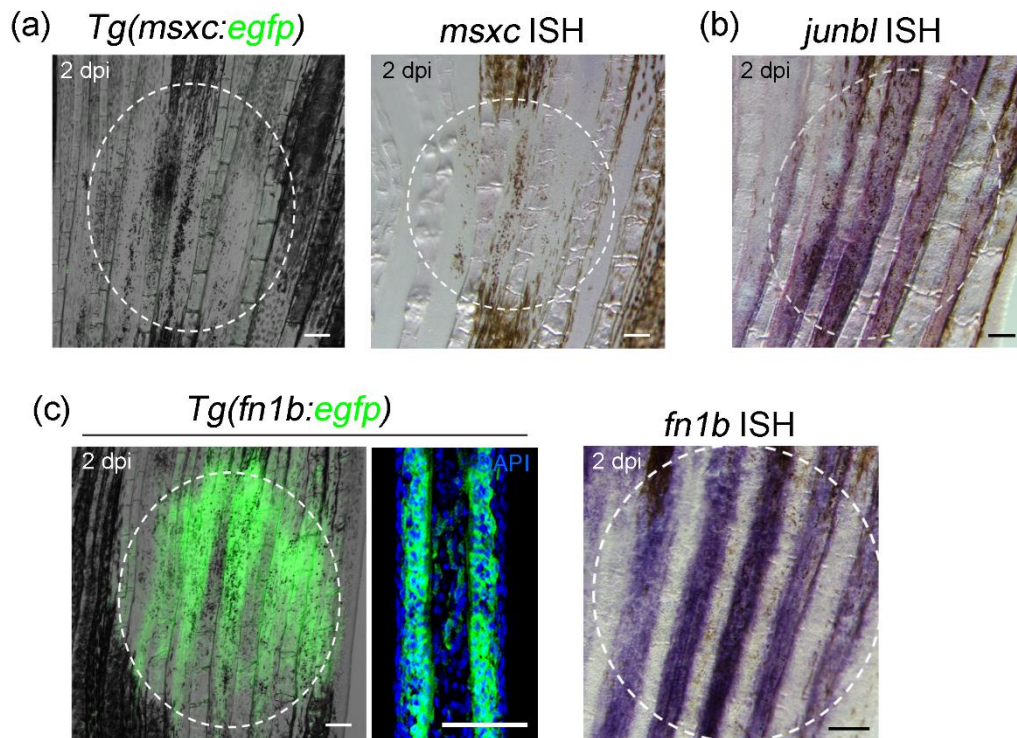


Fig. 30 低温傷害による再生応答遺伝子の応答

低温傷害による3つの再生応答遺伝子の応答。

(a) *msxc* の発現は誘導されなかった。ISHでも同様の結果であった。

(b) 一方で、*junbl* の発現は誘導された。

(c) 加えて、*fn1b* の発現も誘導された。切片で見ると、発現細胞は上皮であった。ISHでも同様の結果が確認された。

各 n = 5 円は傷害範囲。dpi: days post injury. Bar: 100 μm (Whole), 50 μm (Section).

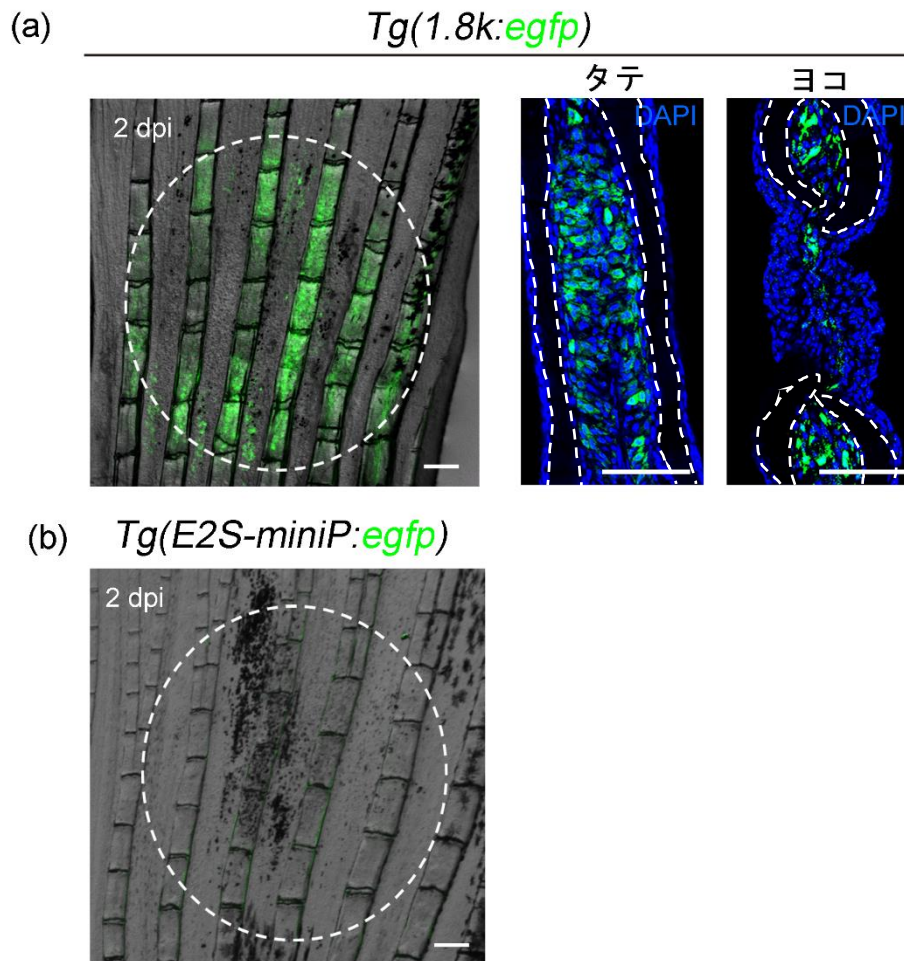


Fig. 31 低温傷害による RRE の応答

低温傷害による 2 つの RRE の応答。

(a) *Tg(1.8k:egfp)* の応答は誘導された。切片で見ると応答細胞は間葉であった。n = 15

(b) 一方で、*Tg(E2S-miniP:egfp)* では応答が見られなかった。n = 5

円は傷害範囲。切片の点線部分は鱗条。

dpi: days post injury. Bar: 100 μ m (Whole), 50 μ m (Section).

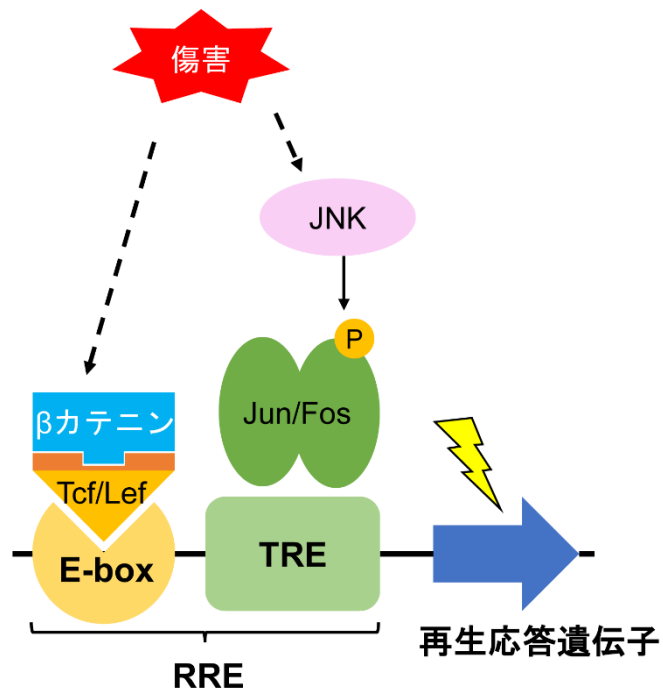


Fig. 32 上流シグナルを介した E-box/TRE RRE 活性化

E-box/TRE RRE システムの模式図。E-box 上流ではβカテニンと Tcf/Lef が、TRE 上流では JNK と Jun/Fos が働いていることが示唆された。傷害によって生じたこれら 2 種類のシグナルが各モチーフへと作用し、シグナルが統合されて RRE を活性化して再生遺伝子の発現へと繋がる。

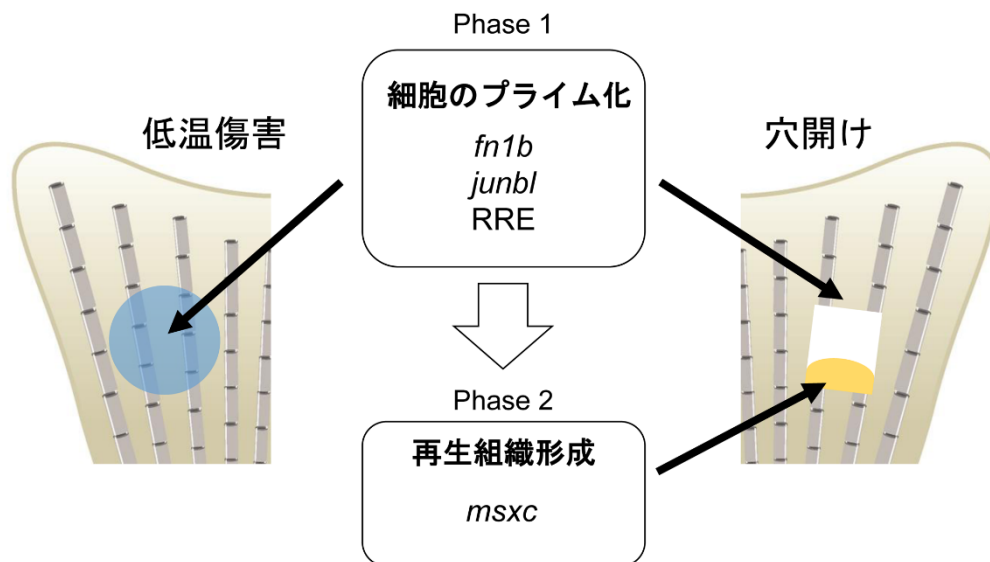


Fig. 33 細胞のプライム化と再生組織形成からなる再生応答システム

傷害による再生応答の違いから推測される再生応答システムの模式図。低温傷害によって応答した遺伝子は穴開けの先端部でも応答が見られた。これらの遺伝子は再生応答の初期フェーズ“細胞のプライム化”の段階ですでに活性化されている。一方で、低温傷害に応答せず、穴開けの基部側でのみ応答する遺伝子もある。このような遺伝子は再生応答の次のフェーズ“再生組織形成”の段階に達し、再生芽形成が起こってはじめて活性化される。

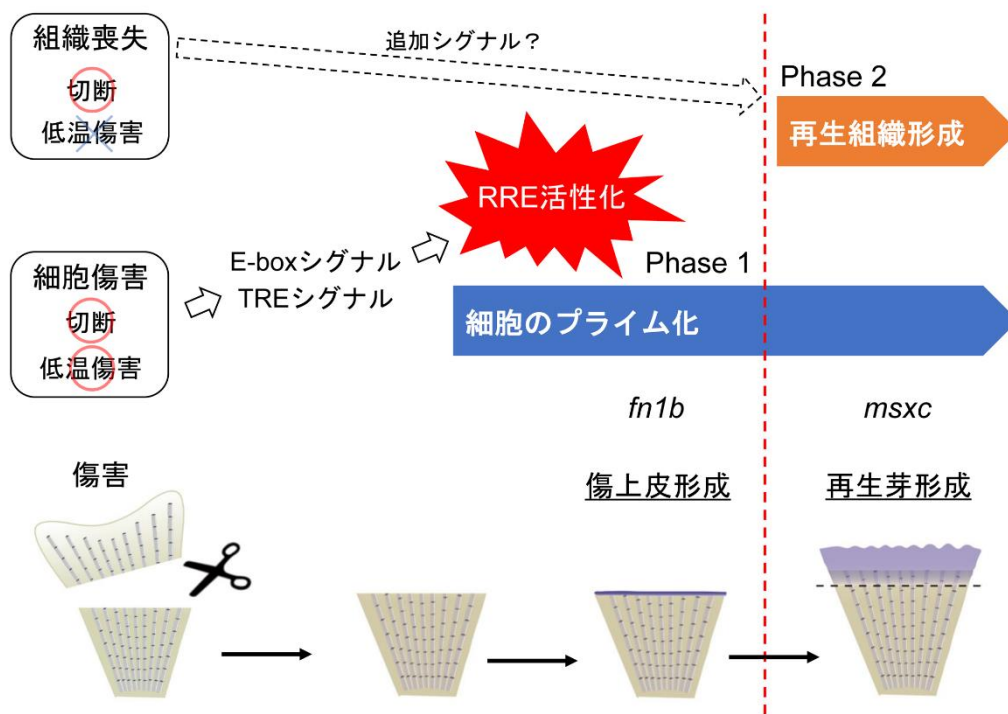


Fig. 34 傷害から再生組織に至る再生応答の全体像

RRE を介した再生応答システムの全体像の予想図。細胞傷害によって発生した E-box/TRE シグナルが RRE の活性化を誘導し、再生応答の第一段階である細胞のプライム化につながる。ここに組織喪失によって発生した追加のシグナルが加わることで、再生応答の第二段階である再生組織形成に進むことができる。

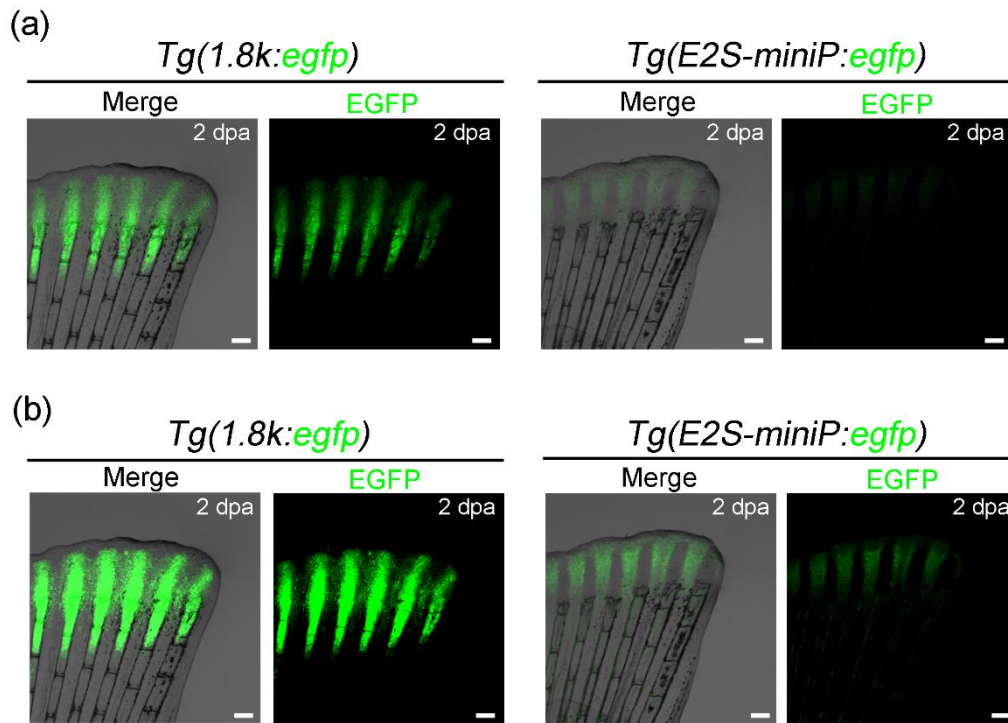


Fig. 35 RRE による応答性の違い

同じ E-box と TRE を含む RRE であっても、RRE の活性を反映する EGFP 蛍光の強度は、*Tg(1.8k:egfp)* と *Tg(E2S-miniP:egfp)* の間で差がある。これが低温傷害によって *E2S* RRE の活性化が見られなかった理由だと考えた。蛍光強度の差を示すため、同条件で 2 つの Tg の 2 dpa ヒレの撮影を行った。

(a) *1.8k* の撮影条件に合わせた場合。*E2S* の EGFP 蛍光はかろうじて確認できる。

(b) *E2S* の撮影条件に合わせた場合。*1.8k* の EGFP 蛍光は saturate するほど強い。

7, 謝 辞

指導教員の東京科学大学生命理工学院 川上厚志准教授には本研究を進め、また本論文を作成するにあたって、ありとあらゆる場面においてご指導ご鞭撻を頂きました。心より感謝を申し上げます。

山形大学医学部 越智陽城准教授にはアフリカツメガエル Tg 系統の作製をして頂くとともに、カエルでの実験に対して多くのご助言を頂きました。大変感謝申し上げます。

大阪大学微生物病研究所 石谷太教授には *dnlef1, β -catCA* のプラスミド DNA を分与していただきました。感謝申し上げます。

山梨大学医学部 川原敦雄教授には *Tg(lysC:egfp)* 系統のゼブラフィッシュ個体を分与していただきました。感謝申し上げます。

東京工業大学工藤研究室 OB の伊藤様にはゼブラフィッシュの心臓切除の手法をご指導いただきました。感謝申し上げます。

また、イメージング解析やその他機器のサービスの提供をいただいた東京科学大学バイオサイエンス統合支援センターに感謝します。

川上研究室の先輩方・同期には実験方法や魚の維持など本研究を進める上で多くの点でご指導ご協力頂きました。深く感謝申し上げます。

最後に精神的にも経済的にも常に支援し続けてくれた母に御礼申し上げます。ありがとうございます。

吉田貴史