ISSN 2186-5647

8-8

再生能力の高いモデル動物ヤマトヒメミミズに発現する遺伝子 *grimp* タンパク質の機能解析

日大生産工(院)　○関口　陽公
日大生産工　　野呂　知加子

1.諸言

近年、医療の分野において幹細胞という分裂して自分と同じ細胞を作る自己複製能と別の種類の細胞への分化能をもつ細胞が注目されている。

再生は生物の種類によって異なり、付加再生と再編再生の二種類がある。付加再生とは、失った部分のみを再生することで、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、再編再生は多能性をもつ幹細胞により、失った部分だけでなく体全体の構造の再調整が行われる現象で、プラナリアなどに見られる。

このような高い再生能力をもつ生物の再生機構を解明し、幹細胞分化の知見をより増やすことは、ヒトの幹細胞の分化誘導においても役立てることが考えられえており、研究がすすめられている。

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。(Fig1)。

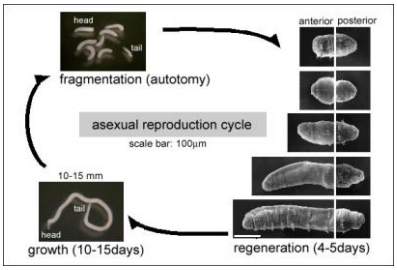

Fig1. ヤマトヒメミミズ無性生殖サイクル

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を行う。ネオブラストと呼ばれる幹細胞が再生の初期に分裂し、再生芽の中胚葉形成に関わっている。また、外胚葉の形成には表皮の脱分化再生が、内胚葉の形成には腸管細胞が関係することが先行研究から明らかになっている。

ヤマトヒメミミズの再生初期と成長期において、発現の異なる 5 つの遺伝子が発見されている。そのうちの一つが *grimp*（*gene required for initial mesodermal cell proliferation*）と名付けられた新規遺伝子である(Fig2)。

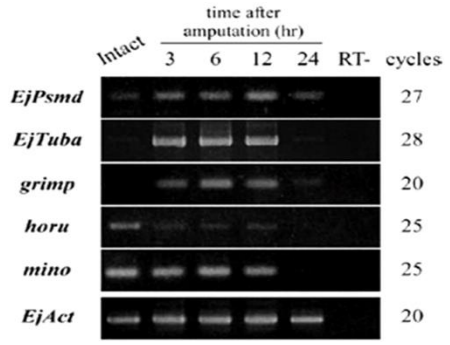

Fig2. 無傷と再生ミミズの切断後 3,6,12,24 時間後 RT-PCR によって示される遺伝子発現量 [1)]

この遺伝子は、ヤマトヒメミミズの断片化後 3-12 時間の再生初期にのみ、一時的にネオブラストと呼ばれる幹細胞および再生芽において強い発現が確認された遺伝子である。

先行研究から RNA 干渉法(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。 このとから、*grimp* が再生初期において、ネオブラスト(幹細胞)とその子孫である中胚葉性細胞の増殖に重要であることが示唆されている。

本研究は、再生における *grimp* タンパク質機能の解明を目的とし、抗体を用いた反応や

Functional analysis of gene grimp protein developing in a model animal　*Enchytraeus japonensis* having high ability to regenerate.

Takahito SEKIGUCHI and Chikako YOSHIDA-NORO.

再生能力の低い近縁種ヒメミミズとの比較解析などの手法により再生における *grimp* タンパク質の局在、機能、他のタンパク質との関係について詳細に解析することを目的とする。

2.材料と実験方法

*grimp*遺伝子のコーディング領域を挿入したpET6xHN-Cベクターを、宿主大腸菌に形質転換して培養を行った。IPTG誘導により*grimp*-Hisタンパク質を発現させ、His tagを利用してカラムによる精製を行い、SDS-PAGE電気泳動により目的タンパク質の発現を確認した(Fig3)。

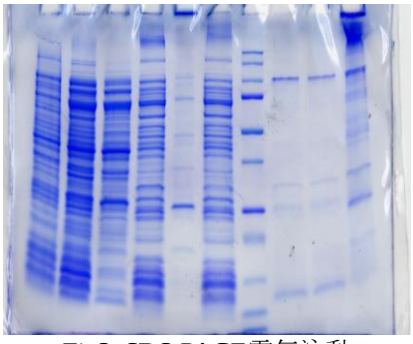

Fig3. SDS-PAGE電気泳動

抗His抗体によるウェスタンブロッティングにより確認した目的のバンドをゲルよりくり抜き、凍結保存した。これをオペロン社に送付して受託でウサギを免疫し、ポリクローナル抗体(*grimp*抗体とする)を得た。一方、*grimp*遺伝子の2カ所の塩基配列をもとに人工合成された*grimp*-peptideを用いて同様にウサギを免疫し、ポリクローナル抗体(*grimp*−peptide抗体とする)を得た。これらの抗体を用いて、免疫蛍光染色とウェスタンブロッティングを行った。

今回、ヤマトヒメミミズの比較対象として、近縁種ヒメミミズであるミサカヒメミミズ(*Enchytraeus buchholzi*)を使用した。このミミズにはネオブラストは存在せず、頭部再生はしないが、後部再生は可能である。

ヤマトヒメミミズとミサカヒメミミズをそれぞれ6時間、24時間再生させた断片とそれぞれの成体をサンプルとして、*grimp*抗体と*grimp*-peptide抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。また、ヤマトヒメミミズを6時間、12時間、24時間再生させた断片をサンプルとして、*grimp*抗体と*grimp*-peptide抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。

3.結果と考察

免疫蛍光染色の結果、ヤマトヒメミミズの6時間、24時間再生断片及びミサカヒメミミズの6時間、24時間再生のサンプルともに蛍光が確認された(Fig4)。

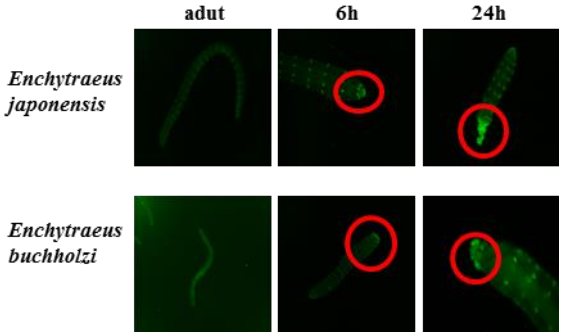

Fig4. *grimp*抗体による免疫蛍光染色

免疫蛍光染色の結果から、ヤマトヒメミミズだけでなくミサカヒメミミズにおいても*grimp*タンパク質の発現が示唆された。

また、ウェスタンブロッティングの結果、25kDa付近とより低分子の領域にバンドが確認された(Fig5)。

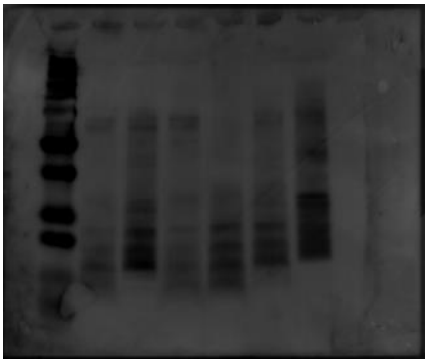

Fig5. *grimp*抗体によるウェスタンブロッティング

ウェスタンブロッティングの結果から、タンパク質プロセシングの結果が示唆された。今後、ミサカヒメミミズを用いたウェスタンブロッティングを行う予定である。

4.参考文献

MAKOTO TAKEO, CHIKAKO YOSHIDA-NORO and SHIN TOCHINAI. Functional analysis *grimp*, a novel gene required for mesodermal cell proliferation at an initial stage of regeneration in *Enchytraeus japonensis* (Enchytraeidae, Oligochaete). Int.J.Dev.Biol. (2010). 54(1), 151-160.