

## イモリは再生因子を赤血球で運んでいる!?

### ～血液の概念を変える新発見～

#### 研究成果のポイント

1. アカハライモリの包括的な遺伝子解析により、新奇遺伝子 *Newtic1* を同定し、これまで知られていなかった赤血球の不思議な行動を明らかにしました。
2. 成体イモリの肢再生過程では、赤血球が *Newtic1* タンパク質を発現し、再生中の組織に、特殊な細胞集合体となって様々な分泌因子を運び込むことを初めて明らかにしました。
3. これらの発見は、血液の概念を変える大きな成果であるとともに、イモリ赤血球成分の生理機能解明と医療応用につながる重要な成果です。

筑波大学生命環境系 千葉 親文 教授、中谷 敬 教授(当時)、八畑 謙介 講師、丸尾 文昭 助教、櫻井 啓輔 助教、同 生命環境科学研究科生物科学専攻 Roman M. Casco-Robles院生(D3、MEXT研究留学生)、宇都宮大学大学院工学研究科 外山 史 准教授、山形大学学術研究院 渡邊 明彦 教授、熊本大学大学院先端科学研究部(理学系) 江頭 恒 准教授、名古屋大学アイソトープ総合センター 竹島 一仁 准教授(当時)、北里大学医療衛生学部 小畑 秀一 准教授、立教大学理学部 木下 勉 教授、玉川大学農学部 有泉 高史 教授、日本獣医生命科学大学獣医学部 中田 友明 講師らの研究グループ(イモリネットワークNNNプロジェクトグループ)は、アカハライモリの遺伝子(mRNA)情報を網羅する新たなデータベースを独自に開発し、公開しました。

研究グループはこれを用いて、イモリが持つ高い再生能力を説明し得る新奇遺伝子を探索し、有尾両生類しか持っていない一つの遺伝子(*Newtic1*と名付けました)を発見しました。

さらに丹念な調査により、*Newtic1*タンパク質が発現している細胞は、一部の赤血球であることを突き止めました。さらに、*Newtic1*を発現する赤血球が、特殊な細胞集合体を形成して全身を循

環していることや、分泌因子の運び屋としてイモリの肢再生にかかわることを初めて明らかにしました。

- \* 本研究の成果は2018年5月10日付で*Scientific Reports*に公開されました。
- \* 本研究は、科学研究費補助金(221S0002;24240062)および筑波大学研究基盤支援プログラム(Bタイプ)によって実施されました。

## 研究の背景

イモリは、有尾両生類イモリ科 (*Salamandridae*) に属す少数の動物群です<sup>注1)</sup>。イモリの大きな特徴は、ヒトを含む四肢動物(4本足の脊椎動物)の中で、陸生期<sup>注2)</sup>にある成体としては唯一、体の様々な部分(body parts)を終分化体細胞<sup>3)</sup>の脱分化/リプログラミングにより再生できることです(千葉親文, 2018)。こうした例外的で高度なイモリの再生能力が、はたして、ヒトを含む脊椎動物が共通に持つ遺伝子の働きだけで説明できるのか、それともイモリ固有の遺伝子を考慮しなければならないかは、イモリの再生能力を理解し、ヒトの医療に応用しようとする生物医学研究にとって本質的な問題です。本研究では、アカハライモリの包括的な遺伝子解析により、イモリに固有の遺伝子を探索しました。

## 研究内容と成果

### 1) アカハライモリの包括的遺伝子データベースの構築と*Newtic1*遺伝子の発見

アカハライモリの遺伝子(mRNA)情報を網羅するデータベース‘TOTAL’を開発しました。ここには694,138本の塩基配列情報が含まれ、このうち他の生物の遺伝子と相同な配列は169,309本(36,742組)です。例えば、ヒトの90%以上の遺伝子と相同な塩基配列情報が含まれています。これらの情報は、イモリネットワークの遺伝子情報サイトIMORI (<http://antler.is.utsunomiya-u.ac.jp/imori/>)で公開しています。

この遺伝子情報を利用して、成体イモリの肢再生過程において、再生芽<sup>注4)</sup>の形成に伴って発現が増加するイモリ固有遺伝子を探索しました。その結果、名のない遺伝子がたった一つ残りました(これを*Newtic1*と名付けました)。*Newtic1*(1,512bp)は、40.7kDの膜タンパク質をコードする遺伝子であると予測されました。*Newtic1*は現時点で、様々な生物の最新の遺伝子データベースと照合した結果から、有尾両生類にしか見られない由来不明の遺伝子(オーファン遺伝子)という位置づけです。

### 2) *Newtic1*タンパク質は、一部の赤血球に発現する

*Newtic1*を発現する細胞が一体何なのか、*Newtic1*タンパク質を検出する抗体を作製して丹念に調べた結果、一部の赤血球であるという驚きの発見に至りました。成体イモリの赤血球は、脾臓で生産され、循環しながら成熟することが知られています。実際、アカハライモリの末梢血には、様々な発達段階の赤血球が観察されます。詳しく調べた結果、*Newtic1*は成熟途上にある赤血球(polychromatic normoblast: PcNob)に特異的に発現し、そのタンパク質はPcNobの縁(赤道面)に沿ってリング状に局在することが明らかになりました(参考図1)。しかも重要なことに、すべてのPcNobが*Newtic1*を発現するわけではありませんでした(平均するとPcNob全体のおよそ25%でした)。さらに詳しく調べた結果、PcNobにおける*Newtic1*の発現は、自身の酸素運搬能の発達とは独立に、すべての発達段階で、一部のPcNobにおいてのみプラスに制御されていることが分かりました。

### 3) *Newtic1*を発現する赤血球は、単球と複合体を形成して全身を循環している

成体イモリの正常な組織を調べた結果、太い血管内を流れる血液の中に、*Newtic1*を発現する(*Newtic1*陽性の)小さなPcNobの集合体を発見しました。*Newtic1*陽性のPcNobは必ず集合体を形成しており、単独のものは観察され

ませんでした。この集合体をerythrocyte clump (EryC)と名付けました。詳しい解析の結果、EryCは、正常血中では必ず単球(白血球の一種)と複合体を形成し、Newtic1を発現していない赤血球(複合体を形成しない単独の赤血球)とともに全身を循環していることが明らかになりました(参考図2;参考図4b)。複合体の最小単位は、PcNobが6-10個と単球が1-2個でした。

4) 肢再生過程では、切断部の赤血球が新たにNewtic1を発現し、集合体を形成しながら、成長する再生芽の先端部に集積する

成体イモリの前肢を切断し、その再生過程におけるNewtic1の発現様式を詳しく解析した結果、Newtic1は、切断部の傷口が閉じたころから、切断部の組織に存在する毛細血管中のPcNobに徐々に発現することが明らかになりました。Newtic1を発現したPcNobは、EryCを形成しつつ、再生芽が成長するに伴い、その先端部に集積していくことが明らかになりました(参考図3)。重要なことに、ここで形成されたEryCは、循環血中の複合体とは異なり、単球を伴っていませんでした。より詳しい解析から、再生芽に集積するEryCは、肢の切断部で局所的に形成されたものであり、循環血中の複合体が集積したものではないことが分かりました。再生芽が発達し、軟骨が分化し始める頃になると、血液循環が再開し、EryCで満たされていた血液は正常血に置き換わり、結果としてEryCの密度は減少しました。

5) Newtic1陽性の赤血球集合体が肢の再生芽に集積する現象は、変態後(陸生期)のイモリに特有である

両生類の主要な造血器官は、一般に、変態に伴い切り替わることが知られています。イモリでは、幼生期(水生期)の造血器官は腎臓であり、変態(陸生期に移行)するとその役割が脾臓に移ります。そこで、陸生期のイモリと同様の赤血球が水生期にも存在するか調べました。その結果、幼生の体幹部においてNewtic1を発現する赤血球集団が非常に稀に検出できるものの、単球のような他の細胞との複合体は観察されず、肢の再生芽においては、内部に伸びる血管中にNewtic1陽性の細胞は観察されませんでした。このことから、全身を循環するEryC-単球複合体や、肢の再生芽に集積するEryCは、変態後のイモリ(陸生期)に特有であることが明らかになりました。

6) イモリの赤血球は様々な分泌因子を肢の再生芽に運ぶ

脊椎動物の体内を循環している赤血球は、哺乳類を除き、一般に核を持っています。イモリもその例外ではありません。つまり、私たちが教科書等で目にする赤血球(ヒトの赤血球のように核を持たず中央が凹んだ扁平な赤血球)は、脊椎動物全体から見れば一般的とは言えません。しかし、哺乳類以外の脊椎動物が持つ赤血球の生理機能は明らかでなく、酸素運搬以外ほとんど何も知られていないのが現状です。本研究において、成体アカハライモリ赤血球の不思議な行動が明らかになりました。そこで、研究グループは、赤血球が酸素運搬以外の何らかの役割を担っていないかを調べることにしました。特に、再生芽に集積することから、何らかの因子を分泌している可能性を考えました。実際、成体イモリの赤血球には、タンパク質を合成したり分泌したりするのに必要な細胞内小器官が存在していることが知られています。遺伝子解析の結果、PcNobには成長因子や細胞外基質分解酵素、機能未知の因子を含む数多くの分泌因子が発現していることが明らかになりました。その中には、肢の再生芽形成に必須とされるメタロプロテアーゼ(Col-a、Col-b、MMP3/10、MMP9、MMP21)や、筋細胞の脱分化に関わるとされるBMPファミリーの因子(BMP2;参考図4a)、イモリ固有の構造をもつ成長因子で心臓再生に関わる可能性が指摘されているnsCCNまで含まれていました。すなわち、イモリの赤血球は、こうした因子を全身に運ぶ「薬のカプセル」のようなものだと考えられます。2つの成長因子(FGF  $\beta$  1とBMP2)に着目した詳しい解析の結果、PcNobが含有する因子の量は、因子の種類によって異なる調節を受けていることが明らかになりました。肢再生過程における因子の動態を解析した結果、驚いたことに、両因子ともEryCが再生芽の先端部に移動する過程で失われていくことが明らかになりました。この結果はまさに、「薬のカプセル」から薬が放出されていくようなものだと考えられます(参考図4c)。

## 今後の展開

本研究では、イモリの陸生期における卓越した再生能力を説明するため、イモリにしかない再生遺伝子を探索しました。そのためにまず、アカハライモリの包括的遺伝子データベースを構築しました。アカハライモリは、我が国を代表する動物の一つで、再生研究はもちろん、遺伝子から環境保全に至る広範囲で多様な研究に活用されています（イモリ研究は日本のお家芸とも称される「クール！」な研究です）。このデータベースはすでに公開されており、今後、様々な研究に活用されることが期待されます。筑波大学 千葉親文教授と宇都宮大学 外山史准教授の研究グループはさらに、アカハライモリの研究利用の促進と、遺伝子解析の精度を高めるために、今年度中の全ゲノム解読を目指しています。

今回、イモリ固有の遺伝子は見つかりませんでしたが、有尾両生類の進化過程で出現したのではないかとみられる新奇遺伝子 *Newtic1* を初めて同定しました。Newtic1 は赤血球の新奇機能と関連しているものとみられ、少なくともアカハライモリでは、陸生期特異的に再生に関わることが明らかになりました。Newtic1 が、外傷部の赤血球に発現し、その赤血球が集合体 (EryC) を形成して様々な因子を再生芽に運んでいるという事実は、Newtic1 や EryC、そして運ばれる因子が、陸生期の再生に欠かせない何らかの機能を担っている可能性を強く示唆しています。実際、今回明らかとなった因子の中には、陸生期イモリの肢の再生芽形成に必須の因子や、陸生期イモリの肢再生の特徴である筋細胞の脱分化に関わるとされる因子も含まれていました。しかし、どの細胞がこれらの因子を分泌しているかはこれまで明らかにされてきませんでした。赤血球はその有力候補であると考えられます。さらに重要なことは、陸生期イモリの赤血球が、nsCCN を含めたくさんの機能未知因子を運んでいることです。今後、Newtic1 の発現調節、EryC の形成機序、赤血球が運ぶ因子の生理機能について詳細に調べていく必要があります。

私たちは、赤血球のはたらきについて、主に哺乳類から学んできました。本研究の成果は、哺乳類以外の脊椎動物が持つ赤血球のはたらきが、酸素運搬だけでなく、より多岐にわたる可能性を浮き彫りにしました。このことは、私たちの抱いてきた血液の概念を大きく変えるものであり、今後、様々な脊椎動物で私たちの想像を超えるような発見につながるものと期待できます。

## 参考図



図 1. Newtic1 を発現する赤血球. Newtic1 タンパク質は成熟過程にある赤血球の縁にリング状に局在する。下に見える 2 つの赤血球は成熟しており Newtic1 を発現していない。スケールバー: 40  $\mu$ m.

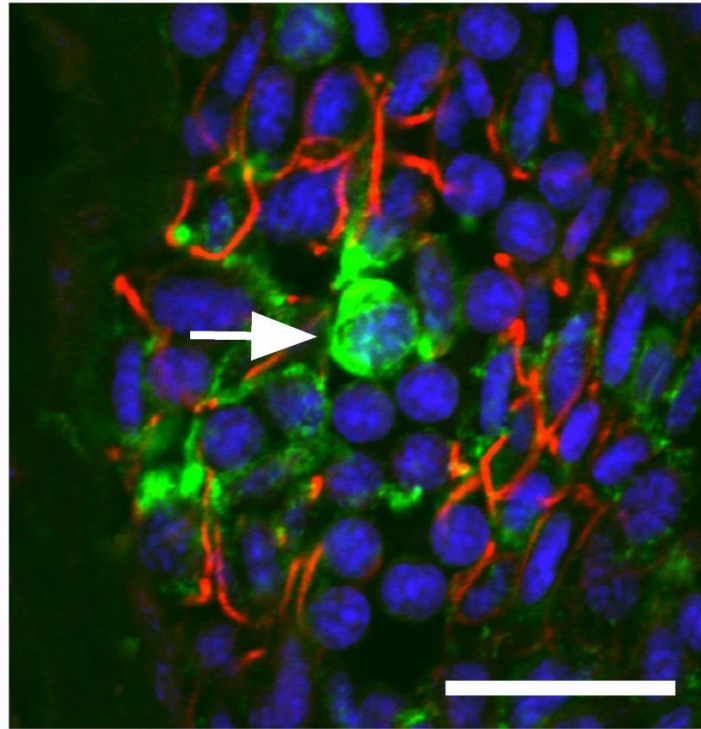


図 2. 循環する EryC-単球複合体.  
赤:Newtic1、緑:vimentin、青:核. 矢印は単球を示す. スケールバー:40  $\mu$ m.

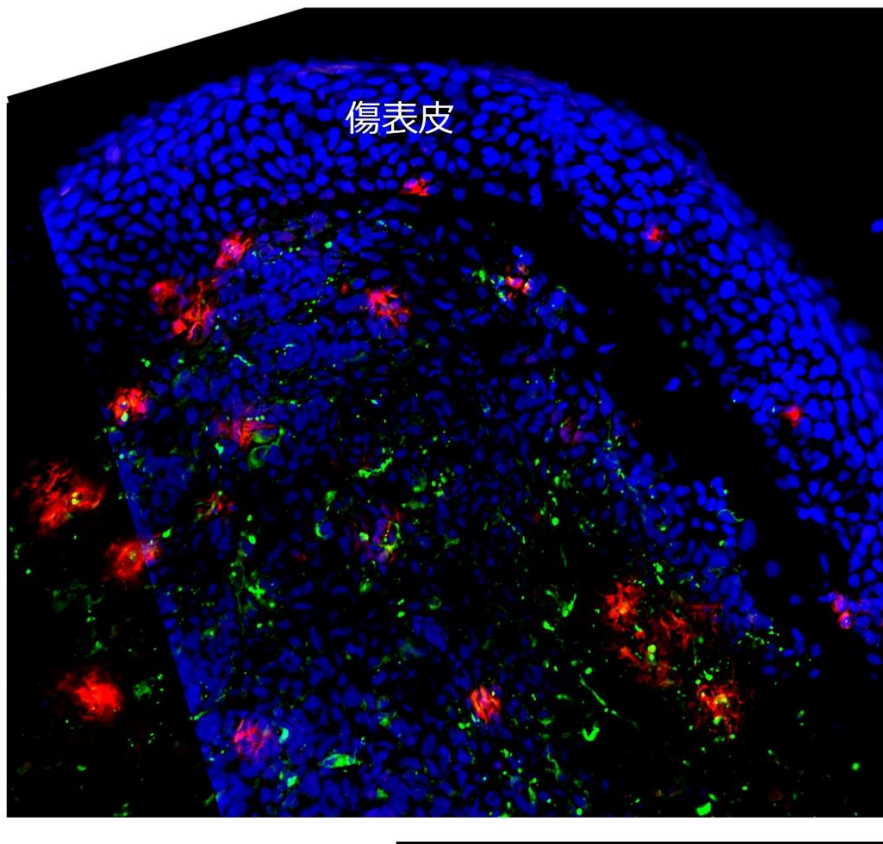


図 3. 肢の再生芽に集積する EryC.  
赤:Newtic1、緑:vimentin、青:核. 矢印は単球を示す. スケールバー:500  $\mu$ m.

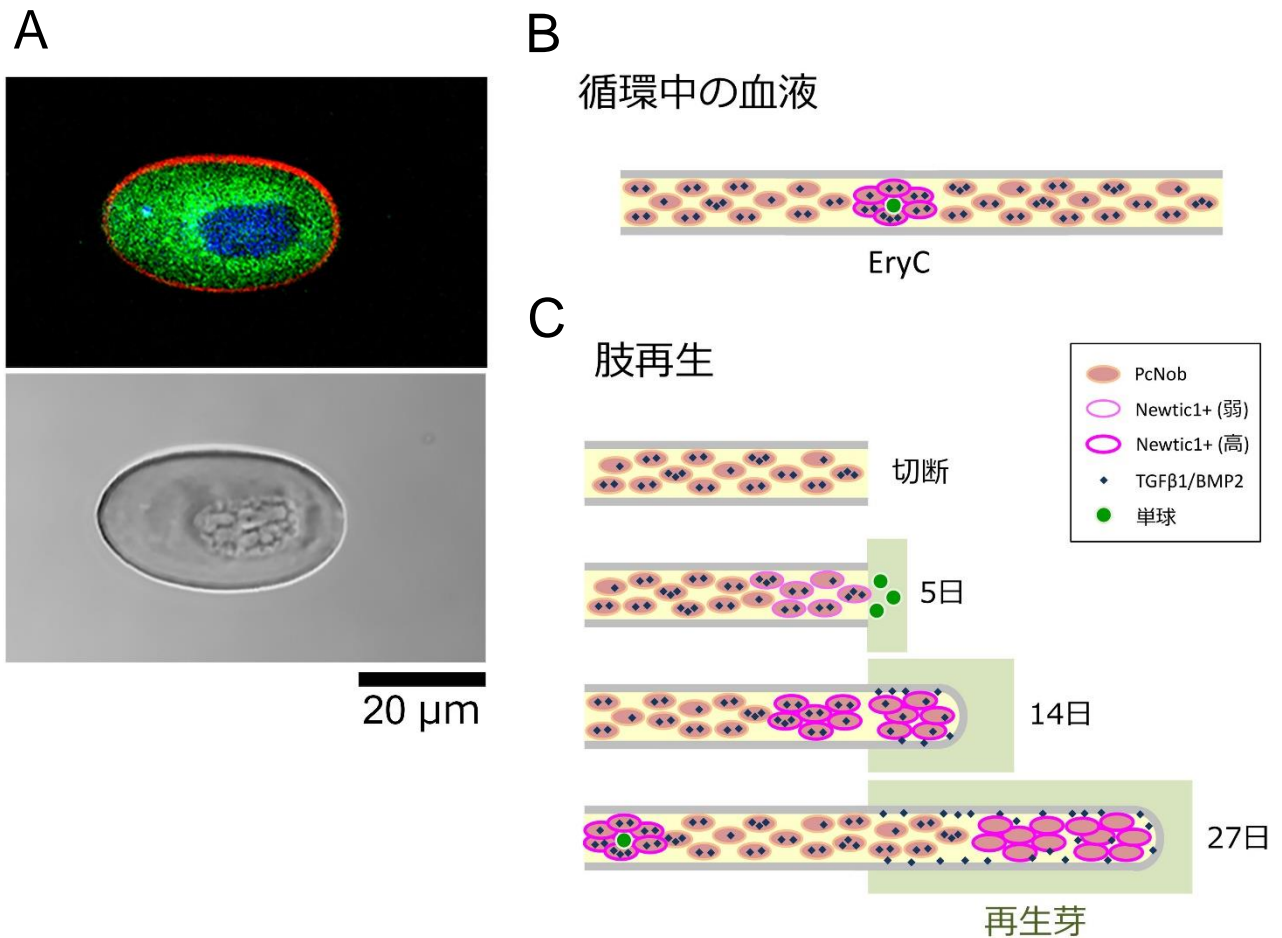


図4. 赤血球が分泌因子を運ぶ.

A. BMP2を含む赤血球. 上は蛍光像、下は明視野像. 赤:Newtic1、緑:BMP2、青:核.

B, C. 赤血球が因子を運ぶことを示す模式図

用語解説

- 注1) イモリとは、有尾両生類イモリ科 (*Salamandridae*)に属す少数の動物群を指し、‘Newt(ニュート)’と呼ばれ、サンショウウオとは区別される。欧米では有尾両生類一般やサンショウウオのことを‘Salamander(サラマンダー)’と呼ぶ。我が国では Salamander をイモリともサンショウウオとも訳していたり、そのままサラマンダーと訳していたりするので注意が必要である。イモリは中生代白亜紀の後期(およそ 9,000 万年前)にサンショウウオから進化した動物群で、現生する殆どの種が新生代(およそ 6,500 万年前以降)に出現したと考えられている。ヒトを含む四肢動物(4本足の脊椎動物)の共通祖先が、およそ 3 億 6,000 万年前までに地球上に出現していたと考えられることから、イモリは、四肢動物の中でも比較的最近、地球上に出現した動物と言える(詳しくは、千葉親文, 2018 を参照)。本研究に使用したアカハライモリ(*Cynops pyrrhogaster*)は、本州、四国、九州に生息する日本固有種で、1,600 万年前以降に出現したと考えられている。
- 注2) 陸生期:四肢動物のライフステージの中で、陸地環境に適応して生活するステージを指す。一般に、両生類では変態後、爬虫類や鳥類ではふ化後、哺乳類では出生後の期間に相当する。陸生期に対して、幼生(オタマジャクシなど)や胚、胎児として水中で過ごすステージを「水生期」と呼ぶ。四肢動物の再生能力は一般に、水生期に高く、陸生期に移ると大きく減退する。これまで調べられた四肢動物の中で、イモリだけが、陸生期に移っても高い再生能力を保ち続けることができる。

注3) 分化の終末に到達した体細胞で、生理的な環境下では分裂をしておらず、形態的にも機能的にも特殊化した状態を保っている。

注4) 再生芽: 肢の切断端に形成されるこぶ状の構造体で、ここから新たな肢が再生する。成体イモリの場合、内部には脱分化により生じた前駆細胞様の細胞が集まっている。

#### 参考文献

1. 千葉親文. 筋の再生能力とその進化: イモリ研究が示唆すること. 「超高齢社会に挑む骨格筋のメディカルサイエンス」 編集: 武田伸一. 実験医学 Vol.36-No.7 pp.82-88, 2018.

#### 掲載論文

【題名】 Novel erythrocyte clumps revealed by an orphan gene *Newtic1* in circulating blood and regenerating limbs of the adult newt.

(成体イモリの循環血と再生中の肢において、オーファン遺伝子 *Newtic1* によって明らかにされた新奇な赤血球集合体)

【著者名】 Roman M. Casco-Robles, Akihiko Watanabe, Ko Eto, Kazuhito Takeshima, Shuichi Obata, Tsutomu Kinoshita, Takashi Ariizumi, Kei Nakatani, Tomoaki Nakada, Panagiotis A. Tsonis, Martin M. Casco-Robles, Keisuke Sakurai, Kensuke Yahata, Fumiaki Maruo, Fubito Toyama & Chikafumi Chiba

【掲載誌】 Scientific Reports **8**: 7455, 2018.

DOI: [10.1038/s41598-018-25867-x](https://doi.org/10.1038/s41598-018-25867-x)