

ヤマトヒメミミズ再生初期の幹細胞増殖に必要な新規遺伝子 *grimp* の

タンパク質機能解析

日大生産工（院） ○野口 翔太 日大生産工 野呂 知加子
北海道大学 柄内 新 北海道大学 武尾 真

1 背景と目的

近年、発生生物学および再生医学において、幹細胞研究に注目が集まっている。幹細胞とは、細胞分裂して自己複製をしつつ、分化した子孫細胞を生み出す細胞のことである。

再生には、付加再生と再編再生の2種類がある。付加再生とは失った部分のみを再生することであり、例としては、イモリが足を失った場合に切断面に組織幹細胞が集まり増殖分化することで、元と同じ組織を再生する現象が挙げられる。一方、再編再生はプラナリアなどに見られ、多能性をもつ幹細胞により、失った部分の補填だけでなく、体全体の構造の再調整が行われる現象である。

環形動物ヤマトヒメミミズ (*Enchytraeus japonensis*) は、比較的高度な組織構造を持ちながら体全体を再生する高い再生能力があり、再生研究のための新たなモデルとして注目されている。ヤマトヒメミミズは付加再生と再編再生の組み合わせにより再生する。各胴体節の隔膜付近に1対ずつ存在するネオブラストと呼ばれる幹細胞が、再生初期に分裂を開始し、再生芽の中胚葉形成に関わっている。他に外胚葉形成には

表皮の脱分化再生が、内胚葉形成には腸管細胞が関与することが、これまでの研究からわかっている。

Takeo¹⁾らの研究から、cDNA subtraction 法により、ヤマトヒメミミズの成長時と再生初期において発現が異なる5つの遺伝子が見つかった。その1つが *grimp* (gene required for initial mesodermal cell proliferation) と名づけられた新規遺伝子である。この遺伝子は再生初期（3-12 時間）にのみ、ネオブラストおよび再生芽において強い発現が確認された。RNA 干渉 (RNAi) により *grimp* 遺伝子発現を抑制すると、細胞増殖および再生芽の形成が阻害された。従って、*grimp* が再生初期において幹細胞ネオブラストとその子孫である中胚葉細胞の増殖に重要であることがわかった。*grimp* は、その構造から細胞接着分子様の機能が示唆されているが、詳細についてはまだ明らかになっていない。本研究は、タンパク質レベルで *grimp* の機能を明らかにし、*grimp* の再生開始機構および再生幹細胞増殖における役割を解明することを目的とする。

2 材料と方法

Protein functional analysis of *grimp*, a novel gene required for stem cell proliferation at an initial stage of regeneration in *Enchytraeus japonensis*

Syota NOGUTI, Chikako YOSHIDA-NORO, Sin TOCHINAI and Makoto TAKEO

これまでの研究により *grimp* 遺伝子は約 1093bp の長さで、そのうち実際にタンパク質に翻訳される領域 (Open reading frame) は 543bp と推定されている。またその配列からアミノ酸配列も推定されている。

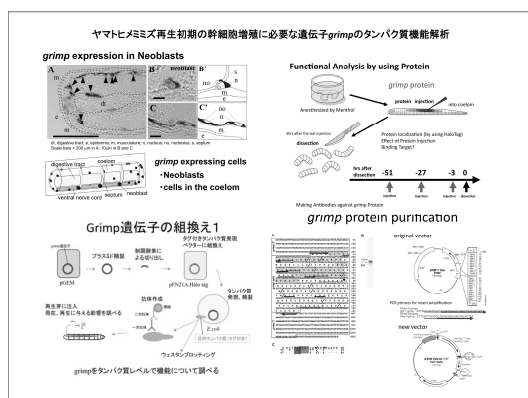


Fig 1. *grimp* 遺伝子タンパク機能解析

北海道大学より *grimp* 遺伝子を pGEM vector に導入された形で提供してもらったため、そこから制限酵素を用いて *grimp* 遺伝子を切り出した。続いて、切り出しをした *grimp* 遺伝子を HaloTag vector に挿入した。このベクターはプラスミドの特定部位に任意の遺伝子を導入させ、組換えタンパク質を誘導させると、目的タンパク質にタグを付加する特徴を持っている。大腸菌を、組変えたベクターにて形質転換させ、プラスミドを増幅精製した。この大腸菌にタンパク質発現を誘導し、菌を破碎、溶解後、HaloTag 結合レジンと目的タンパク質に付加された HaloTag タグの共有結合を利用して、組換えタンパク質の精製に臨んだ。

3 結果と考察

HaloTag vector への *grimp* 遺伝子導入は成功し、大腸菌を形質転換させることもできた。現在、効率よくタンパク質誘導および目的タンパク質の精製を行う方法を模索している。

今後の研究の進め方としては、タンパク質誘導・精製後、1) このタンパク質に対する抗体を作製する 2) 組換えタンパク質を再生芽に注入し、タグや抗体を利用してその局在を明らかにする 3) タンパク質注入の再生に対する影響を調べる 4) タンパク質注入の細胞増殖への影響を調べるために BrdU 取込み実験を行う を計画している。

4 参考文献

- 1) M. Lucila Scimone, et.al. Development doi:10.1242/dev.042051, 137, 1231-1241 (2010).
- 2) Chikako Yoshida, Noro and Shin Tochitani, Develop. Growth Differ. 52, 43-55 (2010)
- 3) Takeo M, et.al. Int. J. Dev. Biol. 54(1), 151-160. (2010)