

四肢再生過程に発現する FGF9 遺伝子の単離

芋川 浩*

Isolation of FGF9 gene that plays an important role in limb regeneration

Yutaka IMOKAWA

要 旨

<目的>有尾両生類に属するイモリは手足（四肢）や眼球内の水晶体を再生できる唯一の脊椎動物である。このイモリの再生機構を解明することは、ヒトをはじめとした手足（四肢）などを再生できない脊椎動物への応用が可能となるため、今後有用な医療・看護技術の開発につながるものとして、現在欧米諸国をはじめとした世界各国で活発に研究がなされている。しかしながら、イモリに関する分子生物学的解析は他の脊椎動物と比べて遅れており、そのような状況を克服するためにも、再生に関わる遺伝子を単離し、解析することは多くの観点から重要である。

<結果>創傷治癒や手足（四肢）の発生過程に重要な働きをすることが明らかとなっている線維芽細胞増殖因子（FGF）分子に注目し、四肢再生過程に発現している FGF9 という分子の単離に成功した。単離された FGF9 は、全長ではないが長さ 1.5kb であり、翻訳領域は 750bp の長さであった。また、265 個以上のアミノ酸残基をもつタンパク質に翻訳されると推測された。

<考察>四肢再生には末梢神経系の分泌タンパク質が重要な働きをしていることがわかっている。今回単離された FGF9 はヒトなど哺乳類で末梢神経系に発現・機能していることが分かっている分子であり、脊椎動物の四肢再生に重要な働きをしていることが予想される。

キーワード；四肢再生 FGF 遺伝子単離 末梢神経系

緒 言

有尾両生類に属するイモリは手足（四肢）や眼球内の水晶体を再生できる唯一の脊椎動物である（吉里ら、1996: Stocum, 2006: Carlson, 2007）。このイモリの再生機構を解明することは、ヒトをはじめとした手足（四肢）などを再生できない脊椎動物への応用が可能となるため、今後有用な医療・看護技術の開発につながるものとして、現在欧米諸国をはじめとした世界各国で活発に研究がなされている。アメリカ合州国では国防省が膨大な研究費を投じて兵士の手足を再生させるための研究が国家機密研究として開始されていることは有名である。しかしながら、イモリに関

する分子生物学的解析は他の脊椎動物と比べて遅れており、そのような状況を克服するためにも、再生に関わる遺伝子を単離し、解析することは多くの観点から重要である。そのような状況を克服するためにも、再生に関わる遺伝子の候補として、創傷治癒など皮膚再生や四肢発生に重要な働きをすることがわかっている分子群を単離し、解析することは重要であると思われる。

線維芽細胞増殖因子（FGF）は種々の生命現象に重要な働きをしている分子として知られており、すでに臨床現場においても最先端医薬の一つとして利用されている。たとえば、FGF は皮膚の創傷治癒の際にも

*福岡県立大学看護学部基盤看護学系
Faculty of Nursing, Fukuoka Prefectural University

連絡先: 〒825-8585 福岡県田川市伊田4395番地
福岡県立大学 看護学部 基盤看護学系 芋川 浩
E-mail: imokawa@fukuoka-pu.ac.jp

重要な働きをしていることがわかっており、重度の熱傷やケロイド患者への皮膚移植や皮膚の再生治療の際の投薬としてすでに利用されており、大きな効果を上げている。大学病院のように大きな病院では看護師が医師の指示のもとに FGF を用いた治療・処置を行っているケースも多い。今回の研究では、創傷治癒や四肢発生に重要な働きをすることが明らかとなっている FGF 分子に注目して、四肢再生過程に発現・機能している FGF を単離し、解析を行った。

方法

1. 実験動物

実験動物としては、日本産アカハライモリを使用した。イモリは浜松生物教材より必要数を購入し、20℃の飼育室で飼育・維持した。

2. 四肢再生

イモリの麻酔や四肢切断方法は以前の論文に詳細に記述されている (Imokawa and Eguchi, 1992; Imokawa and Yoshizato, 1997; Cash, Gate, Imokawa, and Brockes, 1998)。イモリを水生動物

専用麻酔薬により完全に麻酔をかけた後、イモリの前肢前腕部分を鋭利なハサミを使用して切断した。四肢切断後、イモリ用生理食塩水に浸したペーパータオルの上に置き、麻酔から覚めた後、20℃で飼育・維持し、再生を行わせた。

3. RNA 抽出, cDNA 合成および cDNA ライブラリー

四肢切断後7日目の再生肢を30個ほど回収し、Molecular cloningなどに従って、塩化セシウム超遠心法で全 RNA を抽出・精製した (村松, 1988; Sambrook, Fritsch, and Maniatis, 1989)。抽出した全 RNA は使用するまで、-80℃で保存した。

抽出した全 RNA より、1st strand 合成キット (Amersham) を使用して、全 RNA に対する cDNA を合成した。

イモリ FGF4 を単離するための合成プライマーは独自にデザインしシグマ社に注文した。逆転写-DNA ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 後、増幅された遺伝子は TA クローニングによりクローニングし、塩基配列決定解析やクロスハイブリダイゼーションのプローブとして使用した (村松, 岡山, 1991)。

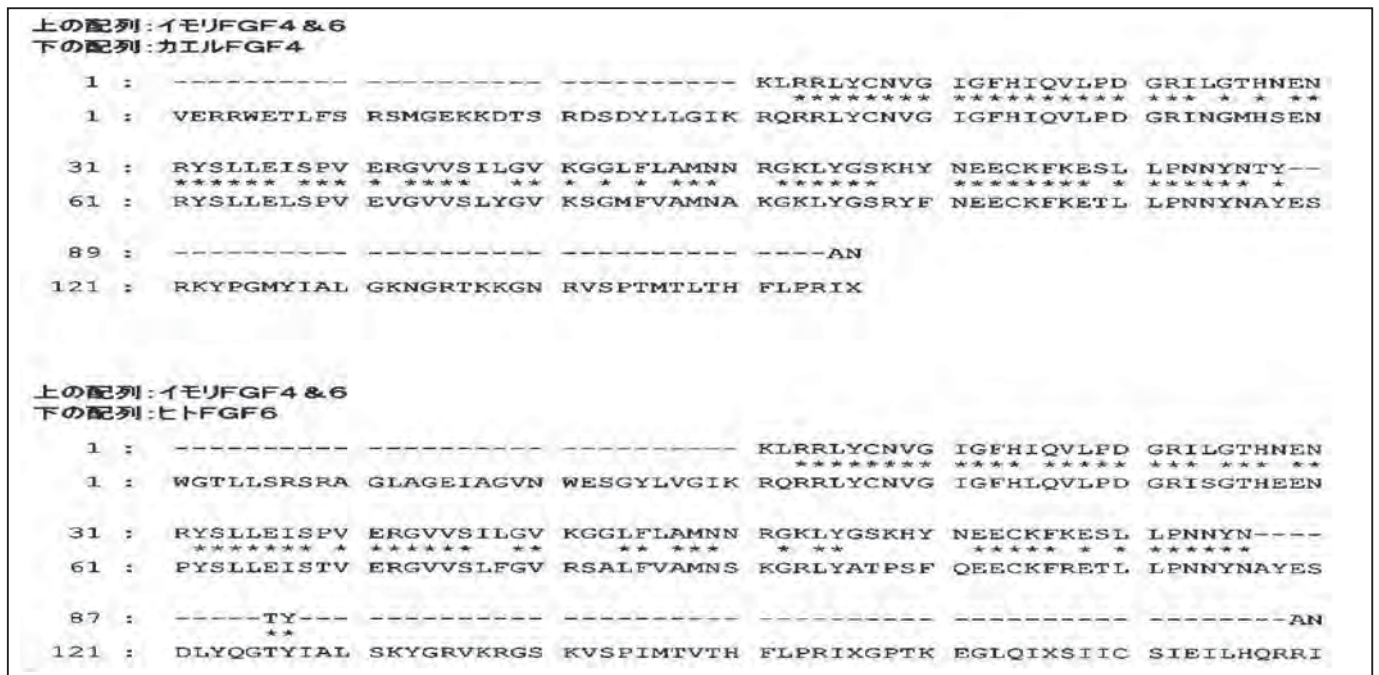


図 1; FGF4 および FGF6 と相同性をもつイモリ FGF 断片の相同性。

RT-PCR により得られたイモリ DNA 断片をカエル FGF4 (前半部分のアライメント) およびヒト FGF6 (後半部分のアライメント) と比較している。同じアミノ酸の場合は * であらわしている。イモリ FGF は FGF4 および FGF6 のどちらにも相同性が高いことがわかる。

また, 再生肢の cDNA ライブラリーの作成は以前の論文に詳しく書かれている (Miyazaki, Uchiyama, Imokawa and Yoshizato, 1996). 遺伝子のスクリーニングは Molecular cloning に従って, 再生中イモリ cDNA ライブラリーより, 前述のプローブを用いて遺伝子の単離を行った (Sambrook, Fritsch, and

Maniatis, 1989).

4. 遺伝子塩基配列解析

TA クローニングによりクローニングされた各遺伝子の塩基配列および cDNA ライブラリーより得られた遺伝子は, DNA シークエンサー CEQ8800 (ベッ

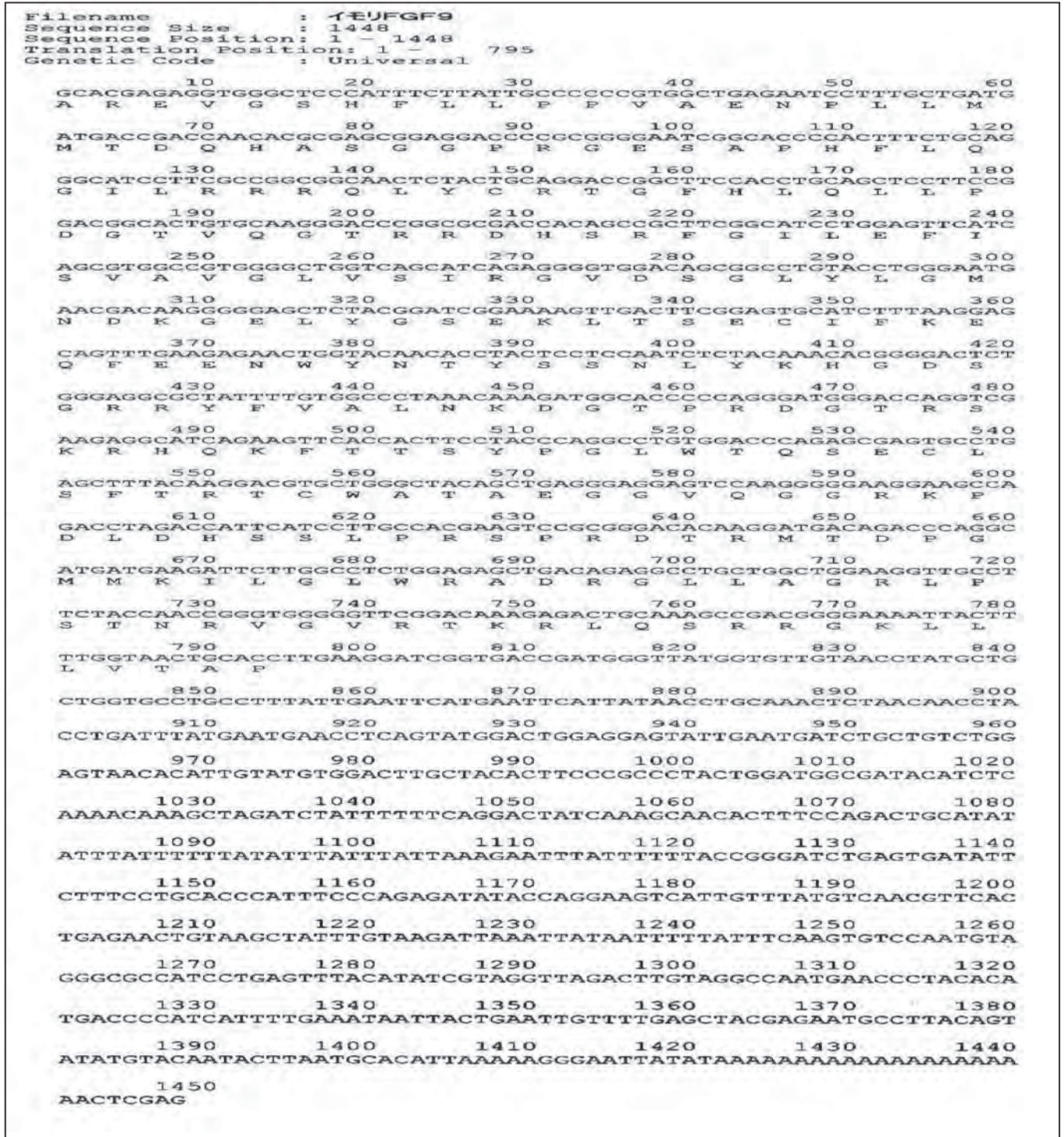


図 2; クローニングしたイモリ FGF9 遺伝子の塩基配列と推定アミノ酸配列. 塩基配列の下にあるアルファベットは推定されるアミノ酸を一文字表記で表している.

クマンコルター)を用いて塩基配列を解析した。さらに、得られた塩基配列はインターネットによるホモロジー検索にかけて、遺伝子の種類を推定した。

結 果

ゼノパス(カエルの一種)、ニワトリ、マウスなど他種脊椎動物のFGF4の塩基配列より推測し、独自にデザインしたdegenerateプライマーを用いてreverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR)を行ったところ、FGF4およびFGF6のどちらとも相同性をもつ約200塩基対のDNA断片が得られた(図1)。この遺伝子をプローブとして用い、イモリ再生肢cDNAライブラリーから転写開始領域から転写終了部位であるポリA部位までを含む全長のFGF遺伝子のクローニングを試みた。その結果、図2に示すようなFGF遺伝子が得られた。この遺伝子の遺伝子データベースホモロジー検索を行った結果、この遺伝子は、マウスやゼノパスなど他の脊椎動物のFGF9と75%以上という非常に高い相同性を示したことから、イモリFGF9であると判断される。このイモリFGF9遺伝子は、まだ5'領域が欠如しているが、長さは1.5kbであり、翻訳領域は750bpの長さであった。また、265個以上のアミノ酸残基をもつタンパク質に翻訳されると推測された。

考 察・結 論

近年、世界中の研究者が協力し実施したヒトゲノムプロジェクトも終了し、ヒトの全ゲノム配列さえも現在明らかにされている。しかしながら、同じ脊椎動物であるイモリはそのゲノムサイズがヒトの10倍以上ということもあり、分子生物学的解析が依然遅れている。しかし、脊椎動物で手足(四肢)や眼球内の水晶体を再生できる脊椎動物はイモリ一種だけであり、その再生メカニズムの解明することは再生医療に多大な貢献をもたらすことは間違いない。そのためにも、多くのイモリの遺伝子を単離し、その機能をひとつずつ解明していくことも、イモリの再生現象の解明につながるものであり、重要であると考えられている。今回単離されたイモリFGF遺伝子は、結果のところ述べてのように、遺伝子データベースのホモロジー検索の結果、他のFGF遺伝子の中でもFGF9遺伝子に最も高い相同性を示し、マウスやゼノパスなど他の脊椎

動物のFGF9とは75%以上という最も高い相同性を示すことから、イモリFGF9であると同定される。今回、このように単離・同定したイモリFGF9は他の脊椎動物ではグリア細胞など神経系細胞に発現していることがわかっている分子である。実は、イモリの四肢再生には神経の有無により再生能力の是非が決まるということが明らかであり、神経分泌因子などが四肢再生に重要な働きをしていることもわかっている(吉里ら, 1996; Stocum, 2006; Carlson, 2007)。さらに、過去の論文においても、各FGF分子が再生過程に重要な働きをしている結果も得られている(Stocum, 1995; Tsonis, 1996)。今回私により単離・同定されたイモリのFGF9遺伝子はこれまで他の研究室では単離・同定されておらず、新たにイモリのFGF9遺伝子を単離・同定したということは今後の再生研究に重要であろう。今後は、この分子を使用して、in situ hybridization法や抗体を持ちいた発現様式を明らかにした上、RNAi法などを用いた遺伝子の発現抑制実験などで再生過程におけるFGF9の機能と四肢再生との詳細な関係を明らかにしていきたい。この研究は、ヒトの熱傷などの治療方法開発にも役立つものと思われる。

文 献

- Carlson, B.M. (2007). *Principles of regenerative biology*. London: Elsevier.
- Cash, D. E. Gate, P Imokawa, Y. and Brockes, J. P. (1998). Identification of Newt Connective Tissue Growth Factor as a Target of Retinoid Regulation in Limb Blastema Cells. *Gene* 222, 119-124.
- Imokawa, Y. and Eguchi, G. (1992). Expression and Distribution of Regeneration-Responsive Molecule during Normal Development of the Newt, *Cynops Pyrrhogaster*. *International Journal of Developmental Biology*, 36, 407-412.
- Imokawa, Y. and Yoshizato, K. (1997). Expression of Sonic Hedgehog Gene in Newt Regenerating Limb Blastemas Recapitulates That in Developing Limb Buds *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 9159-9164.
- Miyazaki, K. Uchiyama, K. Imokawa, Y.

- & Yoshizato, K. (1996), Cloning and Characterization of cDNAs for Matrix Metalloproteinases of Regenerating Newt Limbs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6819-6824.
- 村松正実編. (1988). *ラボマニュアル遺伝子工学*. 東京. 丸善.
- 村松正実, 岡山博人編. (1991). *実験医学 遺伝子工学ハンドブック*. 東京. 羊土社.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning 2nd ed.* Cold Spring Harbor Laboratory.
- Stocum, D.L. (1995). *Wound repair, regeneration and artificial tissues*. New York: Springer-Verlag.
- Stocum, D.L. (2006). *Regenerative biology and medicine*. London: Elsevier.
- Tsonis, P.A. (1996). *Limb regeneration*. New York: Cambridge.
- 吉里勝利編. (1996). *再生-甦るしくみ*, 東京, 羊土社.

受付 2009. 5. 25

採用 2009. 10. 29