

プラナリアの再生における MAPK シグナル経路の
機能解析

細田 和孝

目次

略語集.....	4
要旨.....	5
序説.....	6
～第一章～.....	17
結果.....	21
MEK ホモログ・Raf ホモログの探索.....	21
Raf ホモログ・MEK ホモログの遺伝子発現解析.....	23
Raf ホモログ・MEK ホモログの機能解析.....	24
<i>DjrafA</i> , <i>DjmekA</i> は ERK 下流の遺伝子の発現に必要である.....	28
<i>DjrafA</i> , <i>DjmekA</i> は ERK の活性化に関与している.....	30
<i>DjrafB</i> , <i>DjmekB</i> の機能阻害実験について.....	32
考察.....	33
DjRafA/ DjMEK-A/ ERK シグナルカスケードが、ネオブラストの分化およびそれに伴う再生時の組織形成に必要である.....	33
DjRafA と DjRafB の kinase ドメインについて.....	34
DjMEK-A と DjMEK-B の kinase ドメインについて.....	35
～第二章～.....	38
序論.....	39
結果.....	42
プラナリアは断片の大きさによらず、一定のプロポーシオンを保って再生する....	42
A-P トランスクリプトーム解析によって同定した遺伝子の二次スクリーニング....	44
再生時のパターン形成に関与する遺伝子 <i>Djmek1</i> の同定.....	46
<i>Djmek1</i> は再生時の咽頭前部形成に関与する.....	49
<i>Djmek1</i> は ERK の活性化に関与している.....	53
<i>Djmek1</i> の機能阻害は異所的な β -catenin シグナル活性を引き起こす.....	55
β -catenin シグナルの増強は <i>Djmek1</i> 機能阻害の表現型を亢進する.....	57

<i>Djmekk1</i> の機能阻害により、胴部断片の咽頭前部領域に異所的な咽頭が形成される	59
考察	60
プラナリアのスケーリングについて	60
<i>Djmekk1</i> の機能について	60
DjMEKK1 はどういった因子を制御しているのか	63
<i>Djmekk1</i> (<i>RNAi</i>)の表現型から推察できる前方化のシグナルについて	64
実験材料と方法	67
参考文献	79
謝辞	90

略語集

化合物・遺伝子・タンパク質

APC	Adenomatous polyposis coli
BrdU	5-bromo-2'-deoxy-uridine
ERK	extracellular signal-relating kinase
FGF	Fibroblast growth factor
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
FoxA	Forkhead box protein A
JNK	c-Jun N-terminal kinase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAP2K	mitogen-activated protein kinase kinase
MAP3K	mitogen-activated protein kinase kinase kinase
MEK	MAPK/ERK kinase
MEKK1	MAPK/ERK kinase kinase 1
<i>mkp</i>	<i>mitogen-activated protein kinase phosphatase</i>
<i>ndk</i>	<i>nou-darake</i>
<i>ndl-2</i>	<i>nou-darake like 2</i>
<i>piwi</i>	<i>P-element induced wimpy testis</i>
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma

領域

H	Head region (頭部領域)
Pr	Prepharyngeal region (咽頭前部領域)
Ph	Pharyngeal region (咽頭部領域)
T	Tail region (尾部領域)

手法等

EST	expressed sequence tag
RNAi	RNA interference
qRT-PCR	quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

要旨

プラナリアは高い再生能力を有し、体のどこで切っても完全な個体を再生することができる。プラナリアの再生過程において、体細胞性の分化多能性幹細胞であるネオブラストが傷害に応じて分化し、失われた組織を再生する。特にプラナリアの一種ナミウズムシ (*Dugesia japonica*)を用いた研究で、extracellular-signaling related kinase (ERK)の活性がネオブラストの分化を誘導することが明らかにされていたが、ERKの上流の因子に関しては不明瞭なままであった。そこで、多細胞動物で広く保存されたERKの上流の因子であるMEK1/2, Rafファミリーの因子を研究室の保持する expressed sequence tag (EST)ライブラリより探索し、得られた候補遺伝子の系統解析および機能阻害実験を行ったところ、再生に必要なMEK1/2ホモログ遺伝子、Rafホモログ遺伝子が見つかった。この遺伝子の詳しい機能解析により、同定したMEK1/2ホモログ遺伝子、Rafホモログ遺伝子はERKのリン酸化に必要であり、またERK下流の遺伝子の発現を誘導するのに必要な遺伝子であることが分かり、両遺伝子がERKの上流で働く可能性が示唆された。

また本研究では、上記とは別に、プラナリアの再生時におけるプロポーシオン形成について解析を行った。放射相称動物や左右相称動物では、個体の大きさにあわせて体の各部のプロポーシオンを保つような現象が観察されることがあり、これはスケーリングと呼ばれる。プラナリアの尾部断片からの再生過程において、再生頭部および咽頭形成位置の定量的な解析を行ったところ、プラナリアはプロポーシオンを保って再生していることが明らかになった。適切なプロポーシオン形成には秩序だった体の領域性を構築することが必要になる。本研究では、中間領域に位置する咽頭前部領域形成に関わる遺伝子として、MAPK/ERK kinase kinase 1 (*Djmek1*)を同定した。*Djmek1*の機能解析により、*Djmek1*はERKシグナルの活性化を促し、また一方で β -cateninの活性を抑制することで咽頭前部領域の形成、ひいては正常なプロポーシオン形成に寄与していることが示唆された。

序説

・再生について

動物は外敵からの攻撃や不慮の事故、また病原体による組織破壊などにより、組織・器官が欠損したり、損傷を受けたりする。そのため、程度の差はあれ、動物は傷ついた体を元通りに再生する機能を持っている。

再生の研究の歴史は古く、その学術的な記載は 18 世紀初頭から確認することができる。1712 年には René-Antoine Ferchault de Réaumur がザリガニの脚の再生過程について詳細なスケッチと共にその観察結果を報告している (Réaumur, 1712)。その後様々な動物種について再生現象が観察され、ヒドラやプラナリアや有尾両生類などの再生能力の高い動物の再生現象についても 18 世紀に文献として残されている (Trembley, 1744; Shaw, 1791; Spallanzani, 1768)。プラナリアの再生については 20 世紀初頭に入ってから Morgan や Child といった研究者がよりその詳しい再生過程の様子を記しており (Morgan, 1898; Morgan, 1900; Child, 1906)、それらの観察から再生のメカニズムについての考察を行っている。

・プラナリアについて

本研究で扱っているナミウズムシ(*Dugesia japonica*)は淡水生のプラナリアで、扁形動物門(Platyhelminthes)、渦虫綱(Turbellaria)、ウズムシ目(三岐腸類、Tricladida)に分類される。プラナリアは呼吸器系や循環器系を欠き、単純な構造の排出器官である原腎管を持ち、口と肛門が分離していない、など他の動物と比較して原始的な左右相称の構造を持っているが、放射相称のクラゲなどの刺胞動物類と違い、中枢神経系を持つ(Agata, 1998)。そして、この中枢神経系の構造をみるとプラナリアの体には明確な極性が認められ、プラナリアは前後軸、背腹軸に沿って種々の器官が配置されている(図 0-1)。

・プラナリアの体の基本構造

プラナリアは前後軸に沿った明瞭な体の領域性を示し、前方から「頭部」、「咽頭前部」、「咽頭部」、「尾部」の大きく分けて四つの領域に分けられる(図 0-1 左; Kobayashi 1999; Agata, 2003)。頭部領域の背側には眼がついており、腹側には脳が観察される。プラナリアの体の中央には摂食および排泄を担う器官である咽頭が位置しており、この咽頭が存在する領域が咽頭部であり、また頭部と咽頭部の間の領域を咽頭前部領域としている。尾部領域は咽頭開口部より後方の領域を指している。頭部領域にある脳から一对の腹側神経索が後方に向かって伸びており、また腹側神経索は横連神経で繋がれ、プラナリアの全身の運動が制御されている(図 0-1 中央)。

プラナリアの多枝構造を持つ腸管が頭部を含む体の全領域に広がっており、最も太い腸管は咽頭の前端において三本に分岐し、一本は咽頭前部領域に伸び、その他二本は並行に咽頭部、尾部領域に向かって伸びている(図 0-1 左、右)。主枝の腸管より分枝した腸管はさらに枝別れすることで全身にはり巡らされ、腸管内で消化された食物の栄養分が体全体にいきわたるようになっている(図 0-1 右; Forsthoefel et al., 2011)。

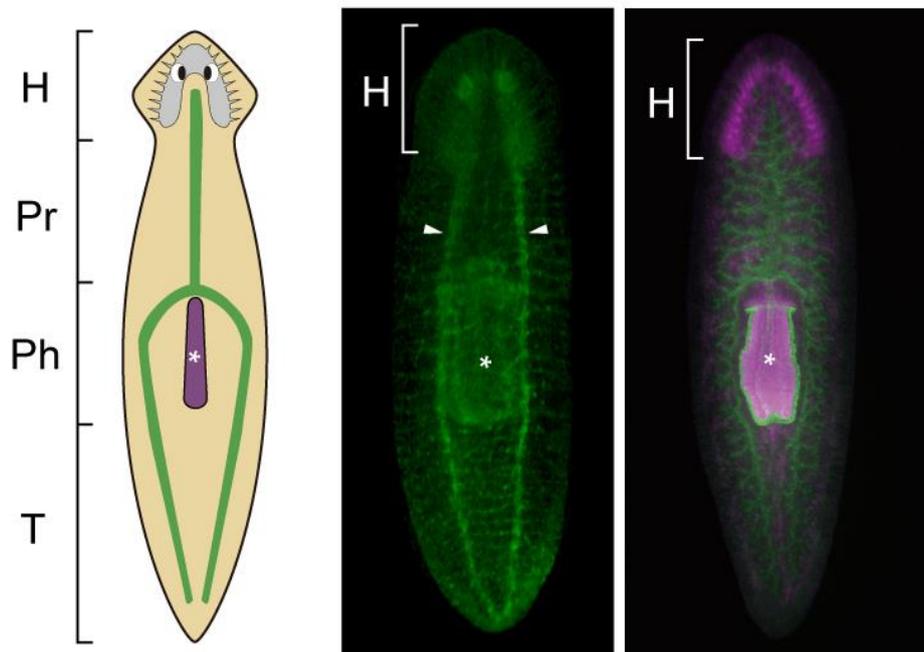


図 0-1 プラナリアの体の基本構造

(左) プラナリアは前方から頭部(H)、咽頭前部(Pr)、咽頭部(Ph)、尾部(T)の大きく分けて4つの領域に分けられる。頭部には脳(灰色)と眼が観察され、咽頭部には咽頭(紫)が観察される。主枝の腸管(緑)は咽頭の先端で3本に分岐し、三岐腸類の名前の由来になっている。ここでは主腸管のみを緑で図示してある。実際には主腸管から幾重にも腸管は枝分かれしている。(右の図参照)

(中央) 抗 Cytochrom b561 抗体(緑)で染色したプラナリア。抗 Cytochrom b561 抗体により、頭部領域にある脳から2本の腹側神経索が尾部に向かって伸びており(矢じり)、腹側神経索と垂直に多数の横連神経が等間隔に伸びている。

(右) 抗 β -CateninA 抗体(緑)および Hoechst33342(マゼンタ)で染色したプラナリア。抗 β -CateninA 抗体によって全身にはり巡らされた腸管が観察できる。また、Hoechst33342によって全身の細胞の核が染色されているが、特に核密度の高い器官である脳、咽頭が識別できる。上側が前方である。
咽頭をアスタリスクで示した。

・プラナリアの再生研究

プラナリアは非常に高い再生能力を示し、切断された小断片から完全な個体を再生することができる(Agata & Watanabe, 1999)。切断される場所や大きさによらず、切断された箇所に応じて、損なわれた器官・組織を再形成し、完全な一個体を再生する(Agata, 2003)。

プラナリアを切断すると、まず切断面の傷口が表皮によってふさがり、その後、傷口に再生芽が形成される(図 0-2 B)。特に再生芽辺縁部に位置する組織など(頭部や尾部など)は再生芽由来で再生が起こる(図 0-2 B)が、再生中に既存の体組織も変化しており、断片の体組織リモデリングを経て中間領域に位置する組織や器官が再生する様子が観察される(図 0-2 C)。

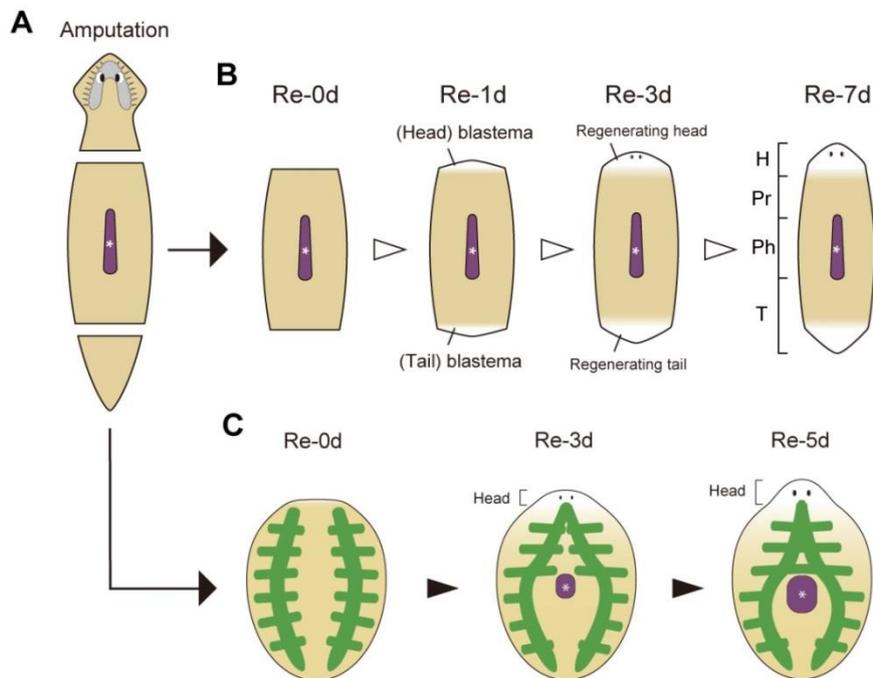


図 0-2 プラナリアの再生過程

プラナリアの再生を模式図で示した。A. プラナリアを咽頭の前後 2 か所で切断した様子。B. 胴部断片の再生過程。切断してから 1 日後には両切断面で再生芽(blastema)が形成される。再生が進行し、7 日以内に完全な形の個体が再生する。C. 尾部断片の頭部再生過程。尾部断片では、頭部再生芽形成を経て頭部の再生が起こるが、断片の中央に咽頭(紫)が形成され、再生が進行するにつれ腸管(緑)のパターンが再構築され咽頭前部が形成される。図は全て、上側が前方である。咽頭をアスタリスクで示した。

・プラナリアの再生と新生細胞(ネオブラスト)

一定の強度以上の X 線を照射されたプラナリアの断片は再生不全を起こす(Wolff and Dubious, 1948)。しかし、X 線を照射したプラナリアに、X 線を照射していない正常なプラナリアの組織片を移植すると再生能が回復することから(Wolff and Dubious, 1948)、プラナリアの体には組織を構成する細胞に分化するための未分化な新生細胞(ネオブラスト)が存在することが古くから示唆されていた。その後の電子顕微鏡による観察や解離細胞の観察、移植実験などによって、ネオブラストがプラナリアの体を構成する細胞の 20-25%を占めていること、ネオブラストが再生時に必要な細胞に分化することで再生が実行されることが示唆された(Baguña, 1976; Baguña and Romero, 1981; Baguña et al., 1989)。

ネオブラストは直径 5-10 μ m ほどの大きさ(Pedersen, 1959; Morita and Best, 1984)で、細胞質に対して核の割合が大きな細胞であり(Hay and Coward, 1975)、間充織領域に散在している(Orii et al., 2005)。また電子顕微鏡を用いた観察により、細胞質にはリボ核タンパク質(RNP)顆粒であるクロマトイド小体を持つといった特徴が報告されている(Pedersen, 1959; Auladell et al., 1993; Yoshida-Kashikawa et al., 2007; Rouhana et al., 2010)。ネオブラストは高い X 線感受性を示し、ある一定以上の X 線を照射することで、体全体のネオブラストが死滅し、プラナリアの再生能力は失われる。プラナリアにおいてネオブラストは増殖能・分化多能性(pluripotency)を持つ唯一の細胞であると考えられており(Morita and Best, 1984)、実際に X 線照射した個体に、X 線非照射個体の断片を移植する実験により、ネオブラストが表皮細胞・神経細胞・筋細胞・分泌細胞へと分化することが示された(Baguña et al., 1989)。また、近年になって X 線感受性の細胞の FACS(Fluorescence-Activated Cell Sorting)を用いた精製法が確立され(Hayashi et al., 2006; Higuchi et al., 2007; Hayashi et al., 2010)、X 線を照射した個体へ単一のネオブラストを移植することにより、単一細胞のネオブラストがプラナリアの体を構成するあらゆる細胞に分化できることで、再生能が回復することが示され、ネオブラストの分化多能性が単一細胞レベルで証明された(Wagner

et al., 2011)。

また、細胞レベルの解析のみならず、*in situ* hybridization 法(Umesono et al., 1997)、免疫染色法の開発(Agata et al., 1998)、RNA 干渉法(RNAi)の確立(Sanchez Alvarado and Newmark, 1999)、などにより分子レベルでの解析も可能になった。、ネオブラスト特異的に発現する遺伝子として、他の生物の生殖細胞や全能性細胞で特異的に発現する *vasa*, *piwi*, *bruno*, *sox* などの相同遺伝子が同定された(Shibata et al., 1999; Reddien et al., 2005; Guo et al., 2006; Hayashi et al., 2010; Önal et al., 2012)。Newmark と Sánchez Alvarado により、プラナリアにも BrdU を用いた細胞の取り込み実験が可能となり(Newmark and Sanchez Alvarado, 2000)、プラナリア内で増殖期の細胞だけを特異的に検出し、その細胞運命を追跡することも可能になった。

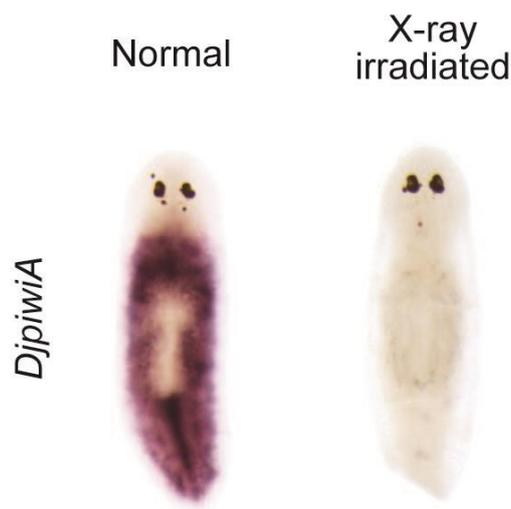


図 0-3 ネオブラスト細胞の分布と X-線感受性

ネオブラストで特異的に発現する *DjpiwiA* を *in situ* hybridization で検出した。*DjpiwiA* の遺伝子発現が全身で検出され、ネオブラストが全身で分布しているのが分かる(Normal)。一方、X-線を照射した個体では *DjpiwiA* の発現が完全に消失しており、ネオブラストが X-線照射により死滅したことを示している(X-ray irradiated)。

・ネオブラストの分化について

再生時の組織形成のみならず、組織の恒常的な細胞の入れ替えも、幹細胞であるネオブラストの分化を介することで起こっている。近年、ネオブラストが分化するためには、**extracellular signal-relating kinase(ERK)**タンパク質のリン酸化が不可欠であることが強く示唆された(Tasaki et al., 2011b)。ERKは動物に広く保存されたタンパク質で、細胞内シグナル伝達分子の一つとして、細胞増殖や分化など様々な生理現象に関与しており、リン酸化されることで活性化され、下流の遺伝子の発現を誘導することが広く知られている(Chang et al., 2003; Li et al., 2006)。Tasakiらは、ERKのリン酸化を阻害する化学物質であるU0126処理実験によって、ERK活性が再生芽形成に必要であることを示し、またネオブラストの分化を駆動する必須シグナル分子であることを明らかにした(Tasaki et al., 2011b)。またTasakiらは、ERK下流で発現するMAP kinase phosphatase (MKP)相同遺伝子(*DjmkpA*)を同定し、この*DjmkpA*がERK活性を負に制御することで、ERKの活性を調節していることを示唆した(Tasaki et al., 2011b)。

・体の位置を決めるシステムについて(ディスタリゼーションとインターカレーション)。

プラナリアの再生現象を説明するモデルとして、ディスタリゼーションとインターカレーションを組み合わせたモデルが提唱されている(Agata et al., 2003, 2007)。プラナリアを前後軸に対して直交方向に切断すると、両断面において1日以内に再生芽が形成される(図0-4)。このとき前方・後方の位置関係において頭部再生芽と尾部再生芽に運命づけられ(ディスタリゼーション)、断片の前後軸極性が形成される。次に両再生芽に挟まれた中間領域の「番地」の振り分けがなされ(インターカレーション)、体全体のおおまかな領域構造が決定する(図0-4)。実際にプラナリアの断片を体の部位ごとに移植した実験により、移植片と移植された場所における空白の領域を埋めるような組織形成が起こることから、このモデルが実験的に証明されている(Kobayashi et al., 1999)。

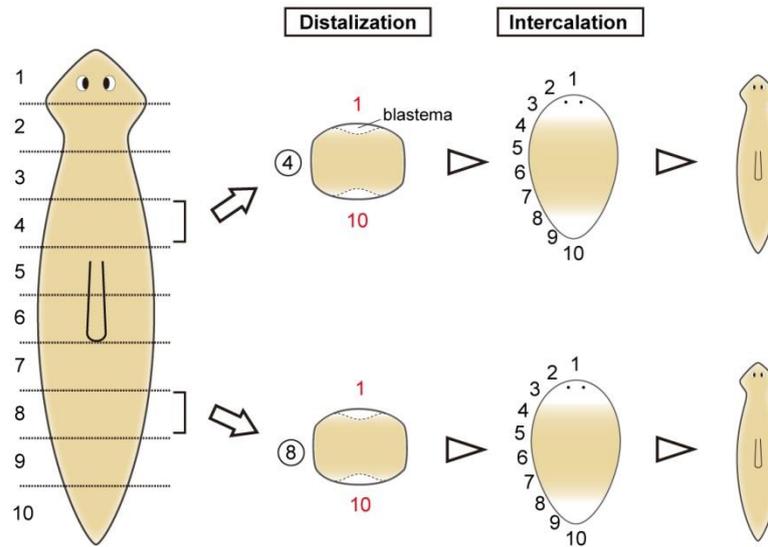


図 0-4 再生におけるディスタリゼーションとインターカレーション

切断断片はまず、前方の再生芽を頭部に、後方の再生芽を尾部に運命づける(ディスタリゼーション)。その後、前部・後部再生芽にはさまれた領域の位置情報がふりなおされ(インターカレーション)、正常な体のパターンが再構築される。

・頭部と尾部領域を作るシグナル経路

プラナリアの位置情報を担う遺伝子として2002年にはじめて *nou-darake(ndk)* 遺伝子が同定された(Cebrià et al., 2002)。*ndk* 遺伝子は頭部領域に発現する遺伝子で、RNAiにより機能阻害することで過剰な脳が形成され、頭部領域の拡大が観察される。多種の多細胞動物のパターン形成や有尾両生類の再生にも重要な役割を果たす、Fibroblast growth factor(FGF)シグナル経路に属するリガンドタンパク質(FGF)と結合する受容体(FGFR)と同様の細胞外ドメインが、NDKタンパク質にも存在しているが、NDKは細胞内のkinaseドメインを欠損しており、FGFシグナルを伝達せず、FGFシグナルの活性範囲を狭める効果を持つことが予想された(Agata and Umesono, 2008)。実際に、プラナリアの *fgfr* 遺伝子(Ogawa et al. 1998, 2002)を *ndk* 遺伝子と同時に機能阻害すると、*ndk* 遺伝子機能阻害による表現型が回復しており(Cebrià et al., 2002)、FGFシグナルが頭部形成に関与している

ことが示唆されている。

頭部再生芽の運命を FGF シグナルが決定づけていることが示唆された一方、尾部再生芽に関しては、動物で広く保存されている Wnt/ β -catenin シグナルが関与していることが明らかになっている。プラナリアの β -catenin は 2 種類あり、一つは腸管の上皮細胞で特に強い発現のみられる β -cateninA 遺伝子で(Kobayashi et al., 2007)、これは細胞膜に局在しているカドヘリンなどの接着分子の裏打ちタンパク質として機能していると考えられ、この β -cateninA の抗体は腸管を特異的に染色できる(図 0-1)。もう一つは β -cateninB 遺伝子で、この β -cateninB 遺伝子が Wnt シグナルの下流で再生時の前後軸極性に機能していると考えられている。プラナリアにおいて β -cateninB 遺伝子または分泌性の Wnt1 相同遺伝子を機能阻害すると、尾部再生芽の運命転換が生じ、断片の両側から頭が再生することが観察されている(図 0-5; Gurley et al., 2008; Petersen et al., 2008; Iglesias, 2008; Petersen et al., 2009; Hayashi et al., 2011)。Wnt/ β -catenin シグナル経路では、 β -catenin に阻害的に働く Axin や APC などが知られているが、これらの遺伝子を阻害することにより、頭部再生芽から尾部が形成することからも、Wnt/ β -catenin シグナル経路が尾部再生芽の運命を決定づけているものと考えられている(Petersen et al., 2008; Iglesias, 2011; Reuter et al., 2015)。プラナリアの *wnt1* 遺伝子は Wnt1/ β -catenin シグナル経路により、後方で発現する他の多数の *wnt* 遺伝子の発現を誘導することが知られており(Petersen et al., 2009; Gurley et al., 2010; Hayashi et al., 2011; Sureda-Gómez et al., 2015)、後方化のための Wnt/ β -catenin シグナル経路を駆動するマスター遺伝子であると考えられている。Wnt/ β -catenin シグナルに加え、Hh シグナル経路も極性形成に関与していることが知られている(Yazawa et al., 2009; Rink et al., 2009)。Hh に関しては、腹側神経索に沿って前方から後方へ Hh タンパク質が運搬され、後方の再生芽で Hh シグナルが *wnt1* 遺伝子を特異的に活性化することで後方の極性が決定づけられるモデルが提唱されている(Yazawa et al., 2009)。

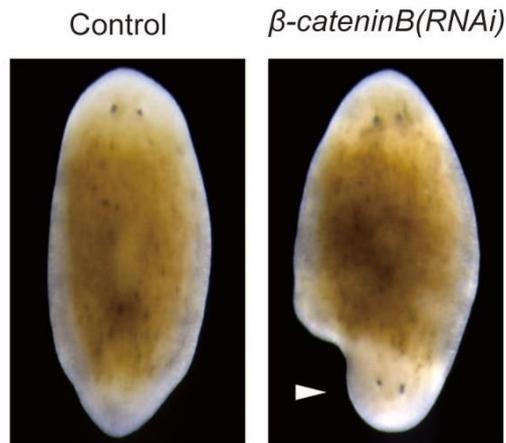


図 0-5 *β-cateninB* 遺伝子は後方の極性形成に必要である

再生 8 日目の胴部断片。 *β-cateninB* を RNAi した個体では、本来の再生尾部が頭部に運命転換するために、断片の後方から頭部が再生し(矢じり)、双頭のプラナリアが生じる。

・再生体の咽頭領域はどのように決定されているのか？

極性形成に関与する遺伝子やシグナル経路の報告が近年相次いで行われたのに対し、頭部と尾部の間にある中間領域の咽頭前部領域や咽頭部の形成に関与する遺伝子やシグナルについてはほとんど報告がなされていない。今までに、咽頭部周囲には *FoxA* という転写因子が発現することが報告されており (Koinuma et al., 2000)、また機能阻害の実験から *FoxA* が咽頭部の形成に必要であることが示されている (Adler et al, 2014; Scimone et al., 2014)。また、2013 年に報告された Umesono らの文献の中で咽頭領域の形成に関する重要な仮説が提唱されている。その文献では先の節で述べた分化に関与する ERK が、体の領域に沿って前方から後方に向かうに従って減衰する活性勾配を持っていることが示されている (図 0-6; Umesono et al., 2013)。さらに、*ndk* 遺伝子の有無がこの ERK の活性範囲に影響を及ぼすことが示唆され、FGF/ERK シグナル経路の活性勾配が前方領域の形成に関与していることが示唆された。また反対に後方の極性形成に関与する *β-catenin* シグナルが後端から前方に向かって減衰する活性勾配を持っていることも示唆された。ERK、*β-catenin* の両シグ

ナルがそれぞれ *DjFoxA* の発現を制御していることも明らかにされ、逆の活性勾配をもつ FGF/ERK シグナルと Wnt/ β -catenin シグナルのせめぎ合い(インターカレーション)によって前後軸に沿った体の領域が決定されているという分子モデルが、再生体の中間領域形成を説明する有力な説として提唱されている(図 0-6; Umesono et al., 2013)。このように、頭部・尾部・咽頭領域の形成に関与するシグナルシステムについての知見は増えたものの、咽頭前部領域がどのようにして形成されるかは未解明であった。

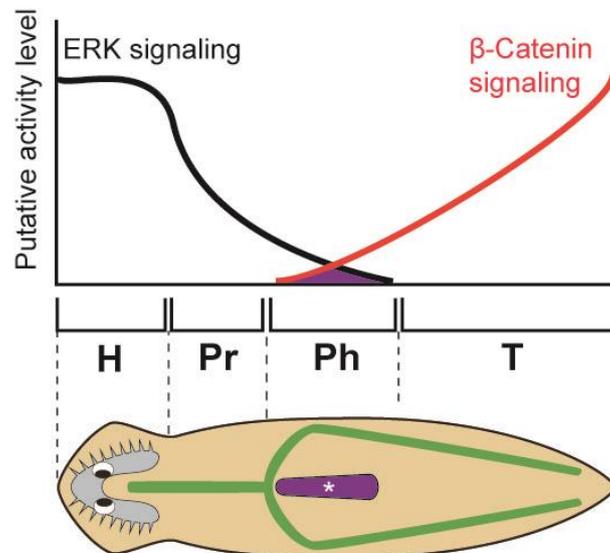


図 0-6 再生体の領域形成モデル

頭部を起点に形成される ERK シグナル活性勾配と、後端から形成される β -catenin シグナル活性勾配がせめぎ合い、再生体の頭部、咽頭前部、咽頭部、尾部の領域が決まる。

～第一章～

プラナリア再生における Raf および MEK 遺伝子の
機能解析

序論

・プラナリアにおける MAPK の働き

Mitogen-activated protein kinase (MAPK)は進化的に広く保存されたタンパク質で、MAPK シグナル経路は細胞分裂や分化、環境ストレス応答、細胞の遊走性など様々な細胞の生理活性に関与している(Nishida and Gotoh et al., 1993)。主要な MAPK シグナル経路としては、ERK シグナル経路、c-Jun N-terminal kinase (JNK)シグナル経路、p38 MAPK シグナル経路がよく知られており(Johnson et al., 2002)、どのシグナル経路においても、MAPK を活性化する MAPK kinase (MAP2K)、MAP2K を活性化する MAP kinase kinase (MAP3K)が存在するという特徴がある(Arthur and Ley, 2013) (図 1-1)。

プラナリアにおいては、p38 MAPK シグナル経路は薬剤による阻害実験では再生に影響が生じず、再生やその他生理活性における役割などは不明である(Tasaki et al., 2011b)。一方、JNK シグナル経路はプラナリアの創傷治癒やネオブラストの細胞周期の進行に重要な役割を示すことが示されている(Tasaki et al., 2011a; Almuedo-Castillo et al., 2014)。JNK シグナルを阻害すると、断片の傷口が表皮でおおわれず、再生の初期のステップが進行できなくなり、再生不全となる。また JNK 阻害は細胞周期の進行も阻害し、分裂細胞の数が著しく低下する。他方では、JNK 活性が *wnt* 遺伝子の発現に必要であることも示唆されているが(Tejada-Romero et al., 2015)、その関連性についての詳細は不明である。

ERK シグナル経路は、序説でも触れたようにプラナリアの再生にとって重要な働きを持っている。ERK 活性はネオブラストの分化に必要であり、ERK 活性の阻害は再生不全を引き起こす(Tasaki et al., 2011b)。また、再生時には量依存的な ERK 活性が断片前方部の領域形成に関与していることが示唆されており(Umesono et al., 2013)、再生時のパターン形成にも重要な役割を果たしていると考えられる。

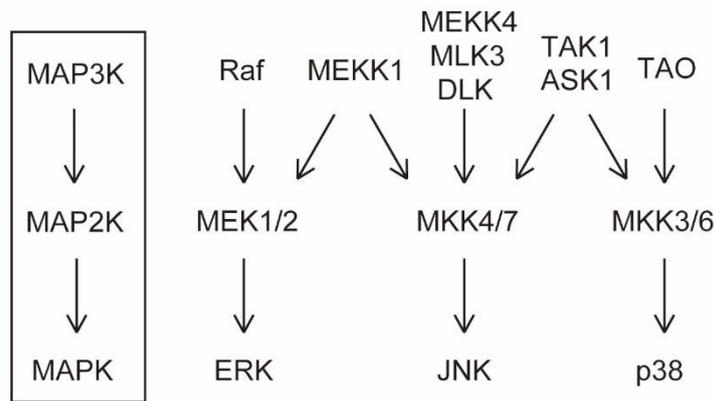


図 1-1 主要な MAPK シグナル経路

MAPK シグナル経路は階層性をもち、MAP3K、MAP2K、MAPK とシグナルが伝わる。

MAP3K の因子が活性化する下流のシグナル経路は複数にまたがっており、図に示した活性化の経路以外の因子も活性化する可能性がある。ただ、Raf、MEK1/2 の基質特異性は高く、Raf/MEK/ERK のシグナルカスケードは動物間で広く保存されている。

- ・ Raf, MEK は ERK の上流に位置する

動物に広く保存されている ERK はそのシグナル活性化システムも進化的に保存されている。Fibroblast growth factor (FGF) や Epidermis growth factor (EGF) といったリガンドが細胞膜上に存在するそれぞれの受容体に結合することで、下流の Ras のリン酸化を引き起こし、活性化した Ras が MAP3K ファミリーである Raf を活性化し、活性化した Raf が下流の MAP2K ファミリーである MAPK/ERK kinase (MEK) をリン酸化する (Dorey and Amaya, 2010)。リン酸化された MEK が ERK をリン酸化することで、リン酸化 ERK (pERK) が核内移行し、下流遺伝子の発現が誘導される。この Raf/MEK/ERK シグナルカスケードは多細胞動物で広く保存されていることが知られているが、プラナリアの Raf や MEK はこれまで同定されていなかった。また MEK 非依存的な ERK のリン酸化 (Aksamitiene et al., 2010; Simard et al., 2015) や、Raf 非依存的な MEK のリン酸化 (Wen-Sheng 2006; Bae and Ceryak, 2009; Marusiak et al., 2014) も他の動物種では知られており、FGF などを発端に

する Raf/MEK/ERK シグナルカスケードがプラナリアの再生に必要であるかどうか定かではないため、ERK の上流となる Raf や MEK を同定し、シグナルカスケードの一部を明らかにすることを試みた。

結果

MEK ホモログ・Raf ホモログの探索

阿形研究室が保有する EST ライブラリを用いて、MAPKK(MAP2K) family に属する遺伝子を探索したところ、C 末側に kinase ドメインを持つ 3 つの候補遺伝子が見つかった。

MAP2K family に属するタンパク質と 3 つの候補遺伝子がコードするタンパク質の kinase domain をアラインメントして系統解析を行うと、候補遺伝子は、MEK1/2 subfamily に属する 2 つの遺伝子(*DjmekA*, *DjmekB*)と、MKK4/7 subfamily に属する 1 つの遺伝子(*Djmkk4/7-A*)に分類できた(図 1-2A)。*Djmkk4/7-A* 遺伝子については、RNAi 法による機能阻害実験において目立った表現型が見られず、また本研究では ERK の上流候補である MEK のみに解析を絞るため、以後の解析より *Djmkk4/7-A* を除外することにした。

MEK のさらに上流の因子を明らかにするため、多細胞動物に広く保存されている MEK の上流の MAPKKK(MAP3K)として働く Raf ホモログの探索を行った。阿形研究室の保有する EST ライブラリを調べたところ、2 つの Raf 候補遺伝子が見つかった。系統解析を行ったところ、この 2 つの候補遺伝子は Raf subfamily に属するタンパク質をコードしていることが分かった(それぞれ *DjrafA*, *DjrafB* と命名, 図 1-2B)。

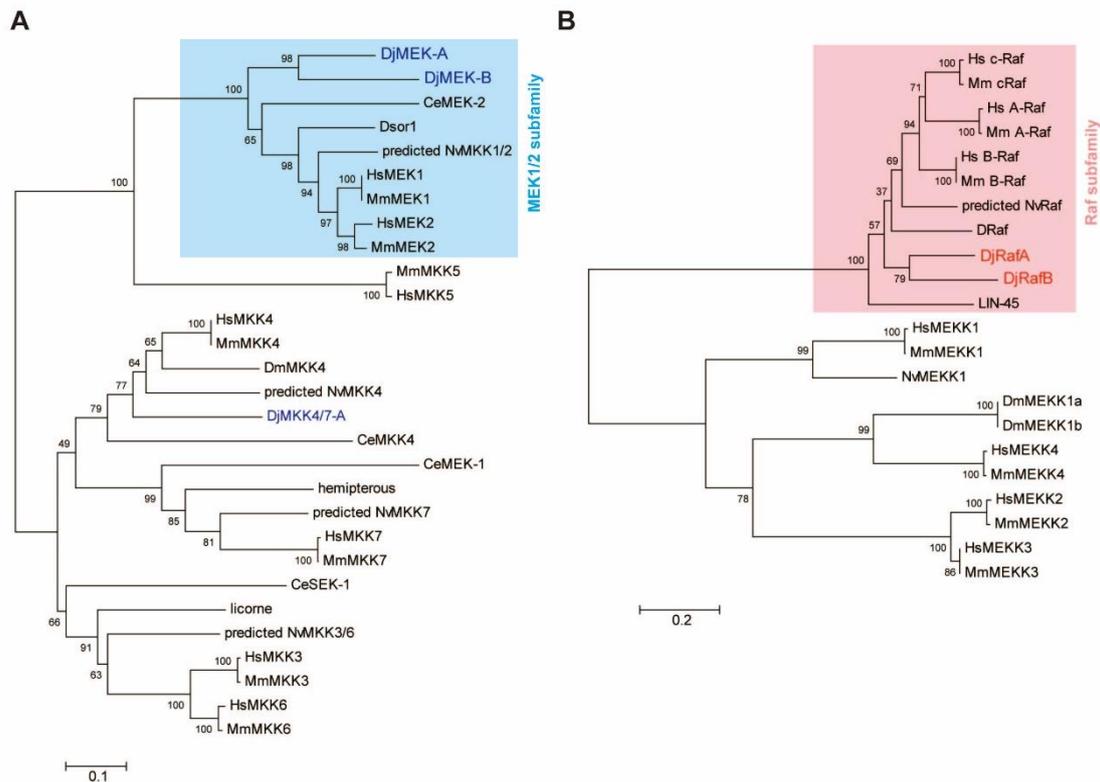


図 1-2 DjMEK-A, DjMEK-B, DjMKK4/7-A, DjRafA, DjRafB,の系統解析

(A) MAP2K ファミリーおよび(B) MAP3K ファミリーの系統解析結果。分子系統樹は MAP2K ファミリーのアミノ酸配列 (A) と MAP3K ファミリーのアミノ酸配列(B)の kinase ドメインをそれぞれマルチプルアラインメントし、MEGA version 6 の近隣結合法の JTT モデルより系統樹を作製した。Ser/Thr kinase ドメインのアミノ酸配列のマルチプルアラインメントには ClustalW を使い、また手動で確認を行った(Hanks and Quinn, 1991)。各ブランチの横の数字は 1000 回の演算からなるブートストラップ値が示してある。DjMEK-A、DjMEK-B、予想 NvRaf タンパク質は MEK1/2 サブファミリー((A)の青色のボックス)に属し、DjRafA、DjRafB、予想 NvRaf タンパク質はそれぞれ Raf サブファミリーのタクソン((B)のピンク色のボックス)に属している。Dsor1 は *D.melanogaster* の MEK1/2 ホモログで、hemipterous タンパク質と licorne タンパク質はそれぞれ *D.melanogaster* の MKK7 ホモログと MKK3 ホモログである。DRaf は *D.melanogaster* の Raf ホモログで、LIN-45 は *C.elegans* の Raf ホモログである。Ce は *Caenorhabditis elegans*、Dm は *Drosophila melanogaster*、Dj は *Dugesia japonica*、Hs は *Homo sapiens*、Nv は *Nematostella vectensis*、Mm は *Mus musculus* を表す。

Raf ホモログ・MEK ホモログの遺伝子発現解析

In situ hybridization 法を用いて、*DjrafA*, *DjrafB*, *DjmekA*, *DjmekB* についてそれぞれ、X線照射個体と非照射個体で発現解析を行った。するとそれぞれの遺伝子は類似の発現パターンを示し、体全体での発現および頭部で比較的強い発現が観察された(図 1-3 上方)。また、X線を照射することで尾部や咽頭前部の発現が消失することから、*DjrafA*, *DjrafB*, *DjmekA*, *DjmekB* がネオブラストでも発現していることが示唆された(図 1-3 下方)。

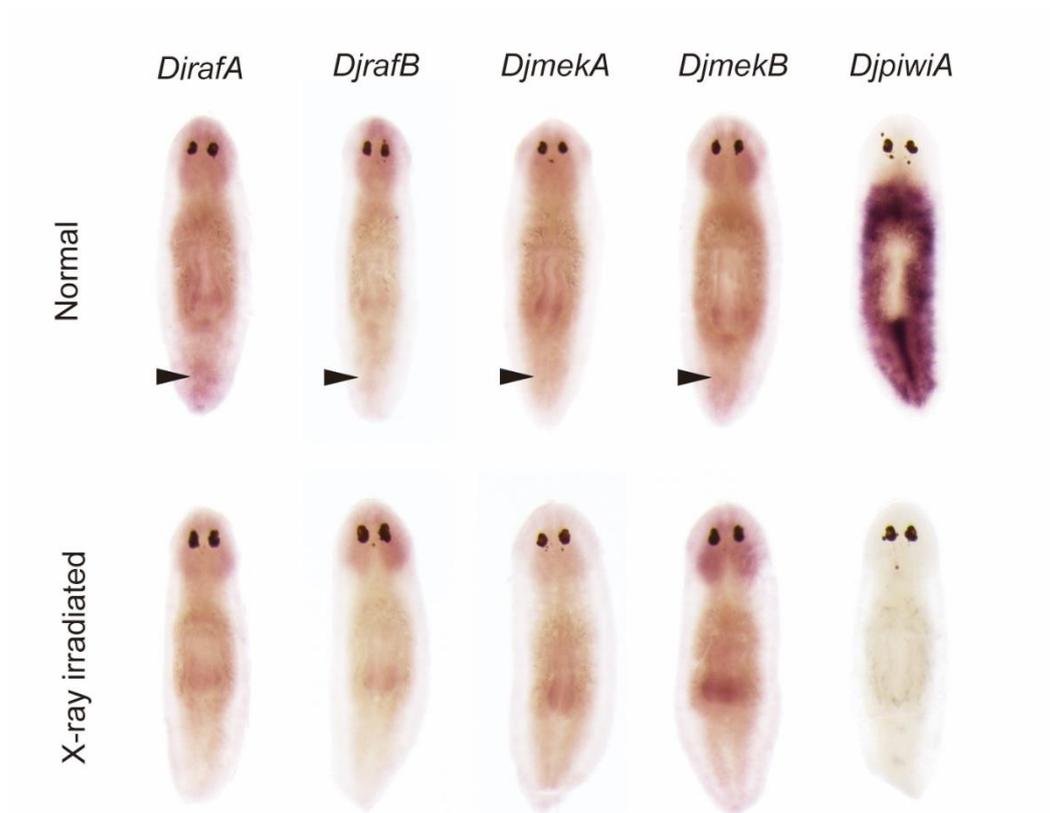


図 1-3 Raf ホモログ、MEK ホモログ遺伝子の発現解析

DjrafA, *DjrafB*, *DjmekA*, *DjmekB*, *DjpiwiA* の発現解析。上(Normal)は X線を照射していない正常な個体で、下(X-ray irradiated)は X線を照射してネオブラストを除去した個体である。*DjrafA*, *DjrafB*, *DjmekA*, *DjmekB* 共に体全体での発現と、頭部での強い発現が観察される。*DjrafA*, *DjrafB*, *DjmekA*, *DjmekB* において、特に尾部領域での線状の発現(Normal の矢じりで示した箇所)が X線照射個体で消失している。上側が前方である。

Raf ホモログ・MEK ホモログの機能解析

尾部断片の頭部再生過程において、ERKの活性が低下すると咽頭前部領域における腸管の融合が不全になる(Umesono et al., 2013)。プラナリアにカエルの血液とレバー溶液を混ぜたペレットを食べさせると腸管が褐色に色づき、明視野で生きたまま腸管を観察することが可能であるため(図 1-4 A, Hosoda et al., 2016)、この手法を用いて短期間のRNAiを行い、*DjrafA*, *DjrafB*, *DjmekA*, *DjmekB*の尾部断片からの頭部再生過程を観察し、腸管の融合について解析した。すると、*DjrafA*, *DjmekA*のRNAiについて腸管の融合が異常になる個体が生じ(図 1-4 B)、*DjrafA*, *DjmekA*がERKの活性化に関与していることが示唆された。

さらに、*DjrafA*, *DjrafB*, *DjmekA*, *DjmekB*のそれぞれの遺伝子についてRNAiによる機能阻害を行い、RNAi 個体の再生過程を観察したところ、*DjrafA(RNAi)*, *DjmekA(RNAi)* 個体において、頭部再生、尾部再生どちらについても再生不全を生じた(図 1-5, 図 1-6)。一方、*DjrafB(RNAi)*, *DjmekB(RNAi)* 個体では正常に再生し、目立った異常は見られなかった(図 1-5, 図 1-6)。

プラナリアのERKは創傷をトリガーとしてリン酸化が起こり、リン酸化によって活性化したERKがネオプラストの分化を誘導することで、失われた組織細胞が再生する(Tasaki et al., 2011b)。そのためERK活性が阻害されることにより、再生断片における組織形成不全が引き起こされる。*DjrafA(RNAi)*, *DjmekA(RNAi)* 個体はERK阻害と同様に、再生芽に起因する頭部再生、尾部再生の再生不全表現型を示しており(図 1-5, 図 1-6)、これより*DjrafA*, *DjmekA*がERKの活性化に関与している可能性が示唆された。

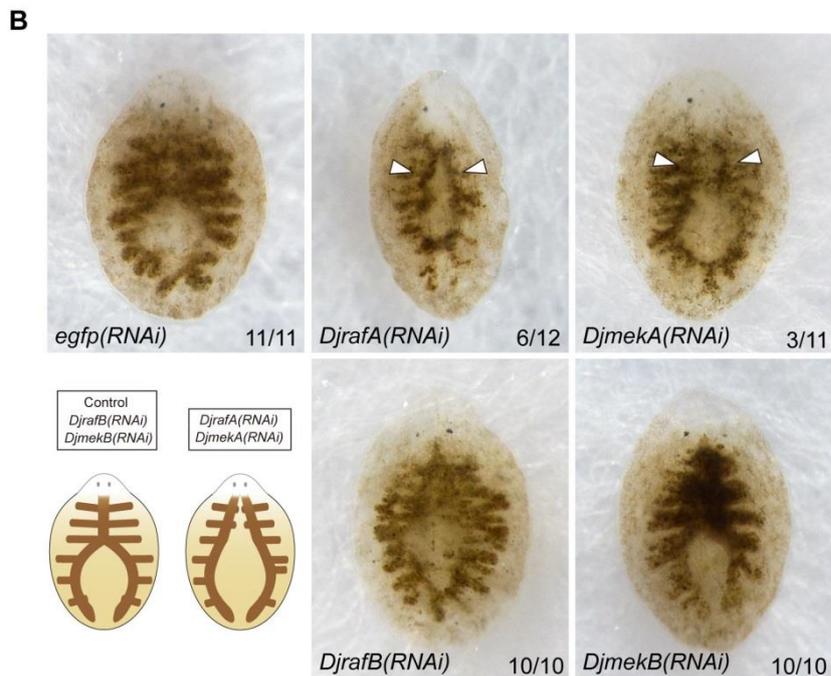
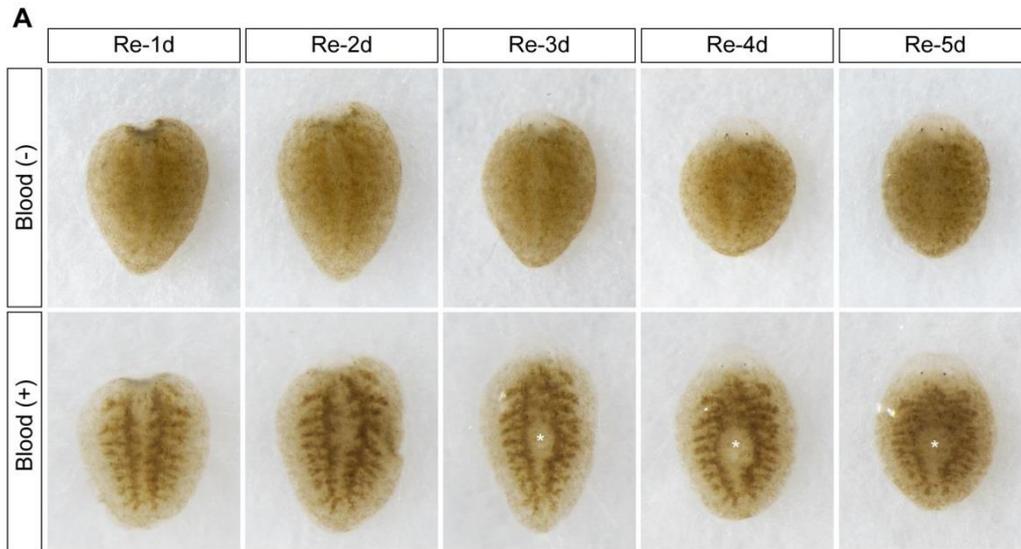


図 1-4 血液による腸管の可視化と、腸管の融合異常を示す個体の観察

A. 尾部断片からの頭部再生過程のライブイメージング。Blood(-)と Blood(+)についてそれぞれ同一個体の経時変化を観察している。血液とレバー溶液を混ぜたペレットを食べさせることにより、腸管が褐色に色づき腸管のリモデリングが観察できる(Blood (+))。撮影は、梅園良彦教授、森本瑞希氏による。 B. 血液により腸管を着色させた再生 5 日目の尾部断片。着色により腸管が観察された個体について、*DjrafA(RNAi)*個体と *DjmekA(RNAi)*個体は2本の腸管同士が離れたままになっており(矢じり)、腸管融合について異常が生じている。撮影は、梅園良彦教授、元石美奈子氏による。

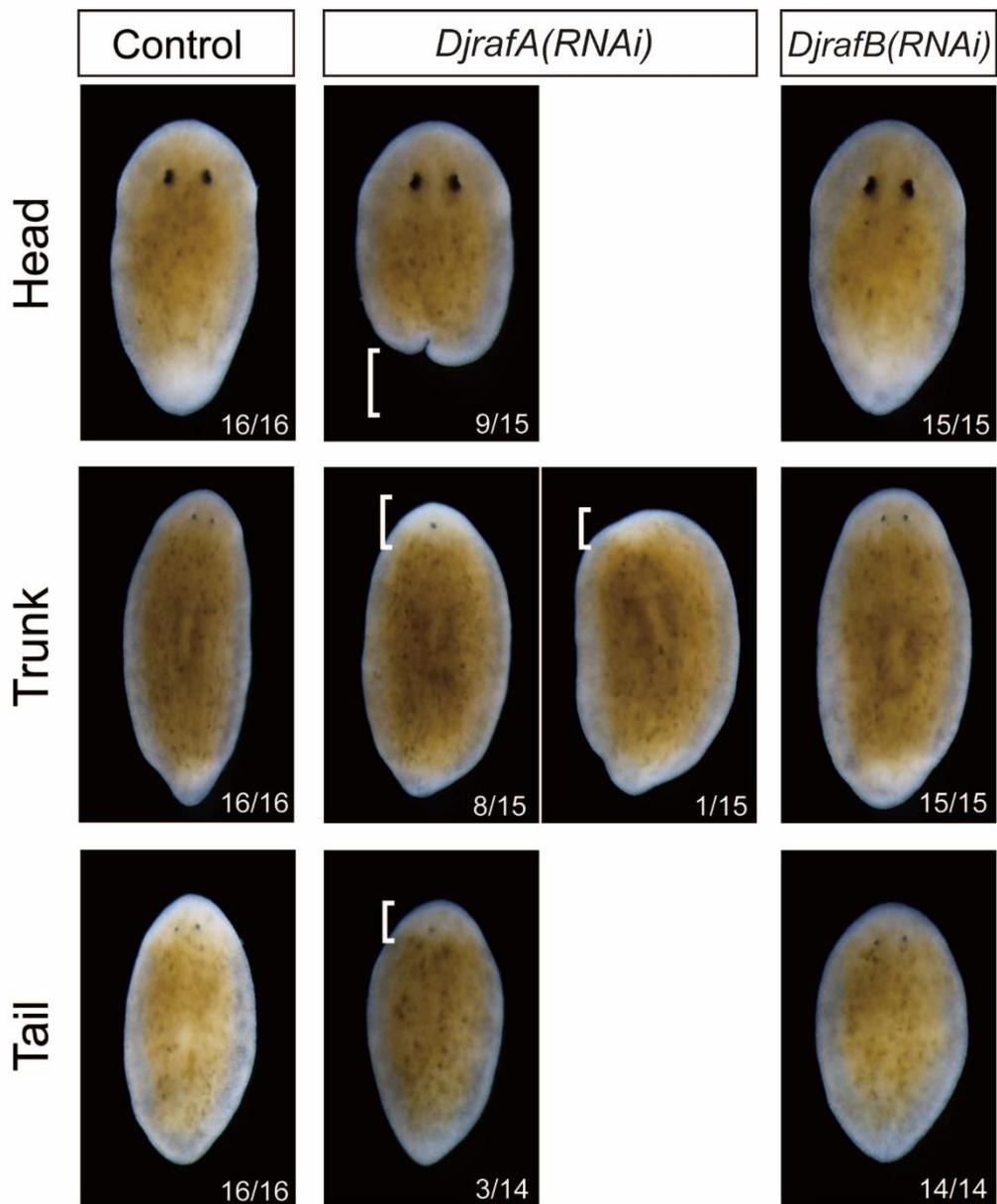


図 1-5 *DjrafA* の機能阻害は再生不全を引き起こす

DjrafA, *DjrafB* の RNAi 個体およびコントロール個体の、再生 7 日目の頭部断片、胴部断片、尾部断片。 *DjrafA*(RNAi) 個体の頭部断片の尾部再生過程では尾部の形成が不全となる個体が多数生じた。胴部断片についても、 *DjrafA* 遺伝子の RNAi により頭部再生に異常を生じ、半数の個体が単眼となり、また 1 個体は眼の形成が完全に抑制された。 *DjrafA*(RNAi) 個体の尾部断片も単眼となる個体を生じ、また尾部断片の全ての個体が咽頭形成不全を起こしていた。 *DjrafB*(RNAi) 個体はコントロール個体と同様に再生し、特に再生に異常は見られなかった。上側が前方である。

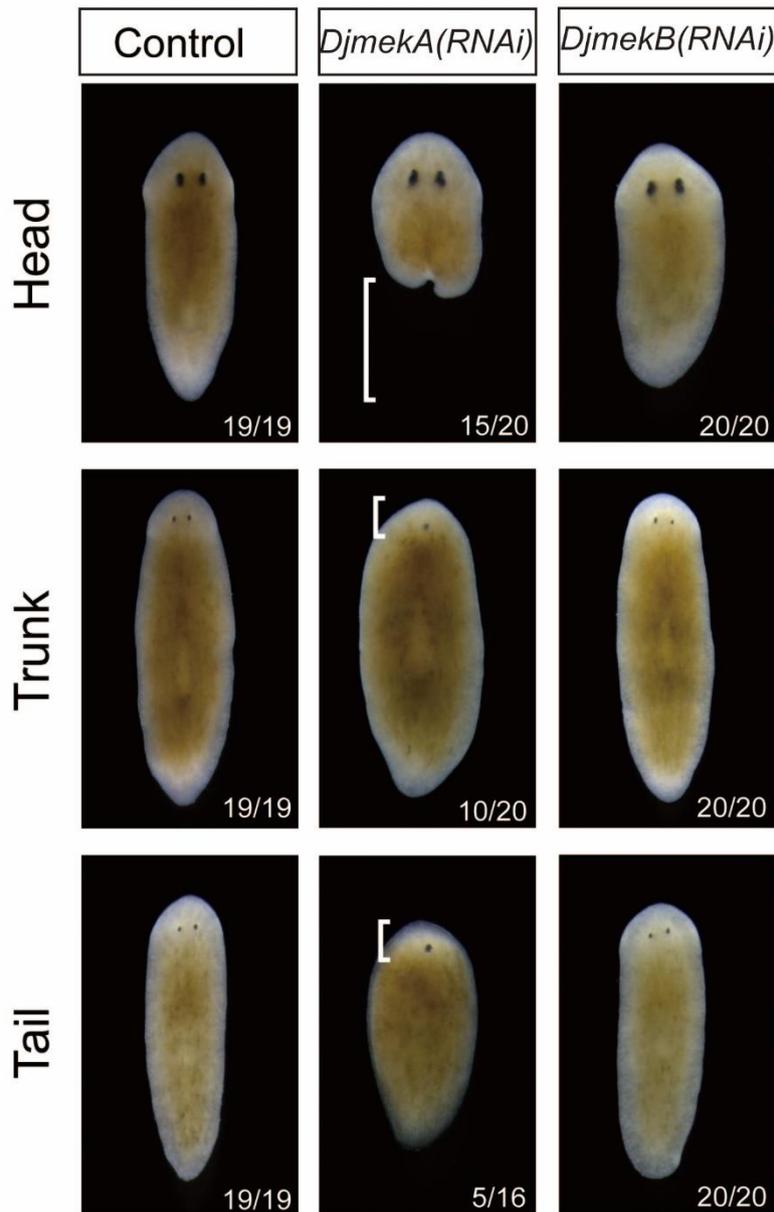


図 1-6 *DjmekA* の機能阻害は再生不全を引き起こす

DjmekA, *DjmekB* の RNAi 個体およびコントロール個体の、再生 7 日目の頭部断片、胴部断片、尾部断片。*DjmekA*(RNAi) 個体の頭部断片の尾部再生過程では多くの個体が尾部の形成不全を示した。胴部断片についても、*DjmekA* RNAi により頭部再生に異常を生じ、半数が単眼となった。*DjmekA*(RNAi) 個体の尾部断片も単眼となる個体を生じ、また 16 個体の尾部断片のうち 15 個体が咽頭形成不全を起こしていた。*DjmekB*(RNAi) 個体の再生体はコントロール個体と同様に再生し、特に再生に異常は見られなかった。上側が前方である。

DjrafA, *DjmekA* は ERK 下流の遺伝子の発現に必要である

ERK は活性化されることで下流の様々な遺伝子の発現が誘導される。プラナリアにおいては、ERK の活性化に応答して発現を示す遺伝子として *DjmkpA* 遺伝子が知られている (Tasaki et al., 2011b; Umesono et al., 2013)。そこで、pERK 下流で発現する遺伝子に対する *DjrafA* と *DjmekA* の影響を調べるため、*DjrafA*, および *DjmekA* 機能阻害個体における *DjmkpA* 遺伝子の発現を調べた。*DjrafA(RNAi)*, *DjmekA(RNAi)* 個体の再生 3 日目の尾部断片における *DjmkpA* 遺伝子の発現を *in situ* hybridization で検出したところ、断片全体で低い発現を示した(図 1-7 A)。さらに定量的逆転写 PCR(quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, qRT-PCR) を行い、*DjrafA(RNAi)*, *DjmekA(RNAi)* 個体における *DjmkpA* の発現を調べると、コントロール個体に比べ有意に発現が減少していた(図 1-7 B)。さらに、尾部断片では再生過程で ERK 依存的に新規に発現してくる *Djndk*(頭部で発現)、*DjFoxA*(咽頭部で発現)の発現量を調べたところ、これらの遺伝子も RNAi 個体において有意に減少していることが分かった(図 1-7 B)。一方で、ネオブラストで特異的に発現する *DjpiwiA*(Reddien et al., 2005; Hayashi et al., 2010)や、S 期マーカーである *Djmcm2* や *Djpcna* といった遺伝子(Salvetti et al. 2000; Orii et al. 2005; Hayashi et al. 2010)については、RNAi 個体でも発現量に大きな変化は見られなかった(図 1-7 B)。これは ERK の阻害でも同様に見られる現象で、*DjrafA(RNAi)* や *DjmekA(RNAi)* がネオブラストの生存に影響を及ぼしていないことを示している。

これらの結果から、プラナリアの再生における pERK 活性依存的な遺伝子発現は、*DjrafA* と *DjmekA* 遺伝子が必要であることが示唆された。

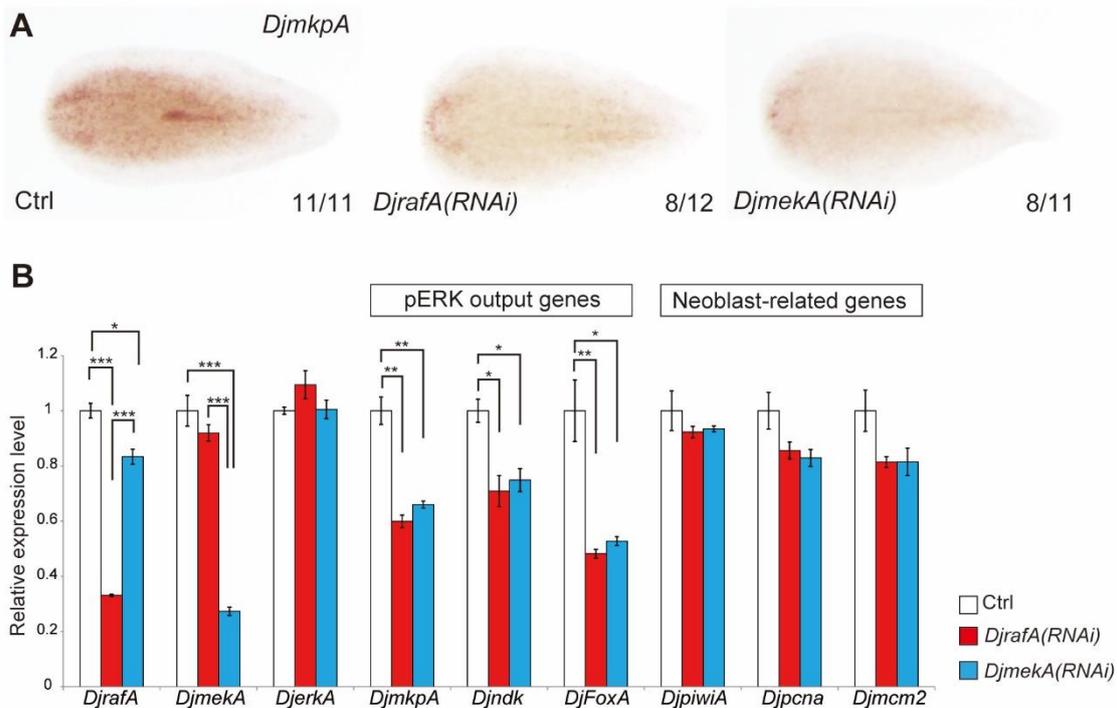


図 1-7 *DjrafA*, *DjmekA* は pERK 下流遺伝子の発現に必要である

A. 再生 3 日目の尾部断片からの頭部再生過程について *DjmcpA* 遺伝子の発現を検出したもの。コントロール個体に比べて、*DjrafA(RNAi)* 個体、*DjmekA(RNAi)* 個体で *DjmcpA* 遺伝子の発現が断片全体で低下している。左側が前方である。

B. 再生 3 日目の *DjrafA(RNAi)* 個体および *DjmekA(RNAi)* 個体の尾部断片について、定量的 PCR による相対的な発現量解析を行った。*DjrafA RNAi*, *DjmekA RNAi* により、pERK output 遺伝子である *DjmcpA* 遺伝子(pERK のリードアウト)、*Djndk* 遺伝子(頭部マーカー)、*DjFoxA* 遺伝子(咽頭マーカー)の発現が有意に低下した。一方で、*DjerkA* の発現や、ネオブラスト関連遺伝子である *DjpiwiA*, *Djpcna*, *Djmcm2* の発現の有意な低下は見られなかった。グラフのエラーバーは 3 回の独立の実験から計算した標準誤差を示している。1 回の総 RNA 抽出に用いた断片は 6 個体。t 検定結果は * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ を示す。

DjrafA, *DjmekA* は ERK の活性化に関与している

ERK はリン酸化されることで活性を持ち、細胞内の生理的な反応を引き起こす。プラナリアにおいては、再生初期の再生芽付近において高レベルのリン酸化 ERK(pERK)を検出することができる(Tasaki et al., 2011b)。 *DjrafA* と *DjmekA* の ERK のリン酸化に対する影響を調べるため、抗 pERK 抗体を用いて再生 1 日目の胴部断片の頭部再生芽に着目して解析を行った(図 1-8)。陰性対照実験として MEK の阻害剤である U0126 処理を同時に行った(Tasaki et al., 2011b; Umesono et al., 2013)。U0126 処理によって頭部再生芽における pERK のレベルはコントロールに比べて減少していた(図 1-8)。また、 *DjrafA*(RNAi), *DjmekA*(RNAi) 個体においても、U0126 処理と同様に pERK レベルはコントロール個体に比べて減少しており(図 1-8)、 *DjrafA* と *DjmekA* が ERK のリン酸化に必要であることが示された。

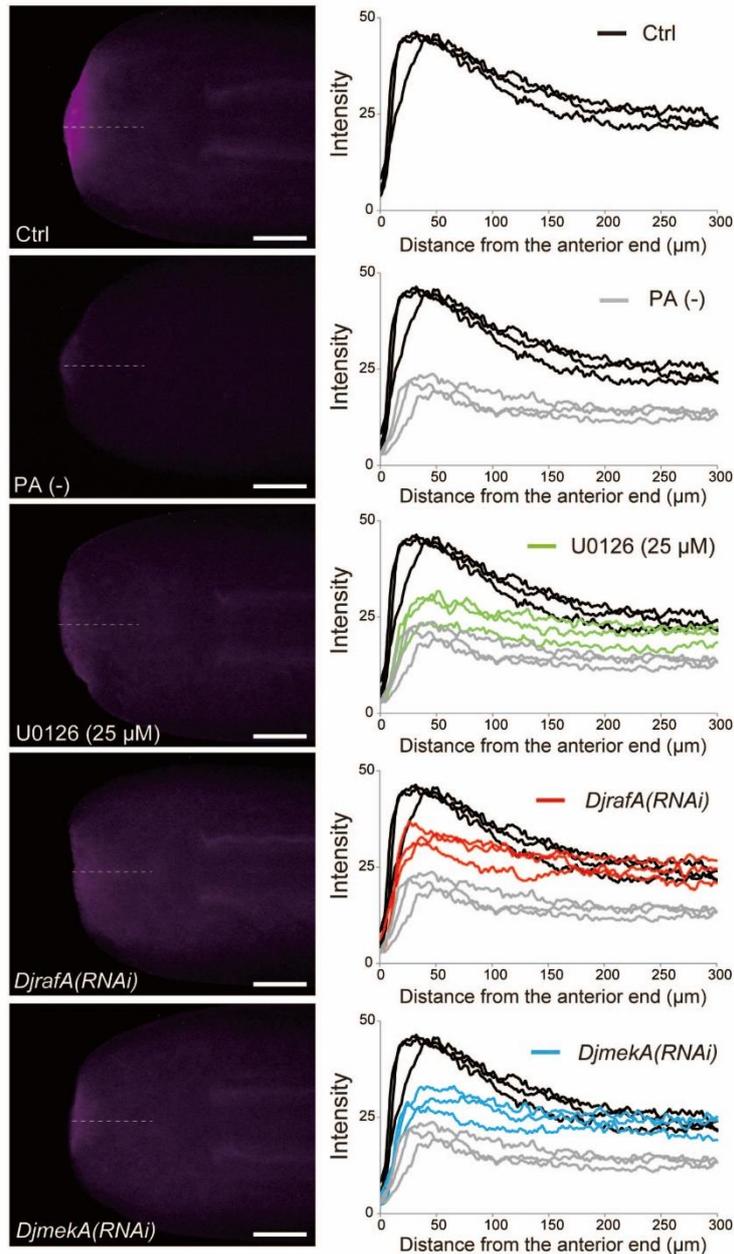


図 1-8 *DjrafA*, *DjmekA* の RNAi は頭部再生芽においてリン酸化 ERK の低下をもたらす
 (左) 再生 24 時間の胸部断片について、活性化 ERK(リン酸化 ERK)の蛍光免疫染色を行った。コントロール個体では頭部再生芽において強いシグナルが検出された。バックグラウンドシグナルを検出するために、一次抗体を除いて免疫染色を行った(PA(-))。破線は各個体のシグナル強度を測定した場所を示す。左側が前方で、スケールバーは 200 μm である。
 (右) pERK のシグナル強度を各サンプルの 3 個体についてプロットした。コントロール個体では、頭部再生芽の前端付近でシグナル強度のピークが見られ、後方に向かうにつれて徐々に強度が低下している。

DjrafB, *DjmekB*の機能阻害実験について

DjrafB, *DjmekB*についてはRNAiによる機能阻害で、再生に異常を生じなかった。そこで、qRT-PCRを行い、RNAiによる遺伝子の発現変化を調べたところ、ERK下流遺伝子である*DjmkpA*の遺伝子に影響を及ぼしていないことは分かったが、*DjrafB*, *DjmekB*自身の発現が期待以上に低下していないことが分かった(図 1-9)。そのため、*DjrafB*, *DjmekB*のRNAiによりERK活性の低下やそれに伴う再生不全が観察されなかったのは、*DjrafB*と*DjmekB*が再生に必要なERKの活性化に関与していないからか、RNAiの効果が不十分であったかは本研究内では結論付けられなかった。

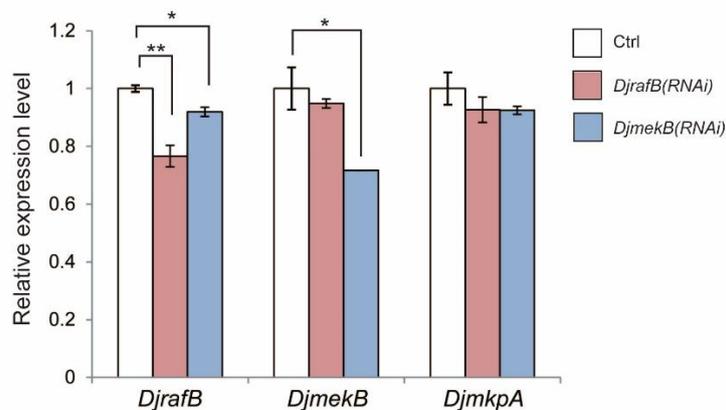


図 1-9 *DjrafB*(RNAi)個体、*DjmekB*(RNAi)個体の相対的発現量解析

再生3日目の*DjrafB*(RNAi)個体および*DjmekB*(RNAi)個体の尾部断片について、定量的PCRによる相対的な発現量解析を行った。それぞれのRNAi個体について*DjmkpA*の発現量に差は見られなかった。一方で、*DjrafB*(RNAi)個体における*DjrafB*の発現、また*DjmekB*(RNAi)個体における*DjmekB*の発現は、それぞれ有意に低下していたが、その減少幅は20-30%に留まっていた。グラフのエラーバーは3回の独立の実験から計算した標準誤差を示している。1回の総RNA抽出に用いた断片は6個体。t検定結果は * p < 0.05, ** p < 0.01を示す。

考察

DjRafA/ DjMEK-A/ ERK シグナルカスケードが、ネオブラストの分化およびそれに伴う再生時の組織形成に必要である

阿形研究室が保有する EST ライブラリより、Raf subfamily である DjRafA, DjRafB と、MEK1/2 subfamily である DjMEK-A, DjMEK-B をコードする遺伝子を同定した。また、RNAi による機能解析により、*DjrafA* および *DjmekA* が再生に必要であることが分かった(図 1-5,1-6)。*DjrafA*, *DjmekA* の RNAi 個体では pERK 下流で誘導される遺伝子の発現が低下し(図 1-7)、リン酸化 ERK レベルも低下していた(図 1-8)。尾部断片からの頭部再生過程において、*DjrafA* と *DjmekA* の RNAi で見られた *Djndk* の発現低下は頭部再生芽形成不全に伴う頭部再生不全を示すものである(図 1-5, 1-6, 1-7)が、咽頭部で発現が誘導される *DjFoxA* の発現も低下しており(図 1-7B)、これらのことから、両 RNAi 個体において、再生体全体でのネオブラストの分化レベルが低下していることが示唆された。一方で、ネオブラスト特異的な遺伝子の発現レベルを qRT-PCR で調べた結果から、*DjrafA* と *DjmekA* の機能阻害による再生不全はネオブラストの減少や死滅によるものではないことが示唆される(図 1-7B)。よって、*DjrafA* と *DjmekA* の機能阻害では、pERK レベルが低下し、それに伴ってネオブラストの分化が減退して、断片全体における組織形成不全が生じたと考えられる。これらのことから、我々が同定した DjRafA, DjMEK-A は ERK の上流に位置しうる因子であり、またこの DjRafA/ DjMEK-A/ ERK のシグナルカスケードが、ネオブラストの分化とそれに伴う再生時の組織形成に主として寄与している可能性が示唆された。

DjRafA と DjRafB の kinase ドメインについて

本研究では、新たに同定した *DjrafA* と *DjrafB* のうち、*DjrafA* の機能阻害実験を介して、*DjrafA* がこれまで先行研究で報告されてきた ERK のリン酸化に必要であり、ERK シグナル経路を活性化することを示唆することができた。一方で、機能阻害を行っても再生に異常の生じない *DjrafB* に関しては、*DjrafB* の RNAi が十分でなかった可能性が浮上してきた(図 1-9)ため、*DjrafB* が ERK の活性化に関わっているのか、関わっていないのかを結論付けることができなかった。mRNA の発現場所を見る限りは、*DjrafA* と *DjrafB* は同様の発現パターンを示しており、プラナリアにおいて *DjrafB* も *DjrafA* と同様の生理活性を示しても不思議ではない。しかし、機能解析のために行った RNAi によって *DjrafB* の発現が低下しているのも事実であるため、*DjrafB* は機能阻害されても再生に影響を与えない遺伝子であり、DjRafB は再生に必要な ERK シグナル経路を活性化できない、すなわち Raf 下流の因子である MEK(本論文で同定された DjMEK-A が主要な MEK かもしれない)をリン酸化できないようなタンパク質であることも十分に考えられる。そこで、DjRafA, DjRafB の kinase ドメインを他の動物種のもものと比較し、それぞれのタンパク質がどういった Raf 活性を持ちうるのか推察することにした。

アラインメント結果から、DjRafA は kinase ドメインの酵素活性部位付近は、Raf サブファミリーで保存されたアミノ酸配列となっており、特に MEK との結合に必要な Ser(S547)、Raf の活性化に重要とされている DFG モチーフ直後の 2 つの被リン酸化サイトも有しており(T566、S569) (Zhang and Guan, 2000; Chong et al., 2001; Baljuls et al., 2008)、十分に MEK をリン酸化しうるアミノ酸配列であるといえる(図 1-10) (Roskoski, 2010)。

一方、DjRafB に関しては、MEK との結合に重要とされる Ser(S203)や、DFG モチーフ直後の活性作用に重要な被リン酸化サイトも一つは有しているものの(T222)、もう一つの残基が Ser や Thr などではなく Cys となっている(C225) (図 1-10, 青色背景で強調した)。

よって、この残基置換のために DjRafB は下流の MEK1/2 ホモログへの活性作用が弱い可能性があり、それに起因して MEK/ERK シグナル経路への寄与が低く、機能阻害しても再生へ影響が出なかった可能性も考えられる。

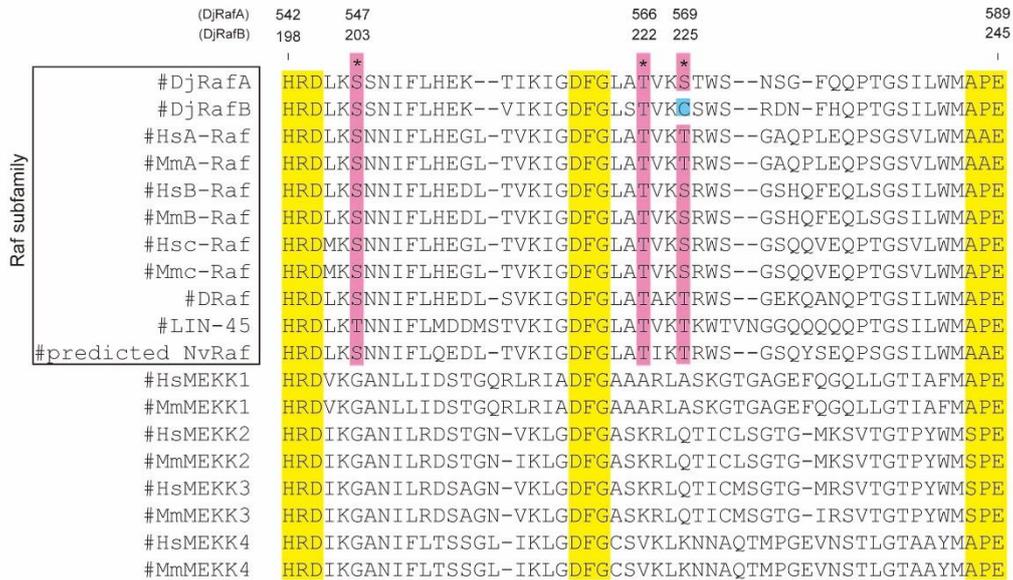


図 1-10 MAP3K ファミリーを含めた Raf サブファミリータンパク質のリン酸化活性に関わる部位のアラインメント

Raf サブファミリーを中心に、MAP3K ファミリータンパク質の kinase ドメイン内における kinase 活性に関わる部位をアラインメントした。HRD モチーフ、DFG モチーフと、活性部位の末端である APE(SPE)モチーフをそれぞれ黄色のハイライトで示した。また、HRD モチーフ直後の MEK1/2 との結合に必要な Ser 残基と、DFG モチーフ直後のリン酸化される Ser、Thr 残基をピンク色の背景で強調した。配列の上の数字は、DjRafA、DjRafB について、それぞれ開始メチオニンから数えて何番目の残基にあたるかを示している。

DjMEK-A と DjMEK-B の kinase ドメインについて

Raf ホモログでの考察は、MEK1/2 ホモログにおいてもそのまま当てはまる。そこで、DjMEK-A と DjMEK-B についてもアラインメントを行い、酵素活性セグメントについてアミノ酸配列の比較を行った。

アラインメント結果から、DjMEK-A、DjMEK-B は各モチーフとモチーフ間の配列もよく保存されており、MEK1/2 の活性に特に必要とされる DFG モチーフと APE 配列の間の 2 つの Ser(DjMEK-A は S246, S250; DjMEK-B は S294, S298)も有しているため、ERK と特異的に結合してリン酸化しうる配列であるといえる(図 1-11) (Roskoski, 2012)。ただ、HRD モチーフと DFG モチーフの間にある Ser(DjMEK-A は S228)は DjMEK-A と他の MEK1/2 サブファミリーでよく保存されているのに対し(図 1-11, 緑色で強調した)、DjMEK-B では Met(M276)に残基置換していることが分かった(図 1-11, 青色背景で強調した)。この部位の Ser 残基が MEK の活性に必須かは分かっていないが、リン酸化されるとタンパク質の立体構造に影響を与え、MEK の活性化を引き起こすことが分かっている (Odendall et al., 2012)。もしかすると、この残基置換によって DjMEK-B は ERK と結合、またはリン酸化できないような構造変化を起こしているのかもしれない。

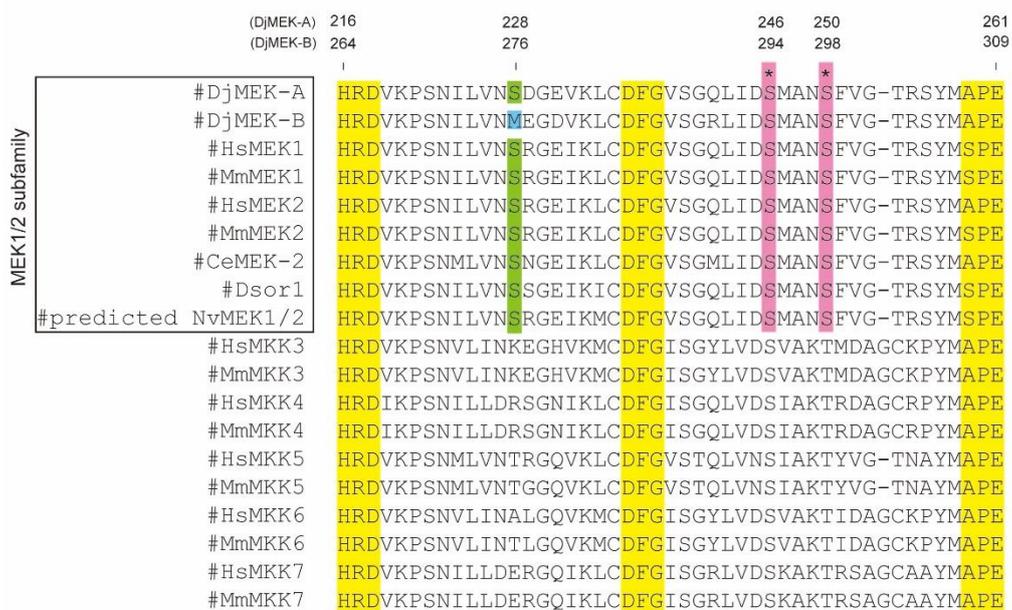


図 1-11 MAP2K ファミリーを含めた MEK1/2 サブファミリータンパク質のリン酸化活性に関わる部位のアラインメント

MEK1/2 サブファミリーを中心に、MAP2K ファミリータンパク質の kinase ドメイン内における kinase 活性に関わる部位をアラインメントした。HRD モチーフ、DFG モチーフと、

活性部位の末端である APE(SPE)モチーフをそれぞれ黄色のハイライトで示した。また、DFG モチーフ直後の MEK の kinase 活性に関わる、被リン酸化サイトの Ser、Thr 残基をピンク色の背景で強調した。配列の上の数字は、DjMEK-A、DjMEK-B について、それぞれ開始メチオニンから数えて何番目の残基にあたるかを示している。

アミノ酸配列を比較しても、DjRafB, DjMEK-B が ERK の活性化に関わらないという確証は得られなかった。今後、*DjrafB*, *DjmekB* の解析を続けていくとしたら、*DjrafB*, *DjmekB* が RNAi により発現が低下しにくい理由を明らかにし、*DjrafB*, *DjmekB* の発現が十分に低下する条件を確立する必要がある。ただ、今回見つかった残基の違いがタンパク質の活性に影響を及ぼしている可能性も考えられるため、DjRafA や DjMEK-A を DjRafB や DjMEK-B 型にする変異の導入や、またその逆の DjRafB や DjMEK-B を DjRafA や DjMEK-A 型にするなどして、生化学的手法や、カエルへの遺伝子導入によってそれぞれのタンパク質の活性を解析することで、DjRafB, DjMEK-B の ERK シグナル経路に対する活性について明らかにしたいと考えている。

～第二章～

プラナリア再生時の咽頭前部領域形成に関わる

MEKK1 遺伝子の同定

(第二章)

序論

・スケーリングについて

動物は種によって様々な体の形態を示す。形態は体構造のパターンと体の各部の示す相対的な割合(プロポーシオン)によって決まっている。例えば哺乳動物の一種のキリンは首の長さのプロポーシオンが胴部やその他の体の器官に比べて大きく、このプロポーシオンの違いはキリンの形態を特徴づけるものになっている。

体のパターンを決定する遺伝子や分子機構に関しては様々な動物種で研究がなされており、その研究報告は非常に多い。一方で、種固有な体のプロポーシオンが存在することから、プロポーシオンも遺伝的作用によって決まっていることが予想されるが、プロポーシオンを制御する遺伝子システムについての研究はほとんど着手されていない。なぜなら、プロポーシオンの研究には成熟した個体が扱われることが多く、細胞を越えた巨視的な観点でしか解析できないことや、栄養依存的な細胞増殖といった成長という要素が含まれるために遺伝学的な解析が難しいためである。

成長の要素を排して解析するには、初期発生などに着目して解析をおこなえばよいが、プロポーシオンを解析するためには、体の大きさの異なる個体を準備しなければならず、胚発生においては胚の大きさを操作することが課題となる。

これらの問題を乗り越えて、体のプロポーシオンに関連した胚発生の研究報告がいくつかなされている。一つはショウジョウバエの胚を用いており、これは産み落とされる胚が示す大きさのばらつきに着目したもので、胚の大きさが多少変化しても、胚発生時の遺伝子発現範囲の割合は大きく変化しないというものである(Houchmandzadeh et al., 2002; Cheung et al., 2014)。また大きさの異なる種のアリの胚を比較して、胚の大きさが3倍程度異なっても、胚発生時の遺伝子発現範囲の割合は大きく変化しないという知見も得られている(Gregor et al., 2005)。脊椎動物を用いた実験では両生類の胚を用いたものが知られ

ており、二次軸を形成させた胚や、半胚(胚の半分相当の腹側割球を除去して発生させたもの)を用いることで、人工的な小さな胚を作製し解析している。どちらの胚でも小さいながら、正常な胚と同様のプロポーションを持った幼生が生じる(Cooke et al., 1981; Koga et al., 2012)。アフリカツメガエルの半胚を用いた解析では、背腹軸におけるタンパク質の濃度勾配が正常胚・半胚に限らず適切に調節される分子機構が明らかにされ、報告されている(Inomata et al., 2013)。こういった、個体の大きさに関わらず一定の体の各部のプロポーションを保つ機構は「スケーリング」と呼ばれている(Ben-Zvi et al., 2011)。

・プロポーシオン解析におけるプラナリアの有用性について

プラナリアは切断によって容易に大きさの異なる断片が得られる(図 2-1 A)ことから、プロポーシオンの解析に適しているといえる。また、プラナリアの再生過程では断片の伸長がほとんど起こらず、成長という要素を排除して解析できる(図 2-1 B)ことも、プロポーシオンを研究する上で有利に働く。

本研究では尾部断片の再生体について定量的に解析することで、プラナリアの再生時にプロポーシオンが保たれていることを発見した。ついで、一定のプロポーシオンを保って再生するために重要である領域形成について、今まで分かっていなかった咽頭前部領域形成に関与する MAP3K ファミリーに属する遺伝子を新しく発見し、その分子機構の解明を試みた。

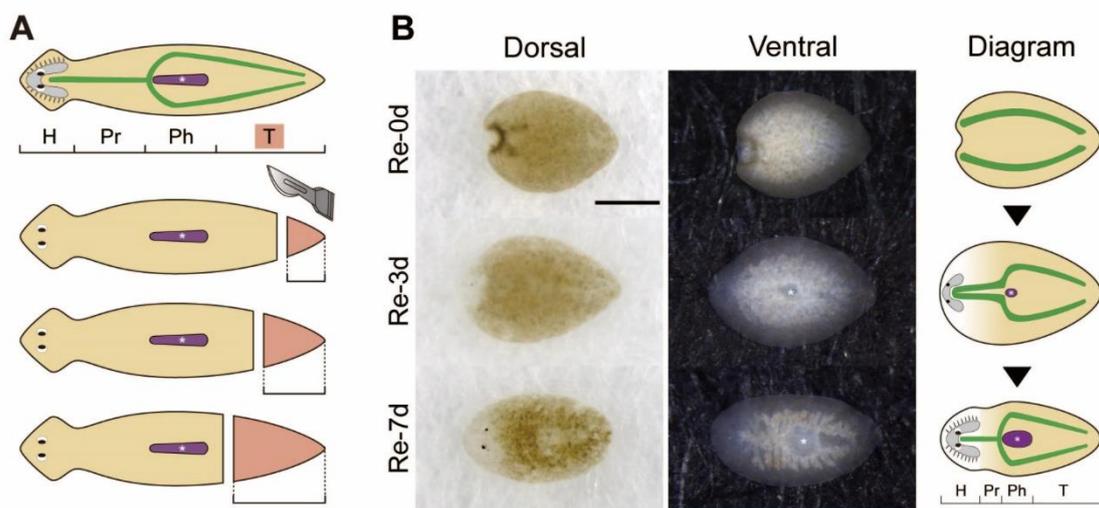


図 2-1 プラナリアの体のプロポーシオン解析に対する有用性

A. プラナリアは切断することにより容易に違う大きさの個体を入手することができる。(最上図に関して) H：頭部、Pr：咽頭前部領域、Ph：咽頭部、T：尾部を表している。

B. 尾部断片からの頭部再生過程について、同一個体をトレースして撮影を行った。同一個体の再生 0 日目、3 日目、7 日目についてそれぞれ背側と腹側から氷上で撮影した。図の右には再生過程の模式図が示してある。再生 3 日目には、断片の中心に咽頭孔が空いている様子が観察できる。左側が前方で、スケールバーは 500 μm である。咽頭はアスタリスクで示した。

結果

プラナリアは断片の大きさによらず、一定のプロポーシオンを保って再生する

大きさの違う尾部断片を切り出して3日間再生させたのち、relaxant solution法を用いて真っ直ぐになるように固定した。固定した再生3日目の尾部断片について、*Djndk*(Cebrià et al., 2002))や *nou-darake like 2 (Djndl-2)* といった遺伝子の発現を Whole-mount *in situ* hybridization により検出した。*Djndk* は頭部で特異的な発現を示す遺伝子で、*Djndl-2* は頭部での発現に加え、咽頭前部領域でなだらかに弱く発現し、咽頭原基で強い発現を示す(図 2-2 A)。*Djndk* を検出した個体を再生頭部領域の測定に用い(図 2-2 A, y)、*Djndl-2* を検出した個体を咽頭の位置(図 2-2 A, y)を測定するのに用いた。

大きさの違う *Djndk* 検出個体および *Djndl-2* 検出個体の断片全体の長さ、再生頭部の端までの長さ、また前端から咽頭までの距離を測定し、その関係性をプロットした(図 2-2 B, C)。すると、尾部断片の全長と再生頭部の長さ、また咽頭の形成位置に強い正の相関があることがわかった(頭部の相関係数 $r_{\text{head}} = 0.92$ 、咽頭の相関係数 $r_{\text{pharynx}} = 0.97$)。計算すると、断片の大きさに依らず、再生頭部の割合は $17.3 \pm 0.22\%$ (s.e.m., $n = 76$) で、咽頭の形成位置の割合は $44.0 \pm 0.37\%$ (s.e.m., $n = 76$) であることがわかった。

これらの結果から、プラナリアは断片の大きさによらず、一定のプロポーシオンを保って再生する仕組みを持っていることが示された。

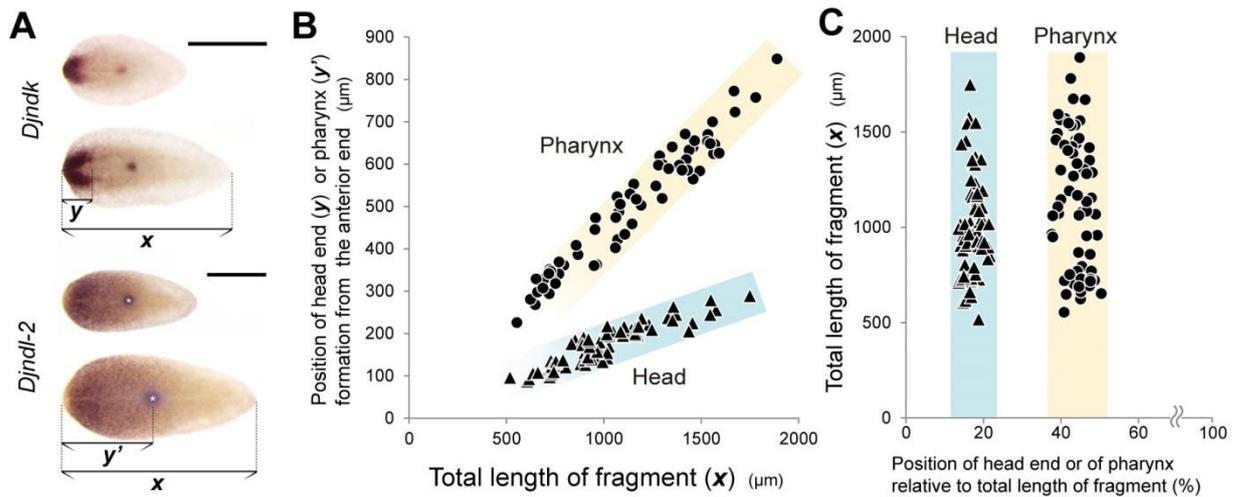


図 2-2 プラナリアはプロポーショナルを保って再生する機構を持つ

A. *Djndk* (上方) と *Djndl-2* (下方) の発現を検出した再生 3 日目の尾部断片について、大きさの異なるものを 2 個体ずつ並べた。*Djndk* の発現する範囲を再生頭部の長さとして測定し(y)、*Djndl-2* の咽頭原基の発現から、咽頭が再生してくる位置を測定した(y')。左側が前方で、スケールバーは $500\ \mu\text{m}$ である。アスタリスクは咽頭を示す。

B. *Djndk* と *Djndl-2* の発現を検出した個体を用いて、再生頭部、咽頭の長さを測定し、断片の全長との関係性をグラフで示した。横軸が断片の全長(x)を示し、縦軸が再生頭部の長さ(y 、青ボックス内の黒三角)と、前端から咽頭までの距離(y' 、黄色ボックス内の黒丸)を示している。

C. (B) に用いたデータを別のグラフとしてプロットした。横軸に、断片の全長に対する再生頭部の長さまたは咽頭形成位置の割合(y/x または y'/x) をとり、縦軸に断片の全長(x) をとった。データが縦一列に並ぶことから、頭部や咽頭が断片の大きさによらず一定の割合の位置に再生していることが分かる。

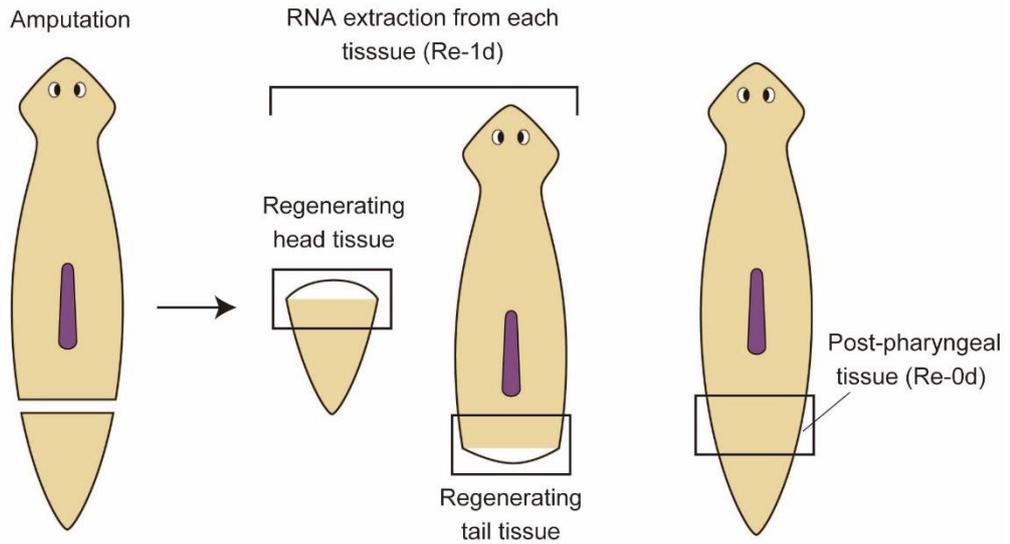
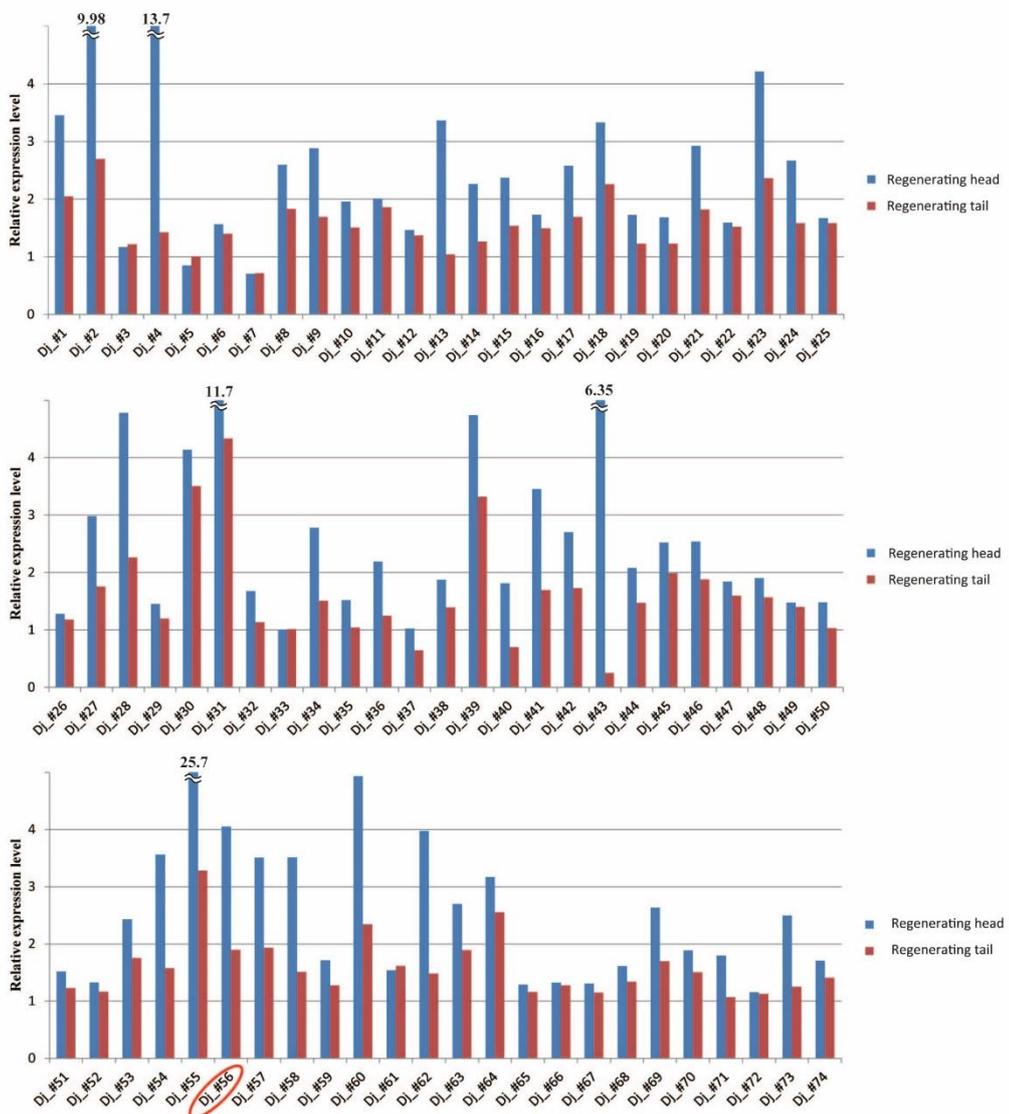
A-P トランスクリプトーム解析によって同定した遺伝子の二次スクリーニング

プラナリアがプロポーシオンを保って再生していることが明らかになったが、プラナリアの咽頭前部領域の形成に関する分子機構については謎が多く、プラナリアのプロポーシオン形成を解明するためには領域形成に関与する遺伝子の同定が不可欠である。阿形研究室で行われた先行研究により、再生 1 日目(再生芽を形成している時期)の頭部再生組織および尾部再生組織から RNA を抽出し、両組織の発現量を比較した RNA-seq が行われ(A-P トランスクリプトーム解析)、頭部再生芽で優位に発現する遺伝子の網羅的な探索が行われ、471 の遺伝子が候補遺伝子として同定された(Nishimura et al., 2015)。本研究では、得られた遺伝子リストの中から偽陽性の遺伝子を除くために、実際に頭部で特異的に発現する *Djndk* のリード数を基準にして、リード数が多く信頼性がある可能性の高い遺伝子だけを選別した。さらに、再生一日目の再生頭部および再生尾部から抽出した RNA を用いて qRT-PCR を行い、リストの遺伝子の発現量比を確認した(図 2-3)。再生頭部の発現が再生尾部の発現の二倍以上になるものを選出し、RNAi による機能阻害を行い、再生に関与する遺伝子を探索した。

(次項の図の説明) 図 2-3 再生頭部で優位に発現が上昇する遺伝子の二次スクリーニング

A. A-P トランスクリプトームで同定された再生頭部で優位に発現が上昇する遺伝子の発現が実際に増加するか調べるために、咽頭後方部でプラナリアを切断し、切断 1 日後の再生頭部組織片(頭部再生芽を含む)と再生尾部組織(尾部再生芽を含む)の総 RNA を抽出した。無処理のプラナリアの咽頭後方部を切り出して総 RNA を抽出し、これを再生 0 日の RNA サンプルとして、再生 1 日の再生頭部組織、再生尾部組織における遺伝子の発現量との比較に用いた。

B. (A) の RNA サンプルを使用して、再生頭部でのリード数の高かった遺伝子について、qRT-PCR によって再生 0 日との相対的発現量比を調べた。青の棒グラフは再生頭部組織での発現、赤の棒グラフは再生尾部組織での発現を示している。赤丸で強調された *Dj_#56* は機能阻害により再生過程において異常が生じた新規遺伝子の *Djmekkk1* 遺伝子であり、*Djmekkk1* が再生頭部で優位に発現が上昇する遺伝子として同定されたことが分かる。

A**B**

再生時のパターン形成に関与する遺伝子 *Djmekkk1* の同定

A-P トランスクリプトーム解析で得られた候補遺伝子について、遺伝子の機能阻害を行うことで、再生時のパターン形成に関与する遺伝子を同定した(図 2-3 の Dj_#56)。その遺伝子は *Dugesia japonica* MAPK/ERK kinase kinase 1(*Djmekkk1*)をコードする遺伝子で、翻訳されたタンパク質 DjMEKK1 は MAP3K ファミリーに属し、N 末側に PHD/RING finger ドメインを、C 末側に serine/threonine kinase ドメインを持つ(図 2-4 A) (Lu et al., 2002; Tu and Lee, 2003)。

Djmekkk1 の機能を類推するため、*Djmekkk1* の発現解析を行った(図 2-5)。結果 *Djmekkk1* は全身で発現しており、頭部で比較的強い発現を示し、切断することで頭部および尾部再生芽付近で発現が上昇することが分かった(図 2-5 B-F)。その後再生 3 日目付近で咽頭周辺での発現が増大し、再生が進行するにつれて徐々にその発現が低下していく様子が観察された。

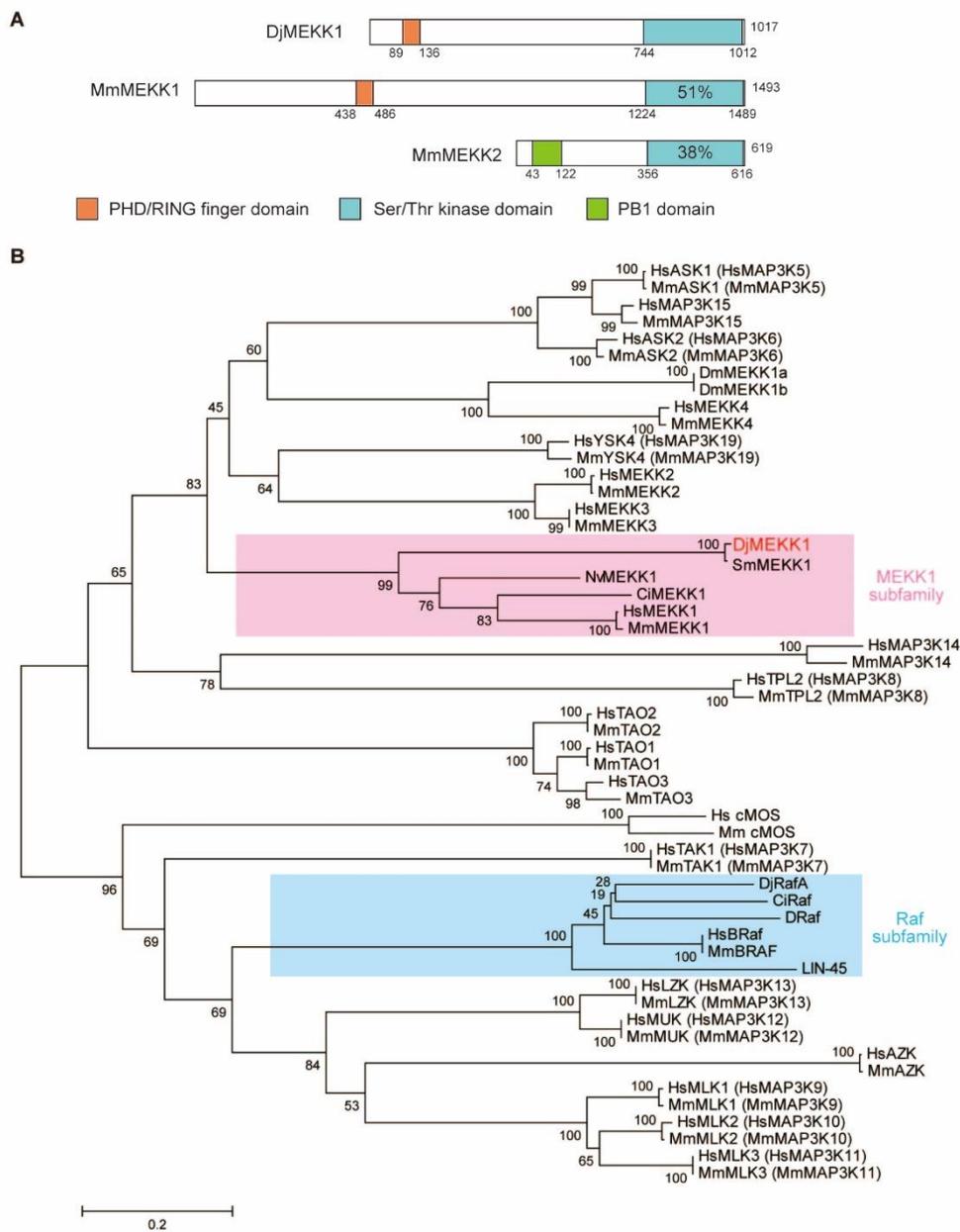


図 2-4 DjMEKK1 タンパク質の構造と系統解析

A. DjMEKK1、MmMEKK1 と、MmMEKK1 と比較的近縁な MmMEKK2 のタンパク質構造を示した。kinase ドメイン内に表示した百分率は DjMEKK1 kinase との相同性を示しており、DjMEKK1 が MmMEKK1 の kinase ドメインと相同性が高いことが分かる。また、DjMEKK1 と MmMEKK1 は N 末側に PHD/RING finger ドメインがあり、これは MmMEKK2 にはない構造である。

B. MAP3K ファミリーの系統解析。分子系統樹は、第一章の図 1-1 と同様の方法で作製した。DjMEKK1、SmMEKK1、予想 NvMEKK1、予想 CiMEKK1 は MEKK1 サブファミリーのタクソンに含まれている。DRaf は *D.melanogaster* の Raf ホモログで、LIN-45

は *C.elegans* の Raf ホモログである。Ce は *Caenorhabditis elegans*、Ci は *Ciona intestinalis*、Dm は *Drosophila melanogaster*、Dj は *Dugesia japonica*、Hs は *Homo sapiens*、Nv は *Nematostella vectensis*、Mm は *Mus musculus*、Sm は *Schmidtea mediterranea* を表す。

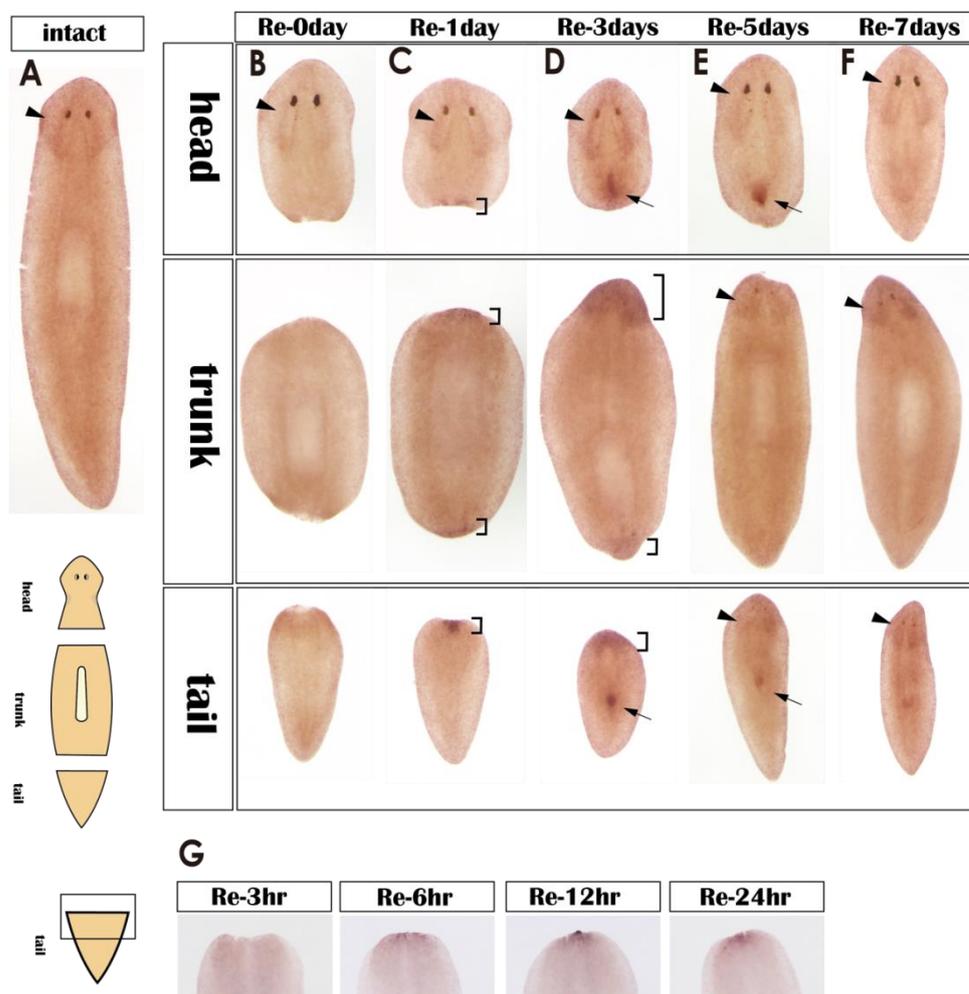


図 2-5 *Djmekk1* 遺伝子の発現解析

A. 切断未処理のプラナリア(intact)では、*Djmekk1*は全身で発現が検出され、また頭部で比較的強い発現が観察された。B-F. *Djmekk1*は切断してから24時間以内に再生芽付近で発現が上昇する。しかし、再生芽付近の発現は再生が進行すると共に減衰し、特に尾部再生芽での発現は再生5日目には全身の発現と区別できなくなる。再生中の咽頭でも比較的強い発現を示すようである。また、少なくとも尾部断片では切断して6時間以内に発現が起こっている様子が観察された(G)。矢じりは頭部の発現、ブラケットは再生頭部および尾部の発現、矢印は再生中の咽頭での発現を示している。上側が前方である。

Djmeck1 は再生時の咽頭前部形成に関与する

Djmeck1 を RNAi により機能阻害すると、尾部断片の頭部再生過程における A-P パターニングに関して異常が見られた。コントロール個体および *Djmeck1(RNAi)* 個体の再生 3 日目の尾部断片について *Djndl-2* 遺伝子を検出し、頭部、咽頭前部及び咽頭原基を可視化した(図 2-6 A)。すると、*Djmeck1(RNAi)* 個体では咽頭原基がコントロール個体と比べて前よりの位置に再生している様子が観察された。一方で頭部の大きさの割合はコントロール個体と *Djmeck1(RNAi)* 個体も大きな差はないように見えた。この結果を定量的に解析するため、*Djndk* 遺伝子を用いて頭部の長さを、*Djndl-2* 遺伝子を用いて咽頭の位置を測定し、それぞれの断片の全長との関係を調べた(図 2-6 B)。すると、頭部の大きさの割合はコントロール個体と *Djmeck1(RNAi)* 個体でも大きな差はなかったが、咽頭については *Djmeck1(RNAi)* 個体ではコントロール個体に比べて前方に偏った位置に咽頭が形成されていることが分かった。

咽頭が前方に移動して再生する現象は先行研究においても例がなく、*Djmeck1* が今までに報告のない新規の機能をもった遺伝子であることを示している。MEKK1 と同じく MAP3K family に属する *DjrafA* の RNAi では、MEK の活性を阻害剤(U0126)で処理した際と同様に、咽頭の前方に移動した再生を示さず、咽頭原基のシグナルが消失した(図 2-6 C)。さらに、再生の完了している再生 7 日目の個体について、咽頭前部領域で発現の見られる *Djpn8* という遺伝子(Kato et al., 1999; Agata et al., 2003)を検出し、また同時に核染色により咽頭の可視化を行った。すると、*Djmeck1(RNAi)* 個体では咽頭前部領域の *Djpn8* の帯状の発現が消失し、代わりに同領域に咽頭が形成されている様子が観察された(図 2-6 D)。

さらに、尾部領域及び咽頭で発現が観察される *Djwnt11-5* 遺伝子(Gurley et al., 2010; Hayashi et al., 2011)の発現を再生 3 日目の尾部断片について検出したところ、*Djmeck1(RNAi)* 個体では、前方に移動して再生した咽頭に伴って *Djwnt11-5* の発現範囲が前方に広がって観察され、後方領域が拡大していることが分かった(図 2-6 E)。

まとめると、*Djmeck1(RNAi)*個体の尾部断片では、頭部以下のプロポーシオンに変化が生じ、咽頭前部領域が縮小、および尾部領域が拡大するのに伴って咽頭が前方にシフトして再生していた(図 2-6 F)。これらの結果は、*Djmeck1*がプラナリアの再生時の咽頭前部領域形成に関与しており、結果としてプロポーシオン形成に影響を与える遺伝子であることを示唆している。

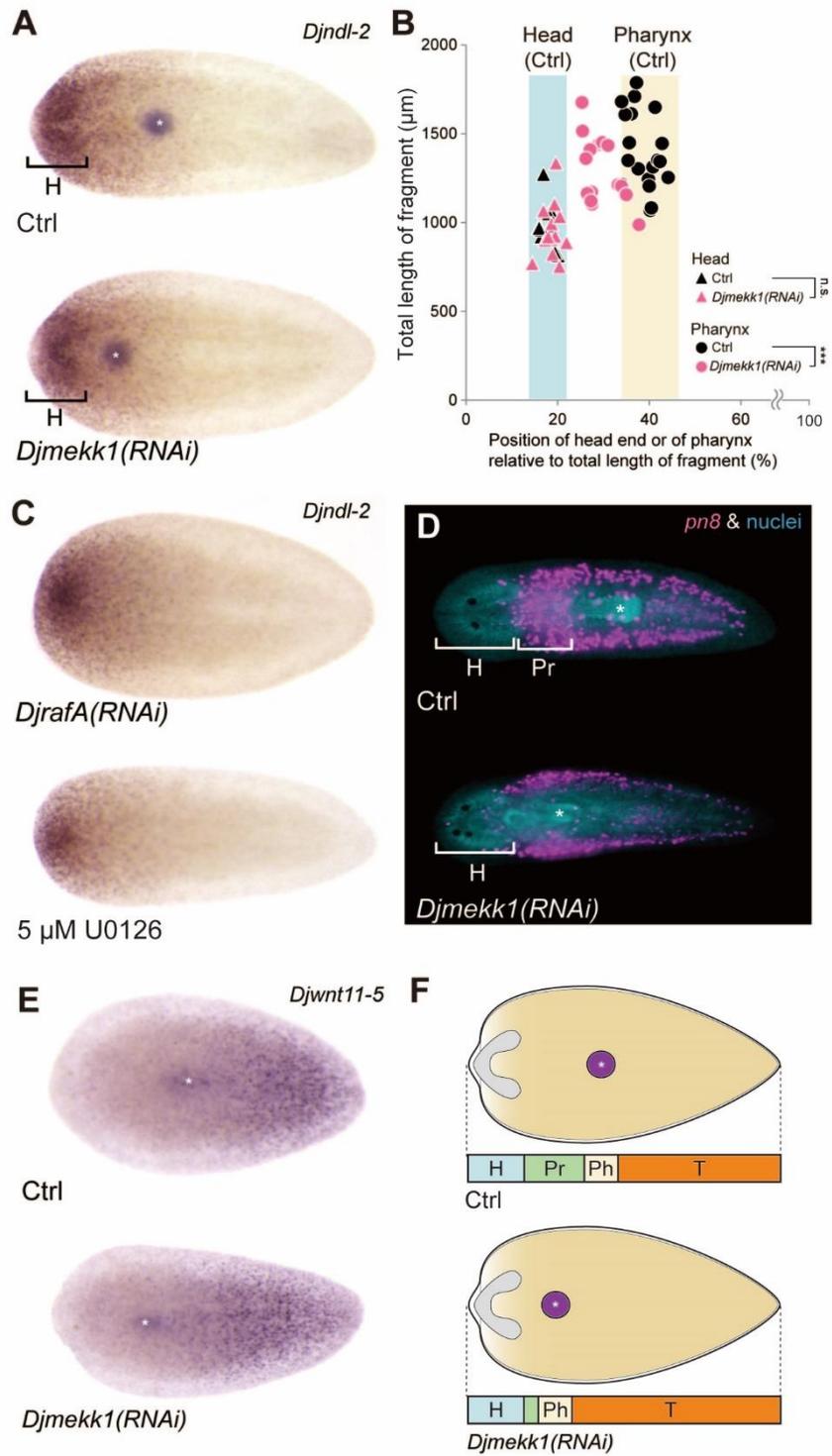


図 2-6 *Djmeck1* は咽頭前部領域の形成に関与し、機能を阻害することで体のプロポーション変化が観察された

A. コントロール個体と *Djmeck1(RNAi)* 個体の再生 3 日目の尾部断片について、*Djndl-2* 遺伝子を検出した。*Djndl-2* の頭部領域の大まかな発現から、*Djmeck1* を RNAi しても頭部領域形成に影響が出ていないことが見て取れるが、*Djmeck1(RNAi)* 個体では咽頭原基がコントロール個体に比べて前にシフトして再生している。 B. 図 2-2 と同様の方法で、再生 3 日目のコントロール子個体および *Djmeck1(RNAi)* 個体の尾部断片について、体長と器官形成位置の定量的な解析を行った。再生頭部の測定には *Djndk*、咽頭原基の位置の測定には *Djndl-2* を検出して解析を行った。t 検定結果は、*** $p < 0.001$ である。 C. *DjrafA(RNAi)* 個体と 5 μ M U0126 で処理した再生 3 日目の尾部断片について *Djndl-2* の検出を行ったところ、咽頭原基の発現が消失していた。 D. 再生 7 日目のコントロール個体と *Djmeck1(RNAi)* 個体の尾部断片からの頭部再生過程について、tyramide signal amplification (TSA) 法を用いて *Djpn8* の検出を蛍光で検出した。通常、*Djpn8* は体側および咽頭前部領域で帯状の発現が見られる(コントロール個体を参照)が、*Djmeck1(RNAi)* 個体では咽頭前部領域の帯状の発現が消失し、予定咽頭前部領域に咽頭が再生している。 E. 後端から咽頭までの尾部領域で発現している *Djwnt11-5* を、再生 3 日目のコントロール個体と *Djmeck1(RNAi)* 個体の尾部断片で検出した。 F. *Djmeck1(RNAi)* の機能阻害により生じた現象をまとめた、再生 3 日目の尾部断片の模式図。 A, C-F 左側が前方で、咽頭または咽頭原基はアスタリスクで示した。

Djmeck1 は ERK の活性化に関与している

Djmeck1(RNAi) 個体では咽頭前部領域が縮小しており(図 2-6)、この領域の ERK 活性が低下している可能性が示唆された。そこで、*Djmeck1* が ERK の活性化に関与しているかを調べるため、咽頭が前方に移動して再生しない程度の RNAi の条件(feeding RNAi のみ。”実験材料と方法”参照)で機能阻害を行った。尾部断片からの頭部再生過程では 2 本に分かれていた腸管が断片前方部で融合するような様子が観察され(Forsthoefel et al., 2011; Hosoda et al., 2016)、再生 7 日目では咽頭前部領域で 1 本の腸管になる。咽頭前部領域における腸管融合には ERK 活性が必要であり、ERK 活性の低下は腸管融合不全を引き起こす(Umesono et al., 2013)。*Djmeck1* を機能阻害することにより、尾部断片の咽頭前部領域において腸管融合不全が生じた(図 2-7 A)。さらに、この腸管融合不全は pERK の脱リン酸化酵素である *DjmkpA* の機能阻害を組み合わせることで回復した(図 2-7 A)。このことから、*Djmeck1* の RNAi により ERK 活性が低下している可能性が示唆された。

Djmeck1 の pERK 活性への影響をさらに調べるために、*DjmkpA* の発現解析を行った。*DjmkpA* は pERK 活性に応答して発現する。*Djmeck1* を RNAi した再生 3 日目の尾部断片では、コントロール個体に比べて *DjmkpA* の発現が断片全体で低下していた(図 2-7 B)。さらに、断片を四分割した組織片から抽出した RNA を用いて qRT-PCR を行い、発現量を確認したところ、*Djmeck1(RNAi)* 個体では後方端の領域を除いて全体的に *DjmkpA* の発現が有意に減少しており(図 2-7 D)、このことから再生体で pERK 活性が低下していることが示唆された。

これらの結果より、*Djmeck1* が再生時の ERK の活性化に関与していることが示唆された。

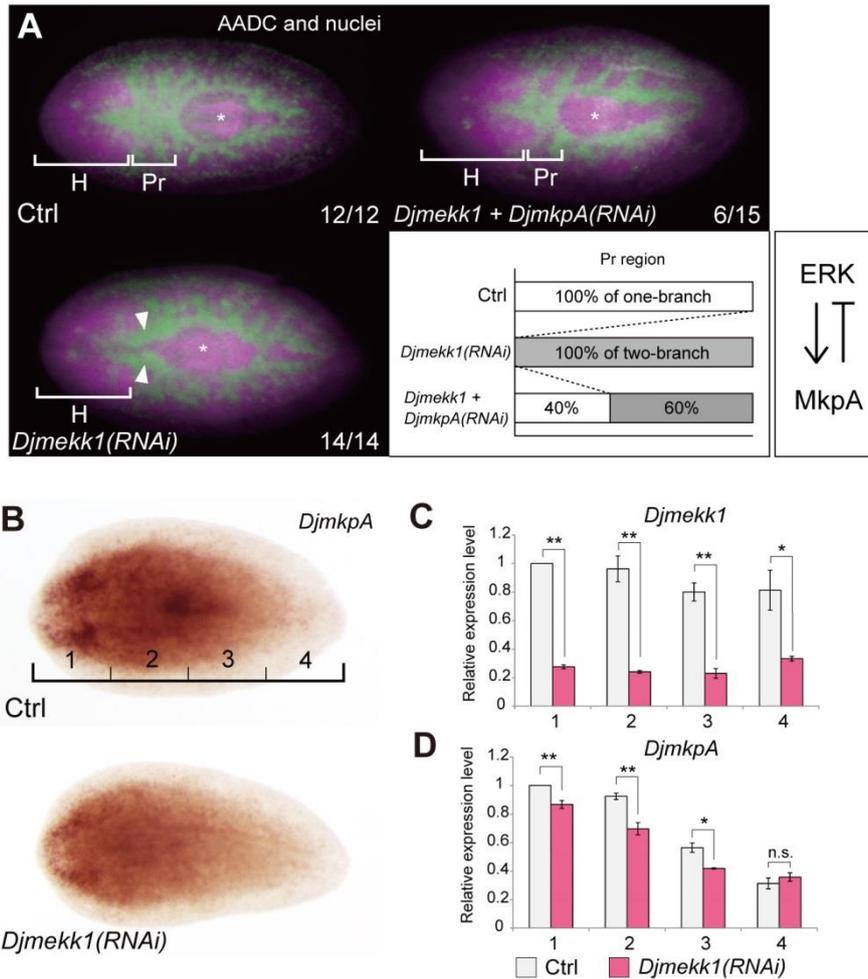


図 2-7 *Djmekk1*は ERK の活性化に関与している

A. 再生 7 日目の尾部断片の頭部再生過程。尾部断片は Hoechst 33342 で核が染色され(マゼンタ)、抗-AADC 抗体で蛍光免疫染色することで腸管が染色(緑色)されており、コントロール個体では咽頭前部(Pr)領域の腸管が融合して 1 本になっている様子が観察される(左上)。一方で、feeding RNAi のみで機能阻害した *Djmekk1*(RNAi)個体は腸管融合不全を示している(左下)。この表現型は *DjmkpA* の機能阻害を組み合わせることによりレスキューされた(右上)。左側が前方であり、咽頭はアスタリスクで示した。B. コントロール個体と *Djmekk1*(RNAi)個体の再生 3 日目の尾部断片について、*DjmkpA* の遺伝子を検出した。*Djmekk1*(RNAi)個体ではコントロール個体に比べて再生体全体の発現が低下している。左側が前方である。C, D 再生 3 日目のコントロール個体と *Djmekk1*(RNAi)個体の尾部断片を、(B)のコントロール個体中に示したように四分割して、それぞれの小片について RNA を抽出し、*Djmekk1*(C)、*DjmkpA*(D)の相対的発現量を qRT-PCR により調べた。グラフのエラーバーは 3 回の独立の実験から計算した標準誤差を示しており、1 回の実験には 10 個体の再生体から切り出した小片より総 RNA を抽出している。t 検定結果は* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ を示す。

Djmeck1 の機能阻害は異所的な β -catenin シグナル活性を引き起こす

Djmeck1 の機能阻害で pERK 活性が低下していることが示唆されたが、*Djmeck1* の機能阻害による表現型は、単純な pERK 活性の低下による表現型とは大きく異なっている。今までに報告のある pERK 活性の低下は、組織の形成不全をもたらすものであった。例えば U0126 処理や *DjrafA* 機能阻害などによる ERK 活性の低下では、咽頭が前に移動して再生することはなく、ただ咽頭形成不全を引き起こす(図 2-6C)。一方で *Djmeck1* を機能阻害した個体ではすべての個体で咽頭原基形成が観察された(100%, n = 109)。このことから、*Djmeck1* の機能阻害により咽頭が前方に移動して再生する現象には pERK 活性低下以外の他の要因も関与していることが考えられる。

プラナリアの β -catenin は再生時の後方極性決定に必要な因子である。序説で述べたように、Umesono らの先行研究から、 β -catenin シグナル活性が極性決定以外にも断片内の後方領域の形成そのものに関与している可能性が強く示唆されている。さらに後方化シグナルである β -catenin シグナルは前方化シグナルである ERK シグナルと協調して、咽頭部の領域が形成されると考えられている。

これらの点を踏まえて、*Djmeck1* の機能阻害による表現型を考えるうえで β -catenin シグナルに着目し、*Djmeck1* の機能阻害では、 β -catenin シグナルが前方で異所的に活性化されるために咽頭が前方に移動して再生したのではないかと考えた。

そこで、 β -catenin シグナルの活性が変化しているかどうかを検出するために、*DjFoxA* という遺伝子の発現を調べた。*DjFoxA* は pERK シグナル、 β -catenin シグナルの両シグナルによって発現が制御されており、この遺伝子の発現は β -catenin シグナル活性を反映している(Umesono et al., 2013)。再生 3 日目の尾部断片において、*Djmeck1(RNAi)* 個体はコントロール個体に比べて前方に移動した *DjFoxA* の発現を示した(図 2-8 A, B)。qRT-PCR により再生体における *DjFoxA* の発現分布を調べると、*Djmeck1(RNAi)* 個体では前方領域における *DjFoxA* の発現がコントロール個体に比べて有意に高く(図 2-8 C)、*Djmeck1(RNAi)*

個体は前方に移動した *DjFoxA* の発現を示すことが確かめられた。これらの結果から、*Djmekkk1* の機能阻害は、尾部断片の前方に異所的な β -catenin 活性化を引き起こしていることが示唆された。

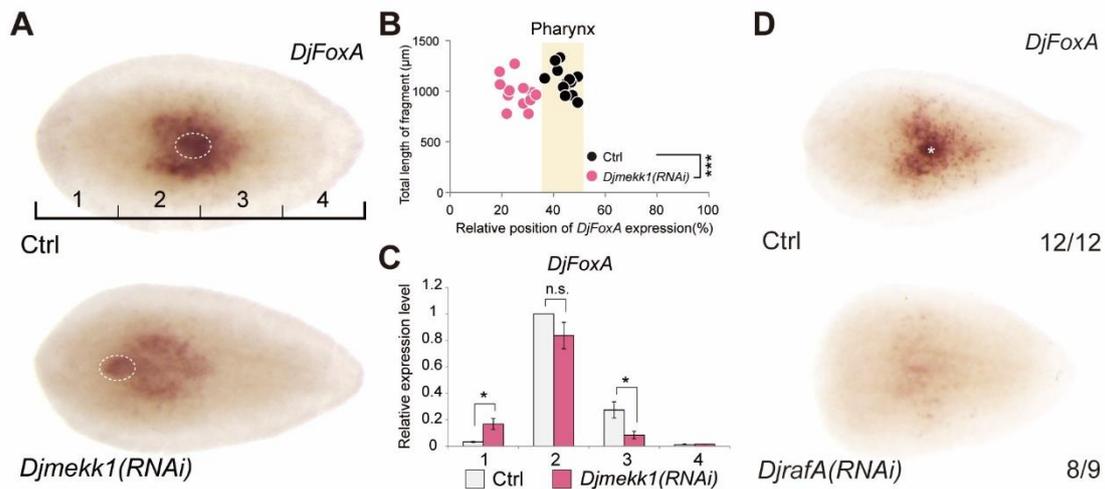


図 2-8 *Djmekkk1* の機能阻害により、*DjFoxA* の発現位置が前方に移動する。

A. 再生 3 日目のコントロール個体および *Djmekkk1(RNAi)* 個体の尾部断片について *DjFoxA* の発現を検出した。白破線の楕円は咽頭原基における *DjFoxA* の発現を示している。

B. (A) で検出された咽頭原基における *DjFoxA* の発現が、断片全体と比較してどの位置に局在しているかを定量的に解析した。横軸は断片の全長を 100% として、相対的な体の位置を示しており、縦軸は断片の全長を示している。コントロール個体 (n = 13) では $44.5 \pm 0.95\%$ (s.e.m.)、*Djmekkk1(RNAi)* 個体 (n = 12) では $26.1 \pm 1.4\%$ (s.e.m.) の位置で咽頭原基における *DjFoxA* の発現が検出された。

C. 再生 3 日目のコントロール個体及び *Djmekkk1(RNAi)* 個体の尾部断片を四分分割して、*DjFoxA* の相対的発現量を qRT-PCR により解析した (方法は (A) および図 2-7 B-D 参照)。*Djmekkk1(RNAi)* 個体において「領域 1」での相対的な発現量が上昇しており (反対に「領域 3」での発現は低下している)、(A)、(B) と同様に *DjFoxA* の発現が前方に移動したことを示している。

D. 再生 3 日目のコントロール個体および *DjrafA(RNAi)* 個体の尾部断片について、*DjFoxA* の発現を検出した。コントロール個体では咽頭原基での発現 (アスタリスクで示した) および咽頭原基周囲で *DjFoxA* の発現が見られるが、*DjrafA(RNAi)* 個体では咽頭原基及びその周囲の発現が低下し、ほとんど検出できなくなっている。A, D 左側が前方である。B, C t 検定結果は * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ を示す。

β -catenin シグナルの増強は *Djmeck1* 機能阻害の表現型を亢進する

Djmeck1 の働きと β -catenin 活性の関係を調べるために、RNAi の組み合わせ実験を行った。*Djmeck1*(RNAi)個体では前方に移動した咽頭再生を示す(図 2-9 右上)が、これに *β -catenin*BRNAi を組み合わせることによって咽頭形成が不全となった(図 2-9 左下)。このことは、前方に移動して再生する咽頭の *β -catenin* 要求性を示している。さらに、 β -catenin をリン酸化することで分解を促し、 β -catenin シグナル経路に対して負に働く *APC*(*DjAPC*) の RNAi を *Djmeck1* の RNAi と組み合わせた。このダブルノックダウンを行った尾部断片は、*DjAPC* の機能阻害の効果により小さい頭部を形成したが、一方で咽頭前部領域は極度に退縮し、*Djmeck1* の単独の機能阻害よりも断片全体としてさらに前方へ咽頭が移動して再生した(図 2-9 右下)。これは、*Djmeck1* の機能阻害にさらに *DjAPC* の機能阻害が組み合わさることで β -catenin 活性が過剰に増強されたためと考えられ、*Djmeck1* が制御する咽頭形成に β -catenin シグナルが関与していることを示唆するものである。

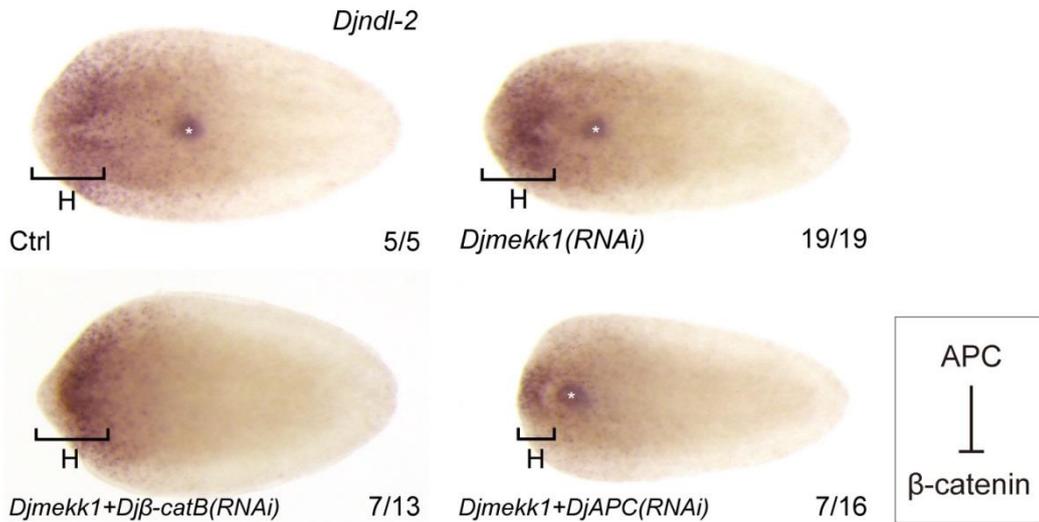


図 2-9 *Djmekk1* の機能阻害の効果は、 β -catenin シグナルを増大することで亢進する再生 3 日目の尾部断片からの頭部再生過程について、*Djndl-2* 遺伝子を検出した。*Djmekk1* と *DjAPC* のダブルノックダウンを行った個体で頭部(H)領域が小さくなっているのは、*DjAPC* RNAi により頭部再生芽における ERK の活性が低下したためである(Umesono et al., 2013)。*Djmekk1* RNAi に *Djβ-cateninB* の RNAi を組み合わせると、前方にシフトして再生する咽頭原基が消失した(左下)。また、*Djmekk1* と *DjAPC* のダブルノックダウンでは、咽頭前部領域が極端に小さくなるといった現象が観察され、結果として、咽頭原基は断片全体からすると著しく前方に移動して再生した。左側が前方で、咽頭原基はアスタリスクで示した。

Djmeck1 の機能阻害により、胴部断片の咽頭前部領域に異所的な咽頭が形成される

Djmeck1 を機能阻害して、*Djndl-2* を検出した胴部断片において、いくつかの断片で咽頭と頭部再生芽の間(すなわち咽頭前部領域)に *Djndl-2* の発現が観察された(図 2-10 A, 中央)。また、このシグナルは *β-cateninB* の RNAi を組み合わせることにより消失し、発現に β -catenin 活性を要求していることが示唆された(図 2-10 A, 右)。

DjFoxA を検出した個体でも同様の位置に異所的な発現が観察され(図 2-10 B)、これらの結果から、*Djmeck1* を機能阻害することにより、胴部断片の咽頭前部領域において異所的な咽頭原基が形成されていることが示された。

加えて、頭部断片についても同様に観察を行ったが、目立って前方に移動して再生した咽頭、また 2 つの咽頭が再生してくる現象などは観察されなかった。

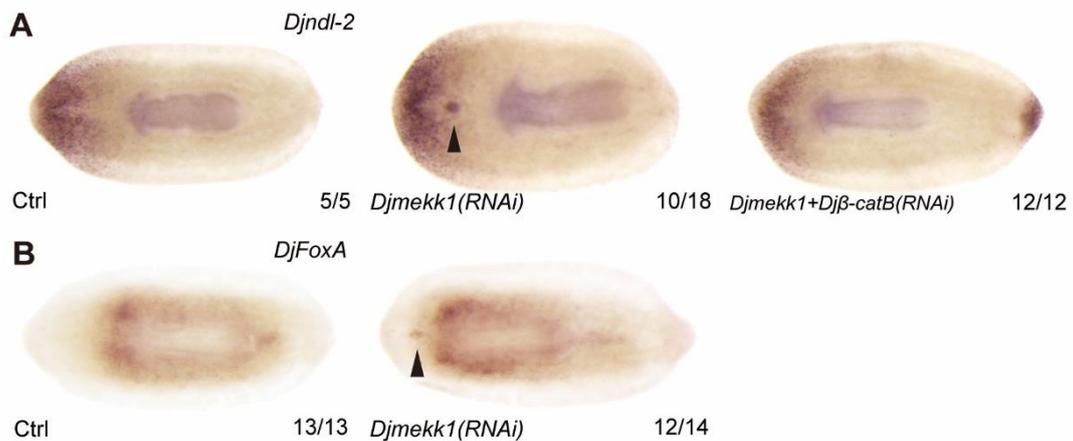


図 2-10 *Djmeck1* の機能阻害は胴部断片の咽頭前部領域において異所的な咽頭形成を誘導する

A. 再生 3 日目の胴部断片について、*Djndl-2* の発現を検出した。*Djmeck1(RNAi)* 個体(図の真ん中)では再生頭部と切断前から残っている咽頭の間領域に、コントロール個体では観察されないシグナルが検出された(矢じり)。このシグナルは *Djβ-cateninB* の RNAi を組み合わせることにより消失した。

B. 再生 3 日目のコントロール個体、*Djmeck1(RNAi)* 個体の胴部断片について *DjFoxA* の発現を検出したところ、*Djmeck1(RNAi)* 個体では *Djndl-2* を検出した時と同様に、再生頭部と切断前から残っている咽頭の間領域で異所的な *DjFoxA* の発現が検出された。

考察

プラナリアのスケーリングについて

再生3日目における尾部断片の頭部および咽頭部を定量的に解析することにより、プラナリアがプロポーションを保って再生するシステム、すなわちスケーリング能力を有していることが明らかになった。また本研究で示されたプラナリアのスケーリングを示す範囲は体長 500 μm から 2000 μm にもおよび(図 2-2 B, C)、これはショウジョウバエで示された 400 μm から 700 μm の範囲内での胚発生(Cheung et al., 2014)や、アフリカツメガエルの半胚(正常な胚に比べて 80%程度の大きさと推察される)(Inomata et al., 2013)と比べても、形態形成時のスケーリングとしては類を見ない結果となっており、プラナリアのプロポーション解析に対する有用性が示された。

適切なプロポーションを持った領域性を再生するためには、自己の断片がどのくらいの大きさを判別していなければならない。そのため、プラナリアは切断時に自己の断片の大きさを知覚する方法を有していることになる。一方で、*Djmek1* の機能阻害の結果より、*Djmek1 RNAi* は咽頭前部領域、咽頭部領域、尾部領域の割合に変化を及ぼしたが、頭部領域には影響を及ぼさなかった(図 2-6 A, B, D, F)ことから、プラナリアの頭部と頭部以外の領域では独立のプロポーション調節機構が働いていることが推察される。

Djmek1 の機能について

Djmek1 の機能阻害の結果より、*Djmek1* は咽頭前部領域の形成に必要な遺伝子であるといえる。それでは、*Djmek1* の機能は咽頭前部領域のみの運命決定に特化したものだろうか？この仮説に沿えば、咽頭前部領域を特異化する遺伝子を失って、予定咽頭前部領域の部位に咽頭部が形成したことになるが、だとすれば、本来の咽頭部形成に影響は及ぼさなはずであるから、再生体中に2つの咽頭が生じるか、大きな咽頭部領域が形成されるはずである。本研究ではどちらの表現型も観察されておらず、この仮説は棄却される。

咽頭形成過程においてはまだ不明な点が多いが、予定咽頭部や予定咽頭前部領域の細胞が頭部再生芽から移動してきて再生していると仮定して、*Djmekkk1* は咽頭部原基の細胞の移動に関与しており、*Djmekkk1* を機能阻害することによって、頭部再生芽からの咽頭部・咽頭前部領域の前駆細胞の移動が阻害されたのだろうか？しかし、胴部断片に生じた異所的な咽頭はこの仮説では説明できない。胴部断片の異所的な咽頭形成も含めて考えると、*Djmekkk1* の機能は再生体のパターンニングに関与していると類推される。

MEKK1 は脊椎動物で研究報告があるのみで、無脊椎動物での機能を示したのは本研究がはじめてである。脊椎動物の MEKK1 は ERK シグナル経路、JNK シグナル経路のどちらの経路も活性化しうる(Yujiri et al., 1998; Lu et al., 2002; Tu and Lee, 2003)が、JNK シグナル経路の活性化への寄与が大きいことが分かっている(Xia et al., 2007)。しかし、先行研究(Tasaki et al., 2011b)で示されたプラナリアにおける JNK の役割(創傷治癒、ネオブラストの細胞周期進行の促進)と照らし合わせると、DjMEKK1 が JNK シグナル経路を活性化しているとは考えにくい。腸管融合の結果や、*DjmcpA* の発現に *Djmekkk1* が関与していることから(図 2-7)、DjMEKK1 は ERK の活性化に関与していると考えられる。また一方で、 β -catenin シグナル下流で発現する *Djwnt11-5* の発現領域拡大(図 2-6 E)、*DjFoxA* の異所的な発現(図 2-8 A, B, C)、 *β -cateninB* と *APC* の組み合わせ RNAi の実験結果(図 2-9)から、*Djmekkk1* は断片の領域形成に必要な β -catenin シグナルに対し抑制的に働いていることが示唆される。

以上のことから、*Djmekkk1* の機能阻害で生じた尾部断片における前方に移動して再生した咽頭は、前方に増大した β -catenin シグナルと、機能阻害の結果低下した ERK シグナルの相互作用の結果生じたものと考えられる。また、胴部断片の咽頭前部領域に生じた異所的な咽頭(図 2-10)についても同様で、切断前から存在する咽頭領域の β -catenin シグナル範囲が増大し、また頭部再生芽として新しく形成された頭部から生じた ERK 活性勾配が、増大した β -catenin シグナルが働いている領域から供されたネオブラストに働きかけること

で、異所的な咽頭が生じたと考えられる。一方で、切断処理により頭部領域がそのまま残る頭部断片においては、機能阻害による表現型が生じなかったと解釈できる。

以上より、*Djmekkk1* は、プラナリアの再生時における領域形成に必要な ERK の活性化を促し、また β -catenin シグナルを抑制して、シグナルのバランスを取ることで、咽頭前部領域の形成や、その他咽頭部、尾部の正しい領域の再生位置を定めている遺伝子であると結論付けた。

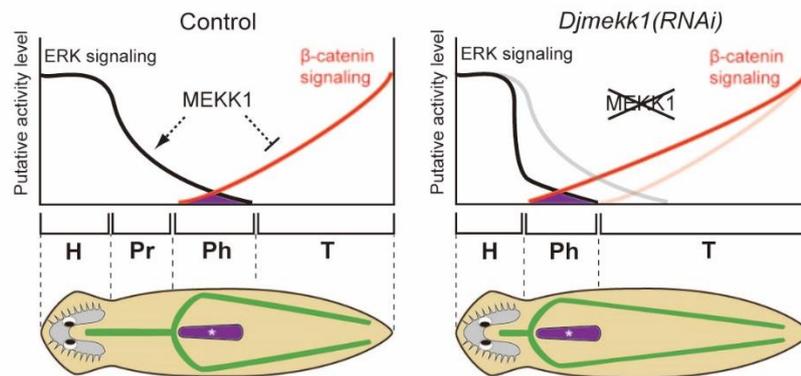


図 2-11 *Djmekkk1* 遺伝子の機能仮説モデル

DjMEKK1 は再生体の ERK シグナルを活性化し、反対に β -catenin シグナルを抑制するような機能を持ち、この機能によりプラナリアの正常な再生体では前方、後方のシグナルのバランスが取れて、適切な領域形成が可能になっている。*Djmekkk1* を機能阻害すると、ERK シグナルが低下し、 β -catenin が増大することでシグナルのバランスが崩れ、咽頭前部領域形成は不全になり、予定咽頭前部領域に咽頭が形成された。

DjMEKK1 はどういった因子を制御しているのか

Djmekkk1 は ERK シグナルを正に、 β -catenin シグナルを負に制御するといった 2 つの機能を持った遺伝子であることが示唆された。ではそれぞれのシグナルのどの因子に作用してシグナル活性を制御しているのだろうか。

まず、ERK シグナルにおける DjMEKK1 の標的因子についてだが、候補因子は第一章で同定した DjMEK-A である。DjMEK-A は再生時に ERK を活性化していることが示唆され、DjMEK-A/ERK シグナル経路がプラナリアの組織再生や領域形成主要な役割を果たしていることが考えられる。MAP3K ファミリーである DjMEKK1 は哺乳動物での解析で MEK をリン酸化することが示されているため、DjMEKK1 は DjMEK-A のリン酸化を介して咽頭前部領域形成に必要な ERK シグナルの活性化を行っているのではないかと予想される。これを確かめるために、同定した DjMEKK1 が DjMEK-A をリン酸化できるかを生化学的に解析しようと考えている。

次に、 β -catenin シグナル経路における DjMEKK1 の標的因子の候補だが、これは β -catenin シグナル経路にはいる全ての因子が候補になりうる。すなわち、Dj β -cateninB そのものや、TCF/LEF、Wnt リガンドの受容体である Fzl や Wnt 分子を特異的に分解している可能性がある。また、 β -catenin の分解を促進する APC や Axin、GSK3- β などの因子の活性を上昇させることや、転写因子の活性化により転写を介してタンパク質を増加させることでも β -catenin シグナルを負に制御することになる。いずれにせよ、タンパク質の結合アッセイや TOP-FLASH を用いた β -catenin シグナルの定量的な活性測定により、DjMEKK1 と β -catenin シグナル因子との関係性を明らかにしていきたいと考えている。

*Djmeck1(RNAi)*の表現型から推察できる前方化のシグナルについて

Djmeck1 の機能阻害により、再生体の前方に移動して咽頭が再生するという結果が得られた。特に顕著な表現型を示したものは、咽頭前部領域の領域性をほとんど失って、頭部にすぐ続いて咽頭部が形成されているように見える(図 2-6 A, D)。移植実験によっても操作することのできなかった頭部、咽頭前部、咽頭部の順(Kobayashi et al., 1999)を単一の遺伝子の機能阻害で変化させることができたのは特筆すべきことである。Kobayashi 等が行った移植実験では、頭部片を切り出して尾部領域に埋め込んで培養することで尾部領域に異所的な咽頭前部領域、咽頭領域の形成が観察された。このことから、頭部は咽頭前部領域、咽頭領域を形成する能力をもった物質を生産していることが示唆される。しかし、さらに Kobayashi 等は、咽頭前部領域を尾部断片に移植すると、移植片と尾部領域の間に咽頭部が形成されることも見出した。このことから、咽頭前部領域は単体で咽頭を誘導する能力をもった物質を生産していることが示唆された(図 2-12 A)。

Djmeck1 の機能阻害の実験結果は頭部領域に続いて咽頭部が再生したような個体が観察されており、この結果から、頭部領域が生産する咽頭前部領域誘導物質は咽頭を誘導する能力も有していると考えられる(図 2-12 B)。咽頭前部領域の移植実験の結果と照らし合わせると、咽頭前部が生産する咽頭を誘導する物質と、頭部が生産する咽頭前部を誘導する物質は同じ物質であると推察できる。

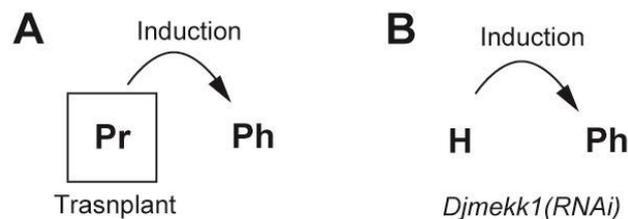


図 2-12 咽頭を誘導する物質の考察

A. 咽頭前部(Pr)領域を尾部領域に移植することで、咽頭(Ph)領域が異所的に形成されることから、咽頭前部領域に咽頭を誘導する因子が存在していることが示唆される。

B. *Djmeck1(RNAi)*個体では予定咽頭前部領域に咽頭を形成する個体が観察されることから、頭部(H)から生産される誘導物質は、咽頭(Ph)も誘導することが示唆される。

FGF リガンドを頭部に限局する働きがあると考えられている *nou-darake* 遺伝子を機能阻害すると、咽頭形成を促進することから(Umesono et al., 2013)、頭部、咽頭前部で生産される咽頭誘導物質は FGF であるのかもしれない。プラナリアの FGF についてはまだ謎に包まれており、その実態は明らかにされてない。しかし、この考えに基づくと、プラナリアの尾部断片からの頭部再生過程では位置に対応した ERK 活性が見られるが(図 2-7 D; Umesono et al., 2013)、この活性は、頭部や咽頭前部から分泌された FGF リガンドが作る濃度勾配に対応した、FGF の濃度依存的な活性勾配ととらえることができる。また *Djmekkk1* RNAi で ERK の活性勾配の傾きが急な低下を見せているが(図 2-7 D)、これは頭部から拡散する FGF リガンドに応答できる DjMEKK1 の量が低下したためと見なすことができる(もしくは *Djmekkk1* 自体が FGF の濃度勾配を形成するのに寄与しているのかもしれない)。この考えは、今までに提唱されている FGF/ERK シグナルと Wnt/ β -catenin シグナルのせめぎ合いで、咽頭前部領域、咽頭領域の運命が決定するという説と合致するものである(Umesono et al., 2013)。このことからプラナリアの FGF 分子の同定と機能解析が進めば、再生体の領域形成の分子機構の理解が飛躍的に進歩すると期待できる。

本研究では ERK を活性化する上流の Raf, MEK ホモログを同定した。また再生体の断片の長さなどを定量的に解析することにより、プラナリアの尾部断片がプロポーシオンを保って再生していることを発見した。さらに、今まで謎であった咽頭前部領域形成の分子機構について、領域形成に必要な *Djmekkk1* 遺伝子を同定し、この遺伝子が ERK シグナルと β -catenin シグナルを制御することで適切な位置に咽頭前部領域、咽頭領域を形成していることを示唆した。今後、本研究で同定した DjMEK-A や DjMEKK1 との関係性、*Djmekkk1* と β -catenin シグナル因子との関係性や、DjMEKK1 を活性化する上流の因子などを明らかにできれば、再生時の領域形成のためのシグナル制御の理解につながり、ついでには断片の大きさによらないプロポーシオンを一定に保つ仕組みの解明につながることを期待できる。

実験材料と方法

実験動物

本研究に用いたプラナリアは、岐阜の入間川から採取した 1 個体が無性生殖して増殖した個体、およびそれらの個体が有性生殖を行って生まれた個体のうち 1 個体が無性生殖して増殖した個体を用いた。プラナリアは TEK513 (TOTO)精製機で精製された水道水、または煮沸して冷ました水道水で、22°C~24°Cで飼育した。プラナリアの維持のために月に 2, 3 度ニワトリの肝臓を凍らせたものをその都度解凍して与え、実験に使用する際には 1 週間以上給餌しなかった個体を用いた。

二重鎖 RNA(dsRNA)合成

本研究の遺伝子の機能阻害には、dsRNA の個体への投与による RNA 干渉法を用いている。dsRNA 合成の鋳型として、まず阿形研究室の保有する *Dugesia japonica* の cDNA ライブラリ(pBlueScript SK (-) に cDNA の部分配列が組み込まれている)を、プロモーター配列を含むプライマーを用いて PCR によって増幅し、直鎖の DNA 断片を得た(ZAP linker + T7: 5'-GATCACTAATACGACTCACTATAGGGCTGCAGAATTCGGCACGAGG-3'; M13 + T3: 5'-GATCACATTAACCCTCACTAAAGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAA-3')。Djmek1 の dsRNA 合成の際は、コーディング配列(CDS)全長と 5' UTR, および 3' UTR を含む cDNA 配列を PCR によって増幅し(5'- CATAGTTTTGTGGAGAAAGTAGCTCAA -3'; 5'- CGAATGTCTAAACCTGGTATCAATAAA-3')、pCR 4Blunt-TOPO (Thermo Fisher Scientific) に導入した。作製した Djmek1 を含むベクターDNA を T7 プロモーター配列が付加された遺伝子特異的プライマーを用いて PCR によって増幅し(5'-GATCACTAATACGACTCACTATAGGGACTAAGTAACCCATACAGACCAA-3'; 5'-GATCACTAATACGACTCACTATAGGGCAGAAATGCACTGTAATGAGTAA-3')、直鎖状の DNA 断片を得た。

上記の行程で、標的遺伝子の CDS を含み、センス鎖 5'側、アンチセンス鎖 5'側の両側に

T7 配列を持つ直鎖の DNA が得られたので、これを鋳型として MEGAscript T7 Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて dsRNA を合成した。

鋳型の DNA 鎖と T7 polymerase を 37°C で 4 ~ 5 時間反応させた後、反応液の dsRNA を 65°C で 20 分間処理して変性させ、37°C で 40 分間保温して再会合させた。その後、Turbo DNase (Thermo Fisher Scientific), RNase T1 (Roche Diagnostic) 処理を 37°C で 1 時間行ってから、フェノールクロロホルム抽出を行い、イソプロパノールで沈殿させて、Nuclease-free water に溶解させた。得られた dsRNA を電気泳動によって確認してから、分光光度計を用いて濃度を測定し、2 ~ 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるように希釈して -30°C で保管した。

RNA 干渉法を用いた遺伝子の機能阻害

(Feeding RNAi) ニワトリのレバーと水を 1:1 の体積比で混ぜ、ミキサーでジュース状にしたもの(レバー溶液)を分注して -30°C で保管した。必要に応じてレバー溶液を解凍して 25 μl とり、10 μl の dsRNA 溶液(2 ~ 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)と、65°C で予め溶解させた 5 μl の 2% Agarose 溶液と混合し、5 ~ 10 μl の液滴に分注して -30°C で 1 時間冷凍した。この分量を 20 匹分とし、固まってペレット状になったものをプラナリアに与えて食べさせ、体内に dsRNA を取り込ませた。これを 1 回の RNAi につき 1 週間で 3 回行ってから、切断して再生体の観察を行った。コントロール個体には *EGFP* の dsRNA 溶液または滅菌水で作製したペレットを与えた。*DjrafA*, *DjrafB*, *DjmekA*, *DjmekB* の RNAi はすべてこの方法で行い、また *Djmek1* の RNAi に関しても、咽頭が前方に移動して再生せず、腸管の融合不全のみが観察される程度の RNAi ではこの方法を用いて機能阻害を行った。

(Feeding RNAi + injection RNAi) *Djmek1* の RNAi では feeding RNAi に加えて injection RNAi を行うことで RNAi の効果を促進した。行程としては、まず上記の通り feeding RNAi を行った後、Drummond Scientific nanoject injector (BroomaII)を用いて、個体の腸管に 2 ~ 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の dsRNA 溶液を 150 ~ 300 nl 注入し(注入量は個体の大きさに合わせる)、これを

3日間のうち2回行った。その後、プラナリアを切断して再生体の観察を行った。コントロール個体には *EGFP* の dsRNA 溶液または滅菌水を注入した。*Djmeck1* の機能阻害により咽頭が前方に移動して再生する表現型は、この方法を用いることで観察できた。また、*Djmeck1* の RNAi と *β-cateninB* の RNAi および *DjAPC* の RNAi を組み合わせる際には、feeding RNAi の際に *Djmeck1* のみの RNAi を行って、injection RNAi の際に、*β-cateninB* または *DjAPC* の dsRNA を *Djmeck1* の dsRNA と同時に注入した。

阻害剤処理による ERK シグナル経路の阻害

U0126(Cell Signaling Technology)を MEK 阻害剤として用いた。U0126 は Dimethyl sulfoxide (DMSO)に溶解し、10 mM の U0126 溶液を調製して、調製した U0126 溶液を 5 μM になるようにプラナリアの飼育水に加え、遮光して飼育した。コントロール個体には U0126 を加えた量と同じ量の DMSO を飼育水に加えた。

DIG RNA プローブ合成

阿形研究室の保有する *Dugesia japonica* の cDNA ライブラリ(pBlueScript SK (-) に cDNA の部分配列が組み込まれている)を、プロモーター配列を含むプライマーを用いて PCR によって増幅し、直鎖の DNA 断片を得た (ZAP linker + T7: 5'-GATCACTAATACGACTCACTATAGGGCTGCAGAATTCGGCACGAGG-3'; M13 + T3: 5'-GATCACATTAACCCTCACTAAAGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAA-3')。これを鋳型にして、digoxigenin-11-UTP を含む溶液中で T3 RNA polymerase (Roche Diagnostic) と 37°C で 3 時間反応させ、digoxigenin 標識した antisense の RNA 鎖 (DIG RNA プローブ) を合成した。もしくは、CDS を含むプラスミド DNA を制限酵素で処理して直鎖化し、それを鋳型に T7 polymerase か T3 polymerase を用いて同様に DIG RNA プローブを合成した。

合成した DIG RNA プローブは電気泳動によって確認し、10 µg の yeast tRNA を加えてエタノール沈殿させ、51 µl の 2 nM DTT / Nuclease-free water に溶解した。これを DIG RNA プローブ溶液の原液として、10 倍希釈または 20 倍希釈したものを準備し、*in situ* hybridization には希釈液を用いた。

プラナリアの固定

再生体、または切断未処理のプラナリアを 9cm ディッシュなどに準備して、飼育水を除いてから直ちに 10 ~ 25 ml の 2% HCl を含む 5/8 Holtfreter 溶液(5/8 Holtfreter 溶液: 37.4 mM NaCl / 0.42 mM KCl / 0.57 mM CaCl₂ / 1.49 mM NaHCO₃)を加えてサンプルをチューブに移し、手で 5 分間激しく振とうした。振とう後、溶液を捨て、4% paraformaldehyde(PFA) / 5% メタノール / 5/8 Holtfreter 溶液 (4% PFA 溶液)を加えて、4°C で 90 分間振とうしてサンプルを固定した。固定後、100% メタノールと置換してから、次の実験行程を始めるまで-30°C でサンプルを保管した。

Relaxant solution を用いたプラナリアの固定

室温の 0.23 M HNO₃(※) / 25 mM MgSO₄ 溶液(Dawar, 1973)を 9cm ディッシュなどに 25 ml ほど移しておき(5 mm 以上の水深が必要)、そこに再生体、または切断未処理のプラナリアを 10 ~ 30cm の高さから 1 匹ずつ滴下した (図 4-1)。サンプルが真っ直ぐになったら直ちに回収してチューブに移し、手で 5 分間激しく振とうした。振とう後、溶液を捨て、4% PFA 溶液を加えて、4°C で 90 分間振とうしてサンプルを固定した。固定後、100% メタノールと置換してから、次の実験行程を始めるまで-30°C でサンプルを保管した。

(※) 比重 1.38 の 60 – 61% 硝酸を 850 µl とって、50 ml でメスアップすれば記載の濃度になる。

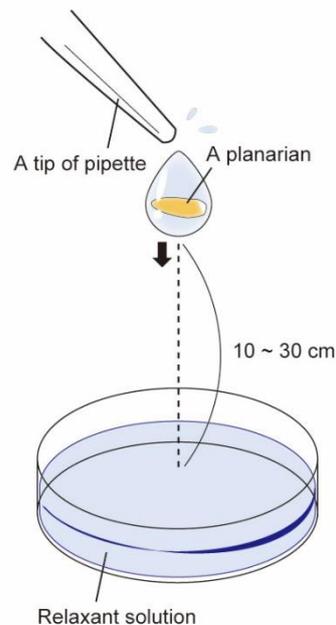


図 4-1 Relaxant solution を用いたプラナリアの固定

Whole mount *in situ* hybridization

固定したサンプルのメタノールを捨て、6% H_2O_2 を含むメタノールを加えて、蛍光灯下で 18 時間程度静置してサンプルを脱色した。脱色後に液を捨てて、キシレンとメタノールを 1:1 で混合した溶液を加えて、4°C で 30 分間振とうした。振とう後溶液を捨てて、100% メタノール、75% エタノール / 5/8 Holtfreter 溶液、50% エタノール / 5/8 Holtfreter 溶液、25% エタノール / 5/8 Holtfreter 溶液の順に液を交換し、それぞれ 4°C で 30 分間振とうした。次に、PBS-T(2.7 mM KCl / 8.1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ / 136.9 mM NaCl / 1.5 mM KH_2PO_4 / 0.1% Triton X-200, pH7.4)溶液を加えて、4°C で 30 分間、または 37°C で 30 分間振とうした。PBS-T 溶液を捨て、2 ~ 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ProteinaseK/ PBS-T 溶液中で、37°C で 10 ~ 15 分間反応させた(※)。溶液を捨てて、4% PFA 溶液を加え、4°C で 30 分間振とうし、固定した。次に、サンプルを PBS-T 溶液で 30 分間に 2, 3 回リンスした後、サンプルを 2 mL の丸底エッペンドルフチューブに移して、1 ml のハイブリダイゼーション溶液(50% formamide / 5 x SSC / 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ yeast tRNA / 100 U/ml heparin / 0.1% Tween-20 / 10 mM

DTT)と置換して 55°Cで 1 時間処理した(プレハイブリダイゼーション)。1 ml のハイブリダイゼーション溶液中に、希釈した DIG RNA プローブ溶液を 1 μ l 加えて、65°Cで 20 分間熱処理した後に、プレハイブリダイゼーションしたサンプルに溶液を加えて混合した。混合後、55°Cで 36 時間以上振とうした(ハイブリダイゼーション)。ハイブリダイゼーション後、50% formamide / 5 x SSC / 0.1% Tween-20 溶液により 55°Cで 30 分間の洗浄を 6 回行った。次に、bufferI (0.1 M maleic acid / 0.15 M NaCl / 0.1% Triton X-100, pH 7.5)で液交換して、bufferI で希釈した 1% blocking reagent 溶液(bufferII)中で 30 分間振とうしてブロッキングし、bufferII で 1/2000 に希釈したアルカリフォスファターゼ標識の抗 digoxigenin 抗体(Roche Diagnostic)と室温で 3 時間、もしくは 4°Cで 16 時間振とうして反応させた。反応後、bufferI で 30 分間の洗浄を 6 回行い、TMN 溶液 (0.1 M Tris-HCl (pH 9.5) / 0.1 M NaCl / 50 mM MgCl₂) と置換した。TMN 溶液中で 175 μ g/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphatase (BCIP) と 180 μ g/ml 4-nitro blue tetrazolium chloride (NBT) (Roche Diagnostics) を調整して、サンプルの発色を行った。呈色の様子を見て TE 溶液(10 mM Tris-HCl / 1 mM EDTA, pH 8.0)で反応を止めた。

Tyramide signal amplification (TSA)によって蛍光標識する場合には、抗体反応の際に、1% blocking reagent で 1/100 に希釈した Horseradish peroxidase(HRP)標識の抗 digoxigenin 抗体(Roche Diagnostic)と 4°Cで 16 時間振とうして反応させ、bufferI で洗浄を行った。次に、life technologies の提供する TSA Kit を用いて、企業のマニュアルに従って TSA 反応を行った。反応時間は 15 ~ 30 分間にとどめ、bufferI で洗浄することで反応を停止させた。

(※)ProteinaseK 溶液作製時からの経過時間、プラナリアの状態を考慮して使用濃度と処理時間を決めた。

ホールマウント免疫染色

抗リン酸化 ERK 抗体を反応させるサンプルについては、塩酸または硝酸ベースの酸液で振

とうした(「プラナリアの固定」の項目参照)のち、5/8 Holtfreter 溶液で1回洗浄した。次に、4% PFA 溶液 10 ml に対して1錠の PhosSTOP(Roche Diagnostics)を溶解させ、内在性のフォスファターゼの活性を阻害しながら 4°Cで 90 分間振とうして固定した。サンプルを固定後、6% H₂O₂ を含むメタノール溶液と液交換して、蛍光灯下で 18 時間程度静置してサンプルを脱色した。脱色後に液を捨てて、キシレンとメタノールを 1:1 で混合した溶液を加えて、4°Cで 30 分間振とうした。振とう後溶液を捨てて、100% メタノール、75% エタノール / 5/8 Holtfreter 溶液、50% エタノール / 5/8 Holtfreter 溶液、25% エタノール / 5/8 Holtfreter 溶液の順に液を交換し、それぞれ 4°Cで 30 分間振とうした。次に、PBS-T 溶液を加えて、4°Cで 30 分間、または 37°Cで 30 分間振とうした。PBS-T 溶液を捨て、2~15 µg/mL ProteinaseK/ PBS-T 溶液中で、37°Cで 10~15 分間反応させた(※)。溶液を捨てて、4% PFA 溶液を加え、4°Cで 30 分間振とうし、固定した。次に、サンプルを PBS-T 溶液で 30 分間に 2, 3 回リンスした後、サンプルを 2 mL の丸底エッペンドルフチューブに移して、2 ml のハイブリダイゼーション溶液と置換して 55°Cで 16 時間処理した。溶液を bufferI と置換した後、適切なブロッキング剤を加えて(抗 AADC 抗体の反応には bufferII、抗リン酸化 ERK 抗体の反応には Blocking One-P(ナカライテスク))、室温で 30 分間振とうした。ブロッキング後、マウス由来の抗 AADC 抗体(1/1000)や、ウサギ由来の抗リン酸化 ERK 抗体(1/1000)を 4°Cで 16 時間反応させた。その後、bufferI で 30 分間の洗浄を 6 回行い、一次抗体に抗 AADC 抗体を使った場合は、bufferII でブロッキング後 1/500 に希釈した Alexa488 標識抗マウス IgG 抗体を 4°Cで 16 時間反応させ、一次抗体に抗リン酸化 ERK 抗体を使った場合は、1% BSA / bufferI 溶液でブロッキング後、1/500 に希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ IgG 抗体を 4°Cで 16 時間反応させた。

アルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ IgG 抗体を反応させた後は、bufferI で 30 分間の洗浄を 6 回行い、detection buffer (100mM Tris-HCl / 100 mM NaCl / 10 mM MgCl₂, pH8.0)に置換後、detection buffer 1 ml に対して 10 mg/ml HNPP (Roche Diagnostics) を

10 μ l、 Fast Red TR solution (Roche Diagnostics) を 2 μ l の分量になるように加え、0.2 μ m のナイロンシリンジフィルターで濾過後、サンプルと反応させた。蛍光の様子をみて TE 溶液で反応を止めた。

(※)ProteinaseK 溶液作製時からの経過時間、プラナリアの状態を考慮して使用濃度と処理時間を決めた。

ImageJ を用いた画像解析

同じ倍率、露光時間、ゲインで撮影した免疫蛍光染色サンプルのデジタル画像(2720 x 2048 pixels)を蛍光強度の解析に用いた。再生 1 日目の胴部断片における頭部再生芽のリン酸化 ERK を蛍光色素 (HNPP/FastRed) で検出した画像では、ImageJ を用いて長方形の領域 (543 x 50 pixels; 543 pixels は今回の実験における 300 μ m に相当する) における濃淡値を測定した。測定の際は長方形の端を頭部再生芽の前端に合わせた。前後軸に沿った濃淡値の平均を計算し、シグナル強度プロファイルとしてプロットした。

個体または組織片からの RNA の抽出

目的の再生体全体または組織片から総 RNA を ISOGEN-LS(Nippon gene)を用いて抽出した。抽出した RNA 溶液の濃度を、分光光度計を用いて測定した。

cDNA は、Quantitect Reverse Transcription kit (QIAGEN)、または PrimeScript RT reagenet Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time) (TaKaRa)を使用して合成した。cDNA 合成の 1 回の反応には 500 ng の RNA を使用した。

定量的逆転写 PCR(qRT-PCR)による遺伝子の相対的発現量解析

定量的逆転写 PCR (qRT-PCR)では、Quantitect SYBR Green PCR Master Mix (QIAGEN) または SYBR *Premix Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus)と遺伝子特異的プライマー、cDNA を混合して反応させ、7900HT Sequence Detection system (Applied Biosystems) か

Thermal Cycler Dice Real Time System II (TaKaRa) によって、PCR による蛍光強度変化をリアルタイムで検出した。cDNA ソース間の値の差異の標準化には、*Djgapdh* の結果から取得したサイクル数を用いた。

Quantitect SYBR Green PCR Master Mix を用いた反応は

1. 50°C 2分
2. 95°C 15分
3. 95°C 15秒
4. 60°C(または 55°C) 30秒
5. 72°C 60秒

の順で進行し、3 から 5 を 40 サイクルで PCR 反応を行った(5 のときの蛍光強度を検出)。

SYBR *Premix Ex Taq* II を用いた反応は

1. 95°C 30秒
2. 95°C 5秒
3. 60°C 30秒

の順で進行し、2 と 3 を 40 サイクルで PCR 反応を行った(3 のときの蛍光強度を検出)。

各遺伝子の検出には、以下のプライマーセットを使用した。

DjrafA, 5'-TGGAATACTGATGCTGTGCGTGT-3'; 5'-GGACGTGATAAGCTCCCCAACAT-3'

DjrafB, 5' AATATTTCTGAGTGTGAAGGTAATTC TT 3'; 5' TACTGATTTGTATCTGACTTTTCAATGT 3'

DjmekA, 5'-ACA ACTCCACCATTTCTTTGCC-3'; 5'-CACCGGACCAATGGATGTTGAAG-3'

DjmekB, 5' GCAAATTGATGTTGTTTAAATTATAGGC 3'; 5' CATCTTGTAAGCTAATGCAGAAATTTTA 3'

DjerkA, 5'-GTGAAGGAGCTTATGGTCAAGTTGTAT-3'; 5'-TGTCCGCTTTATCGCAACATT-3'

DjmkpA, 5'-CACTGATATCTACTTCACGAAAGCCAG-3'; 5'-AAGGCATCCAGTTCATTTCTAAAT-3'

Djndk, 5'-TCACAACTCCACCGCAGTACTTT-3'; 5'-GGTATGGATTAGCATTATTGAATTGTG-3'

DjFoxA, 5'-AGCATGTCAGGTATCGCTGCA-3'; 5'-GGACTATCACTTCGACTCAAACCTAAATC-3'

DjpiwiA, 5'-CGAATCCGGGAACTGTCGTAG-3' 5'-GGAGCCATAGGTGAAATCTCATTTG-3'

Djpcna, 5'-ACCTATCGTGTCACTGTCTTTGACCGAAAA-3'; 5'-TTCATCATCTTCGATTTTCGGAGCCAGATA-3'

Djmc2, 5'-CGCTGTTGGACAAGGTCAGAAGAATGAACA-3'; 5'-CCAGAAACACAAATCTACATCTTCCAAAGG-3'

Djmek1, 5'-TACGCAAGCGTAACTGGTTCCAGAA-3'; 5'-CCATTACTCGGTGCTGTCTTTTCCC-3'

Djgapdh, 5'-ACCACCAACTGTTTAGCTCCCTTA-3'; 5'-GATGGTCCATCAACAGTCTTTTGC-3'

Contig	プライマー配列 (5' to 3')	プライマー配列 (5' to 3')
Dj_#1	AATGCCGGTTTCAATAAACATCTGG	CACTAGAAGCCCCAACAGGAGACAG
Dj_#2	TTGGCTTGGATAATTTGTGGAGCTT	ATCAAAAGACCCAGGCAATAAAGCA
Dj_#3	GTGGCAAGCACAAGGAATAGGAACC	CCCCGGATATCCAAATCTGAAATCA
Dj_#4	GGTTGCGCGGAAGATAATGAATTGT	CATCAACCGTCGCAAGTTTCTTCAA
Dj_#5	AAGCATCTAATGCGATTTTCATGCAA	ATTTTCCGGGAGAGAAAGAGCAAGT
Dj_#6	AAAGAACATTCTTCAAATGAATCGTGC	TTAAAACCTTCTTCTCCTCCTGGGTGTT
Dj_#7	GCTGCCGTTTGATTGTTGTAATACG	TTAGTGAATTCGGTTCGACATCCAA
Dj_#8	AGTCCGATTTGCGAGAAATGAAACC	TTTACACCGGGGACCATCTTTGTT
Dj_#9	TTACCAGCTGCTTCAAATTGTCTGG	CGAATTTTATGCTGCAGCACAAGAT
Dj_#10	TTTGGTTTAGGTAAGGCTGGTAAGG	GCCCTCAAAATTAGAGCATGATTCT
Dj_#11	GGGCAAACGAACACTTGGTGTTATT	CCAATCTTTTTTGTGATCGGCATTT
Dj_#12	TGGTAATGGTGGGCAGAGACGAGAC	CGTCTTGTTGGCGTCTTCTGTCTCC
Dj_#13	CTACTGAACAACAAGAGACAGGCGAAGG	TCAATCCATTTAAAGAGTTCCCATTCCC
Dj_#14	ATGGAGGCAAAGGTTTCAGACAAGGT	GCTCGAAATCTGAGATGCTGTGGTC
Dj_#15	GGTCGGCCTATCATCTGAACATTCG	TCTGCAACAACCTGCCAACAGCAAAT
Dj_#16	TACCGGGTTGAGAGAAGAGCGTATG	CGGATCCAAGATTCCTCAGAGTTCA
Dj_#17	CCGATTAACCAGGGGGACAATATA	ATTCATGCTCGAGAATGGGTTGCTA
Dj_#18	TCTTGGAATTCTTGTGGGATTTGGA	GTCAAAATGGAAGTAGACGAGCCGA
Dj_#19	ATCAAACGAACACAGTTGTGTGCCA	CTAATAGAATCCGGTTTCGCTGGGAG
Dj_#20	TGAAATCAGAAATCGAAACCTCGGGA	ACGGAAACGGTACGATGAAACAGGA
Dj_#21	TCGATTGTTTCCCATGACTCCAAAT	GCATCAAGCCGAAAAAACTGAAAA
Dj_#22	TGTGGCAAAAACGACGATACAATGA	TGCTACCAACTCCAAGAATGTTCCGG
Dj_#23	ATTGCAACCTTTAACCAACCCATTA	ATAAAATCCAAAGGAAGTGCCAACA
Dj_#24	CAGATAATTGCCACCAGCCTCTACC	GGAAGAACTTGGACCGAAAGGTTT
Dj_#25	GAATCAGCACAAATGTCTGCGTTGT	TGTCCAATTTTACACGACTCTTCG
Dj_#26	ATTTCCATGCGAATCTTGTTCATTG	ATGCTTGAATGACGATTTGGTTGTC
Dj_#27	CGCTTTGGTTTTTTTTGAATTGCATG	GCATCATCTGCATTTGAAATTTTGGC
Dj_#28	AGTGTGACAAAATCATCAACCAAAACG	TGGGAAAGAAATTTTGACAAAACGAAT
Dj_#29	TCACACGGGCACTGAGACACGGG	GCACGCGGCATGGCTATGTCAGA

Dj_#30	GTCATCGAATCACACTTTGCGTTTG	TCGAAATGTGACCTGCAAAATCAAA
Dj_#31	TGAATTCACCACGAAACCCAAGAG	ATCGACAAGCATGAATCCGTTTTGG
Dj_#32	ATTACCGTTGCGTTTGTGGATTGG	ACTAGGAATGGGTGGCATTGGACTT
Dj_#33	CTTCTGGCCCATAACCAACCATCAC	GTAAAGCCGGATTTGCTGGAGATGA
Dj_#34	GAAGCAGAACAGTTGGCAGCACTTC	TGCTTCAATACTGTCTTTCCACGC
Dj_#35	TGGGATACAGCAGGTCAAGAACGAT	CCATTTCCCAATGCTATGAATGAA
Dj_#36	AGATGCCGCTTTATGTAAACAGTGC	TGTGCTATAATTCGTGGTACGGGA
Dj_#37	GTTACAGATTCATGCGGTTGGCAAT	AAGCGTTGAAAGCGAACCTACTTC
Dj_#38	AATGCGATCTACTGCCAATGGAAAG	TCTCTGGCTTTGAGGAATTCGCTAA
Dj_#39	GACCTTCACTACTCGGATGGGATTC	GAGATCATTGGGCGTCTGTTGTAA
Dj_#40	ATTGTAGATTTTTCCCGATGGTTGGAT	TATACGGGTGAATTTAAATCGTGGTGG
Dj_#41	GAGTGCCAACCAAAGATTGAGCATC	TCAAACCCGCGAATGTTTTTATCAC
Dj_#42	TGAATTTGCAAGCACCATCACATTG	CCTCGAACGACAACGTAGCAAATTG
Dj_#43	CACCCACCGAATCAAGAAAGAGC	TAACGGGTAACGGGGAATCAGTG
Dj_#44	CGCAACCGATTTTATCCTCAAATAT	AATCCAGCTCATCCACAGTCTTTTC
Dj_#45	ATTGGGCACAGATGGAGTCATGCTG	TTCCACGTGGATGATCTCTCGCATC
Dj_#46	GGGAAATTCGTTGTAAATCAATCG	CTGGCCCCGAATAATGCAATTATAC
Dj_#47	TGTGGTGGTGCCGTAGATGGTAGAG	ATTCGTGTTGGGGAACAAAATTGCT
Dj_#48	ACATCAGATTCTTCGGCAGCATAAT	TGTCCACCGGGCTTAGAATATTTAA
Dj_#49	GTGAGGAAATCGACGAAAAAAGAA	GAATTTACCACTGCCTTCATTGCT
Dj_#50	GACAAATTTCAATTGGAACCATCGG	ACATACGCATCGTATTCCAGTTGCA
Dj_#51	TGAACATGTTGGGCGTGAAGTGTCT	GGCCTCGGATTCAGGTTTTGGTACT
Dj_#52	ATCTCAGATTTTCAGCTTTAAGTCGCA	CTGTTGTTTTGCCTAAGCCTAACACTC
Dj_#53	ATTCACAACCTGCTACTGCATTGCAC	TAAGGTAGTTCACCAACGCCAGAAT
Dj_#54	CTCTAGAACCAGCTCCTGACATGGG	CGAAAAACGGTTCAGTAAAATCGAA
Dj_#55	CCAGCAACAGTGTGTTGTGGTTGAA	CTTCACAAGCCCCATCATCGAATTA
Dj_#56	TACGCAAGCGTAACTGGTTCCAGAA	CCATTACTCGGTGCTGTCTTTTCCC
(Djmekki)		
Dj_#57	AAAGTAACAAATCCAAAACCCCGTG	TTTGTGGGTAGATTAAAGCGCAATG
Dj_#58	ATCCCCTGTTTACGATGACTGCTC	ATGGATTGAGGTGGTATTTGCGTGT
Dj_#59	TGCCTCCTTCACTTGACAGACAATAC	CAAAAACCTCTGTTACCGGTCCAGT
Dj_#60	GGTGGAGGAAAAGTGTGGGTTTCAC	CGACTTGTGAAAACCGCTTCTCTCA
Dj_#61	GAACTGGACAGGATAACACCTTGTGAA	AAGTCCAGTTGATGTTGCAATTGATTC
Dj_#62	AATGACCATAACCATAACCGCTTG	CCTTCATCAACGGTTTTGGGTTGTA
Dj_#63	AGGAAAAGAAGCAAACCGAAAAAAA	ATCCACGAACAGGAGTTCTTTGTGA
Dj_#64	CGTCTAACAGAAAACCTGCCTTCGG	CAGCGCACTGAGGACCGTTATCATA

Dj_#65	TTGCCTTTGACGGGATAGAACATTT	CATCCATTTCGCCTATCGAGTACACA
Dj_#66	TGTGGGGGAGGTTTGTTAACAGAAC	TTTCTTGCGATCAGTTGCTGAAGAA
Dj_#67	TTACTTCTGTGGATTGCGAAGGTGC	ACGAAATACCGGCCCCAGTGTATAA
Dj_#68	TTTGCGGAATCCTGAGACAACATCA	TATCAGCTTTGAAATGGGCGGCTAC
Dj_#69	TTTGATTTTCCTTGCCTTTGATTTTC	TTGCTGGAATACTGCGAAGACTCTG
Dj_#70	TGAAAACGCTTTGGGAAATTATGGG	AAAGCAACATCAGCAGCCCCAGTAT
Dj_#71	TCCGGACGATTTGGTGGATCTAATT	AACTGGAACTGCTGAATTAACGGGG
Dj_#72	CTCTTCAGAAAAATGATTCCAGGCG	TCGCAAATGGACTTTCATCAACAAG
Dj_#73	GTGTAGAGATGATTTTGTGGATGACGAG	TCAATATTACTTCCACATCCACCATGAC
Dj_#74	GGTAAAGTCCATCAAGGCTACTTCCC	AATAGTTGTCCACGGATTCATCCTGA

参考文献

- Adler, C. E., Seidel, C. W., McKinney, S. A. and Sánchez Alvarado, A. (2014). Selective amputation of the pharynx identifies a FoxA-dependent regeneration program in planaria. *Elife* **3**, e02238.
- Agata, K., Saito, Y. and Nakajima, E. (2007). Unifying principles of regeneration I: Epimorphosis versus morphallaxis. *Dev Growth Differ* **49**, 73-78.
- Agata, K., Soejima, Y., Kato, K., Kobayashi, C., Umesono, Y. and Watanabe, K. (1998). Structure of the planarian central nervous system (CNS) revealed by neuronal cell markers. *Zoolog Sci* **15**, 433-440.
- Agata, K., Tanaka, T., Kobayashi, C., Kato, K. and Saitoh, Y. (2003). Intercalary regeneration in planarians. *Dev Dyn* **226**, 308-316.
- Agata, K. and Umesono, Y. (2008). Brain regeneration from pluripotent stem cells in planarian. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **363**, 2071-2078.
- Agata, K. and Watanabe, K. (1999). Molecular and cellular aspects of planarian regeneration. *Semin Cell Dev Biol* **10**, 377-383.
- Aksamitiene, E., Kholodenko, B. N., Kolch, W., Hoek, J. B. and Kiyatkin, A. (2010). PI3K/Akt-sensitive MEK-independent compensatory circuit of ERK activation in ER-positive PI3K-mutant T47D breast cancer cells. *Cell Signal* **22**, 1369-1378.
- Almuedo-Castillo, M., Crespo-Yanez, X., Crespo, X., Seebeck, F., Bartscherer, K., Salò, E. and Adell, T. (2014). JNK controls the onset of mitosis in planarian stem cells and triggers apoptotic cell death required for regeneration and remodeling. *PLoS Genet* **10**, e1004400.
- Arthur, J. S. and Ley, S. C. (2013). Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat Rev Immunol* **13**, 679-692.

- Auladell, C., Garcia-Valero, J. and Baguñá, J.** (1993). Ultrastructural localization of RNA in the chromatoid bodies of undifferentiated cells (neoblasts) in planarians by the RNase–gold complex technique. *J. Morphol.* **216**, 319–326.
- Bae, D. and Ceryak, S.** (2009). Raf-independent, PP2A-dependent MEK activation in response to ERK silencing. *Biochem Biophys Res Commun* **385**, 523-527.
- Baguñà, J.** (1976). Mitosis in the intact and regenerating planarian *Dugesia mediterranean*.sp. II. Mitotic studies during regeneration, and a possible mechanism of blastema formation. *J. Exp. Zool.* **195**, 65-79.
- Baguñá, J. and Romero, R.** (1981). Quantitative analysis of cell types during growth, degrowth and regeneration in the planarians *Dugesia mediterranea* and *Dugesia tigrina*. *Hydrobiologia* **84**, 181-194.
- Baguñá, J., Saló, E., and Auladell, C.** (1989). Regeneration and pattern formation in planarians III. Evidence that neoblasts are totipotent stem cells and the source of blastema cells. *Development* **107**, 77-86.
- Baljuls, A., Schmitz, W., Mueller, T., Zahedi, R. P., Sickmann, A., Hekman, M. and Rapp, U. R.** (2008). Positive regulation of A-RAF by phosphorylation of isoform-specific hinge segment and identification of novel phosphorylation sites. *J Biol Chem* **283**, 27239-27254.
- Ben-Zvi, D., Shilo, B. Z. and Barkai, N.** (2011). Scaling of morphogen gradients. *Curr Opin Genet Dev* **21**, 704-710.
- Cebrià, F., Kobayashi, C., Umesono, Y., Nakazawa, M., Mineta, K., Ikeo, K., Gojobori, T., Itoh, M., Taira, M., Sánchez Alvarado, A., et al.** (2002). FGFR-related gene *nou-darake* restricts brain tissues to the head region of planarians. *Nature* **419**, 620-624.
- Chang, F., Steelman, L. S., Lee, J. T., Shelton, J. G., Navolanic, P. M., Blalock, W. L.,**

- Franklin, R. A. and McCubrey, J. A.** (2003). Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia* **17**, 1263-1293.
- Cheung, D., Miles, C., Kreitman, M. and Ma, J.** (2014). Adaptation of the length scale and amplitude of the Bicoid gradient profile to achieve robust patterning in abnormally large *Drosophila melanogaster* embryos. *Development* **141**, 124-135.
- Child, C.M.** (1906). The Relation between Regulation and Fission in Planaria. *Biol. Bull.* **11**, 113-123.
- Chong, H., Lee, J. and Guan, K. L.** (2001). Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation. *EMBO J* **20**, 3716-3727.
- Cooke, J.** (1981). Scale of body pattern adjusts to available cell number in amphibian embryos. *Nature* **290**, 775-778.
- Dawar, B. L.** (1973). A combined relaxing agent and fixative for triclads (planarians). *Stain Technol* **48**, 93-94.
- Dorey, K. and Amaya, E.** (2010). FGF signalling: diverse roles during early vertebrate embryogenesis. *Development* **137**, 3731-3742.
- Forsthoefel, D. J., Park, A. E. and Newmark, P. A.** (2011). Stem cell-based growth, regeneration, and remodeling of the planarian intestine. *Dev Biol* **356**, 445-459.
- Gregor, T., Bialek, W., de Ruyter van Steveninck, R. R., Tank, D. W. and Wieschaus, E. F.** (2005). Diffusion and scaling during early embryonic pattern formation. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 18403-18407.
- Guo, T., Peters, A. H. and Newmark, P. A.** (2006). A Bruno-like gene is required for stem cell maintenance in planarians. *Dev Cell* **11**, 159-169.
- Gurley, K. A., Elliott, S. A., Simakov, O., Schmidt, H. A., Holstein, T. W. and Sánchez**

- Alvarado, A.** (2010). Expression of secreted Wnt pathway components reveals unexpected complexity of the planarian amputation response. *Dev Biol* **347**, 24-39.
- Gurley, K. A., Rink, J. C. and Sánchez Alvarado, A.** (2008). Beta-catenin defines head versus tail identity during planarian regeneration and homeostasis. *Science* **319**, 323-327.
- Hanks, S. K. and Quinn, A. M.** (1991). Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol* **200**, 38-62.
- Hay E. D. and Coward S. J.** (1975). Fine structure studies on the planarian, *Dugesia*. I. Nature of the "neoblast" and other cell types in noninjured worms. *J Ultrastruct Res.* **50**, 1-21
- Hayashi, T., Asami, M., Higuchi, S., Shibata, N. and Agata, K.** (2006). Isolation of planarian X-ray-sensitive stem cells by fluorescence-activated cell sorting. *Dev Growth Differ* **48**, 371-380.
- Hayashi, T., Motoishi, M., Yazawa, S., Itomi, K., Tanegashima, C., Nishimura, O., Agata, K. and Tarui, H.** (2011). A LIM-homeobox gene is required for differentiation of Wnt-expressing cells at the posterior end of the planarian body. *Development* **138**, 3679-3688.
- Hayashi, T., Shibata, N., Okumura, R., Kudome, T., Nishimura, O., Tarui, H. and Agata, K.** (2010). Single-cell gene profiling of planarian stem cells using fluorescent activated cell sorting and its "index sorting" function for stem cell research. *Dev Growth Differ* **52**, 131-144.
- Higuchi, S., Hayashi, T., Hori, I., Shibata, N., Sakamoto, H. and Agata, K.** (2007). Characterization and categorization of fluorescence activated cell sorted planarian stem

cells by ultrastructural analysis. *Dev Growth Differ* **49**, 571-581.

Hosoda K., Morimoto M., Motoishi M., Nishimura O., Agata K. and Umesono Y. (2016). A simple blood-feeding method for live imaging of gut tube remodeling in regenerating planarians. *Dev Growth Differ* **58** (Accepted)

Houchmandzadeh, B., Wieschaus, E. and Leibler, S. (2002). Establishment of developmental precision and proportions in the early *Drosophila* embryo. *Nature* **415**, 798-802.

Iglesias, M., Gomez-Skarmeta, J. L., Saló, E. and Adell, T. (2008). Silencing of *Smed-betacatenin1* generates radial-like hypercephalized planarians. *Development* **135**, 1215-1221.

Inomata, H., Shibata, T., Haraguchi, T. and Sasai, Y. (2013). Scaling of dorsal-ventral patterning by embryo size-dependent degradation of Spemann's organizer signals. *Cell* **153**, 1296-1311.

Johnson, G. L. and Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **298**, 1911-1912.

Kato, K., Orii, H., Watanabe, K. and Agata, K. (1999). The role of dorsoventral interaction in the onset of planarian regeneration. *Development* **126**, 1031-1040.

Kobayashi, C., Nogi, T., Watanabe, K. and Agata, K. (1999). Ectopic pharynxes arise by regional reorganization after anterior/posterior chimera in planarians. *Mech Dev* **89**, 25-34.

Kobayashi, C., Saito, Y., Ogawa, K. and Agata, K. (2007). Wnt signaling is required for antero-posterior patterning of the planarian brain. *Dev Biol* **306**, 714-724.

Koga, M., Nakashima, T., Matsuo, S., Takeya, R., Sumimoto, H., Sakai, M. and Kageura, H. (2012). High cell-autonomy of the anterior endomesoderm viewed in blastomere fate

shift during regulative development in the isolated right halves of four-cell stage *Xenopus* embryos. *Dev Growth Differ* **54**, 717-729.

Koinuma, S., Umesono, Y., Watanabe, K. and Agata, K. (2000). Planaria FoxA (HNF3) homologue is specifically expressed in the pharynx-forming cells. *Gene* **259**, 171-176.

Li, Z., Theus, M. H. and Wei, L. (2006). Role of ERK 1/2 signaling in neuronal differentiation of cultured embryonic stem cells. *Dev Growth Differ* **48**, 513-523.

Lu, Z., Xu, S., Joazeiro, C., Cobb, M. H. and Hunter, T. (2002). The PHD domain of MEKK1 acts as an E3 ubiquitin ligase and mediates ubiquitination and degradation of ERK1/2. *Mol Cell* **9**, 945-956.

Marusiak, A. A., Edwards, Z. C., Hugo, W., Trotter, E. W., Girotti, M. R., Stephenson, N. L., Kong, X., Gartside, M. G., Fawdar, S., Hudson, A., et al. (2014). Mixed lineage kinases activate MEK independently of RAF to mediate resistance to RAF inhibitors. *Nat Commun* **5**, 3901.

Morgan, T.H. (1898). Experimental studies of the regeneration of *Planaria maculate*. *Arch. Entwicklungsmech Org.* **7**, 364–397.

Morgan, T.H. (1900). Regeneration in Planarians. *Arch. Entwicklungsmech Org.* **10**, 58-119.

Morita, M. and Best, J. B. (1984). Electron microscopic studies of planarian regeneration. IV. Cell division of neoblasts in *Dugesia dorotocephala*. *J. Exp. Zool.* **229**, 425–436.

Newmark, P. A. and Sánchez Alvarado, A. (2000). Bromodeoxyuridine specifically labels the regenerative stem cells of planarians. *Dev Biol* **220**, 142-153.

Nishida, E. and Gotoh, Y. (1993). The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem Sci* **18**, 128-131.

Nishimura, O., Hosoda, K., Kawaguchi, E., Yazawa, S., Hayashi, T., Inoue, T., Umesono,

- Y. and Agata, K.** (2015). Unusually Large Number of Mutations in Asexually Reproducing Clonal Planarian *Dugesia japonica*. *PLoS One* **10**, e0143525.
- Odendall, C., Rolhion, N., Förster, A., Poh, J., Lamont, D. J., Liu, M., Freemont, P. S., Catling, A. D. and Holden, D. W.** (2012). The Salmonella kinase SteC targets the MAP kinase MEK to regulate the host actin cytoskeleton. *Cell Host Microbe* **12**, 657-668.
- Ogawa, K., Kobayashi, C., Hayashi, T., Orii, H., Watanabe, K. and Agata, K.** (2002a). Planarian fibroblast growth factor receptor homologs expressed in stem cells and cephalic ganglions. *Dev Growth Differ* **44**, 191-204.
- Onal, P., Grün, D., Adamidi, C., Rybak, A., Solana, J., Mastrobuoni, G., Wang, Y., Rahn, H. P., Chen, W., Kempa, S., et al.** (2012). Gene expression of pluripotency determinants is conserved between mammalian and planarian stem cells. *EMBO J* **31**, 2755-2769.
- PEDERSEN, K. J.** (1959). Cytological studies on the planarian neoblast. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **50**, 799-817.
- Petersen, C. P. and Reddien, P. W.** (2008). Smed-betacatenin-1 is required for anteroposterior blastema polarity in planarian regeneration. *Science* **319**, 327-330.
- Petersen, C. P. and Reddien, P. W.** (2009). A wound-induced Wnt expression program controls planarian regeneration polarity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 17061-17066.
- Reddien, P. W., Oviedo, N. J., Jennings, J. R., Jenkin, J. C. and Sánchez Alvarado, A.** (2005). SMEDWI-2 is a PIWI-like protein that regulates planarian stem cells. *Science* **310**, 1327-1330.
- Reuter, H., März, M., Vogg, M. C., Eccles, D., Grífol-Boldú, L., Wehner, D., Owlarn, S., Adell, T., Weidinger, G. and Bartscherer, K.** (2015). B-catenin-dependent control of positional information along the AP body axis in planarians involves a teashirt family member. *Cell Rep* **10**, 253-265.

- Rink, J. C., Gurley, K. A., Elliott, S. A. and Sánchez Alvarado, A.** (2009). Planarian Hh signaling regulates regeneration polarity and links Hh pathway evolution to cilia. *Science* **326**, 1406-1410.
- Roskoski, R.** (2010). RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* **399**, 313-317.
- Roskoski, R.** (2012). MEK1/2 dual-specificity protein kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* **417**, 5-10.
- Rouhana, L., Shibata, N., Nishimura, O. and Agata, K.** (2010). Different requirements for conserved post-transcriptional regulators in planarian regeneration and stem cell maintenance. *Dev Biol* **341**, 429-443.
- Réaumur, R.A.F.** (1712). Sur les diverses reproductions qui se font dans les Ecrevisse, les Omars, les Crabes, etc. et entr'autres sur celles de leurs Jambes et de leurs Ecailles". *Mem. Acad. Roy. Sci.*, 223-245.
- Salvetti, A., Rossi, L., Deri, P. and Batistoni, R.** (2000). An MCM2-related gene is expressed in proliferating cells of intact and regenerating planarians. *Dev Dyn* **218**, 603-614.
- Scimone, M. L., Lapan, S. W. and Reddien, P. W.** (2014). A forkhead transcription factor is wound-induced at the planarian midline and required for anterior pole regeneration. *PLoS Genet* **10**, e1003999.
- Shibata, N., Umesono, Y., Orii, H., Sakurai, T., Watanabe, K. and Agata, K.** (1999). Expression of vasa(vas)-related genes in germline cells and totipotent somatic stem cells of planarians. *Dev Biol* **206**, 73-87.
- Shaw, G.** (1791) Description of the *Hirudo viridis*, a new English Leech. *Trans. Linn. Soc. Lond. (Zool.)* **1**, 93-5.

- Simard, F. A., Cloutier, A., Ear, T., Vardhan, H. and McDonald, P. P.** (2015). MEK-independent ERK activation in human neutrophils and its impact on functional responses. *J Leukoc Biol* **98**, 565-573.
- Spallanzani, L.** (1768). *Prodromo di un'opera da imprimersi sopra le riproduzioni animali dato in luce dall'abate Spallanzani*. Modena: Nella stamperia di Giovanni Montanari.
- Sureda-Gómez, M., Pascual-Carreras, E. and Adell, T.** (2015). Posterior Wnts Have Distinct Roles in Specification and Patterning of the Planarian Posterior Region. *Int J Mol Sci* **16**, 26543-26554.
- Sánchez Alvarado, A. and Newmark, P. A.** (1999). Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5049-5054.
- Tasaki, J., Shibata, N., Sakurai, T., Agata, K. and Umesono, Y.** (2011a). Role of c-Jun N-terminal kinase activation in blastema formation during planarian regeneration. *Dev Growth Differ* **53**, 389-400.
- Tasaki, J., Shibata, N., Nishimura, O., Itomi, K., Tabata, Y., Son, F., Suzuki, N., Araki, R., Abe, M., Agata, K., et al.** (2011b). ERK signaling controls blastema cell differentiation during planarian regeneration. *Development* **138**, 2417-2427.
- Tejada-Romero, B., Carter, J. M., Mihaylova, Y., Neumann, B. and Aboobaker, A. A.** (2015). JNK signalling is necessary for a Wnt- and stem cell-dependent regeneration programme. *Development* **142**, 2413-2424.
- Trembrey, A.** (1744). *Memoires, pour servtr a l'histoire d'un genre de polypes d'eau dance, a bras en forme de cornes*.
- Tu, Z. and Lee, F. S.** (2003). Subdomain VIII is a specificity-determining region in

MEKK1. *J Biol Chem* **278**, 48498-48505.

Umesono, Y., Tasaki, J., Nishimura, Y., Hroudá, M., Kawaguchi, E., Yazawa, S., Nishimura, O., Hosoda, K., Inoue, T. and Agata, K. (2013). The molecular logic for planarian regeneration along the anterior-posterior axis. *Nature* **500**, 73-76.

Umesono, Y., Watanabe, K. and Agata, K. (1997). A planarian orthopedia homolog is specifically expressed in the branch region of both the mature and regenerating brain. *Dev Growth Differ* **39**, 723-727.

Wagner, D. E., Wang, I. E. and Reddien, P. W. (2011). Clonogenic neoblasts are pluripotent adult stem cells that underlie planarian regeneration. *Science* **332**, 811-816.

Wen-Sheng, W. (2006). Protein kinase C alpha trigger Ras and Raf-independent MEK/ERK activation for TPA-induced growth inhibition of human hepatoma cell HepG2. *Cancer Lett* **239**, 27-35.

Wolff, E. and Dubois, F. (1948) Sur la migration des cellules de régénération chez les Planaires. *Rev. Suisse Zool.* **55**, 218-227

Xia, Y., Wang, J., Xu, S., Johnson, G. L., Hunter, T. and Lu, Z. (2007). MEKK1 mediates the ubiquitination and degradation of c-Jun in response to osmotic stress. *Mol Cell Biol* **27**, 510-517.

Yazawa, S., Umesono, Y., Hayashi, T., Tarui, H. and Agata, K. (2009). Planarian Hedgehog/Patched establishes anterior-posterior polarity by regulating Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 22329-22334.

Yoshida-Kashikawa, M., Shibata, N., Takechi, K. and Agata, K. (2007). DjCBC-1, a conserved DEAD box RNA helicase of the RCK/p54/Me31B family, is a component of RNA-protein complexes in planarian stem cells and neurons. *Dev Dyn* **236**, 3436-3450.

Yujiri, T., Sather, S., Fanger, G. R. and Johnson, G. L. (1998). Role of MEKK1 in cell

survival and activation of JNK and ERK pathways defined by targeted gene disruption. *Science* **282**, 1911-1914.

Zhang, B. H. and Guan, K. L. (2000). Activation of B-Raf kinase requires phosphorylation of the conserved residues Thr598 and Ser601. *EMBO J* **19**, 5429-5439.

謝辞

本研究を遂行するにあたってご指導・ご鞭撻を賜りました京都大学大学院理学研究科・生物科学専攻分子発生学講座の阿形清和教授、ならびに兵庫県立大学大学院生命理学研究科・細胞制御学 I 講座の梅園良彦教授に厚く御礼申し上げます。

本研究遂行にあたって活用させていただきましたトランスクリプトーム解析において、次世代シーケンサーのシーケンスをしてくださいました、名古屋大学細胞生理学研究中心の矢澤重信博士に御礼申し上げます。また同じくトランスクリプトーム解析におけるトランスクリプトームデータのアセンブリをしてくださいました、理化学研究所・分子配列比較解析ユニットの西村理博士に御礼申し上げます。

本研究での発現解析に用いるプラスミドを供与していただきました、理化学研究所・バイオインフォマティクス研究開発ユニットの林哲太郎博士に御礼申し上げます。

京都大学大学院理学研究科・生物科学専攻分子発生学講座の中島エリザベス博士には論文投稿にあたって英文校正でたいへんお世話になりました。感謝申し上げます。

京都大学大学院理学研究科・生物科学専攻分子発生学講座の船山典子准教授、柴田典人博士、井上武博士には度々日常での細かい実験指導を賜り、本研究を進めるにあたって多大なご助言をいただきました。御礼申し上げます。また、同講座の研究室のみなさまには本研究を進めるうえで実験や研究内容に多くのご助言をいただき、感謝申し上げます。特に、下山せいら博士、鹿島誠博士、佐藤勇輝氏にはよく実験の相談に乗っていただきました。御礼申し上げます。

本研究での実験計画や結果の考察において多数のご助言を賜り、実験指導もしていただきました、兵庫県立大学大学院生命理学研究科・細胞制御学 I 講座の餅井真准教授、織井秀文助教授、また実験の補助をしてくださいました元石美奈子氏に御礼申し上げます。本研究における、血液によるプラナリアの腸管の可視化を用いた尾部断片の頭部再生過程のデータは同講座の森本瑞希氏が撮影したものを使用させていただきました。御礼申し上げます。また、同講座の研究室の皆様には本研究に対して多岐にわたるご助言をいただき、また大いに議論していただきました。感謝申し上げます。

最後に、本研究を進めるにあたり、上に述べました方々をはじめ数多くの方々にお世話になりました。お力を貸して下さった皆様に厚く御礼申し上げます。