

2010年度両生類研究施設研究活動及び研究成果報告書



撮影：檜垣俊忠

平成 23 年 10 月 1 日

広島大学大学院理学研究科附属両生類研究施設

目次

I.	施設概要	3
II.	教育活動	4
III.	研究活動と研究内容現況	5
IV.	社会活動	1 5
V.	国際共同研究	1 6
VI.	その他（特記事項）	1 7
VII.	各部門の研究内容と研究業績	1 8
	発生遺伝学研究部門	1 8
	分化制御機構研究部門	3 6
	多様化機構研究部門	5 0
	生理生態学研究部門（客員部門）	
	プロジェクト研究①	7 9
	プロジェクト研究②	8 1
	プロジェクト研究③	8 7
	プロジェクト研究④	9 0
	プロジェクト研究⑤	9 4

I. 施設の概要

両生類研究施設は、元広島大学長の川村智治郎先生が在職中に挙げられた業績を基礎にして、昭和42年6月に創設された、世界で類例のない研究施設である。

創設時の第1研究部門「発生遺伝学」は、定員が教授1，助教授1，助手2，その他職員2であったが、昭和49年4月に系統維持班の附設が認められた。従来から実験動物飼育に従事していた教務員1に加え、新たな飼育要員として一般職員2（行一技官）の増員、技能補佐員3，臨時職員2の予算化が認められた。昭和51年4月に系統維持班の強化のために助教授1の増員，臨時職員1の予算化が認められた。その後，行一技官1の教務員1への振替が行なわれ，充実した系統維持体制が整った。

昭和56年4月，第2研究部門「生理生態学」が客員部門として増設された。昭和59年4月，第3研究部門「進化生化学」が増設された。平成元年4月，第4研究部門「形質発現機構」が新たに増設され，増員が認められた。平成2年11月末には，東広島市の新キャンパスに，4つの研究部門の研究棟，飼育棟および野外飼育場が完成した。新キャンパスへの移転は，平成3年2月から始まり，平成4年1月末に完了した。

平成6年6月，10年時限が到来した進化生化学研究部門に代わり，種形成機構研究部門が新設され，増員が認められた。また，平成11年4月からは形質発現機構研究部門に代わり，分化制御機構研究部門が，平成16年4月からは種形成機構研究部門に代わり，多様化機構研究部門が固定部門として新設された。

しかし，平成17年度に系統維持班の助教授が定員削減の対象となり，発生遺伝学研究部門の助教授が兼任することで，定員削減による影響を最少に留めるよう努力し続けている。平成19年度に助手2と教務員2から助教4への振替が行われた。平成21年度に定年退職した助手のポストで，平成22年度には2名の特任助教が採用された。平成22年度における施設教員の構成は教授2（矢尾板芳郎、住田正幸），准教授4（鈴木厚、古野伸明、三浦郁夫、高瀬稔），助教4（中島圭介、倉林敦、花田秀樹、田澤一朗），特任助教2（竹林公子、柏木啓子），客員教授2（松井正文、倉本満），研究員（Alam Mohammad Shafiqul）、契約一般職員（中島妙子）である。系統維持班の人員の構成は准教授1（高瀬稔、兼任），助教2（花田秀樹、田澤一朗、いずれも兼任），技術員1（宇都武司），契約技能員2（難波ちよ、玉城淳子），契約用務員2（水戸妙子、渡辺八重子）、である。事務室には契約一般職員1（脇早耶佳）がいる。

系統維持班では、両生類50種170系統2～3万匹の野外系統及び突然変異系統等の特殊系統を保存している。これまでに確立されている系統には，自然・人為色彩突然変異系統，野外種育成系統（近交系），四肢形成異常系統，癌多発系統，遺伝子組換え系統，遺伝子連鎖群解析系統，人工新種系統，核細胞質雑種系統および人為倍数体系統などがある。突然変異系統は約50系統にのぼる。系統維持班では平成22年度には，交配系統数：40系統、飼育幼生数：2,941匹、

新しい系統数：20 系統、新しい系統の飼育幼生数：971 匹を系統保存しており、5 系統 970 個体を研究材料として大学研究所に配布した。系統維持班には 17 件約 200 人の見学者があった。広島県教育バザールへの参加し、生物教材を提供した。また、日本や世界各地から昭和 51 年より約 30 年あまりかけて野外収集した 9 科 27 属 112 種 320 集団 12,600 匹及び実験的に作製された特殊系統 100 系統 4 千匹のカエルがマイナス 80 度に凍結保存されている。

平成 14 年度より文部科学省のナショナルバイオリソースプロジェクト (NBR) の中核的拠点整備プログラム「ネッタイツメガエル」の中核機関として選定されて、ネッタイツメガエルの収集、人工増殖、近交系の開発、研究者への提供を行った。平成 19 年度より第 2 期ナショナルバイオリソースプロジェクトが始まり、ネッタイツメガエルの中核機関として同様の事業を継続している。このプロジェクトには 3 名の契約技術職員 (小林里美、榎本美香、西口祐子) が従事している。

平成 21 年度より特別教育研究経費「先端的両生類研究の展開—両生類の絶滅危惧種の保全と標的遺伝子破壊方法の開発—」が 5 年に渡り展開されることとなった。それにより 2 名の特任助教 (井川武、Islam Mohammed Mafizul) が採用され研究に従事している。

II. 教育活動

両生類研究施設は、生物科学専攻で両生類発生遺伝学演習、両生類多様化機構学演習、両生類分化制御機構学演習を開講し、細胞と生命、形態形成、性の起源、分類・進化の授業や生物科学特別研究や生物科学研究セミナーに携わっている。今年度、博士課程前期 1 年に 5 名、2 年に 2 名、後期 1 年に 1 名、2 年に 2 名、3 年に 2 名で合計 12 名の院生が在学しており、当施設で大学院研究に励んでいる。博士課程前期学生の国内学会発表は 5 件であり、博士課程後期学生の国内学会発表は 3 件、国際学会での発表は 2 件である。原著論文発表は博士課程後期で 4 編である。今年度、博士課程後期 3 年の 1 名が、以下の学位論文により博士号を取得している。

Nia Kurniawan

Genetic divergence, phylogenetic relationship, and taxonomic status in the *Fejervarya cancrivora* complex from Indonesia and other Asian countries based on allozyme and molecular techniques, morphological observations and crossing experiments

「インドネシアとアジア諸国のカニクイガエル類における遺伝的分化と系統関係と分類学的

位置付け：アロザイムと mtDNA 分析、外部形態観察および交雑実験による解明」
平成 22 年 9 月 27 日

大学院生の教育活動の一環として、月に 2 回、教員、ポスドク、博士課程後

期の大学院生が研究活動報告を両生類研究施設公開セミナーとして行っている。

スーパーサイエンスハイスクールでの教育活動に関しては、三浦准教授が理数ゼミ（生物）の講師として広島県立広島国泰寺高等学校において、生徒に研究および教育の指導をしている。今年度は、クラブアシスタンスとして「遺伝子と生物学研究 -何を調べ、どう使うか-」という題名で模擬授業を行っている。（2010年12月19日（日）：広島市）

三浦准教授は、その他にもSSH課題研究「生命科学基礎」講義として「ヒトがヒト／動物たる由縁」を岡山清心女子高校において行っている。（2011年2月1日（月）：倉敷市）

鈴木准教授は名古屋大学医学部において非常勤講師を担当している。百数十名程度の医学部生を対象に「両生類の初期胚を用いた発生生物学研究」について講義を行い、臨床医学における基礎研究の重要性などについて解説し、基礎生物学および先端医療への理解を促している。

III. 研究活動と研究内容現況

発生遺伝学研究部門、分化制御機構研究部門、多様化機構研究部門に分けて記載する。

発生遺伝学研究部門

○研究活動の概要

本研究部門は「種々の両生類を材料として、遺伝学と発生学との新領域を開拓する。」ことを目標として、昭和42年6月に最初の両生類研究施設の研究部門として創設された。それから40年余りの間に古典的遺伝学的手法や実験動物学的手法に重きを置く研究から、次第に遺伝子工学的手法、細胞生物学的手法なども取り入れて、両生類の発生を分子生物学的視点から考察する研究へと進んでいる。平成22年度には本研究部門では、原著論文3編、総説・解説1編、国内学会での一般講演6件、研究助成金の受入は4件である。研究内容は以下の通りである。

1) 甲状腺ホルモン受容体の発現量の違いによる甲状腺ホルモン感受性の制御

両生類の変態（メタモルフォシス）は、幼生から成体へと体の作り替えが起きる現象である。特に無尾両生類の変態は劇的であり、四肢の発生、成長と尾の退縮が連続して起きる。変態における全身の体内器官の形態変化は決まった順序で起きる。形態変化のタイミングを決めている要因を調べるために、組織ごとに安定して発現していると想定されている甲状腺ホルモン受容体alphaに注目して研究を押し進めた。甲状腺ホルモンの合成を阻害し、メタモルフォシスを抑制した幼生の尾部筋細胞において甲状腺ホルモン受容体の強制発現を行

い、通常では反応できない低濃度の甲状腺ホルモン (T4) でも細胞死が誘導されることを、昨年度に確認した。

甲状腺ホルモン受容体の高発現下での低濃度の甲状腺ホルモン (T4) による筋細胞死が甲状腺ホルモン活性化酵素阻害物質イオパニ酸により抑制された。つまり、甲状腺ホルモン活性化酵素の発現誘導を介して細胞死が起きていることが示唆された。実際、尾の筋細胞に甲状腺ホルモン受容体を過剰発現させて低濃度の甲状腺ホルモン処理した時に甲状腺ホルモン活性化酵素mRNAの誘導が観察された。

甲状腺ホルモン活性化酵素遺伝子のプロモーターを解析すると、甲状腺ホルモン認識塩基配列 (TRE) が存在していた。Gel retardation assayによって、甲状腺ホルモン受容体beta遺伝子のプロモーターのTREより甲状腺ホルモン受容体への親和性が低いTREであることを示した。したがって、甲状腺ホルモン活性化酵素のTREが甲状腺ホルモンにより制御されるためには甲状腺ホルモン受容体の高発現が必要であることが示唆された。

上記の実験結果により、甲状腺ホルモン受容体alphaが高発現している後肢や過剰発現させた尾の筋細胞では、変態前期の少量の甲状腺ホルモン前駆体 (T4) でも甲状腺ホルモン活性化酵素遺伝子のプロモーターを弱く刺激して甲状腺ホルモン活性化酵素を誘導してT4を活性型甲状腺ホルモン (T3) に変換し、そのうちに、より安定的に甲状腺ホルモン活性化酵素を発現させ、数日後には高い甲状腺ホルモン活性化酵素遺伝子の安定的発現によりT4が効率にT3に活性化され、形態変化が起きるものと考えられる。したがって、変態における形態変化のタイミングの決定機構として、この「甲状腺ホルモン受容体alpha高発現によるpositive feed-forward説」を提唱する。これによれば、器官の甲状腺ホルモン受容体alphaの発現が高い程、変態のより早い時期に器官の再構成が起きることになる。

2) 性転換機構の解析：両生類への性ホルモンおよび化学物質影響の基盤的研究

ツチガエル (*Rana rugosa*) およびトノサマガエル (*R. nigromaculata*)、ネッタイツメガエル (*Xenopus tropicalis*) を用いて、性ホルモン投与または環境化学物質投与による性転換効果に関する基盤的データの収集を目的として行った。アンドロゲンによる性転換がほとんど誘導されないツチガエル地方集団とほぼ100%性転換が誘導されるツチガエル地方集団を用いた雑種幼生にアンドロゲン処理を行ったところ、性転換が有意に誘導された。従って、性転換抑制機構ではなく性転換誘導機構の存在が示唆された。さらに、変態後のトノサマガエルではNPおよびBPAの投与により精巣卵形成が誘導され、エストロゲン投与では誘導されなかったが、今回、変態後のネッタイツメガエルではいずれの処理においても精巣卵形成は見られなかった。従って、精巣卵形成はエストロゲン作用とは異なる作用により誘導され、その誘導作用には種差があることが明らかになった。

3) 性分化関連遺伝子の探索：マイクロアレイを用いた網羅的解析

性分化後のNFステージ58および変態完了期のNFステージ66のネツタイツメガエルの精巣および卵巣における遺伝子発現をマイクロアレイ法により網羅的に解析した。精巣で発現量が多い遺伝子に着目したところ、細胞間結合に関するいくつかの遺伝子が含まれていた。そこで、それらの遺伝子発現をRT-PCR法により解析したところ、Claudin 遺伝子がネツタイツメガエルの精巣において高い発現を示した。さらに、*in situ*ハイブリダイゼーション解析を行ったところ、ネツタイツメガエルおよびツチガエル共に精巣の生殖細胞が強い陽性を示した。

4) 両生類脳におけるニューロステロイド生合成：アカハライモリの脳におけるシトクロム

P450scc 遺伝子発現

アカハライモリからシトクロムP450scc遺伝子を単離し、脳における遺伝子発現を解析したところ、様々な脳領域において遺伝子発現が見られた。さらに、*in vitro*での脳のプレグネノロン生合成も解析した。ほ乳類および鳥類、無尾両生類においてニューロステロイド生合成が報告されていることから、ニューロステロイド生合成は脊椎動物において広く見られる生理的な現象であることが考えられた。

5) 抗酸化剤 (phenolic antioxidant) は除草剤パラコートによって誘起された培養カエル白血球細胞の染色体損傷を強める

代表的な phenolic antioxidant の一つにビタミンE (VE) がある。VEの本来の機能はヒトや動物体内で起こる脂質過酸化の抑制であるが、イニシエーターによって活性化されたVEはヒト低密度リポタンパクの酸化を促進することが知られている。これは、VEの脂質過酸化物に対する抑制反応が常に起こるものではなく、ある種の条件が揃うと、VE抗酸化機能はかく乱され、逆に酸化ストレスを強めることを意味する。

除草剤パラコート (PQ) の毒性は無尾両生類の胚やオタマジャクシに対して致死性および催奇性が認められ、いずれもPQから発生する活性酸素が原因であると考えられている。このことから、PQによって誘導される活性酸素に対して無尾両生類は感受性が高いことがわかる。さらに、PQによって発生する活性酸素はチャイニーズハムスター由来の培養細胞に対して染色体異常の誘起に関わっていると考えられ、その機構は①PQによるNADPHからの電子の奪取、②スーパーオキシドの発生、③スーパーオキシドジスムターゼによる H_2O_2 への代謝、④フェントン反応によるヒドロキシラジカルの発生、⑤脂質過酸化、⑥染色体異常発生である。本研究は、培養カエル白血球細胞を用い、脂質過酸化抑制物質 phenolic antioxidant によるPQ遺伝毒性の強化機構を調べた。その結果、PQ共存下の phenolic antioxidantは本来の役割である脂質過酸化の抑制をせず、PQの電子ドナーとなって、細胞遺伝毒性を増幅することがわかった。

6) 変態前後のツメガエルにおけるHox遺伝子の発現

両生類変態における Hox 遺伝子の機能について研究している。平成 22 年度は、ネツメガエル変態期の全 Hox 遺伝子の発現等、両生類変態期における Hox 遺伝子の発現を詳しく調べた。これにより、無尾類幼生で Hox 遺伝子が尾芽胚期とよく似た発現パターンを示すことを明らかにした。

分化制御機構研究部門

○研究活動の概要

分化制御機構研究部門は、卵の分化、生殖腺、体色を決定する機構、環境と内分泌攪乱について分子細胞生物学的な手法を用いて研究している。平成 22 年度には本研究部門では、原著論文 6 編、総説・解説 2 編、国内学会での招待講演 3 件、国内学会での一般講演 9 件、研究助成金の受入は 2 件である。研究内容は以下の通りである。

1) 卵形成における卵特異的細胞周期調節遺伝子の発現調節機構と機能解析

卵の分化機構を研究する為には、卵特異的に発現する遺伝子に着目し、その卵特異的な発現調節機構を解明する事がきわめて重要であると考えられる。卵は、減数分裂や受精後に特殊な細胞分裂を行う。例えば、減数分裂では、DNA 複製をスキップした 2 回の連続した分裂をするが、そのために、Mos という卵特異的な細胞周期調節因子を発現しており、この発現が DNA 複製のスキップのため必須である事を報告した。また、受精後、卵は最初の一回を除き、G1, G2 期のない細胞分裂（卵割）を中期胞胚まで行うが、そのためには、卵特異的な細胞周期調節因子である Wee1A の発現が必須である。もし、体細胞特異的な Wee1B が発現すれば受精後の卵割は失敗する。よって、これらの卵特異的な細胞周期調節因子の発現調節機構の解明は、卵への決定・分化の機構解明につながる。

細胞周期調節因子に母性型があると分かって来たのは最近であり、その発現調節機構の研究は今までに行われていない。現在、ニツメガエルの Mos と Wee1A のプロモーター領域と思われる部分（翻訳開始点より 10kbo 上流まで）をクローニングし、GFP の上流に挿入した transgenic ガエル作製のベクターを構築した。このコンストラクトや、プロモーターにいろんな欠失を導入したコンストラクトで transgenic ガエルを作製し、卵特異的な発現に必要な領域を特定する。また、これらの遺伝子のノックアウトも行いたい。このようにして卵特異的な細胞周期調節因子の発現調節機構と機能の解析を行う。

2) 両生類を用いた生活環に対する過重力および強磁場の影響に関する研究

人類はいずれ火星などの惑星探査に本格的に乗り出すと思われる。しかし、地球とはまるで異なる重力・磁場などの環境下での長期滞在はヒトの身体に大きなストレスをもたらすと考えられる。これまでに両生類は、重力変化に関する地上および宇宙実験によく用いられ相当量のデータが集積されている。一方、両生類には磁気受容能力があるとの報告もあるが、磁場影響に関する研究は少ない。私たち宇宙環境利用委員会研究チームのテーマである「両生類の生活環に対する過重力および強磁場の影響」は、平成16年度から今年度に至るまでJAXA

で採択されている。主として、アフリカツメガエルを実験材料として用い、その生活環に対する過重力・強磁場影響について研究を続けている。初期発生、特に受精直後の卵の感受性は著しく高く、この時期に過重力や強磁場を印加した場合、いろいろな奇形が出現する。胚やオタマジャクシの発生・成長は阻害され、脳や眼の細胞にアポトーシスが亢進され、さらには頭部マーカー遺伝子やセメント腺マーカー遺伝子の発現が低下することなどが分かった。過重力や強磁場に対する感受性の高い時期の同定や発生・性分化への影響を簡潔かつ迅速に調べるため遺伝子レベルでの解析方法の開発も予定している。

3) アフリカツメガエルの発生における I 型ケラチンの新規遺伝子の特徴

ケラチンは脊椎動物の上皮性細胞骨格繊維である中間径フィラメントの構成タンパク質で、生化学的性質の違いにより I 型と II 型に区別される。アフリカツメガエルのケラチン遺伝子は自然変態中に幼生型から成体型へと変化すること、遺伝子の中には尾部再生中に誘起されるも、肢芽では不活性化されるものがあること、などがこれまでの私たちの研究等で明らかになっている。しかし、その制御機構についてはよくわかっていない。ごく最近、私たちは、アフリカツメガエル尾部の再生中に傷ついた上皮細胞で誘導される I 型ケラチンの新規遺伝子 (Tazaki ら, 2005 ; クローン名 : XL073g19) に関する研究結果を公表した。まず、この遺伝子の 4.2-kb 上流域と連結させた EGFP レポーター遺伝子を持つトランスジェニックアフリカツメガエルを作製し、その F1 の胚およびオタマジャクシを用いて生体内における遺伝子の転写調節を調べた。自然変態の場合、EGFP 遺伝子発現は St. 40 オタマジャクシの尾鰭、嗅上皮、外鰓、鰓弓で、外鰓の縮小した St. 44 オタマジャクシでは鰓弓で見られたが、変態開始時の鰓吸収に伴い急速に消えた。変態前期のオタマジャクシに甲状腺ホルモン (TH) を投与した場合、TH 曝露 5 日目に強烈な EGFP 蛍光が無処理対照群の内鰓で見られたのに対し、処理群では急速に消えていった。同様のことは鰓弁でも観察された。一方、レポーター発現は TH 投与によって発達中の前後肢でアップレギュレートされた。上述の如く、トランスジェニックガエル系統は各種器官の形成、発生、吸収を客観的に明らかにするための有用な研究材料となりうる。

4) 両生類に対する化学物質の影響

環境省の調査によると、アトピーやぜんそく、肥満、ADHD (注意欠陥多動性障害) などの疾患をもつ子どもの数が年々増えている。それには遺伝的要因のみならず化学物質曝露による環境要因も関係しているものと推測されている。私たちは、甲状腺受容体遺伝子 (TRbetaA1) の上流域と EGFP 遺伝子を連結させて作ったプラスミド DNA を導入したトランスジェニックツメガエルを用いるなどして BPA とその関連化合物、UV フィルター、4-OH-TCB などの影響を調べてきた。現在、脳神経系に対する影響について研究中である。

5) ZNF による甲状腺ホルモン受容体 b 遺伝子の破壊

ノックアウトによる特定の遺伝子破壊は、その遺伝子の機能を探る上で非常に有効な手段である。この技術は、マウスでは ES 細胞を用いて確立されてポピ

ユラーにつかわれるようになってきているが、それ以外の動物ではES細胞が確立されていない事で不可能である。しかしながら、最近、ZNF (Zinc finger nuclease) を使用すると、特定の配列に突然変異が入れられる事がわかり、コオロギやラットなどで応用されて来た。この技術をカエルで確立する事は、カエルの実験動物として有用性を飛躍的に高める。今回、カエルでZNFが応用可能かどうか実験を行った。選んだ遺伝子は甲状腺ホルモン受容体b遺伝子である。この結果、TRbの遺伝子に変異が入れられる事がわかった。この変異を入ったカエルを育て、子孫をとったり、他の遺伝子をZNFで破壊したい。

6) Nramp ファミリーの新規バナジウム/プロトン共役輸送体

海産動物のホヤは体内に高濃度のバナジウムをもっている。これは、海中のバナジウムから濃縮されたもので、ホヤはバナジウムを高濃度に濃縮する機構を持っている。その機構を研究している。その結果、Nramp/DCTファミリーは、二価金属イオンの輸送に関わる膜輸送体である。我々はバナジウムを高度に濃縮する海産動物ホヤ類の血球からNrampファミリーの新規膜輸送体遺伝子を同定した。この遺伝子AsNrampはヒトのNramp1および2と、アミノ酸レベルで約60%の相同性があった。アフリカツメガエルの卵母細胞による発現系を用いて金属輸送活性を検証したところ、プロトンとの共役輸送によって四価バナジウムを取り込む共役輸送体であることがわかった。さらに、四価バナジウムの輸送はNaによる阻害を受けること、AsNrampは血球の液胞膜画分に局在することも明らかになった。

7) mTOR 情報伝達系の解析

炎症は、生体の損傷に対する組織の反応であり、その反応の一部にはmTOR (mammalian target of rapamycinの略。ほ乳類などの動物の細胞内シグナル伝達に関与するタンパク質キナーゼ。最初にrapamycinの標的タンパク質として見つかったのでこの名前がついた)情報伝達系が関与している。この情報伝達系の研究を進めている。その結果、炎症に関与するmTOR情報伝達系に関与するタンパク質や、その相互作用を調べる事でこの情報伝達系の全貌を解明しようとしている。その結果、mTOR伝達系にEgo1, Ego3とGtr1, Gtr2のタンパク質が関与していることがわかった。

8) 性決定と生殖腺の性分化

性という仕組みは、生物に多様性を生み出し、個体や種の維持、そして進化に貢献する重要な機能のひとつである。本研究では、性決定や性分化の普遍性と多様性の分子基盤を解明するため、我が国に生息するツチガエルに着目した。本種は、地域集団ごとに、性決定や性分化機構の著しい多様性を有する、世界に類を見ない特徴をもつ。2010年度は以下の成果を挙げた。

(i) 生殖腺性分化の多様性機構の解明

脊椎動物では、性ステロイドホルモンが生殖腺の性分化に重要な役割を担っている。哺乳類の真獣類は外部から投与した性ホルモンに全く感受性を示さないが、有袋類はエストロゲンによって遺伝的雄に性転換が生じる。また、他の脊椎動物では、性ホルモンに対する感受性は種によって異なる。ツチガエルは

遺伝的に大きく4つの地域グループに分けられるが、それぞれの集団において性転換の感受性が異なることを明らかにした。性染色体が未分化な西日本と東日本はテストステロンとエストロゲンによって完全に性転換を生じる。一方、性染色体が分化したZW集団では雄から雌への性転換に感受性を示すが、雌から雄へは性転換しない。さらに、XY集団では、いずれの方向にも性転換が生じないことがわかった。さらに、エストロゲンによる雄から雌への性転換については、生殖腺性分化の開始時期とホルモン投与による性転換の感受期（これを窓とよぶ）との時間的相互関係が決定的に重要であることを実証した。

(ii) 佐渡島に新種ガエルを発見

ツチガエルの新潟県佐渡島の集団は、形態学的に本土集団と著しく異なることを発見した。そこで、外部形態、遺伝および生殖について詳細に調べた。外部形態では佐渡集団は小柄であり、特に腹側が強い黄色を呈すること、皮膚全体が滑らかであること、約6割の個体に本土では見られない細い背中線が存在することがわかった。ミトコンドリア遺伝子の解析から、佐渡黄腹集団は、東日本（関東）の集団と共通性があることがわかった。それゆえ、佐渡黄腹は、古くから東日本全域に生息していた東日本集団に起源を發し、その後、佐渡島に孤立し、独自に分化したと推測された。さらに同島の南部に生息する新潟由来の集団との交雑実験、鳴き声解析、詳細な外部形態の解析を行っている。

9) 色彩発現

(i) ニホンアカガエルの卵の色を決定する突然変異の同定

両生類の色彩を担う色素細胞には3種類存在し、主に皮膚、眼、卵に存在する。これまで、同一つの遺伝子突然変異体において、眼と皮膚の色彩が異なる例が発見されていることから、眼と皮膚では色彩遺伝子の発現制御が異なることが知られていた。今回、つくば市でニホンアカガエルの白色卵塊が発見されたので、それを成熟親まで飼育し、さらに兄妹同士のF1を作成した。その結果、白色卵とそのF1はいずれも野生型の皮膚と眼の色彩をもつ成体に成熟した。ところが、F1の約1/4の雌に、卵の色だけが白色である個体が見つかった。以上から、卵の色彩だけを制御する遺伝的仕組みの存在することが明らかになった。

(ii) ナゴヤダルマガエルの遺伝的地域分化

西日本に生息するナゴヤダルマガエルは生息数が減少しており、近年とくに保全が叫ばれているカエルのひとつである。本種は、古典的に名古屋集団と岡山集団の大きく2つに分けられ、鳴き声、外部形態が異なり、遺伝的な違いも指摘されている。本研究では、2つの集団の遺伝的分化の違い、分布の広まりと、特に境界集団の同定を行った。その結果、ミトコンドリア遺伝子の配列は両集団で明らかな違いがあり、その境界は兵庫県西端部付近であった。一方、核遺伝子のひとつSox3の解析では、名古屋集団の遺伝子型が岡山集団の中央部まで到達していることがわかった。以上から、2つの集団の間を構成する、岡山東部から名古屋西部に掛けて分布する集団では、核と細胞質の由来がことなる雑種から構成されることが示唆された。

(iii)アカハライモリの秋交配の証明

アカハライモリは一般に春から初夏に掛けて交配、産卵、繁殖することが知られている。しかし、一方で、秋にも雄の婚姻食や求愛が観察されることから、秋からの繁殖（交配）の開始が示唆されてきた。そこで本研究は、イモリの生殖腺と生殖器官における成熟の年周期変化を観察し、とくに、雌貯精嚢内への秋の精子の取り込みについて調べた。その結果、生殖腺と生殖器官は春に成熟して夏には退格的になり、秋から再び成熟が開始すること、秋にはいずれの雌の貯精嚢にも十分な精子がとりこまれていること、そして、その秋精子は春の精子と共に、春から初夏にかけての産卵に使用されていることを明らかにした。よって、アカハライモリの繁殖（交配）は秋（10月）から開始し、冬眠の冬を挟んで初夏まで至る。従来考えられていた期間より6ヶ月早く開始すると結論した。

多様化機構研究部門

○研究活動の概要

多様化機構研究部門では、分子生物学的手法や交雑実験に基づいて両生類における種の多様性やゲノム構造の分子進化プロセスを究明するとともに、人工繁殖による絶滅危惧種の効率的な保全方法の確立を目指した研究や、透明ガエルの作成を進めている。また、両生類初期胚を用いての形態形成の研究も展開している。平成22年度には本研究部門では、原著論文7編、総説・解説3編、国際会議での招待講演1件、国際会議での一般講演7件、国内学会での招待講演1件、国内学会での一般講演10件、研究助成金の受入は4件である。研究内容は以下の通りである。

1) 繁殖隔離機構に基づく種の多様性

カニクイガエルは、アジアに広く分布する種の一つであり、中国からインドまでと、フィリピンおよびインドネシアに棲息することが知られている。従来単一種 *Fejervarya cancrivora* とされていたが、最近の研究から、形態学的にも遺伝学的にも分化した複数のタイプの存在が知られてきた。本研究では、形態観察、mtDNA 分析及び交雑実験によって、アジアに広範に分布するカニクイガエル類について、どのような種多様性があるのか、どの程度の遺伝的また形態的分化が起っているのか、どのような繁殖隔離機構が確立しているのか、それらは分類学的にどのように位置付けられるのか、を明らかにした。その結果、(1) アジア産のカニクイガエル類は外部形態および遺伝的特徴からマングローブ型、大型、プランラト/スラベシ型の大きく3つに分けられること、(2) これらは互いに生殖的に隔離された別種であること、(3) 大型は *F. cancrivora* マングローブ型は *F. moodiei* に該当し、スラベシ型は未記載種の可能性があること、(4) 従来の *F. raja* は *F. cancrivora* のシノニムの可能性があること、が明らかになった。

2) ヒメアママガエル科の高次系統関係と生物地理

両生類は海を渡れないため、大陸を跨いだ両生類の分布は、中生代に生じた超大陸の分断に沿って生じたと考えられている。今年度の研究では、世界のほとんどの大陸に分布するヒメアママガエル科について分子系統学的手法を用いて、大陸間の分類群の系統関係と分岐年代の推定を行った。その結果、ヒメアママガエルの中でもアフリカに分布するグループが、本科の原始的なグループである可能性が示唆され、本科はアフリカに起源すると考えられた。また、大陸間分類群の分岐年代は、古地理学的に各々の大陸が分かれたとされている時代よりも若いものであった。このことは、古地理学的知見よりも長い間各大陸間に陸橋が存在したとする仮説を支持する。さらに、オセアニア地域に分布するオセアニアヒメアママガエル亜科は、南極とオーストラリアが地続きであった時代に、南極を通して分布を広げたと考えられていた。しかし本研究によって、アジアのみに分布する亜科所属不明属 *Gastrophrynoidea* は、アジア産のヒメアママガエル亜科よりもむしろオセアニアヒメアママガエル科の最も原始的な系統的位置を有することが明らかになった。さらに分岐年代推定の結果を合わせると、オセアニアヒメアママガエル亜科の分布域拡大ルートはこれまでに考えられていた南極経由ではなく、むしろ東南アジアの島々が隆起した2000万年前頃に、アジアからニューギニアに渡った可能性がきわめて高いことを示した。

3) 絶滅危惧種の保全と分類学的位置付け

イシカワガエルは、奄美大島と沖縄島北部に分布する日本で最も美しいとされるカエルで、鹿児島県と沖縄県では天然記念物に、環境省レッドリストでは絶滅危惧IB類に指定されるなど、早急な保護対策が求められている。本研究は、

(1) 実験室での人工繁殖・飼育維持方法を確立し、効率的な保全に資する (2) 集団間及び集団内の遺伝的多様性を調べ、人工繁殖下でも遺伝的多様性を評価する (3) 種内の遺伝的及び形態的分化を解明するとともに、交配後隔離の程度を明らかにすることによって、各集団の分類学的位置付けを明らかにすることを目的に行った。昨年の繁殖期には、人工繁殖によって生まれた6年齢の人工繁殖個体から、完全飼育下での自然繁殖によって、多数の2代目を得ることに成功した。また、形態計測に基づく主成分分析の結果、奄美産と沖縄産とは形態的に明瞭な相違があること、アロザイム分析及びmtDNA解析から、両集団は遺伝的にも明瞭に分化していることがわかった。さらに、交雑実験の結果、沖縄産雌と奄美産雄との雑種は発生初期ですべて致死になること、奄美産雌と沖縄産雄の雑種は正常に発育するが、成熟期に達した雑種の雄は精子形成が異常であることがわかった。奄美産と沖縄産は遺伝的にも形態的にも明瞭に分化しており、生殖的にも明確な交配後隔離が成立していることから、両集団は別種とするのが妥当であると考えられた。イシカワガエルの基準産地は沖縄本島であることから、奄美産のイシカワガエルを新種「アマミイシカワガエル」*Odorrana splendida*として記載した。

4) 絶滅危惧種イシカワガエル及びアマミイシカワガエルにおけるマイクロサ

テライトマー

カーを用いた遺伝的多様性の解明

西南諸島は両生類に限らず動植物全般における生物多様性のホットスポットであると同時に、島嶼という限定的な生息域によって絶滅の危険性も孕んでおり、具体的な保全活動を行う上で種内の遺伝的多様性を解明しておく必要がある。しかしながら、従来の研究では島間の遺伝的關係にのみ焦点が置かれ、島内の微細な集団構造についてはほとんど明らかになっていない。特に、日本産両生類における最美麗種と言われることも多い、イシカワガエルについては、すでに沖縄島の集団の一部が失われた可能性が高く、速やかに研究に着手する必要があった。そこで、本研究では、まず、共優性かつ多型性に富んだ遺伝マーカーであるマイクロサテライト（以下、STR）遺伝子座を単離し、さらに、これらを用いてイシカワガエル・アマミイシカワガエルにおける遺伝的多様性と微細集団構造を解明した。本研究の結果、磁気ビーズ法及び、二重抑制 PCR 法によって単離された STR を含む 542 クローンから、安定的に増幅され、かつ多型性が確認された 12 遺伝子座が単離された。ハーディ・ワインベルグ平衡 (HWE) 及び、連鎖平衡について、統計テストを行ったところ、一部の遺伝子座で HWE からの逸脱と連鎖不平衡が確認されたが、概ね常染色体上の中立的な遺伝子座であった。さらに、STRUCTURE を用いた集団構造解析の結果、イシカワガエルについては、階層的構造は見られなかったが、アマミイシカワガエルにおいては、5 あるいは 6 個の遺伝的クラスターに分けられることが分かった。また、遺伝距離に基づく系統解析を行ったところ、アマミイシカワガエルの集団は地理的距離が単系統を形成した。これらの集団構造を形成した環境的要因を探索するため、現在利用可能なほぼすべての地形データ（高度、植生、土壌、流量、土壌水分含有量）を用いて、生息適地モデルを構築し、これに基づくコスト距離と遺伝距離を比較したところ、高度及び土壌を変数として構築したモデルと高い相関が見られた。したがって、アマミイシカワガエルの集団構造は、奄美大島における起伏の激しい複雑な地形と、それに依存した生息適地の連続性によって形成されたことが考えられた。

5) 透明ガエル「スケルピオン」の量産化

ニホンアカガエルにおいては、黒色眼と灰色眼の二つの色彩突然変異系統があり、これらの突然変異系統を用いて、2007 年には両生類で初となる体が透明で内臓が透けて見える「透明ガエル」（スケルピオン）を誕生させることに成功し、「透明ガエルおよびその作製方法」については特許を取得している。本研究では、有用な実験動物の実用化を目的に、透明ガエルの量産化を行った。「透明ガエル」の雌雄の組合せで交配を行い、2 代目「透明ガエル」の系統確立を試みるとともに、黒色眼と灰色眼の二つの色彩突然変異遺伝子をヘテロ接合に持つ雌雄を用いて、種々の組合せで交配を行うことによって、これらの遺伝子をホモ接合に持つ「透明ガエル」を飼育維持して、量産化に成功した。これらは、内臓透視のできる新しい実験動物として、環境、医学、生物学の分野において実験材料や教材として利用価値が高いと思われ、すでに国内外から需要があり、動物愛護の伝統がある欧米では、特に「透明ガエル」への関心は高い。

6) 両生類の初期発生過程における形態形成の分子機構

脊椎動物の初期発生では、一個の受精卵が細胞分裂を繰り返し、それぞれの細胞が分化しながら所定の位置に配置されていく。近年、これらの細胞分裂、分化、移動に細胞増殖因子が重要な役割を担うことが明らかにされている。本研究では、アフリカツメガエルを用いて、初期発生過程における細胞増殖因子の働きを解析し、形態形成の分子機構の解明を試みている。骨形成タンパク質（BMP）は、体の背腹軸形成を制御する細胞増殖因子であり、当研究グループでは、BMPに対する細胞応答を抑制する働きを持つOct-25転写因子を単離している（Takebayashi-Suzuki et al., Mechanisms of Development 2007）。また、昨年度までに、Oct-25転写因子によって発現が誘導される標的遺伝子としてFoxB1転写因子を単離し、FoxB1がBMP応答を抑制して神経形成を促進すること、および、他の細胞増殖因子シグナル（FGF、Wnt）と相互作用して中枢神経系の前後軸パターン形成を調節することを明らかにしてきた。平成22年度は、FoxB1遺伝子の機能阻害実験を行い、初期発生におけるFoxB1の必要性を検討した。また、後方神経形成の促進機構についても解析を行った。特異的なアンチセンスオリゴにより、FoxB1の機能を阻害すると、後方神経の抑制と前方神経の拡大が観察され、予想通りFoxB1が後方神経の形成に必要であることが確認できた。しかしながら、予想に反して神経組織の誘導自体は、ほぼ正常であることが分かり、FoxB1機能阻害の影響を補う分子が存在すると考えられた。このような機能を持つものとして、FoxB1遺伝子上流で働くOct-25遺伝子が考えられたため、FoxB1とOct-25の二重阻害を行い、神経誘導が著しく抑制されることを確認した。したがって、FoxB1とOct-25が機能的に協調して、神経形成の促進に働いていることが明らかになった。一方、後方神経形成の促進機構については、FoxB1が、Wnt・FGF経路を活性化して、神経の後方化を導くことが分かった。以上の結果から、FoxB1は、Oct-25と協調的に働き、BMP応答を抑制することで神経化を引き起こし、またWnt・FGF経路を介して神経の後方化を促進することが分かった。

IV. 社会活動

○セミナー・講義・講演会講師等

花田秀樹，田澤一朗：広島県立教育センター主催の「第13回生物教材バザール」に参加し教材の提供（2010年5月）

柏木啓子：第一回開会セミナー講師「北九州市板櫃川における後肢欠損ツチガエルについて考える」2010年8月3日 北九州市役所（北九州市）

住田正幸：プレゼンター「生きた化石イボイモリと日本一きれいなイシカワガエルと内臓透視スケルピオン」日本動物学会第81回大会動物学ひろば 2010年9月25日 東京大学（東京）

住田正幸：科学実験教室講師「日本一きれいなイシカワガエルと透明ガエル スケルピオンのかんさつ教室」2010年11月12日 平岩小学校（東広島）

倉林 敦：長浜バイオ大学・バイオセミナー講師。講義題名「動物ミトゲノムの解

析方法と両生類における実践例：ミトゲノム解析から何を知ることができるのか？」2011年3月 長浜バイオ大学（長浜）

○各種役員，委員

矢尾板芳郎：文部科学省国立遺伝学研究所・生物遺伝資源委員会委員

花田 秀樹：日本動物学会中国四国支部・会計監査

古野伸明：広島工業大学・入試委員

三浦郁夫：（財）染色体学会・理事・学会賞選考常任委員・学会誌編集委員

三浦郁夫：Editorial Board of Asian Herpetological Research

柏木啓子：北九州市板櫃川後肢欠損ガエル調査検討委員会・委員

住田正幸：国際両生爬虫類学会・執行委員

鈴木 厚：日本ツメガエル研究集会・組織委員

鈴木 厚：ツメガエルゲノムプロジェクト・ワーキンググループ委員

倉林 敦：Gene誌 および Zoological Science誌・論文レビューアー

V. 国際交流活動

○国際共同研究

三浦郁夫

・成都生物学研究所（中国）Prof. Zeng Xiaomao

研究テーマ：ツチガエル種族系統進化の起原をもとめて-日本から朝鮮半島、そして中国

大陸へー

・キャンペラ大学（豪州）Prof. Jenny Graves, Prof. Tariq Ezaz

研究テーマ：爬虫類および両生類における性染色体の進化について

住田正幸

・バングラデシュ農業大学（大学間協定締結校）Khan, M. M. R. 教授との共同研究

「生化学的および分子生物学的手法による日本とバングラデシュのカエル類の系統進化関係」

倉林 敦

・マラヤ大学 BA. Daicus博士・マレーシア国民大学H-S Yong 教授（共にマレーシア）、ブラウシュバイク工科大学・ミュンヘン動物博物館のMiguel Vences教授とFrank Glaw 博士（共にドイツ）と共同研究を実施した。

○外国人留学生の受入れ

住田正幸

・文部科学省国費留学生（Kurniawan, Nia, インドネシア）（D3）

・文部科学省国費留学生（Hasan, Mahmudul, バングラデシュ）（D2）

○外国人客員研究員

住田正幸

- Alam, Md. Shafiqul (バングラデシュ農業大学) 平成22年4月1日から平成22年5月31日まで「バングラデシュにおける無尾両生類の種多様性と保全に関する遺伝学的研究」というテーマで、共同研究を行った。
- Agung Pramana Warih Marhendra (University of Brawijaya, Indonesia) 平成22年6月17日から平成22年7月17日まで「ミトコンドリア16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づくインドネシア産無尾両生類における遺伝的多様性と系統関係に関する研究」というテーマで共同研究を行った。

VI. その他（特記事項）

- 理学部・大学院理学研究科公開（平成22年11月5日）において研究施設を公開し、およそ150名が見学した。上記とは別に、平成22年度には17件総数200名程が施設見学をしている。
- 花田秀樹助教と田澤一朗助教は附属両生類研究施設で行われている系統保存事業に従事している。
- NHK番組「クローズアップ現代」の「カエルの磁気浮上実験」（2010年12月13日放映）を藤原准教授（数理分子生命専攻）とともに行った。
- International Symposium on Biodiversity Sciences (ISBDS) 2010, “Genome, Evolution and Environment” (August, 2010. Nagoya) において、倉林敦助教が Travel Award を獲得した。
- 新種「アマミイシカワガエル」記載 (Zootaxa 2767: 25-40) の成果が、新聞（朝日新聞2010年9月16日、2011年2月18日、朝日小学生新聞2011年2月27日、奄美新聞2010年9月16日、2011年2月20日、南海日々新聞2011年2月20日）に掲載された。
- 沖縄本島で「青いイシカワガエル」の発見が、報道（日本経済新聞他 国内10紙2010年4月3日～6日）された。
- 透明カエル「スケルピオン」の量産化が、新聞（読売新聞2010年9月27日、朝日新聞2011年2月21日～22日、朝日小学生新聞2011年2月23日）やテレビ（TBS全国放送2011年2月21日～22日）で取り上げられた。
 - イボイモリの実験室での自然繁殖成功が、読売新聞（2010年9月25日）で報道された。

VII. 各部門の研究内容と研究業績

[発生遺伝学研究部門]

教授・矢尾板芳郎 (Yoshio Yaoita)

研究内容

1. 甲状腺ホルモン受容体の発現量の違いによる甲状腺ホルモン感受性の制御

Regulation of thyroid hormone sensitivity by differential expression of the thyroid hormone receptor

[目的]

両生類の変態（メタモルフォシス）は、幼生から成体へと体の作り替えが起きる現象である。特に無尾両生類の変態は劇的であり、四肢の発生、成長と尾の退縮が連続して起きる。体長の2倍以上の長さである尾が数日のうちに完全に消失する。無尾両生類の発生に伴い、前後肢の成長や尾の退縮等、ほとんど全ての体内器官が変化していく。このような体の再構成のメカニズムを分子生物学的な立場から明らかにするために研究をしている。

変態における全身の体内器官の形態変化は決まった順序で起きる。発生過程の血中甲状腺ホルモン濃度の増加に伴い、後肢は変態前期の低濃度の甲状腺ホルモンに反応して分化、成長するのに対して、尾の筋細胞は変態の最盛期の高濃度の甲状腺ホルモンの存在下でのみ細胞死を起こす。この説明として、各器官に異なる、甲状腺ホルモン感受性があるためと考えられているが、その分子基盤に関しては何も報告されていない。

形態変化のタイミングを決めている要因を調べるために、組織ごとに安定して発現していると想定されている甲状腺ホルモン受容体alphaに注目して研究を押し進めた。

[成果・考察]

無尾両生類変態の形態変化のタイミングの決定機構のモデルを実験結果に基づいて検討した。

1) 甲状腺ホルモン受容体alphaとbetaや甲状腺ホルモン活性化酵素と不活性化酵素の遺伝子発現の変化を様々な器官で調べた。血中甲状腺ホルモン濃度が低い時期に分化・成長している後肢や脳では、甲状腺ホルモン受容体alphaの発現が高く、一方、甲状腺ホルモン濃度が高くなる変態の最盛期で退縮が起きる尾では甲状腺ホルモン受容体alphaの発現は低かった。甲状腺ホルモンの活性化酵素は組織が形態変化を起こす時に、その組織での発現が高かった。甲状腺ホルモン受容体alphaの発現が高いことが組織の甲状腺ホルモンに対する感受性を高くし、甲状腺ホルモンへの反応が甲状腺ホルモン活性化酵素により促進されると推測した。

2) 幼生における甲状腺ホルモンの合成を薬物で阻害して、飼育水に加えた甲

甲状腺ホルモン濃度だけが幼生に影響を及ぼす条件下で、尾の筋細胞に甲状腺ホルモン受容体とGFP遺伝子を強制発現させ、低濃度の甲状腺ホルモンの飼育水で処理すると筋細胞のGFP発現が減少した。筋細胞に細胞死抑制遺伝子bc1XLを共に強制発現させるとGFP発現の減少が抑制されることから、甲状腺ホルモン受容体の高発現下では低濃度の甲状腺ホルモンに反応して筋細胞が死んでいることが明らかになった。

3) 甲状腺ホルモン受容体の高発現下での低濃度の甲状腺ホルモンによる筋細胞死が甲状腺ホルモン活性化酵素阻害物質イオパニ酸により抑制された。つまり、甲状腺ホルモン活性化酵素の発現誘導を介して細胞死が起きていることが示唆された。実際、尾の筋細胞に甲状腺ホルモン受容体を過剰発現させて低濃度の甲状腺ホルモン処理した時に甲状腺ホルモン活性化酵素mRNAの誘導が観察された。後肢では甲状腺ホルモン活性化酵素mRNAが高く発現されていることが知られている。これも、甲状腺ホルモンによって誘導されていることを証明した。

4) 甲状腺ホルモン活性化酵素遺伝子のプロモーターを解析すると、甲状腺ホルモン認識塩基配列 (TRE) が存在していた。Gel retardation assayによって、甲状腺ホルモン受容体beta遺伝子のプロモーターのTREより甲状腺ホルモン受容体への親和性が低いTREであることを示した。したがって、甲状腺ホルモン活性化酵素のTREが甲状腺ホルモンにより制御されるためには甲状腺ホルモン受容体の高発現が必要であることが示唆された。実際、細胞株で甲状腺ホルモン受容体遺伝子を過剰発現させると甲状腺ホルモン活性化酵素mRNAがより多く誘導された。卵母細胞の系でも甲状腺ホルモン受容体遺伝子を高発現させることが、甲状腺ホルモン活性化酵素のTREが転写活性をコントロールするために必要であることが示された。

5) 上記の実験結果により甲状腺ホルモン受容体alphaが高発現している後肢や過剰発現させた尾の筋細胞では、変態前期の少量の甲状腺ホルモン前駆体 (T4) でも甲状腺ホルモン活性化酵素遺伝子のプロモーターを弱く刺激してT4を活性化型甲状腺ホルモン (T3) に変換し、徐々に安定的に甲状腺ホルモン活性化酵素を発現させ、数日後には高い甲状腺ホルモン活性化酵素発現によりT4が効率的にT3に活性化され、弱いTREを有する甲状腺ホルモン応答遺伝子でも誘導され、形態変化が起きるものと考えられる。したがって、変態における形態変化のタイミングの決定機構として「甲状腺ホルモン受容体alpha高発現によるpositive feed-forward説」を提唱する。これによれば、器官の甲状腺ホルモン受容体alphaの発現が高い程、変態のより早い時期に器官の再構成が起きることになる。

[将来の展望]

「甲状腺ホルモン受容体alpha高発現によるpositive feed-forward説」を証明するためにより生理的な条件下での実験を行う。また、自然変態で甲状腺ホルモン受容体alpha発現と形態変化のタイミングが相関する例を探し求めて示し、より確かなものにする。

2. ツメガエル甲状腺ホルモン受容体alpha mRNAの5' -UTRによる翻訳抑制 Translational regulation by the 5' -UTR of the *Xenopus* thyroid hormone receptor alpha mRNA

[目的]

甲状腺ホルモンはヒトの生理・病理病態と関係しているだけでなく様々な生命現象とも関わっており、脊索動物の変態、特に両生類の変態を引き起こす。その時、甲状腺ホルモン受容体alphaの発現量は各々の器官で各々一定量へ制御されており、その器官のホルモン感受性と関連していると考えられている。つまり、発生中に漸増して行く血中甲状腺ホルモン濃度に反応して形態変化のタイミングが決まる訳だが、甲状腺ホルモン受容体alphaの発現量とその主な決定要因になっている可能性がある。

甲状腺ホルモン受容体は、発生過程において血中で増加していく甲状腺ホルモンに結合することにより遺伝子発現を調節し、両生類の変態の中で重要な役割を果たしている。甲状腺ホルモン受容体にはalpha、betaがある。甲状腺ホルモン受容体betaは前肢の出芽から尾の退縮までの最盛期と言う時期に、高い血中甲状腺ホルモン濃度に反応して発現する。甲状腺ホルモン受容体alpha mRNAは受精後3日頃から発現し始め、増加し続ける。頭部と尾では受精後3週間から最盛期後期まで甲状腺ホルモン受容体alpha mRNAは増加し続けるにもかかわらず、細胞当たりの甲状腺ホルモン受容体alpha蛋白質分子数が、各々、6000と2000と一定であることが知られている。このことから、甲状腺ホルモン受容体alphaの発現は転写後、強力な調節を受けていると想像されている。

したがって、甲状腺ホルモン受容体alpha mRNAの翻訳調節を明らかにして、その細胞内蛋白量の設定機構を知ることは甲状腺ホルモンへの感受性の決定機構を理解することになり、変態における器官変化の順番がどのように決められているかを理解することの一助となる。また、一般的な翻訳制御機構の解明にも寄与する。

[成果・考察]

1) 様々な種の両生類の甲状腺ホルモン受容体alpha mRNAの5' -UTRをクローニングして塩基配列を比較した。ツメガエル類では開始コドンの上流、160 bpまで保存されていた。

2) 開始コドンの上流、160 bpがある甲状腺ホルモン受容体発現型ベクターと160 bpが無いものを培養細胞にtransfectionしてWestern Blottingして受容体蛋白質量を比較すると、前者で甲状腺ホルモン受容体蛋白質が数十分の一に抑制されていた。

3) 開始コドンの上流、160 bpをリポーター遺伝子であるfirefly luciferase遺伝子の前に挿入することにより、luciferase活性が十分の

一以下に下がった。つまり、構造遺伝子が違っていても5'-UTRの翻訳抑制活性が発揮されることが示された。

4) 甲状腺ホルモン受容体 alpha mRNAの5'-UTRを5'側や3'側から欠失させたDNA断片をluciferase遺伝子上流に挿入した発現型ベクターを培養細胞にtransfectionさせてluciferase活性を測定することにより、5つの翻訳抑制の塩基配列があることが確認された。それらは単独で翻訳抑制活性を有するシスエレメントであった。

[将来の展望]

5つの翻訳抑制のシスエレメントが甲状腺ホルモン受容体 alpha mRNAの5'-UTRに見つかった。それぞれのシスエレメントに塩基置換を導入して翻訳抑制活性がどのような影響を受けるのかを調べることによって、より詳細な分子機構について考察できるかもしれない。また、翻訳系の条件を自由に設定できるようにするため、in vitroの翻訳システムを確立することが重要になる。そうなれば想定される翻訳抑制モデルを検証できる。

3. 変態前後のツメガエルにおける Hox 遺伝子の発現。

Expression of Hox genes during the *Xenopus* metamorphosis

[目的]

初期発生においてHox遺伝子群が体の前後軸に沿った位置を規定するという考えは受け入れられているが、変態のような後期発生における役割は何も解析されていない。そこで、本研究において体の再構成が行われる両生類の変態ではHox遺伝子の発現パターンがどうなるかについて調べる。

[成果・考察]

体節ごとに抽出したRNAを用いたreal time PCR解析により、初期胚と同様のHox遺伝子の発現パターンが変態前のツメガエル幼生にて観察された。

[将来の展望]

変態後のツメガエルにおける体節ごとのHox遺伝子の発現などを調べて、尾の退縮とともに尾でのHox遺伝子の発現が消えるのか、それとも、残った体で発現しているのかを調べてみたい。

研究業績

①原著論文

1. Yukiko Yamazaki, Ryo Akashi, Yutaka Banno, Takashi Endo, Hiroshi Ezura, Kaoru Fukami-Kobayashi, Kazuo Inaba, Tadashi Isa, Katsuhiko Kamei, Fumie Kasai, Masatomo Kobayashi, Nori Kurata, Makoto Kusaba, Tetsuro Matuzawa, Shohei Mitani, Taro Nakamura, Yukio Nakamura, Norio Nakatsuji, Kiyoshi

Naruse, Hironori Niki, Eiji Nitasaka, Yuichi Obata, Hitoshi Okamoto, Moriya Okuma, Kazuhiro Sato, Tadao Serikawa, Toshihiko Shiroishi, Hideaki Sugawara, Hideko Urushibara, Masatoshi Yamamoto, Yoshio Yaoita, Atsushi Yoshiki, and Yuji Kohara
NBRP databases: databases of biological resources in Japan
Nucleic Acids Research 38, D26-D32, 2010

②総説・著書

1. Keiko Kashiwagi, Akihiko Kashiwagi, Atsushi Kurabayashi, Hideki Hanada, Keisuke Nakajima, Morihiko Okada, Minoru Takase, and Yoshio Yaoita.
Xenopus tropicalis: an ideal experimental animal in amphibia.
Exp Anim. 59(4): 395-405, 2010

③学会発表

国内学会

1. 田沢一朗、石田雄二、吉里勝利、矢尾板芳郎
無尾両生類の変態期における Hox 遺伝子の発現
社団法人日本動物学会第 81 回大会、2010 年 9 月 23 日、東京大学駒場キャンパス、東京都

2. 岡田守弘、中島圭介、矢尾板芳郎
甲状腺ホルモン受容体 α (TR α) mRNA の翻訳抑制の分子機構
第 83 回日本分子生物学会、2010 年 12 月 8 日、神戸ポートアイランド、神戸

3. 中島圭介、藤本健太、矢尾板芳郎
無尾両生類の変態における甲状腺ホルモンに対する組織感受性の決定機構
第 83 回日本分子生物学会、2010 年 12 月 8 日、神戸ポートアイランド、神戸

国際学会

該当無し

④科研費等の受け入れ状況

科学研究補助金 基盤研究(C) 「甲状腺ホルモン受容体 α mRNA の uORF による翻訳抑制機構」 代表者：矢尾板芳郎 1,170 千円

准教授・高瀬 稔 (Minoru Takase)

研究内容

I. 性転換機構の解析：両生類へのホルモン様化学物質影響の基盤的研究

Analyses of mechanisms of sex reversal: basic studies on effects of hormonal chemicals on amphibians

[目的]

両生類では性ホルモン処理により性転換が誘導されることが古くから知られている。しかし、そのメカニズムに関してはほとんど解明されていない。特にすでに分化した生殖腺の性転換現象には①脱分化・リプログラミングからなると思われる分化転換機構②生殖細胞などの生殖腺を形成する細胞の性分化機構の2つのメカニズムが働いていると考えている。本研究では、ツチガエル (*Rana rugosa*) およびトノサマガエル (*R. nigromaculata*)、ネッタイツメガエル (*Silurana (Xenopus) tropicalis*) を用いて、性ホルモン投与または環境化学物質投与による性転換効果の基盤的データの収集を目的として行った。

[材料・方法]

- 1) 雄と雌の両方に性転換する東広島集団ツチガエルとほとんど性転換が誘導されない浜北集団ツチガエルを用いて種内雑種を作成し、幼生期にテストステロンプロピオネート (TP) を1回腹腔内注射した。変態後に生殖腺を取り出し、組織学的に解析した。
- 2) 地域により精巣卵出現率が異なるトノサマガエルおよびエストロゲンにより容易に雌への性転換が誘導されるネッタイツメガエルを用いて、変態後にエストラジオールベンゾエイト (EB) およびノニルフェノール (NP)、ビスフェノール A (BPA) を投与し、精巣卵形成の有無を組織学的に解析した。

[成果]

- 1) 浜北集団と東広島集団を用いた性逆雑種幼生に TP 処理を行ったところ、精巣を持つ個体が対照群に比べて有意に多かった。
- 2) トノサマガエルでは NP および BPA の処理で精巣卵形成が誘導されたが、EB 処理では誘導されなかった。一方、ネッタイツメガエルではいずれの処理においても精巣卵形成は見られなかった。しかし、EB 処理では精巣の発達阻害が観察された。

[考察]

- 1) 性転換し易い集団と性転換し難い集団の種内雑種へ性ホルモンを投与したところ、性転換が誘導された。従って、東広島集団では性転換機構を持ち、浜北集団では性転換機構を全てもしくは一部を欠いていることが考えられた。
- 2) トノサマガエルではエストロゲン様作用の弱い環境化学物質により精巣卵

が誘導された。従って精巣卵形成はエストロゲン様作用とは異なる作用により誘導されることが示唆された。一方、ネッタイツメガエルでは未分化生殖腺を持つ雄の幼生へエストロゲン処理すると容易に雌へ性転換することが知られているが、変態後の分化した精巣ではいずれの処理においても精巣卵形成が見られなかった。従って、種により精巣卵形成能が異なることが明らかになった。

[将来の展望]

- 1) ツチガエルでは性転換の促進機構が働いていることがまずは考えられた。従って、東広島集団を用いて性転換関連遺伝子の網羅的解析および性ホルモン作用機序の解析を進め、性転換に関して変異体である浜北集団との比較も行いながら、性転換機構の全容を解明する。一方、性転換抑制機構については今後さらに検討する必要がある。
- 2) トノサマガエルやネッタイツメガエルとは異なる性転換様式を示すツチガエルを用いてエストロゲンおよび環境化学物質の投与実験を行い、精巣卵形成機構を解析するための最も良いモデル両生類を選ぶことが必要である。

II. 性分化関連遺伝子の探索：マイクロアレイを用いた網羅的解析

Isolation of genes related to sex differentiation: comprehensive analysis employing microarray technique

[目的]

ネッタイツメガエルはゲノム解析や様々な EST 解析が行われている。そこで、両生類性分化関連遺伝子の探索を目的として、それらデータベースを基にアレイを作成し、性分化後の NF ステージ 58 および変態完了期の NF ステージ 66 の精巣および卵巣における遺伝子発現をマイクロアレイ法により網羅的に解析した。そして、精巣で発現量が多い遺伝子にまず着目し、ネッタイツメガエルおよびツチガエルの精巣における遺伝子発現を解析した。

[材料・方法]

ネッタイツメガエルの NF ステージ 58 幼生および変態完了期の NF ステージ 66 の生殖腺を取り出して左右に切り分け、片側の生殖腺を組織学的に解析し、精巣および卵巣を確認した。その結果を基にもう片側の生殖腺を精巣と卵巣とに分けた後に全 RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。マイクロアレイ解析には、42,655 個の cDNA を固定したアレイを用いた。次に、精巣において発現量の多い遺伝子に着目し、ネッタイツメガエルの精巣と卵巣を用いて RT-PCR 解析を行った。さらにネッタイツメガエルおよびツチガエルの精巣を用いて in situ ハイブリダイゼーション解析も行った。

[成果]

ステージ 66 では、183 個の遺伝子が卵巣に比べ精巣において有意に高い発現

を示した。その中には細胞間結合に関するいくつかの遺伝子が含まれていたため、それらの遺伝子発現を RT-PCR 法により解析したところ、ネツタイツメガエルの精巣における Claudin 遺伝子発現が卵巣に比べて高かった。さらに、精巣を用いた *in situ* ハイブリダイゼーション解析の結果、ネツタイツメガエルおよびツチガエル共にシスト中の生殖細胞が強い陽性を示した。

[考察]

Claudin はタイトジャンクションを構成するタンパク質として同定され、これまでいくつものサブタイプが報告されている。精巣では精細管という卵巣には見られない構造が構築され、ほ乳類では精細管内のセルトリ細胞同士がタイトジャンクション（血液-精巣関門）を形成し、精子形成に関して必要な微小環境（ニッチ）を作っている。ほ乳類では血液-精巣関門に関わる Claudin サブタイプが知られている。今回、シスト内の生殖細胞において強い発現が見られたことから、両生類では生殖細胞同士の接着に関与していることが考えられる。また、Claudin のサブタイプによっては細胞接着以外の機能を持っていることも知られている。そこで、生殖細胞の分化に関与している可能性も考えられる。

[将来の展望]

マイクロアレイで同定された他の性分化関連遺伝子に関しても RT-PCR 法を用いて精巣および卵巣における遺伝子発現の違いを確かめる必要がある。

また、Claudin 遺伝子は雄の生殖細胞で高い発現を示すことから、性転換過程における生殖細胞の分化マーカーとして有用であると考えられる。

III. 両生類脳におけるニューロステロイドの解析：アカハライモリの脳におけるシトクロム P450scc 遺伝子発現

Neurosteroids in the brain of amphibians: expression of cytochrome P450scc gene in the brain of the red bellied newt *Cynops pyrrhogaster*

[目的]

ニューロステロイド生合成では、まずシトクロム P450scc の酵素活性によりコレステロールからプレグネノロンが生合成される。そして、プレグネノロンが共通の前駆物質となり、様々なニューロステロイドが生合成される。従って、ニューロステロイドが生合成されるか否かを知るためには、脳におけるシトクロム P450scc の発現やプレグネノロンの生合成を確かめることが重要である。本研究では、アカハライモリからシトクロム P450scc 遺伝子を単離し、脳における遺伝子発現を解析した。さらに、*in vitro*での脳のプレグネノロン生合成も解析した。

[材料・方法]

アカハライモリの精巣から全 RNA を抽出し、5' /3' -RACE 法により全長シト

クロム P450scc cDNA を単離した。そして、脳におけるシトクロム P450scc 遺伝子発現を RT-PCR 法および in situ ハイブリダイゼーション法により解析した。さらに、脳ホモジネートをアイソトープラベルされたコレステロールを含む培養液中でインキュベーションした後に培養液を回収し、HPLC を用いて培養液中に含まれるステロイドを解析した。

[成果]

有尾両生類では初めて全長シトクロム P450scc cDNA が単離された。RT-PCR 法により脳における遺伝子発現を解析したところ、終脳および間脳、中脳、小脳において発現が認められた。また、in situ ハイブリダイゼーション法を用いて解析したところ、全ての脳領域において発現細胞が観察された。さらに、HPLC 解析の結果、アイソトープラベルされたプレグネノロンが培養液に含まれていた。

[考察]

アカハライモリの脳は広範囲にシトクロム P450scc 遺伝子を発現していることが明らかになった。また、実際に脳がプレグネノロンの生合成能を持つことが確かめられた。これまで、アカハライモリの脳から 7α -ヒドロキシプレグネノロンがニューロステロイドとして単離され、免疫組織染色によりシトクロム P450scc タンパク質の発現が示唆されてきた。今回の研究結果から、アカハライモリの脳においてコレステロールからニューロステロイドが生合成されることがさらに確かめられた。ほ乳類および鳥類、無尾両生類においてニューロステロイド生合成が報告されていることから、ニューロステロイド生合成は脊椎動物において広く見られる生理的な現象であることが考えられる。

[将来の展望]

無尾両生類では、アンドロゲンおよびエストロゲン、副腎ステロイドがニューロステロイドとして生合成されていることが報告されている。脳における受容体の発現と局在を調べる事は、ニューロステロイドの機能を考えるためにも大変重要である。変温動物であり、水辺において生活または繁殖する両生類は環境から様々なストレスを受けていることが考えられる。そこで、ストレスと関係があると思われる副腎ステロイドの受容体に着目して、その発現や局在を解析する。

研究業績

①原著論文

1. Takase M., Haraguchi S., Hasunuma I., Kikuyama S., Tsutsui K. (2011) Expression of cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme mRNA and production of pregnenolone in the brain of the red-bellied newt *Cynops pyrrhogaster*. Gen. Comp. Endocrinol. 170, 468-474.

2. Katsu Y., Taniguchi E., Urushitani H., Miyagawa S., Takase M., Kubokawa K., Tooi O., Oka T., Santo N., Myburgh J., Matsuno A., Iguchi T. (2010) Molecular cloning and characterization of ligand- and species-specificity of amphibian estrogen receptors. *Gen. Comp. Endocrinol.* 168, 220-230.
3. Kashiwagi K., Kashiwagi A., Kurabayashi A., Hanada H., Nakajima K., Okada M., Takase M., Yaoita Y. (2010) *Xenopus tropicalis*: an ideal experimental animal in amphibian. *Exp. Anim.* 59, 395-405.

②総説・著書

なし

③学会発表

国内学会

1. 高瀬 稔、井口泰泉 「両生類精巣分化過程における claudin 5 遺伝子発現」 第 33 回日本分子生物学会年会、12/7-10、2010、神戸.
2. 高瀬 稔 「変態後のネッタイツメガエル精巣に対するエストロゲンおよび内分泌かく乱物質の影響」 第 13 回環境ホルモン学会研究発表会、12/16-17、2010、東京.

国際学会

なし

④科研費等の受け入れ状況

1. 基礎生物学研究所個別共同利用研究 2010 年度 22 万 4 千円 (旅費・他機

助教・中島圭介 (Keisuke Nakajima)

研究内容

アフリカツメガエル変態期における甲状腺ホルモンに対する組織感受性決定機構の解明

The analysis of thyroid hormone sensitivity regulation mechanisms during *Xenopus laevis* metamorphosis

[目的]

無尾両生類の変態は水中生活を行っていた幼生が陸上生活を行う成体に成長するために全身の器官を変化させる劇的なものである。中でも尾の退縮は、体長の2倍以上の長さがあった器官が数日のうちに無くなってしまうもので、古くから注目されてきた。両生類の変態は甲状腺ホルモンによって引き起こされ、定められた順序で定められた器官が順番に変化していくことが重要である。例えば後肢は変態前期の低濃度の甲状腺ホルモンに反応して成長するのに対し、尾の筋細胞は変態最盛期の高濃度の甲状腺ホルモンでないと細胞死を起こさないことが知られているが、その分子機構はこれまで明らかになっていなかった。血液に乗って全身を巡る甲状腺ホルモンに対してこのような反応性の違いを生み出す機構として組織感受性に注目し、組織感受性を生み出す機構を解明することを目的とした。

[材料・方法]

- 1) 変態期のアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の様々な組織から RNA を抽出し、甲状腺ホルモンシグナルに関わる甲状腺ホルモン受容体 α 、 β 、レチノイド X 受容体 α 、細胞内で甲状腺ホルモンを活性型に変換する 2 型脱ヨード化酵素、甲状腺ホルモンを分解する 3 型脱ヨード化酵素の発現量をリアルタイム PCR を用いて定量化した。
- 2) リアルタイム PCR の結果、甲状腺ホルモン感受性の高い後肢において甲状腺ホルモン受容体 α と 2 型脱ヨード化酵素の発現量が多かったことから、これらが甲状腺ホルモン感受性に深く関わっていると考えた。この考えを証明するために甲状腺ホルモン受容体 α を甲状腺ホルモン感受性の低い尾の筋細胞において強制発現させたところ、後肢と同程度の高い感受性で細胞死を引き起こすことを確認した。
- 3) 上記の細胞死において 2 型脱ヨード化酵素の活性が必要であることを 2 型脱ヨード化酵素の抑制剤であるイオパノ酸を用いることで証明した。
- 4) 内在性の甲状腺ホルモンの合成を抑えるメチマゾールで幼生を処理、さらに甲状腺と甲状腺ホルモン放出ホルモンを分泌する下垂体を除去することによって後肢における 2 型脱ヨード化酵素の高い発現はほとんどが甲状腺ホルモンによって誘導されていることを示した。
- 5) 甲状腺ホルモンによる 2 型脱ヨード化酵素の発現誘導の機構を調べる

ために2型脱ヨード化酵素のプロモーター領域のクローニングを行い、ここに甲状腺ホルモン応答配列があることを見つけた。

- 6) 上記甲状腺ホルモン応答配列が甲状腺ホルモン受容体 α と弱い結合を示すことをゲルモビリティシフトアッセイを用いて示した。
- 7) レポーター遺伝子の upstream に上記甲状腺ホルモン応答配列を組み込み、卵母細胞で甲状腺ホルモン受容体 α 、レチノイドX受容体 α と共に発現させ、この配列が弱い活性を持つことを示した。

[成果と考察]

上記の結果から甲状腺ホルモンに対する組織感受性の決定機構として甲状腺ホルモンを活性化する2型脱ヨード酵素に制御される以下のモデルを提唱する。後肢は変態初期に甲状腺ホルモン受容体を多量に発現しているために、弱い甲状腺ホルモン応答配列しか持たない2型脱ヨード酵素でさえ、この時期の低濃度の甲状腺ホルモンに反応して発現が弱く誘導される。一旦2型脱ヨード酵素の発現が起こると甲状腺ホルモンが活性化され、さらに2型脱ヨード酵素の発現が強まり、この正のフィードバックによって甲状腺ホルモンシグナルが増強され、急激な成長を示す。一方、尾は変態期を通して甲状腺ホルモン受容体 α のタンパクレベルが低いので甲状腺ホルモン受容体 α と弱い結合しかできない2型脱ヨード酵素の甲状腺ホルモン応答配列からは転写が起らない。さらに甲状腺ホルモンを不活性化させる3型脱ヨード酵素の発現によって変態前期の甲状腺ホルモンシグナルが抑制されている。変態最盛期に甲状腺ホルモン濃度が上昇すると強い甲状腺ホルモン応答配列を持つ甲状腺ホルモン受容体 β の発現が誘導され、甲状腺ホルモンシグナルが伝わり、2型脱ヨード酵素による正のフィードバックが引き起こされる。その結果様々な甲状腺ホルモン応答遺伝子が活性化され、尾の退縮が起こる。

以上の結果および考察を論文にまとめ、投稿中である。

[将来の展望]

変態期における形態変化の順序を決める機構についてはこれまでほとんど研究されてこなかった。本研究はこの問題の答えを様々な方法で実験的に示しており、いわば長年にわたった大きな命題に終止符を打つものである。

研究業績

① 原著論文

I. K. Kashiwagi, A. Kashiwagi, A. Kurabayashi, H. Hanada, K. Nakajima, M. Okada, M. Takase and Y. Yaoita
Xenopus tropicalis: An Ideal Experimental Animal in Amphibia
Experimental Animals 2010 July; 59(4): 395-405

② 総説・著書

該当なし

③学会発表

国内学会

1. 中島圭介、藤本健太、矢尾板芳郎

無尾両生類の変態における甲状腺ホルモンに対する組織感受性の決定機構

The mechanism of thyroid hormone sensitivity regulation during anuran metamorphosis

第33回日本分子生物学会、神戸(2010, 12.8)

2. 岡田守弘、中島圭介、矢尾板芳郎

甲状腺ホルモン受容体 α (TR α) mRNAの翻訳抑制の分子機構の解析

第33回日本分子生物学会、神戸(2010, 12.8)

国際学会

該当なし

④科研費の受け入れ状況

該当なし

助教・花田秀樹 (Hideki Hanada)

研究内容

無尾両生類は、甲状腺ホルモンによってオタマジャクシ尾部アポトーシスを誘導できること、またそれを時系列に外部形態の変化として捉えることができることなどから、アポトーシス研究には最適な研究材料の一つと考えられている。さらには、化学物質、過重力および強磁場に対するカエルの感受性の高さから、卵、胚、オタマジャクシおよびカエルを様々な研究に用いてきた。現在研究中の下記項目について述べる。

① 甲状腺ホルモン誘導による無尾両生類オタマジャクシ尾部短縮の機構

Mechanism for thyroid hormone-induced shortening of anuran tadpole tail

筋細胞アポトーシスを通じて起こるオタマジャクシ尾部短縮は変態期における無尾両生類の最も劇的な現象のうちの一つである。多くの研究はミトコンドリア膜透過性 (MPT) がアポトーシスの重要な役割を果たしていることが示してきた。これまで我々はサイクロスポリン A (CsA) が、甲状腺ホルモン (T_3) によって誘導されるミトコンドリアの膨潤と、それに伴って起こる MPT からのサイトクロム c (Cyt. c) 漏出を抑制することを報告してきた。オタマジャクシの変態機構のさらなる解明を目的として、 T_3 誘導尾部短縮におけるサイクロスポリンの効果調べた。低濃度の T_3 によってオタマジャクシ尾部は短縮し、それに伴う caspase-3 と -9 様酵素の活性増加、DNA 断片化およびラダー形成の増加が起こった。CsA はこれらの T_3 の効果を抑制した。より高濃度の T_3 とカルシウムイオンは成体のカエル肝臓から単離したミトコンドリアの膨潤の誘導とその膨潤に伴ったアポトーシス関連物質の放出を起し、その放出された物質を含むフラクションは dATP の存在下において caspase-3 様酵素を活性化させた。この結果は T_3 の直接的間接的作用を通じ、 T_3 によってミトコンドリアから Cyt. c が放出されたことを示す。これらの結果とこれまでの研究データから、ミトコンドリア MPT は T_3 誘導による尾部アポトーシスにおいて重要な役割を担っており、CsA はそれらの T_3 の効果を抑制すると結論づけた。

② 除草剤パラコートによって誘起される培養カエル白血球細胞の染色体損傷に対して崩壊した抗酸化剤の機能

Disrupted function of phenolic antioxidant protection against paraquat-induced structural chromosomal damage in cultured anuran leukocytes

両生類が世界的にその数を急激に減らしている。その原因の一つに考えられるのが農薬などの化学物質の影響といわれている。農薬のうちの一つである除

草剤パラコート (PQ) の毒性は、無尾両生類のオタマジャクシや胚に対して致死性および催奇性があり、いずれも PQ から発生する活性酸素が原因であると考えられている。このように、無尾両生類は PQ 毒性に対して感受性が高いことがわかる。一方、PQ の遺伝毒性の発生機構は、多くの研究者によって次のことがこれまでにわかっている。(1) PQ による NADPH からの電子の奪取、(2) スーパーオキシドの発生、(3) スーパーオキシドジスムターゼによる H₂O₂ への代謝 (4) フェントン反応によるヒドロキシラジカルの発生 (5) 染色体異常発生。

本研究は、培養カエル白血球細胞を用い、脂質過酸化抑制物質 phenolic antioxidant による PQ 遺伝毒性の強化機構を調べた。その結果、PQ 共存下の phenolic antioxidant は本来の役割である脂質過酸化の抑制をせず、PQ の電子ドナーとなって、細胞遺伝毒性を増幅することがわかった。

研究業績

① 原著論文

1. Kashiwagi, K., Kashiwagi, A., Kurabayashi, A., Hanada, H., Nakajima, K., Okada, M., Takase, M. and Yaoita, Y. (2010) *Xenopus tropicalis*: An ideal experimental animal in Amphibia. *Exp. Anim.* 59(4): 395-405.

② 総説・著書

該当なし

③ 学会発表

国内学会

1. 花田秀樹 パラコートによって誘起される培養カエル白血球細胞の染色体異常はブチル化ヒドロキントルエンでさらに増加する。生物教育学会九州支部会 (2010年11月、福岡)。

国際学会

該当なし

④ 科研費等の受け入れ状況

該当なし

助教・田澤一朗 (Ichiro Tazawa)

研究内容

無尾両生類の変態期尾退縮に於ける Hox 遺伝子の機能

The function of the Hox genes during anuran tail resorption

[目的]

両生類の変態は甲状腺ホルモンによって引き起こされる。血中の甲状腺ホルモン濃度は体中で差が無いと考えられるにもかかわらず、甲状腺ホルモンに対する応答性は体の領域ごとに異なる。無尾両生類幼生の皮膚、筋および脊髄は体の前後軸に沿って連続した組織であるが、胴部と尾部とでは変態後の運命が全く異なる。変態期に両領域でプログラム細胞死が活発に起こるが、胴部でのみ活発な細胞増殖が起こり、結果として尾部のみが消失する。この予定消失域を決定する機構は全く解明されていない。

幼生の尾部を切断しレチノイドで処理すると、本来尾が再生されるところに成体の器官である後肢が生じる。このことは、胴部にだけではなく尾部にも変態後も生き残り成体の細胞となり得る細胞が存在することを示す。Hox 遺伝子群は初期発生の動物の細胞に体軸に沿った位置価を与えられている。また、Hox 遺伝子による細胞死調節の報告もあることから、私は「無尾両生類幼生期に発現する Hox 遺伝子が消失域を決定する」という仮説（以下、仮説）を立てた。本研究の目的はこの仮説の検証である。

[材料と方法]

本研究では、最初の段階として、変態期における Hox 遺伝子群の詳細な発現パターンを明らかにし、発現する細胞を同定する。次いで、幼生胴部または尾部特異的に発現する Hox 遺伝子の強制発現および機能阻害実験を生体の胴部および尾部にて行う。これらの実験による変態現象に与える影響を、形態、細胞増殖、および細胞死などに関して明らかにする。同様の遺伝子機能検定は、甲状腺ホルモン処理した培養細胞（幼生由来）を用いても行う。さらに、幼生生体をレチノイド処理することで Hox 遺伝子群の発現を変化させ、Hox コードと変態後の予定運命との関連を調べる。主な実験材料としてアフリカツメガエル *Xenopus laevis* およびネツタイツメガエル *Xenopus tropicalis* を用いる。

[2010年度までに得られた結果と考察]

幼生の Hoxa13 mRNA は脊椎動物胚で一般的に見られるのと同様、体の後方に局在し、特に脊髄での発現が高かった。

共同研究者が予備段階的実験として、脊髄の組織培養系を用いて Hoxa13 機能阻害実験を行った。この実験では Hoxa13 が正常な甲状腺ホルモン誘導性細胞死に必要であることが示唆された。一方、幼生生体尾部の筋管での Hoxa13 機能阻害実験では、Hoxa13 が正常な甲状腺ホルモン誘導性細胞死に必ずしも必要が無

いことが示唆された。

[2010年度内に得られた結果と考察]

両生類変態期に注目して Hox 遺伝子ファミリーの発現を調べた研究はこれまでに無い。無尾両生類の Hox 遺伝子発現パターンは、発生が進んだ尾退縮間近の幼生でも尾芽胚期とよく似ていることが本研究から明らかになった。そして腰部から前側では、変態完了に至るまで基本的にそれまでの発現パターンが保持されていた。以上のことから Hox 遺伝子が胚期だけではなく幼生期以降の領域性決定にも関わっているものと推測される。この発現解析から、尾部特異的発現をする Hox 遺伝子は Hoxa13 の他にもあることが判明した。これらの遺伝子間には機能の冗長性がある可能性があり、1つの Hox 遺伝子の阻害だけでは甲状腺ホルモン誘導性細胞死に影響を与えられないかもしれない。前述の筋管での Hoxa13 機能阻害実験でその影響が認められなかったのは、このことが原因である可能性がある。

なお、幼生の Hox ファミリーの発現パターンはレチノイド処理によって変化させることができた。

[これからの展開]

脊髄での Hoxa13 の機能検定を *in vivo* で行い、前述の予備段階的 *in vitro* 実験結果を確認する。また、Hoxa13 以外の Hox 遺伝子についてもこの実験系で機能検定を行う。筋管については尾部特異的発現をする複数の Hox 遺伝子を同時に機能阻害する実験が、仮説を証明する上でも棄却する上でも必要である。また、前述の通り、幼生をレチノイド処理することで Hox コードを変化させることができた。したがって、この処理による Hox コードの変化と変態期細胞死との関係を調べることは仮説検証のための補足的実験として期待できる。以上の実験を行い、仮説検証作業を進めることを予定している。

研究業績

① 原著論文

なし

② 総説・著書

なし

③ 学会発表

国内学会

1. 田澤一朗, 石田雄二, 吉里勝利, 矢尾板芳郎 (2010) 無尾両生類の変態期における Hox 遺伝子の発現, 日本動物学会

国際学会

なし

④科研費等の受け入れ状況

なし

[分化制御機構部門]

准教授・古野伸明 (Nobuaki Furuno)

研究内容

[1]卵形成における卵特異的細胞周期調節遺伝子の発現調節機構と機能解析
Analysis of the regulatory mechanisms of oocyte specific cell cycle gene expression and function during *Xenopus oogenesis*

卵の分化機構を研究する為には、卵特異的に発現する遺伝子に着目し、その卵特異的な発現調節機構を解明する事がきわめて重要であると考えられる。卵は、減数分裂や受精後に特殊な細胞分裂を行う。例えば、減数分裂では、DNA複製をスキップした2回の連続した分裂をするが、そのために、Mos という卵特異的な細胞周期調節因子を発現しており、この発現がDNA複製のスキップのため必須である事を報告した。また、受精後、卵は最初の一回を除き、G1, G2 期の細胞分裂（卵割）を中期胞胚まで行うが、そのためには、卵特異的な細胞周期調節因子である Wee1A の発現が必須である。もし、体細胞特異的な Wee1B が発現すれば受精後の卵割は失敗する。よって、これらの卵特異的な細胞周期調節因子の発現調節機構の解明は、卵への決定・分化の機構解明につながる。

[目的と結果]

細胞周期調節因子に母性型があると分かって来たのは最近であり、その発現調節機構の研究は今までに行われていない。現在、ニシツメガエルの Mos と Wee1A のプロモーター領域と思われる部分（翻訳開始点より 10 kbp 上流まで）をクローニングし、GFP の上流に挿入した transgenic ガエル作製用のベクターを構築した。このコンストラクトや、プロモーターにいろんな欠失を導入したコンストラクトで transgenic ガエルを作製し、卵特異的な発現に必要な領域を特定する。また、これらの遺伝子のノックアウトも行いたい。このようにして卵特異的な細胞周期調節因子の発現調節機構と機能の解析を行う。

[2]両生類の生活環に対する過重力の影響

The effect of the hypergravity on the life cycle of amphibians

将来、人類が宇宙へ進出して行くためには地球とは異なった重力環境下でヒトを含めた動植物が正常で健康な子孫を作れるかどうかを知る事が重要であり、もし、正常な子孫が作れないようなら、どのようにすれば異なった重力環境で正常に生活環が回るかどうか調べる事が重要である。我々は、両生類をモデル生物として過重力が成長や内分泌系にどのような影響を与えるかを調べ、その改善方法を探っている。

[目的と成果]

両生類をモデル生物として、生活環の重要な時期（初期発生や減数分裂など）に焦点を絞って過重力の影響を調べたり、長期にわたる過重力暴露におけるホルモン分泌を含む生理的影響を追跡する。また、過重力で生じた異常を正常に戻す手段を探索する。それらの実験を通じて、地上とは異なった重力環境下でヒトを含めた動植物の世代交代が可能かどうかを調べることを目標とする。その結果、過重力に感受性が高い時期は、受精後から卵割が始まるまでである事が判明した。また、卵減数分裂に影響を与える事がわかった。また、長期に渡る過重力曝露によって、甲状腺ホルモンによって支配されている変態が遅れる事がわかり、内分泌系にも影響を与える事が明らかになった。

[3]両生類の生活環に対する強磁場の影響

The effect of strong static magnetic field (SMF) on the life cycle of amphibians

現在、携帯電話や高圧送電線、家電製品などから磁場にさらされる機会が多くなってきた。それにもかかわらず、脊椎動物の発生および遺伝子発現に対する強磁場の影響に関する研究は少ない。両生類を用いて、その生活環に対する影響を調べる。

[目的と成果]

カエル胚は、体外受精を行うので胚の観察が容易で、発生も早いことから、磁場の影響を調べるには有用と考えられる。アフリカツメガエルやニシツメガエルを用いて、卵減数分裂から変態までの磁場の影響を調べた。その結果、卵成熟過程において卵の色素の分布に影響を与える事や、初期発生にさまざまな影響を与える事が明らかになった。

[4]ZNFによる甲状腺ホルモン受容体β遺伝子の破壊

Targeted mutagenesis of thyroid hormone receptor beta gene by ZNF in amphibian embryo

ノックアウトによる特定の遺伝子破壊は、その遺伝子の機能を探る上で非常に有効な手段である。この技術は、マウスではES細胞を用いて確立されてポピュラーにつかわれるようになっているが、それ以外の動物ではES細胞が確立されていない事で不可能である。しかしながら、最近、ZNF（Zinc finger nuclease）を使用すると、特定の配列に突然変異が入れられる事がわかり、コオロギやラットなどで応用されて来た。この技術をカエルで確立する事は、カエルの実験動物として有用性を飛躍的に高める。

[目的と成果]

カエルでZNFが応用可能かどうか実験を行った。選んだ遺伝子は

甲状腺ホルモン受容体 b 遺伝子である。この結果、TRb の遺伝子に変異を入れられる事がわかった。この変異を入ったカエルを育て、子孫をとったり、他の遺伝子を ZNF で破壊したい。

[5]化学物質による両生類内分泌機構のかく乱

Disturbance of the endocrine system by chemical substances in amphibians

重大な地球環境問題の 1 つは世界中にばら撒かれた人工化学物質の存在である。それら中には、生体の内分泌系をかく乱し、悪性腫瘍を引き起こす可能性のあるものも含まれていると指摘されている。人工化学物質のどのような物が内分泌かく乱活性を持つのか調べる事は重要である。

[目的と成果]

多くの化学物質は甲状腺ホルモン機能を阻害する。甲状腺ホルモンは、ヒトを含むすべての脊椎動物において成長や発生、生体内部環境の恒常性維持、代謝などで重要な役割を果たしている。典型的な甲状腺ホルモン依存性発生過程である両生類オタマジャクシの変態は、化学物質の影響を受けやすいため、かく乱作用をもつと疑われる環境汚染物質の個体レベルでのスクリーニングに役立つことができる。甲状腺ホルモン受容体遺伝子を導入したトランスジェニックアフリカツメガエルを用いるなどして、さまざまな化学物質について形態学、生化学および分子細胞学レベルでの反応態様を解析したり、生殖機能に対する影響についても調べる。その結果、多くの人工化学物質について、甲状腺ホルモンにたいして、アゴニスト、アンタゴニスト活性がある事が明らかになった

[6]卵成熟および初期発生におけるサイクリン B2 の 2 極紡錘体形成における機能

The role of the cyclin B2 in the bipolar spindle formation during oocyte maturation and early embryogenesis

MPF はサイクリン B と Cdc2 の複合体であり、M 期を引き起こす普遍的な因子である。MPF が活性化すると核膜崩壊、染色体凝縮、紡錘体の形成が起こり、M 期が開始する。サイクリン B は MPF の調節サブユニットであり、多くの種でサブタイプが複数存在し、また、それぞれのサブタイプの細胞内局在も違っている。しかしながらその機能に違いがあるかどうか報告はほとんどない。この研究ではサイクリン B1 と B2 の機能の違いについて研究している。

[目的と成果]

ツメガエルの卵母細胞や胚ではサイクリン B1 とサイクリン B2 が主に発現しており、機能差を解析する良い系である。今までに、この系を用いて、サイクリ

ンB1でなくサイクリンB2が正常な紡錘体の形成に関与することを明らかにした。この系を用いてサイクリンBのサブタイプの機能を解析する事を目標とする。その結果、サイクリンB2のN末端から約90アミノ酸から120アミノ酸までに2極の紡錘体を形成するのに働く領域があることがわかった。

[7]Nramp ファミリーの新規バナジウム/プロトン共役輸送体
A novel vanadium/proton antiporter of a Nramp family

海産動物のホヤは体内に高濃度のバナジウムをもっている。これは、海中のバナジウムから濃縮されたもので、ホヤはバナジウムを高濃度に濃縮する機構を持っている。その機構を研究している。

[目的と成果]

Nramp/DCT ファミリーは、二価金属イオンの輸送に関わる膜輸送体である。我々はバナジウムを高度に濃縮する海産動物ホヤ類の血球から Nramp ファミリーの新規膜輸送体遺伝子を同定した。この遺伝子 AsNramp はヒトの Nramp1 および2と、アミノ酸レベルで約60%の相同性があった。アフリカツメガエルの卵母細胞による発現系を用いて金属輸送活性を検証したところ、プロトンとの共役輸送によって四価バナジウムを取り込む共役輸送体であることがわかった。さらに、四価バナジウムの輸送はNaによる阻害を受けること、AsNramp は血球の液胞膜画分に局在することも明らかになった。

[8]mTOR 情報伝達系の解析
Analysis of the mTOR signal transduction

炎症は、生体の損傷に対する組織の反応であり、その反応の一部には mTOR (mammalian target of rapamycin の略。ほ乳類などの動物の細胞内シグナル伝達に関与するタンパク質キナーゼ。最初に rapamycin の標的タンパク質として見つかったのでこの名前がついた) 情報伝達系が関与している。この情報伝達系の研究を進めている。

[目的と成果]

炎症に関与する mTOR 情報伝達系に関与するタンパク質や、その相互作用を調べる事でこの情報伝達系の全貌を解明しようとしている。その結果、mTOR 伝達系に Ego1, Ego3 と Gtr1, Gtr2 のタンパク質が関与していることがわかった。

研究業績

①原著論文

1. Furuno, N., Futsuki, D., Kawasaki, T., Shiraga, M., Tanimoto, Y., Kashiwagi, K., Yamashita, M., Suzuki, K. and Kashiwagi, A (2010) Effect

of strong static magnetic fields on the amphibian life cycle -Effect on oocyte maturation of *Silurana tropicalis*-. Space Utiliz. Res., 26, 228-231

2. Keiko Kashiwagi, Yoshihisa Fujiwara, Satomi Sakao, Nobuaki Furuno, Makoto Yanagisawa, Hideki Hanada, Yoshifumi Tanimoto, Masamichi Yamashita, Minoru Watanabe, Tadashi Shinkai, Satoshi Yoshitome, Hideki Kubo, Masao Sakai, Fujii, Tomio Naitoh, Ken-ichi Suzuki, Akihiko Kashiwagi. (2010) Effect of strong static magnetic fields on amphibian life cycle-morphological and molecular biological analyses of early development-. Spce Utiliz. Res. 26, 232-235

3. Tatsuya Ueki, Nobuaki Furuno, Hitoshi Michibata. (2011) A novel vanadium transporter of the Nramp family expressed at the vacuole of vanadium-accumulating cells of the ascidian *Ascidia sydneiensis samea*. BBA - General Subjects 1810, 457-464

4. Yanagisawa, M., Furuno, N.*, Watanabe, M., Kashiwagi, K., Hanada, H., Shinkai, T., Yoshitome, S., Kubo, H., Sakai, M., Fujii, H., Suzuki, K., Yamashi, M. and Kashiwagi, A. (2011) Molecular analysys of the head-defects in the *Xenopus* embyos rased hyper gravity condition. II Space Utili. Res. 27, 198-200 (* Corresponding author)

②総説・著書

該当なし

③学会発表

国内学会

1. 古野伸明、夫津木大輔、川崎大志、白神聖也、谷本能文、柏木啓子、山下雅道、柏木昭彦 両生類の生活環に対する強磁場の影響-卵成熟に対する影響— 第26回宇宙利用シンポジウム 2010年1月26日 相模原市 神奈川

2. 柏木昭彦、柏木啓子、坂尾智美、古野伸明、藤原好恒、谷本能文、山下雅道、渡部稔、新海正、吉留賢、久保英夫、坂井雅夫、藤井博匡、柳澤誠、花田秀樹、内藤富夫 両生類の生活環に対する強磁場の影響—初期発生の形態学のおよび分子生物学的解析— 第26回宇宙利用シンポジウム 2010年1月26日 相模原市 神奈川

3. 関口猛、舟越稔、古野伸明、小林英紀 ヘテロ2量体Gタンパク質のGtr1、Gtr2は単独で相互作用タンパク質Ego3、Ego1に結合する。日本遺伝学会 第82回大会、札幌市 北海道大学 2010年 9月

4. 関口猛、舟越稔、古野伸明、小林英紀 Tor シグナル伝達系のヘテロ 2 量体 Gtr1-Gtr2 の Gtr1 と Gtr2 の働きの違いの解析 日本分子生物学会、第 33 回大会、神戸市 ポートアイランドホテル 2010 年 12 月

5. 佐能正剛、柏木啓子、花田秀樹、古野伸明、松原加奈、柏木昭彦、杉原数美。北村繁幸、太田茂 ツメガエルにおけるエストラジオールとビスフェノール A の生物蓄積、および発生に対する影響 第 13 回環境ホルモン学会 東京大学、東京 2010 年 12 月 16 日

6. 柳澤誠、古野伸明、渡部稔、柏木啓子、花田秀樹、新海正、吉留賢、久保英夫、坂井雅夫、藤井博匡、鈴木賢一、山下雅道、柏木昭彦 過重力によって生じたアフリカツメガエル初期胚の頭部形成異常の解析 II 第 27 回宇宙利用シンポジウム 2011 年 1 月 25 日 相模原市 神奈川

国際学会

該当なし

④科研費等の受け入れ状況

宇宙環境利用科学委員会研究班ワーキンググループ (2010) 両生類の生活環に対する過重力の影響、10 万円、研究分但者

准教授・三浦郁夫 (Ikuo Miura)

研究内容

[1]性決定と生殖腺の性分化

Sex determination and gonadal sex differentiation

性という仕組みは、生物に多様性を生み出し、個体や種の維持、そして進化に貢献する重要な機能のひとつである。本研究では、性決定や性分化の普遍性と多様性の分子基盤を解明するため、我が国に生息するツチガエルに着目した。本種は、地域集団ごとに、性決定や性分化機構の著しい多様性を有する、世界に類を見ない特徴をもつ。2010年度は以下の成果を挙げた。

1) 生殖腺性分化の多様性機構の解明

Diversity in the sensitivity of sex steroid hormones to sex-reversal

脊椎動物では、性ステロイドホルモンが生殖腺の性分化に重要な役割を担っている。哺乳類の真獣類は外部から投与した性ホルモンに全く感受性を示さないが、有袋類はエストロゲンによって遺伝的雄に性転換が生じる。また、他の脊椎動物では、性ホルモンに対する感受性は種によって異なる。ツチガエルは遺伝的に大きく4つの地域グループに分けられるが、それぞれの集団において性転換の感受性が異なることを明らかにした。性染色体が未分化な西日本と東日本はテストステロンとエストロゲンによって完全に性転換を生じる。一方、性染色体が分化したZW集団では雄から雌への性転換に感受性を示すが、雌から雄へは性転換しない。さらに、XY集団では、いずれの方向にも性転換が生じないことがわかった。さらに、エストロゲンによる雄から雌への性転換については、生殖腺性分化の開始時期とホルモン投与による性転換の感受期（これを窓とよぶ）との時間的相互関係が決定的に重要であることを実証した。

2) 佐渡島に新種ガエルを発見

Identification of a new morphotype of *Rana rugosa* in Sado Island, Japan

ツチガエルの新潟県佐渡島の集団は、形態学的に本土集団と著しく異なることを発見した。そこで、外部形態、遺伝および生殖について詳細に調べた。外部形態では佐渡集団は小柄であり、特に腹側が強い黄色を呈すること、皮膚全体が滑らかであること、約6割の個体に本土では見られない細い背中線が存在することがわかった。ミトコンドリア遺伝子の解析から、佐渡黄腹集団は、東日本（関東）の集団と共通性があることがわかった。それゆえ、佐渡黄腹は、古くから東日本全域に生息していた東日本集団に起源を発し、その後、佐渡島に孤立し、独自に分化したと推測された。さらに同島の南部に生息する新潟由来の集団との交雑実験、鳴き声解析、詳細な外部形態の解析を行っている。

[2]色彩発現

ニホンアカガエルの卵の色を決定する突然変異の同定

Identification of a gene mutation controlling egg color of the frog *Rana japonica*

両生類の色彩を担う色素細胞には3種類存在し、主に皮膚、眼、卵に存在する。これまで、同一つの遺伝子突然変異体において、眼と皮膚の色彩が異なる例が発見されていることから、眼と皮膚では色彩遺伝子の発現制御が異なることが知られていた。今回、つくば市でニホンアカガエルの白色卵塊が発見されたので、それを成熟親まで飼育し、さらに兄妹同士のF1を作成した。その結果、白色卵とそのF1はいずれも野生型の皮膚と眼の色彩をもつ成体に成熟した。ところが、F1の約1/4の雌に、卵の色だけが白色である個体が見つかった。以上から、卵の色彩だけを制御する遺伝的仕組みの存在することが明らかになった。

①原著論文

1. Sekiya K, Ohtani H, Ogata, M, and Miura I (2010) Phyletic diversity in the frog *Rana rugosa* (Anura: Ranidae) with special reference to a unique morphotype found from Sado Island, Japan. *Current Herpetology* 29(2): 69-78.
2. 尾形光昭、三浦郁夫 (2011) ツチカガエルの日本国内における生息場所について *爬虫両棲類学報* 2011(1): 24-25.

②総説・著書

該当なし

③学会発表

国内学会

1. 秋山繁治、小泉雄紀、三浦郁夫 アカハライモリの秋から春をまたぐ多重交配について - 両季節の精子が受精に利用されている遺伝学的証拠 - 日本爬虫両生類学会第49回大会 10月9日-10日 横浜 (神奈川県)
2. 長井悠佳里、土井敏男、湯浅義明、藤谷武史、伊藤邦夫、小泉雄紀、三浦郁夫 ナゴヤダルマガエルの遺伝的地域分化 - とくに岡山集団と名古屋集団が接する境界領域について - 日本爬虫両生類学会第49回大会 10月9日-10日 横浜 (神奈川県)
3. 小泉雄紀、森淳、三浦郁夫 ニホンアカガエルの新規色彩変異 - 体色と眼は正常だがメスのもつ卵だけが白い - 日本爬虫両生類学会第49回大会 10月9日-10日 横浜 (神奈川県)

4. 尾形光昭、関谷國男、三浦郁夫 佐渡島産ツチガエルの外部形態について
日本爬虫両生類学会第49回大会 10月9日-10日 横浜(神奈川)
5. 北本光、佐々木健、三浦郁夫 オタマジャクシの性を色で見分ける -山口
県産ツチガエルの性に連鎖した色彩変異遺伝子の同定- 日本爬虫両生類
学会第49回大会 10月9日-10日 横浜(神奈川)
6. 小泉雄紀、大谷浩己、三浦郁夫 XY型とZW型の遺伝子発現のちがい 染色
体学会第61回年会 11月5日-7日 習志野(千葉)

招待講演

1. 三浦郁夫 ツチガエルの地域集団における生殖腺性差構築機構の解明 文
部科学省：新学術領域研究「性差構築の分子基盤」 第2回領域会議・公
開研究会 12月15日-17日 逗子(神奈川)
2. 佐渡島で新種発見！ お腹まっ黄色のカエル 染色体学会公開シンポジウ
ム 「カエル・トカゲの生物学」 11月5日 2010年 習志野(千
葉)

高大連携

1. 「ヒトがヒト/動物たる由縁」 岡山清心女子高校 SSH 課題研究「生命科
学基礎」 講義 2月1日(月) 倉敷市
2. 「遺伝子と生物学研究 -何を調べ、どう使うか-」 広島国泰寺高校 ク
ラブアシスタンス 12月19日(日) 広島市

国際学会

該当なし

④ 科研費等の受け入れ状況

科学研究費基盤C(代表) 1,400千円 「性決定元祖遺伝子の双方向進化
- 精巣および卵巣決定」

特任助教・柏木啓子 (Keiko Kashiwagi)

研究内容

I. 両生類における編集 ZFN による甲状腺ホルモン受容体 (TRb) 遺伝子の標的突然変異誘発

Targeted mutagenesis of thyroid hormone receptor beta gene by engineered zinc-finger nuclease in amphibian embryos

[目的]

両生類の変態および再生は魅力的な生物現象であり、オタマジャクシの発生過程における体の作り替えに関する分子機構を解明するための有用なモデルとなりうる。この現象に関与する遺伝子の機能を明らかにするために遺伝子を標的にした研究方法の確立は長年の願望であった。私たちは、ニシツメガエル胚特異的なゲノムサイトに突然変異を導入するため、編集ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) による遺伝子標的突然変異誘発法を採用した。

[方法]

甲状腺ホルモン受容体 (TRb) 遺伝子のターゲット配列を認識するように合成された ZFN の mRNA をニシツメガエルの受精卵に顕微注入した。二本鎖切断 (DSB) が導入されているかを調べるために Cel-1 アッセイとシークエンス解析を行った。

[成果と考察]

ZFN は、ジンクフィンガードメインと、II 型制限酵素である FokI 由来の DNA 切断ドメインから成る人工酵素であって、標的とする遺伝子シークエンスに DSB を導入するよう編集されている。誘導された DSB が非相同末端結合によって修復されるときに挿入や欠失が起り、その結果、ヌル接合体や、正常なものに比べ機能の劣る突然変異遺伝子 (hypomorphic alleles) を生じる。

TRb 遺伝子は両生類オタマジャクシ変態の調節に重要な役割を演じていると考えられている。ZFN を注入した受精卵から発生した胚のヌクレアーゼ標的領域をシークエンスしたところ、挿入や欠失が認められた。

[将来の展望]

私たちは TRb 遺伝子を標的にした ZFN をつくり、ニシツメガエル TRb 遺伝子内に突然変異を誘導するのに成功した。突然変異が次世代に伝えられることを想定し、現在、ホモ接合の突然変異体 (TRb^{-/-}) を含む系統の確立を目指している。

II. アフリカツメガエルの器官形成過程における新規 I 型ケラチン遺伝子の特徴

Characterization of a novel type I keratin gene in *Xenopus laevis* during

[目的]

ケラチンは等電点などの生化学的特徴に基づき I 型と II 型に分けられ、両者のヘテロ二量体が重合してフィラメントが構成される。ケラチン遺伝子の発現は細胞特異的で、その様式は細胞分化や、感染による形質転換に関係する。アフリカツメガエルでは個体発生中の発現状況によりいろいろなケラチン遺伝子が同定されたが、遺伝子の調節メカニズムは不明である。新規 I 型ケラチン遺伝子（クローン名：XL073g19）の転写産物発現および上流域プロモーター/エンハンサー活性が胚の尾鰭と内外鰓に強く見られるため、この遺伝子を鰭鰓ケラチン (FGK) 遺伝子とよぶことにする。

私たちは、FGK 遺伝子のプロモーター/エンハンサーと EGFP または DsRed2 遺伝子を連結させてつくったベクターを導入したアフリカツメガエルのトランスジェニック系統を確立している。トランスジェニック F1 世代を用いて FGK 遺伝子の特徴を調べた。

[方法]

FGK 遺伝子の cDNA クローニングは Tazaki ら (2005) に従った。ゼノパスの I 型ケラチン遺伝子の同定には Xenobase BLAST system を用いた。FGK 遺伝子の全上流域、およびそれをいろいろな長さに削除してつくったコンストラクトを pEGFP-1 または pDsRed2-1 の中にサブクローンした。トランスジェニックガエルは、Kroll と Amaya (1996) に従って作製した。

[成果と考察]

まず、オタマジャクシの鰓に特徴的なレポーター遺伝子発現が起こるためにはプロモーター近位部位の存在が必要であった。次に、自然変態および甲状腺ホルモン誘導による変態オタマジャクシにおいて、レポーター発現は嗅上皮、四肢、レンズのほか、特に内鰓において強烈であった。変態開始に伴い鰓は吸収されるが、その過程で内鰓でのレポーター発現は急速に失われた。トランスジェニック系統に導入された蛍光レポーター遺伝子の発現は、カエルの生活環の中で起こる様々な器官の形成、発生、吸収を動物を生かしたままの状態で見視化しモニターできるという利点を備えている。

[将来の展望]

非常に多くの人工化学物質が環境中に放出されており、その中には正常な甲状腺ホルモン (TH) 作用をかく乱するものが含まれることが知られている。TH は成長や発生を調節し、代謝ホメオスタシスの維持に重要な役割を果たしている。現在使われている 10 万種類以上の化学物質のうちで、ヒトを含む生物への安全性が確認されているものは僅かである。安全性に関する情報を得るための優れた試験法がないのが現状である。オタマジャクシの変態過程における鰓の消長

はTHによって誘起・支配されている発生プロセスである。蛍光レポーター遺伝子を内蔵したアフリカツメガエルトランスジェニック系統はTHの働きをかく乱すると危惧される化学物質を簡単・迅速に調べられるツールとして極めて有用である。今後、私たちはこのカエル系統を用い、TH作用をかく乱する化学物質をピックアップしていく予定である。

III. 両生類を用いた生活環に対する過重力および強磁場の影響に関する研究 Effects of hypergravity environments and strong static magnetic fields on amphibian life cycle

[目的]

私たちは、両生類（主としてアフリカツメガエル）を実験材料として、その生活環に対し過重力や強磁場がいかなる影響を与えるかについて研究を続けている。これまでに得られた研究結果は以下の通りである。過重力については、①影響は受精直後に最もよく現われ、小頭症・小眼症などの奇形を引き起こすこと、②プログラム細胞死が増えること、③奇形個体では頭部マーカーであるXotx2（前脳、中脳、眼の形成に関係する）、Xag1（セメント腺マーカー）の発現低下が見られ、また頭部形成異常はWntシグナルの活性化抑制が原因であること、④卵減数分裂で白斑や紡錘体の形成が異常になること、⑤視床下部-下垂体-標的器官系の異常で体の成長や器官分化に遅延が生じるが、その症状は甲状腺ホルモンの投与によって改善されること、などがわかった。その他にも、予備実験から過重力が生殖腺に影響を与えることも示唆されている。強磁場については、①処理受精卵から発生した胚には生存率の大幅低下や、頭部・セメント腺の形成異常、頭部-胴部-尾部の比率の変化、②Xotx2やXag1の発現抑制、③卵母細胞の色素分布の異常、などが見られた。

[方法]

発生に対する過重力影響は、媒精後10分、20分の未分割卵や、2細胞期の胚、原腸胚に、2G、5Gの過重力を印加して調べた。強磁場に関しては、11T(-1400T²m⁻¹)、15T(0T²m⁻¹)、12T(+1200T²m⁻¹)を印加した。プログラム細胞死についてはHensey and Gautier (1998)のTUNEL染色法で調べた。遺伝子発現は、尾芽胚においてwhole-mount in situ hybridization(WISH)により調べた。

[成果と考察]

上述のごとく、私たちは、過重力・強磁場下に置いた両生類胚には小頭症・小眼症などの頭部形成異常を含め、様々な奇形が生じることを報告してきた。また、Xotx2やXag1の発現も過重力に曝露した胚では抑制されることも示した。しかし、頭部のどの部分が過重力に対して感受性があるのか、つまり影響を受けやすいのかについてはわかっていない。昨年度は、Xotx2やXag1、En2（中脳と後脳の間領域に発現する）の遺伝子発現に対する影響を、アフリカツメガエ

ル胚において WISH で調べた。5G に曝された胚を用いて Xotx2 と Xag1 の二重染色を行ったところ、Xotx2 の発現は抑えられたが、Xag1 の発現に変動は見られなかった。また、En2 発現にも影響はなかった。これらの結果から、眼、前脳、中脳は感受性が高く、後脳の後部には影響しないことが示唆された。

[将来の展望]

発生・性分化に対する重力・磁場の影響を簡潔かつ迅速に調べるため遺伝子レベルでの解析を試みている。

研究業績

① 原著論文

1. Kashiwagi, K., Fujiwara, Y., Sakao, S., Furuno, N., Yanagisawa, M., Hanada, H., Tanimoto, Y., Yamashita, M., Watanabe, M., Shinkai, T., Yoshitome, S., Kubo, H., Sakai, M., Fujii, H., Naitoh, T., Suzuki, K. and Kashiwagi, A. (2010) Effect of strong static magnetic fields on the amphibian life cycle - morphological and molecular biological analyses of early development. *Space Utiliz. Res.* 26, 232-235.
2. Kashiwagi, K., Kashiwagi, A., Kurabayashi, A., Hanada, H., Nakajima, K., Okada, M., Takase, M. and Yaoita, Y. (2010) *Xenopus tropicalis*: An ideal experimental animal in amphibia. *Exp. Anim.* 59(4), 395-405.
3. Suzuki, K., Kashiwagi, K., Ujihara, M., Marukane, T., Tazaki, A., Watanabe, K., Mizuno, N., Ueda, Y., Kondoh, H., Kashiwagi, A. and Mochii, M. (2010) Characterization of a novel type I keratin gene and generation of transgenic lines with fluorescent reporter genes driven by its promoter/enhancer in *Xenopus laevis*. *Dev. Dyn.* 239, 3172-3181.
4. Furuno, N., Futsuki, D., Kawasaki, T., Shiraga, M., Tanimoto, Y., Kashiwagi, K., Suzuki, K., Yamashita, M. and Kashiwagi, A. (2010) Effect of strong static magnetic fields on the amphibian life cycle - Effect on oocyte maturation of *Silurana tropicalis*. *Space Utiliz. Res.* 26, 228-231.
5. Yanagisawa, M., Furuno, N., Watanabe, M., Kashiwagi, K., Hanada, H., Shinkai, T., Yoshitome, S., Kubo, H., Sakai, M., Fujii, H., Suzuki, K., Yamashita, M. and Kashiwagi, A. (2011) Molecular analysis of the head-defects in the *Xenopus* embryos raised under hypergravity conditions. II. *Space Utiliz. Res.* 27, 198-200.

② 総説・著書

なし

③ 学会発表

国内学会

1. 佐能正剛、柏木啓子、花田秀樹、古野伸明、松原加奈、柏木昭彦、杉原数美、北村繁幸、太田 茂. Estradiol and bisphenol A bioaccumulation and effect on development in clawed frogs (ツメガエルにおけるエストラジオールとビスフェノール A の生物蓄積、および発生に対する影響)。第 13 回環境ホルモン学会発表会 (2010 年 12 月、東京大学山上会館 東京)
2. 柏木昭彦、柏木啓子、坂尾智美、古野伸明、藤原好恒、谷本能文、山下雅道、渡部稔、新海正、吉留賢、久保英夫、坂井雅夫、藤井博匡、柳澤誠、花田秀樹、内藤富夫. 両生類の生活環に対する強磁場の影響—初期発生の形態学および分子生物学的解析—第 26 回宇宙利用シンポジウム 2010 年 1 月 26 日 相模原市 神奈川県
3. 古野伸明、夫津木大輔、川崎大志、白神聖也、谷本能文、柏木啓子、山下雅道、柏木昭彦. 両生類の生活環に対する強磁場の影響—卵成熟に対する影響—第 26 回宇宙利用シンポジウム 2010 年 1 月 26 日 相模原市 神奈川県
4. 柳澤誠、古野伸明、渡部稔、柏木啓子、花田秀樹、新海正、吉留賢、久保英夫、坂井雅夫、藤井博匡、鈴木賢一、山下雅道、柏木昭彦. 過重力によって生じたアフリカツメガエル初期胚の頭部形成異常の解析 II 第 27 回宇宙利用シンポジウム 2011 年 1 月 25 日 相模原市 神奈川県

国際学会

該当なし

- ④ 科研費等の受け入れ状況
宇宙環境利用科学委員会研究班ワーキンググループ 2010 年 100 千円 (分担)
- ⑤ その他
北九州市板櫃川後肢欠損ガエル調査検討委員会委員
第一回開会 (2010 年 8 月 3 日 北九州市役所) セミナー
「北九州市板櫃川における後肢欠損ツチガエルについて考える」柏木啓子

[多様化機構研究部門]
教授・住田正幸 (Masayuki Sumida)

研究内容

1. アジア諸国のカニクイガエル類における遺伝的分化と系統関係

Genetic divergences and phylogenetic relationships in the *Fejervarya cancrivora* complex from Asian countries

[目的]

カニクイガエルは、アジアに広く分布する種の一つであり、中国からインドまでと、フィリピンおよびインドネシアに棲息することが知られている。従来単一種 *Fejervarya cancrivora* とされていたが、最近の研究から、形態学的にも遺伝学的にも分化した複数のタイプの存在が知られてきた。本研究の目的は、アジアに広範に分布するカニクイガエル類について、どのような種多様性があるのか、どの程度の遺伝的また形態的分化が起っているのか、どのような繁殖隔離機構が確立しているのか、それらは分類学的にどのように位置付けられるのか、を明らかにすることである。

[材料・方法]

インドネシア、マレーシア、タイ、フィリピンおよびバングラデシュから 24 集団の計 131 個体のカニクイガエルを用いて、アロザイム分析およびミトコンドリア DNA 分析、形態計測および交雑実験を行なった。

[成果]

アロザイム分析の結果、カニクイガエル類は大きく 2 つのグループに大別され、これらの遺伝距離は 0.535 であった。また、16S rRNA 遺伝子と Cytb 遺伝子の塩基配列に基づく系統解析でも、大きく 2 つのグループに分かれ、そのうち一つはさらに 2 つのサブグループに分かれた。タイ、フィリピンおよびバングラデシュはマングローブ型、インドネシアとマレーシアは大型、スラベシはプランラト/スラベシ型に属することが分った。形態計測に基づく判別分析の結果、これら 3 つのタイプは各々明瞭に識別でき、交雑実験でも、これら 3 つのタイプの間には配偶子隔離または雑種精子形成異常のいずれかの隔離機構が成立していることが分った。

[考察]

本研究により、(i) アジア産のカニクイガエル類は外部形態および遺伝的特徴からマングローブ型、大型、プランラト/スラベシ型の大きく 3 つに分けられること、(ii) これらは互いに生殖的に隔離された別種であること、(iii) 大型は *F. cancrivora*、マングローブ型は *F. moodie* に該当し、スラベシ型は未記載種の可能性があること、(iv) 従来 *F. raja* は *F. cancrivora* のシノニムの可能

性があること、が明らかになった。

2. 絶滅危惧種イシカワガエルの保全と遺伝的多様性に関する研究

Studies on conservation and genetic diversity in an endangered frog species
Odorrana ishikawae

[目的]

イシカワガエルは、奄美大島と沖縄島北部に分布する日本で最も美しいとされるカエルで、鹿児島県と沖縄県では天然記念物に、環境省レッドリストでは絶滅危惧 IB 類に指定されるなど、早急な保護対策が求められている。本研究は、

(1) 実験室での人工繁殖・飼育維持方法を確立し、効率的な保全に資する (2) 集団間及び集団内の遺伝的多様性を調べ、人工繁殖下でも遺伝的多様性を評価する (3) 種内の遺伝的及び形態的分化を解明するとともに、交配後隔離の程度を明らかにすることによって、各集団の分類学的な位置付けを明確にする、ことを目的に行った。

[材料・方法]

(1) 奄美大島と沖縄島からイシカワガエルを採集し、人工受精法により人工交配系を確立するとともに、実験室での自然繁殖と飼育維持を試みる。(2) 野外から採集した沖縄、奄美大型、奄美普通の各集団の個体を用いて、集団間で交雑実験を行ない、雑種の生存率と繁殖能力を調べ、集団間の繁殖隔離の有無とその程度を調べる。(3) 野外集団について、アロザイム分析及び mtDNA 解析を行ない、本種の各集団における遺伝的多様性と集団間の遺伝的分化の程度を把握する。(4) 野外集団について、31 部位の外部形態計測を行ない、主成分分析に基づき、集団間の形態的な差異を明らかにする。

[成果・考察]

2010年の繁殖期には、人工繁殖によって生まれた6年齢の人工繁殖個体から、完全飼育下での自然繁殖によって、多数の2代目を得ることに成功した。また、形態計測に基づく主成分分析の結果、奄美産と沖縄産とは形態的に明瞭な相違があること、アロザイム分析、mtDNA解析から、両集団は遺伝的にも明瞭に分化していることがわかった。さらに、交雑実験の結果、沖縄産雌と奄美産雄との雑種は発生初期ですべて致死になること、奄美産雌と沖縄産雄の雑種は正常に発育するが、成熟期に達した雑種の雄は精子形成が異常であることがわかった。以上、奄美産と沖縄産は遺伝的にも形態的にも明瞭に分化しており、生殖的にも明確な交配後隔離が成立していることから、両集団は別種とするのが妥当であると考えられた。イシカワガエルの基準産地は沖縄本島であることから、奄美産のイシカワガエルを新種「アマミイシカワガエル」*Odorrana splendida*として記載した。

3. 沖縄産と奄美大島産の準絶滅危惧種リュウキュウアカガエルの遺伝的分化 Genetic divergences in *Rana* “okinavana” a near threatened species from Okinawa and Amami

[目的]

南西諸島のカエルの多くは、島嶼間で種分化していることが報告されており、奄美大島産と沖縄島産の間でも、別種に分化しているものも少なくない。リュウキュウアカガエルについては、これまで両島間の分化に関する詳細な研究はない。本研究では、リュウキュウアカガエルの2集団間に、どの程度の遺伝的差異があるか、またどの程度の交配後隔離があるのかを明らかにすることを目的に行った。

[材料・方法]

奄美大島産と沖縄産のリュウキュウアカガエルを用いて、アロザイム・mtDNAの分析を行うとともに、人工受精法によって、交雑実験を行い、雑種の生存率と繁殖能力を調べた。

[成果・考察]

アロザイム分析の結果、沖縄と奄美は明瞭 ($D=0.155$) に分化していた。両者間にはLDH-A座で対立遺伝子に完全な置換 ($F_{st}=1.000$) があつた。mtDNA解析では、沖縄と奄美は明瞭に区別できた (塩基置換率 $12S=5.2\%$, $16S=3.1\%$)。交雑実験の結果、2集団間には雑種致死による隔離はなく、雑種は正常に発育するが、生育した雑種の雄の精巣には、減数分裂で相同染色体の対合がうまく行かないで、精子形成の異常が見られた。沖縄と奄美は遺伝的に明瞭に分化しており、精子形成異常により生殖的にもある程度隔離が見られた。他の無尾類を考慮すると両集団は亜種以上の分化であると考えられる。

[将来の展望]

両集団間の交配実験については、正逆での繁殖隔離を調べるとともに、沖縄と奄美について詳細な外部形態観察を行い、その形態的な違いも明らかにして、両者の分類学的関係を明らかにする。さらに、リュウキュウアカガエルは久米島と徳之島にも分布していることから、今後はこれらの島のサンプルも加えて、本種の分化の全貌を明らかにし、生物地理学的な考察も行う。

4. 透明ガエル「スケルピョン」の量産化 Mass production of see-through frogs “Sukerupyon”

[目的]

ニホンアカガエルにおいては、黒色眼と灰色眼の二つの色彩突然変異系統があり、これらの突然変異系統を用いて、2007年には両生類で初となる体が透明で

内臓が透けて見える「透明ガエル」(スケルピオン)を誕生させることに成功し、「透明ガエルおよびその作製方法」については特許を取得している。本研究では、有用な実験動物の実用化を目的に、透明ガエルの量産化を行った。

[材料・方法]

「透明ガエル」の雌雄の組合せで交配を行い、2代目「透明ガエル」の系統確立を試みるとともに、黒色眼と灰色眼の二つの色彩突然変異遺伝子をヘテロ接合に持つ雌雄を用いて、種々の組合せで交配を行うことによって、これらの遺伝子をホモ接合に持つ「透明ガエル」を飼育維持して、量産化を試みた。

[成果・考察]

「透明ガエル」を200個体にふやし、今後も量産の目途をたてることに成功した。これらは、内臓透視のできる新しい実験動物として、環境、医学、生物学の分野において実験材料や教材として利用価値が高いと思われ、すでに需要がある。動物愛護の伝統がある欧米では特に「透明ガエル」への関心は高く、海外からの需要もあり、多様な可能性を秘めた「透明ガエル」の活躍の場は今後、世界へと広がって行きそうである。

[将来の展望]

2代目の「透明ガエル」は生活力が弱いため、以降の継代飼育がかなり困難であったため、安定した系代飼育のため改良が必要であり、現在、生活力改善のために、改良を試みている。これとは別に、今後は、実用化に向けては、さらに背面の透明度を上げるような工夫(黄色素胞を欠く突然変異を導入)も必要である。また、今後は、「透明ガエル」にGFP(蛍光蛋白質)遺伝子をつないだベクターをインジェクションすることで、トランスジェニック「光る透明ガエル」を作成する計画である。これにより、遺伝子発現の様子を外部から蛍光によってリアルタイムで観察でき、この方法では、プロモーターの設計を変えることで、さまざまな遺伝子の発現解析への応用が可能である。

研究業績

①原著論文

1. Kotaki, M., A. Kurabayashi, M. Matsui, M. Kuramoto, T. H. Djong and M. Sumida (2010) Molecular phylogeny for the diversified frogs of genus *Fejervarya* (Anura: Dicroglossidae). *Zool. Sci.*, 27 : 386-395.

2. Kurabayashi, A., N. Yoshikawa, N. Sato, Y. Hayashi, S. Oumi, T. Fujii and M. Sumida (2010) Complete mitochondrial DNA sequence of the endangered frog *Odorrana ishikawae* (family, Ranidae) and unexpected diversity of mt gene arrangements in ranids. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 56 : 543-553.

3. Alam M. S., A. Kurabayashi, Y. Hayashi, N. Sano, M. M. R. Khan, T. Fujii and M. Sumida (2010) Complete mitochondrial genomes and novel gene rearrangements in two dicroglossid frogs, *Hoplobatrachus tigerinus* and *Euphlyctis hexadactylus*, from Bangladesh. *Genes & Genet. Syst.*, 85: 219–232.
4. Kurniawan, N., T. H. Djong, M. M. Islam, T. Nishizawa, Daicus, M. B., H. S. Yong, R. Wanichanon, I. Yasir and M. Sumida (2011) Taxonomic status of three types of *Fejervarya cancrivora* from Indonesia and other Asian countries based on morphological observations and crossing experiments. *Zool. Sci.*, 28: 12–24.
5. Kuramoto, M., N. Satou, S. Oumi, A. Kurabayashi and M. Sumida (2011) Inter- and intra-island divergence in *Odorrana ishikawae* (Anura, Ranidae) of the Ryukyu Archipelago of Japan, with description of a new species. *Zootaxa*, 2767: 25–40.
6. Iwakoshi-Ukena, E., K. Ukena, A. Okimoto, M. Soga, G. Okada, T. Fujii, Y. Sugawara and M. Sumida (2011) Identification and characterization of antimicrobial peptides from the skin of the endangered frog *Odorrana ishikawae*. *Peptides*, 32: 670–676.

②総説・著書
該当なし

③学会発表
国際学会

1. Sumida, M. “Artificial breeding and genetic diversity in an endangered frog *Odorrana ishikawae*: Case study of fauna conservation from Japan.” 2010 International Meeting of the Association for Tropical Biology and Conservation (Jul., 2010. Bali, Indonesia)
2. Igawa, T., M. Okuda, S. Oumi, S. Katsuren, A. Kurabayashi, T. Umino and M. Sumida. “Development of microsatellite markers and population genetic analysis of the endangered frog, *Odorrana ishikawae* (Anura: Ranidae).” 2010 International Meeting of the Association for Tropical Biology and Conservation (Jul., 2010. Bali, Indonesia)
3. Kurniawan, N., T. H. Djong, T. Igawa, M. Kotaki and M. Sumida “Geographic

distribution and phylogenetic relationship of genus *Fejervarya* from Indonesian Sunda Land inferred from 16S rRNA gene.” 2010 International Meeting of the Association for Tropical Biology and Conservation (Jul., 2010. Bali, Indonesia)

4. Kurabayashi, A., N. Yoshikawa, N. Sato, Y. Hayashi, S. Oumi, T. Fujii, and M. Sumida. “Mitochondrial genome of the endangered frog *Odorrana ishikawae* and unexpected diversity of mt genomic arrangements in the family Ranidae.” International Symposium on Biodiversity Sciences (ISBDS) 2010, “Genome, Evolution and Environment.” (Aug., 2010. Nagoya, Japan)

5. Sumida, M. “Attempt at artificial breeding for conservation and analyses of genetic divergences and postmating isolation mechanisms in an endangered frog *Odorrana ishikawae* from Japan.” International Congress of BioSystematics Berlin 2011 (Feb., 2011, Berlin, Germany)

6. Hasan, M., M. M. Islam, T. Igawa, Md. M. R. Khan, M. S. Alam, T. H. Djong, N. Kurniawan, M. Kuramoto and M. Sumida. “Genetic divergences and phylogenetic relationships in the frogs from South to East Asia.” International Congress of BioSystematics Berlin 2011 (Feb., 2011, Berlin, Germany)

国内学会

1. Hasan, M. • M. M. Islam • Md. M. R. Khan • M. S. Alam • T. H. Djong • T. Igawa • N. Kurniawan • M. Kuramoto • M. Sumida “Genetic divergences and phylogenetic relationships in the frogs from south to east Asia.” 日本学会動物学会第62回中国四国支部大会 (2010年5月, 山口)

2. Alam, M. S. • A. Kurabayashi • Y. Hayashi • N. Sano • M. M. R. Khan • T. Fujii • M. Sumida “Complete mitochondrial genomes and novel gene rearrangements in two dicroglossid frogs, *Hoplobatrachus tigerinus* and *Euphlyctis hexadactylus*, from Bangladesh.” 日本遺伝学会第82回大会 (2010年9月, 札幌)

3. Hasan, M. • M. M. Islam • M. M. R. Khan • M. S. Alam • T. Igawa • M. Kuramoto • M. Sumida “Species diversity and phylogenetic relationships among frogs from Bangladesh revealed by nucleotide sequences of mitochondrial 16S rRNA gene.” 日本遺伝学会第82回大会 (2010年9月, 札幌)

4. 井川武 • 奥田優 • 大海昌平 • 勝連盛輝 • 倉林敦 • 海野徹也 • 住田正幸 「マイクロサテライトマーカーを用いた絶滅危惧種および天然記念物イシカワガエル

の遺伝的集団構造の解明」 日本遺伝学会第82回大会 (2010年9月, 札幌)

5. 住田正幸・佐藤直樹・M. M. Islam・井川武・吉川夏彦・倉林敦・大海昌平・勝連盛輝・福庭博子・新谷望・藤井保・倉本満 「絶滅危惧種イシカワガエルにおける飼育下繁殖の試みと交配後隔離機構の解明」 日本遺伝学会第82回大会 (2010年9月, 札幌)

6. 住田正幸・西谷拓磨・菅原弘貴・倉林敦・勝連盛輝・大海昌平 「絶滅危惧種イボイモリの飼育下繁殖の試みとミトコンドリアゲノムの解析」 日本動物学会第81回大会 (2010年9月, 東京)

7. Islam, M. M.・M. M. R. Khan・M. Kuramoto・M. Sumida “Reproductive isolating mechanisms among frogs of genus *Fejervarya* elucidated by crossing experiments, histological and spermatogenesis observations.” 日本動物学会第81回大会 (2010年9月, 東京)

8. 小巻翔平・倉林敦・Mohammed Mafizul Islam・住田正幸・東城幸治 「中部日本のトノサマガエル種群の交雑帯における遺伝子浸透」 日本爬虫両棲類学会第81回大会 (2010年10月, 横浜)

④ 科研費等の受け入れ状況

1. 科学研究補助金 基盤研究(C) 「絶滅危惧種イシカワガエルの保全と遺伝的多様性に関する研究」 代表者：住田正幸 1,040 千円

2. 奨学寄付金 500 千円

准教授・鈴木 厚 (Atsushi Suzuki)

研究内容

両生類の初期発生過程における形態形成の分子機構

Molecular mechanisms of morphogenesis during early amphibian embryogenesis

[目的]

脊椎動物の初期発生では、一個の受精卵が細胞分裂を繰り返し、それぞれの細胞が分化しながら所定の位置に配置され、形態形成が進行する。近年、形態形成にともなう細胞の分裂、分化、移動に細胞増殖因子が重要な役割を担うことが明らかにされている。本研究では、アフリカツメガエルを用いて、初期発生過程における細胞増殖因子の働き、および細胞増殖因子に対する細胞応答の制御機構を解析し、形態形成の分子機構を解明することを目的としている。本年度は、細胞増殖因子に対する細胞応答が、発生過程の時期および胚領域に応じてダイナミックに変化することに着目し、背腹軸形成の制御因子である骨形成タンパク質 (BMP) に対する細胞応答の制御機構を解析した。また、背腹軸に沿った細胞の分化は、頭尾軸の形成と連携していることから、BMP 応答の制御機構を切り口として、頭尾軸形成との関連についても解析を行った。

[成果と考察]

私達の研究グループでは、XOct-25 転写因子が BMP 応答を抑制することを見出し、神経形成の促進に働くことを明らかにしている。昨年度までに、XOct-25 転写因子の過剰発現によって発現誘導される遺伝子として FoxB1 転写因子を同定することに成功し、FoxB1 が BMP 応答を抑制して、神経誘導を促進することを明らかにしている。また、FoxB1 は神経誘導因子と協調して、後方神経の形成に働くことを示した。本年度は、FoxB1 遺伝子の機能阻害実験を行い、初期発生における FoxB1 の必要性を検討した。また、後方神経形成の促進機構について解析を行った。

特異的なアンチセンスオリゴにより、FoxB1 の機能を阻害すると、後方神経の抑制と前方神経の拡大が観察され、予想通り FoxB1 が後方神経の形成に必要であることが確認できた。しかしながら、予想に反して神経組織の誘導自体は、ほぼ正常であることが分かり、FoxB1 機能阻害の影響を補う分子が存在すると考えられた。このような機能を持つものとして、FoxB1 遺伝子の上流で働く XOct-25 遺伝子が考えられたため、FoxB1 と XOct-25 の二重阻害を行い、神経誘導が著しく抑制されることを確認した。したがって、FoxB1 と XOct-25 が機能的に協調して、神経形成の促進に働いていることが明らかになった。一方、後方神経形成の促進機構については、FoxB1 が、Wnt・FGF 経路を活性化して、神経の後方化を導くことが分かった。以上の結果から、FoxB1 は、XOct-25 と協調的に働き、BMP 応答を抑制することで神経化を引き起こし、また Wnt・FGF 経路を介して神

経の後方化を促進することが分かった。

[将来の展望]

FoxB1 は、神経化（すなわち背側化）と後方化を促進することから、胚の背腹軸と頭尾軸の形成を制御する重要な遺伝子であると考えられる。従来から、背腹軸と頭尾軸は互いに連携をとりながら形成されると考えられているが、体軸形成の連携に働く遺伝子の同定は進んでいなかった。近年になり、いくつかの知見が報告され始めたが、背腹軸と頭尾軸の個々の制御機構の理解が大幅に進んでいるのと比べ、背腹軸と頭尾軸の連携機構は、ほとんど未解明である。私達は、BMP 応答の制御機構を探求する過程で、FoxB1 の他に Biz と命名した細胞内タンパク質が、背腹軸と頭尾軸の制御に働くことを見出している（特任助教・竹林公子の項を参照）。これらの知見を総合すると、背腹および頭尾軸形成の時空間的な連携を可能にする複雑な制御機構の存在が予想されるが、今後の研究により、その一端が明らかになると期待している。また、神経誘導についても FoxB1 と XOct-25 が制御ネットワークを形成して働いていることが明らかになり、様々な環境変化に対応して、安定的に正常発生を行うために機能している可能性が考えられた。この点は、従来から知られている調節的発生機構の分子メカニズムに迫る重要な課題であることから、今後、実験的な裏付けをして、FoxB1 を構成因子とする制御ネットワークが調節的発生に重要な役割を担っていることを実証していきたい。

研究業績

①原著論文

該当なし

②総説・著書

1. 鈴木 厚 (2011) 「骨形成タンパク質のシグナル伝達と形態形成における役割」実践 柔道整復学シリーズ 細胞生物学, オーム社, in press

③学会発表

(国内学会)

1. 竹林-鈴木公子・喜多山篤・上野直人・鈴木 厚 “A mechanism coordinating the establishment of the dorsal-ventral and anterior-posterior axes during early *Xenopus* embryogenesis” 第 43 回 日本発生生物学会・ワークショップ (2010 年 6 月、京都)

2. 竹林-鈴木公子・喜多山篤・上野直人・鈴木 厚 「胚発生初期に背腹と前後のパターン形成が調和する機構」 第 33 回 日本分子生物学会 (2010 年 12 月、神戸)

3. 竹林-鈴木公子・喜多山篤・寺坂-飯岡 知恵・上野直人・鈴木 厚 「胚発生初期に背腹と頭尾のパターン形成が連動するしくみ」 日本動物学会中国四国支部 広島県例会 (2011年3月、東広島)

(国際学会)

1. Takebayashi-Suzuki, K., Kitayama, A., Ueno, N. and Suzuki, A. “A mechanism coordinating the establishment of the dorsal-ventral and anterior-posterior axes during early *Xenopus* embryogenesis” The 16th International Society of Differentiation Conference (Nov., 2010. Nara, Japan)

2. Takebayashi-Suzuki, K., Kitayama, A., Ueno, N. and Suzuki, A. “A mechanism coordinating the establishment of the dorsal-ventral and anterior-posterior axes during early *Xenopus* embryogenesis.” 13th International Xenopus Conference (Sep., 2010. Calgary, Canada)

④科研費等の受け入れ状況

1. 新学術領域研究 (課題提案型) 2010年 120万円 (分担)

助教・倉林 敦 (Atsushi Kurabayashi)

研究内容

ヒメアマガエル亜科間の系統関係および分岐年代に基づく大陸間分布形成プロセスの解明

Molecular phylogeny and divergence age estimation of microhylid subfamilies: Implications on a formation process of their inter-continental distributions

[目的]

ヒメアマガエル科は、すべての無尾両生類の8%に相当する487種を含む巨大な分類群である。ヒメアマガエル科は、11の亜科に分類され、それぞれの亜科がゴンドワナ超大陸由来の陸地に分布している。また、アジアと南米には亜科の所属が不明な属が数多く残っている。これまでにヒメアマガエル亜科間の系統関係と大陸間分布の形成プロセスを明らかにすることを目的とした研究がいくつか行われてきているが、どちらについてもコンセンサスは得られていない。本研究では、(1) ヒメアマガエル類の亜科間の系統関係と各分岐年代を再推定すること、(2) 大陸間の分布がどのように成立したのかについてより詳細な知見を得ること、(3) 亜科所属不明のアジア産2属 *Gastrophrynoidea* と *Phrynellia* の系統学的位置を明らかにすることを目的とし、これまでで最大の分子データを用いて分子系統解析と分岐年代推定を行った。

[材料・方法]

全部で11のヒメアマガエル亜科のうち、8亜科22種を新たに解析に用いた。これらのサンプルから、2つのミトコンドリアコード遺伝子 (*cox1*・*16SrRNA*) と6つの核遺伝子 (*bdnf*, *cxcr4*, *ncx1*, *rag1*, *rag2*, and *tyr*)、合計およそ8 kbpをPCR増幅し、塩基配列を決定した。このデータと先行研究(主に Van Bocxlaer et al. 2006 と van der Meijden et al. 2007)のデータを合わせ、系統解析と分岐年代推定を行った。系統解析にはML法とBayes法、分岐年代推定はBayesian relaxed clock法を用いた。

[結果・考察・成果]

今回の解析から、アジア産の *Microhylinae* 亜科とマダガスカル産の *Dyscophinae* 亜科が単系統になり、オーストラリアとパプアニューギニアに分布する *Asterophryninae* 亜科がその姉妹群になることが明確になった。しかし、それ以外の亜科間の系統関係は不明瞭であった。この原因は、ヒメアマガエルの亜科は、白亜紀後期から新生代初期(8500~6600万年前)に素早く放散した結果、系統関係を示す塩基置座位が殆ど残っていないためと推定された。所属不明亜科のうち、*Phrynellia* 属はアジア産亜科の *Microhylinae* に含まれるが、*Gastrophrynoidea* 属は、*Asterophryninae* 亜科の最も初期に分岐したグループであることが本研究の結果明らかになった。これまでに、*Asterophryninae* 亜科は、オーストラリア-ニューギニアや一部の東南アジアの島からしか知られてお

らず、マレーシアに産する *Gastrophrynoides* は、本亜科のユーラシア大陸からの初の記録である。なお、これまでに *Asterophryninae* 亜科は、南極を渡ってオーストラリアに定着したと考えられていた。しかし、今回の研究では、*Gastrophrynoides* と他の *Asterophryninae* グループは、未だオーストラリアとユーラシアは離れ、かつ東南アジアの島々も形成されていない時期(およそ 5000 万年) に系統分岐したことが明らかになった。さらに、*Gastrophrynoides* 以外の *Asterophryninae* の分類群は、比較的最近(2500 万年前から) 分岐し始めたことも分かった。この結果は、*Asterophryninae* 亜科の祖先は、南極を渡ってきたのではなく、アジア経由で比較的最近にオーストラリア-ニューギニア地域に分布を広げたことを強く示唆するものである。この成果を *BMC Evolutionary Biology* 誌に発表した(2011)。

研究業績

① 原著論文

1. Kotaki M., Kurabayashi A., Matsui M., Kuramoto M., Djong T.H., Tandon M., and Sumida M. (2010) Molecular phylogeny for the diversified frogs of genus *Fejervarya* (Anura: Discoglossidae). *Zool Sci* 27, 386-395.
2. Kurabayashi A., Yoshikawa N., Sato N., Hayashi Y., Oumi S., Fujii T., and Sumida M. (2010) Complete mitochondrial DNA sequence of the endangered frog *Odorrana ishikawae* (family Ranidae) and unexpected diversity of mt gene arrangements in ranids. *Mol Phylogenet Evol* 56, 543-553.
3. Kashiwagi K., Kashiwagi A., Kurabayashi A., Hanada H., Nakajima K., Okada M., Takase M., and Yaoita Y. (2010) *Xenopus tropicalis*: An ideal experimental animal in amphibia. *Experimental Animal* 59, 395-405.
4. Alam M.S., Kurabayashi A., Hayashi Y., Sano N., Khan M.M.R., Fujii T., and Sumida M. (2010) Complete mitochondrial genomes and novel gene rearrangements in two dicroglossid frogs, *Hoplobatrachus tigerinus* and *Euphlyctis hexadactylus*, from Bangladesh. *Genes Genet Syst* 85, 219-232.
5. Kuramoto M., Satoh N., Oumi S., Kurabayashi A., and Sumida M. (2011) Inter- and intra-island divergence in *Odorrana ishikawae* (Anura, Ranidae) of the Ryukyu Archipelago of Japan, with description of a new species. *Zootaxa* 2767: 25-40 (2011 Feb).

② 総説・著書

なし

③ 学会発表

国際学会

1. Igawa T., Okuda M., Oumi S., Katsuren S., Kurabayashi A., Umino T., and Sumida M. "Development of microsatellite markers and population genetic analysis of the endangered frog, *Odorrana ishikawae* (Anura:

- Ranidae).” 2010 International Meeting of the Association for Tropical Biology and Conservation (Jul., 2010. Bali, Indonesia)
2. Kurabayashi, A., Yoshikawa N., Sato N., Hayashi Y., Oumi S., Fujii T., and Sumida M. “Mitochondrial genome of the endangered frog *Odorrana ishikawae* and unexpected diversity of mt genomic arrangements in the family Ranidae”. International Symposium on Biodiversity Sciences (ISBDS) 2010, “Genome, Evolution and Environment (Aug., 2010. Nagoya, Japan)
(Travel Award 獲得)

国内学会

1. Alam M. S., Kurabayashi A., Hayashi Y., Sano N., Khan M. M. R., Fujii T., and Sumida M. 「Complete mitochondrial genomes and novel gene rearrangements in two dicroglossid frogs, *Hoplobatrachus tigerinus* and *Euphlyctis hexadactylus* from Bangladesh」 日本遺伝学会第82回大会(2010年9月, 札幌)
 2. 井川武, 奥田優, 大海昌平, 勝連盛輝, 倉林敦, 海野徹也, 住田正幸 「マイクロサテライトマーカーを用いた絶滅危惧種および天然記念物イシカワガエルの遺伝的集団構造の解明」 日本遺伝学会第82回大会(2010年9月, 札幌)
 3. 住田正幸, 佐藤直樹, Islam M. M., 井川武, 吉川夏彦, 倉林敦, 大海昌平, 勝連盛輝, 福庭博子, 新谷望, 藤井保, 倉本満 「絶滅危惧種イシカワガエルにおける飼育下繁殖の試みと交配後隔離機構の解明」 日本遺伝学会第82回大会(2010年9月, 札幌)
 4. 住田正幸, 西谷拓磨, 菅原弘貴, 倉林敦, 勝連盛輝, 大海昌平 「絶滅危惧種イボイモリの飼育下繁殖の試みとミトコンドリアゲノムの解析」 日本動物学会第81回大会(2010年9月, 東京)
- ④ 科研費等の受け入れ状況
日本学術振興会科学研究費補助金・基盤研究(C) 2010年 10万円(分担)

特任助教・竹林公子 (Kimiko Takebayashi-Suzuki)

研究内容

胚発生初期に背腹と前後のパターン形成が調和する機構

A mechanism coordinating the establishment of the dorsal-ventral and anterior-posterior axes during early *Xenopus* embryogenesis

[目的]

初期発生過程において、背腹と前後の軸が形成されると初めて胚の3次元座標が精確に決まり、基本的な体の設計図（ボディープラン）が確立される。近年の研究から、様々な細胞増殖因子によってボディープランの形成が制御されることが知られており、背腹軸は腹側化因子 BMP によって、前後軸は後方化因子 Wnt、FGF やレチノイン酸によって、それぞれ決定されている。胚が正常に発生するためには、背腹と前後の体軸形成が互いに調和しながら形成される必要があるが、この調和機構については未だにわかっていない。

私達は、機能スクリーニングで単離した Biz (BMP inhibitory zinc-finger) 転写因子が体軸形成の調和機構に関わる可能性を見出した。本研究では、この可能性を検証するために Biz の詳細な機能解析を行った。

[成果と考察]

本年度までに、Biz が腹側化因子 BMP のシグナルを抑制して神経を誘導（背側化）することと、その一方で、後方化因子 Wnt のシグナルを活性化して後方化を引き起こすことを明らかにしている。さらに、Biz が BMP のシグナルを抑制するメカニズムの一つとして、BMP シグナル伝達因子 Smad1/5/8 の C 末リン酸化型タンパク質の発現量を抑制することもわかっている。

本年度は、Biz 特異的なアンチセンスモルフォリノオリゴ (MO) を3種類作成し、Biz 機能阻害実験をおこなった。まず、アフリカツメガエル初期胚で Biz 転写因子を過剰発現させて、それぞれの MO が効率的に Biz mRNA の翻訳を阻害するかをイムノブロットング法で確認した。その結果、翻訳阻害効果に若干の差はあるが、3種類の MO 全てが Biz mRNA の翻訳を阻害できることがわかった。さらに、初期胚の片側に Biz 特異的 MO を注入し、後方神経マーカーの1つである HoxB9 転写因子の発現が低下することを明らかにした。これらの結果から、Biz が後方神経の形成（前後軸形成）に必要な可能性が示唆された。

この他、Biz 以外にも、同様に体軸形成の調和に関与する FoxB1 転写因子について機能解析を行っている（詳細については本研究部門・鈴木准教授の項目を参照）。

[将来の展望]

今後は、さらに多くの前方・後方神経マーカーや神経・表皮マーカーの発現を解析して、これらに対する Biz MO の影響を検討し、前後軸および背腹軸形成

における Biz の働きを解析する。また、腹側化因子 BMP や後方化因子 Wnt が体軸形成を制御する際に Biz を必要とするのか、その場合は各々のシグナル経路のどの段階で Biz が働いているのかについても解析をおこなう予定である。前後軸および背腹軸形成における Biz の役割と、腹側化因子 BMP や後方化因子 Wnt に対する Biz の作用機序を解析することが、複雑な体軸形成調和機構の解明につながると考えている。

研究業績

①原著論文

該当なし

②総説・著書

該当なし

③学会発表

(国内学会)

1. 竹林-鈴木公子・喜多山篤・上野直人・鈴木 厚 “A mechanism coordinating the establishment of the dorsal-ventral and anterior-posterior axes during early *Xenopus* embryogenesis” 第 43 回 日本発生生物学会・ワークショップ (2010 年 6 月、京都)
2. 竹林-鈴木公子・喜多山篤・上野直人・鈴木 厚 「胚発生初期に背腹と前後のパターン形成が調和する機構」 第 33 回 日本分子生物学会 (2010 年 12 月、神戸)
3. 竹林-鈴木公子・喜多山篤・寺坂一飯岡 知恵・上野直人・鈴木 厚 「胚発生初期に背腹と頭尾のパターン形成が連動するしくみ」 日本動物学会中国四国支部 広島県例会 (2011 年 3 月、東広島)

(国際学会)

1. Takebayashi-Suzuki, K., Kitayama, A., Ueno, N. and Suzuki, A. “A mechanism coordinating the establishment of the dorsal-ventral and anterior-posterior axes during early *Xenopus* embryogenesis” The 16th International Society of Differentiation Conference (Nov., 2010. Nara, Japan)
2. Takebayashi-Suzuki, K., Kitayama, A., Ueno, N. and Suzuki, A. “A mechanism coordinating the establishment of the dorsal-ventral and anterior-posterior axes during early *Xenopus* embryogenesis.” 13th International *Xenopus* Conference (Sep., 2010. Calgary, Canada)

④科研費等の受け入れ状況
該当なし

特任助教・井川 武 (Takeshi Igawa)

研究内容

絶滅危惧種イシカワガエル及びアマミイシカワガエルにおけるマイクロサテライトマーカーを用いた遺伝的多様性の解明

Detection of genetic diversities of endangered frogs, *O. ishikawae* and *O. splendida* based on polymorphism of microsatellite markers

[目的]

西南諸島は両生類に限らず動植物全般における生物多様性のホットスポットであると同時に、島嶼という限定的な生息域によって絶滅の危険性も高い。実際、日本の両生類相における絶滅危惧種（環境省レッドリスト・IA、IB、およびIIB類）の半数は西南諸島固有種である。したがって、早急にこれらの種における種内の遺伝的多様性を解明しておく必要がある。しかしながら、従来の研究では島間の遺伝的関係にのみ焦点が置かれ、島内の微細な集団構造についてはほとんど明らかになっていない。特に、日本産両生類における最美麗種と言われることも多い、イシカワガエルについては、最近、奄美大島集団が *O. splendida*（アマミイシカワガエル）として新種記載されたが (Kuramoto et al., 2011)、島内における遺伝的多様性については不明確なままであった。そこで、本研究では、まず、(1) 共優性かつ多型性に富んだ遺伝マーカーであるマイクロサテライト (以下、STR) 遺伝子座を単離し、さらに、(2) これらを用いてイシカワガエル・アマミイシカワガエルにおける遺伝的多様性と微細集団構造を解明することを目的とした。

[材料・方法]

(1) イシカワガエルのメス個体及び、アマミイシカワガエルの♂個体をサンプルとして、磁気ビーズハイブリダイゼーション法 (Glenn and Schable 2005) と二重抑制 PCR 法 (Lian and Hogetsu 2002) を用い、STR 領域を含む遺伝子座のクローンを得た。これらの塩基配列に基づいて特異的なプライマーを設計し、イシカワガエルとアマミイシカワガエルの両集団内における多型性の程度を検討した。

(2) 現存する生息域を網羅したイシカワガエル 6 集団 33 個体、アマミイシカワガエル 12 集団 127 個体について、(1) で単離した遺伝子座のうち多型性が見られた 12 遺伝子座の遺伝子型を決定し、集団構造解析を行った。さらに、GIS を用いて景観生態学的解析を応用し、集団構造の形成要因を探索した。

[結果・考察・成果]

(1) 磁気ビーズ法及び、二重抑制 PCR 法によって単離された STR を含む、542 クローンから、安定的に増幅され、かつ多型性が確認された 12 遺伝子座が単離された。ハーディ・ワインベルグ平衡 (HWE) 及び、連鎖平衡について、統計テストを行ったところ、一部の遺伝子座で HWE からの逸脱と連鎖不平衡が確認されたが、概ね常染色体上の中立的な遺伝子座であった。

(2) STRUCTURE (Pritchard et al., 2000)を用いた集団構造解析の結果、イシカワガエルについては、階層的構造は見られなかったが、アマミイシカワガエルにおいては、5あるいは6個の遺伝的クラスターに分けられることが分かった。また、遺伝距離に基づく系統解析を行ったところ、アマミイシカワガエルの集団は地理的距離が単系統を形成した。さらに現在利用可能なほぼすべての地形データ（高度、植生、土壌、流水量、土壌水分含有量）を用いて、生息適地モデルを構築し、これに基づくコスト距離と遺伝距離を比較したところ高い相関が見られた。したがって、アマミイシカワガエルの集団構造は、奄美大島における複雑な地形と、それに依存した生息適地の連続性によって形成されたことが考えられた。

研究業績

①原著論文

- Kim H.L*, Igawa T*, Kawashima A., Satta Y., Takahata N. (2010)
Divergence, demography and gene loss along the human lineage. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 365 (1552), 2451–2457.
*The first two authors contributed equally.

② 総説・著書

なし

③ 学会発表

国際学会

1. Igawa T., Okuda M., Oumi S., Katsuren S., Kurabayashi A., Umino T., and Sumida M. “Development of microsatellite markers and population genetic analysis of the endangered frog, *Odorrana ishikawae* (Anura: Ranidae).” 2010 International Meeting of the Association for Tropical Biology and Conservation (Jul., 2010. Bali, Indonesia)
2. Kurniawan, N., T. H. Djong, T. Igawa, M. Kotaki and M. Sumida “Geographic distribution and phylogenetic relationship of genus *Fejervarya* from Indonesian Sunda Land inferred from 16S rRNA gene.” 2010 International Meeting of the Association for Tropical Biology and Conservation (Jul., 2010. Bali, Indonesia)
3. Hasan, M., M. M. Islam, T. Igawa, Md. M. R. Khan, M. S. Alam, T. H. Djong, N. Kurniawan, M. Kuramoto and M. Sumida. “Genetic divergences and phylogenetic relationships in the frogs from South to East Asia.” Internatinal Congress of BioSystematics Berlin 2011 (Feb., 2011, Berlin, Germany)

国内学会

1. Hasan, M. • M. M. Islam • Md. M. R. Khan • M. S. Alam • T. H. Djong • T. Igawa • N. Kurniawan • M. Kuramoto • M. Sumida “Genetic divergences and phylogenetic relationships in the frogs from south to east Asia.” 日本学会動物学会第62回中国四国支部大会（2010年5月, 山口）

2. Hasan, M. • M. M. Islam • M. M. R. Khan • M. S. Alam • T. Igawa • M. Kuramoto • M. Sumida “Species diversity and phylogenetic relationships among frogs from Bangladesh revealed by nucleotide sequences of mitochondrial 16S rRNA gene.” 日本遺伝学会第82回大会（2010年9月, 札幌）

3. 井川武 • 奥田優 • 大海昌平 • 勝連盛輝 • 倉林敦 • 海野徹也 • 住田正幸 「マイクロサテライトマーカーを用いた絶滅危惧種および天然記念物イシカワガエルの遺伝的集団構造の解明」 日本遺伝学会第82回大会（2010年9月, 札幌）

4. 住田正幸 • 佐藤直樹 • M. M. Islam • 井川武 • 吉川夏彦 • 倉林敦 • 大海昌平 • 勝連盛輝 • 福庭博子 • 新谷望 • 藤井保 • 倉本満 「絶滅危惧種イシカワガエルにおける飼育下繁殖の試みと交配後隔離機構の解明」 日本遺伝学会第82回大会（2010年9月, 札幌）

④ 科研費等の受け入れ状況
なし

Assistant Professor • Islam Mohammed Mafizul

Title

Genetic divergence and reproductive isolating mechanisms among frogs of the genus *Fejervarya* from several Asian countries.

Summary:

In order to elucidate the genetic divergences and reproductive isolating mechanisms among different frogs of the genus *Fejervarya*, I have conducted mtDNA gene sequence analyses, crossing experiments, spermatogenesis and histological observations using the *Fejervarya* frogs from Bangladesh, India, Sri Lanka, Thailand, Malaysia, Indonesia, the Philippines and Japan. Molecular analyses showed that there were four groups among the frogs within the genus *Fejervarya*; the cancrivora group, limnocharis group, iskandari group and Indian group. Based on the crossing experiments, spermatogenesis and histological observations, we also found the same four isolated groups, among which the cancrivora group was isolated from the iskandari group by gametic isolation, the Indian group was also isolated from others by complete hybrid inviability, although the iskandari and limnocharis groups were not completely reproductively isolated from each other, but they showed significant abnormalities in spermatogenesis suggested hybrid sterility. Frogs belonging to the limnocharis group showed no isolation among different localities from Japan but isolated by abnormality in spermatogenesis between Japan and Malaysia. Within the iskandari group, Bangladesh large type was not isolated from Thailand or Kota Kinabalu of Malaysia ones, but isolated from Indonesian *F. iskandari*. Within the Indian group, Bangladesh small type showed no isolation with Sri Lanka one or Indian *F. caperata*, but was isolated from Bangladesh medium type by hybrid sterility and characterized by extremely abnormal spermatogenesis. The present studies suggest that many frogs of the genus *Fejervarya* are wrongly named as *F. limnocharis*, and that there are several cryptic and possible undescribed species in this genus.

Methods:

To understand the genetic divergences and reproductive isolation, I have utilized the following methods-

Mitochondrial 16S rRNA gene sequence analyses: Direct sequencing of mitochondrial 16s rRNA gene were conducted and resultant sequences were analyzed with other known species of *Fejervarya* from DDBJ.

Crossing experiments: A total of 35 frogs of the genus *Fejervarya* were used

for crossing experiments consisting of 16 male and 19 female frogs of four types from Bangladesh. Also 7 female and 10 male frogs of the genus *Fejervarya* were used from different Asian countries. Mature female frogs were injected with *Rana catesbeiana* pituitary, whereas a sperm suspension was made by crushing the testes of mature male individual. The tadpoles were feed with boiled spinach and the metamorphose frogs were feed with live cricket.

Histological observations: Testes of mature male frogs of all hybrids and their controls were collected from the live frog and were fixed in Novashin fixative. After subsequent tissue processing, embedding, and microsectioning, slides were prepared and slides were stained with Heidenhain's iron hematoxylin for histological observation.

Spermatogenesis observations: Meiotic chromosomes were prepared according to the technique described by Schmid et al. (1979) with some modification. The chromosomes were stained with a 1.2% Geimsa solution for 5 minutes. Chromosome analyses were carried out using only diploid cells at the diakinesis and metaphase of the first reduction division, when bivalent and univalent chromosomes could be easily distinguished from each other.

Results:

Mitochondrial 16S rRNA gene sequence analyses: From the molecular data, I have found four major clades among the frogs of the genus *Fejervarya* representing four groups; these four groups are the cancrivora group, limnocharis group, iskandari group and Indian group.

Crossing experiments: After conducting crossing experiment with different frogs from genus *Fejervarya* from Bangladesh and other Asian countries I have found different types of isolation. Crossing experiments within the genus *Fejervarya* from Bangladesh indicated three types of reproductive isolating mechanisms, i.e., gametic isolation between large and mangrove types, hybrid inviability between large and other two types, and hybrid sterility between medium and small types, which indicated that four types can be considered as four different species. Crossing experiments among different Asian *Fejervarya* species indicated that Bangladesh large type, *Fejervarya* from Bangkok of Thailand, Kota Kinabalu of Malaysia, and also *F. iskandari* of Indonesia produced viable hybrids with each other i.e., these frogs belongs to iskandari group. Among this group Bangladesh large type and *Fejervarya* of Thailand is most closely related. On the other hand Bangladesh small type, medium type, Sri Lankan and Indian *Fejervarya* produced viable hybrids among each other indicated that they belong to Indian *Fejervarya*. Among them, Bangladesh small type

is most closely related to Sri Lankan *Fejervarya*. My findings also noticed that frogs from Japan and Malaysia which belongs to *limnocharis* group is isolated from Bangladesh large type or Thailand one (*iskandari* group) by less viability of their hybrids

Histological observations: Histological studies have confirmed several relationships and isolations among different frogs of the genus *Fejervarya*. Among them, I found the testes of reciprocal hybrids between Bangladesh Large type and Thailand are completely normal in inner structure with bundle of normal spermatozoa, where those with Hiroshima and Sarawak of Malaysia have little bit abnormal. Testes of hybrids between Bangladesh large type and *F. iskandari* are completely abnormal which indicated that although they are of same group but they are distinctly different species. The testes of hybrids between Bangladesh small and Sri Lanka were completely normal but it was extremely abnormal in hybrid between Bangladesh small and medium type as well as triploid with *F. caperata* indicating that existence of at least 3 species among the frogs studied here from Indian group. In case of Japanese *Fejervarya*, the testes of hybrids between Hiroshima and Okinawa were completely normal, but those with Ishigaki and Iriomote were little bit abnormal but with Kuala Lumpur of Malaysia were completely abnormal, which indicates that there is negligible variation within Japan but Japanese *Fejervarya* is different species from Malaysian *Fejervarya* which is considered very close with topotypic *F. limnocharis* of Indonesia. The testes of the hybrids between Bangladesh large type and Kuala Lumpur of Malaysia having very large spermatozoa indicating they are triploid, which clarified again difference among *limnocharis* and *iskandari* group.

Spermatogenesis observations: Almost similar results with histology were found after spermatogenesis observation. Hybrids between Bangladesh large type with Thailand and Kota Kinabalu of Malaysia one showed comparatively normal spermatogenesis which indicating their close relationships as found in previous works. In contrast hybrid between Bangladesh small and medium types showed complete abnormalities by means of both number of rod shaped chromosomes and number of univalent, which indicating although they produce viable hybrid they are of different species. But hybrid between Bangladesh small type and Sri Lankan *Fejervarya* showed quite normal spermatogenesis, which reflect their close relationship as found in previous works. Among the Japanese *Fejervarya*, the hybrids and their controls showed normal spermatogenesis but the hybrid between Hiroshima of Japan and the Malaysia one had abnormal spermatogenesis which again confirmed their different specific entity.

After completion of all molecular, crossing experiments and subsequent

histology and spermatogenesis observations, I have confirmed the existence of 4 groups of frogs from the genus *Fejervarya* which are reproductively isolated from each other; these four groups are the cancrivora group, limnocharis group, iskandari group and Indian group. cancrivora group is isolated from iskandari group by gametic isolation, limnocharis group is isolated from iskandari group by incomplete hybrid inviability and abnormalities in spermatogenesis and Indian group is isolated from others by complete hybrid inviability. Bangladesh four types of frogs were reproductively isolated from each other, which confirmed the existence of four different species of the genus *Fejervarya* in Bangladesh territory. Present study also indicated that: within iskandari group- Bangladesh large type is closely related to *Fejervarya* from Bangkok but surely different species from *F. iskandari*; within Indian group- Bangladesh small type is closely related to Sri Lankan *Fejervarya* but different species from Bangladesh medium type and Indian one. Within limnocharis group frogs from Japan are of the same species but different with Malaysia one which resemble with topotypic *F. limnocharis*.

Discussion :

Frogs belonging to the genus *Fejervarya* are most commonly misidentified due to their poor differences in morphology in all over the Asian countries. As these frogs are widely distributed and occurred sympatrically or parapatrically, scientists have often misunderstood one population with another even one species with another. Using only a single method like morphology, molecular data or breeding call sometime cannot confirm the identity of certain *Fejervarya* species. That is why combinations of these techniques are very useful. Although several species still have been describing from their genus more there is scope for taxonomic revision of this genus. Also I like to suggest that it is high time to reconsider about the taxonomic status of the Indian group, whether they will be included in genus *Fejervarya* or considered as different genus -due to their wide differences with other *Fejervarya* frogs.

Future research plan:

Research is going on to identify the specific entity of each *Fejervarya* frogs from Bangladesh as well to describe new *Fejervarya* species. Also I am collecting more *Fejervarya* frogs from different Asian countries. Due to minor differences in morphology and sometime molecular data are not sufficient to make conclusion about different population of *Fejervarya* frogs, detailed reproductive isolation study with maximum number and

diversified population will clarify it, and I am working for that achievement.

Research Achievements:

Journal paper:

1. Kurniawan N, Islam MM, Djong TH, Igawa T, Daicus MB, Yong HS, Wanichanon R, Khan MMR, Iskandar DT, Nishioka M and Sumida M (2010) Genetic divergence and Evolutionary relationship in *Fejervarya cancrivora* from Indonesia and other Asian countries inferred from allozyme and mtDNA sequence analyses. *Zoological Science*, 27: 222-233.

Presentations in Conference:

(National Meetings)

1. Islam MM, KhanMMR, Kuramoto M and Sumida M (2010) Reproductive isolating mechanisms among the frogs of the genus *Fejervarya* elucidated by crossing experiments, histological and spermatogenesis observations. Presented in the 81st Annual Meeting of Zoological Society of Japan in Tokyo University, Tokyo, Japan.
2. Hasan M, Islam MM, Khan MMR, Alam MS, Igawa T, Kuramoto M and Sumida M (2010) Species diversity and phylogenetic relationships among frogs from Bangladesh revealed by nucleotide sequences of mitochondrial 15S rRNA gene. Presented in the 82nd annual meeting of The Genetics Society of Japan in Hokkaido University, Hokkaido, Japan.
3. Hasan M, Islam MM, Khan MMR, Alam MS, Djong TH, T Igawa, Kurniawan N, Kuramoto M and Sumida M (2010) Genetic divergences and phylogenetic relationships in the frogs from South to East Asia. Presented in the annual meeting of Chugoku Shikoku branch of The Zoological Society of Japan, Yamaguchi University, Yamaguchi, Japan.
4. Komaki S, Kurabayashi A, Islam MM, Sumida M and Koji Tojo (2010) Introgression in the hybrid zone of the Japanese pond frog species in central Japan. Presented in the 49th Annual Meeting of Herpetological Society of Japan in Keio University, Yokohama, Japan.

(International Conferences)

1. Hasan, M, Islam MM, Igawa T, Khan MMR, Alam MS, Djong TH, Kurniawan N, Kuramoto M and Sumida M “Genetic divergences and phylogenetic

relationships in the frogs from South to East Asia” Internatinal Congress
of BioSystematics Berlin 2011 (Feb., 2011, Berlin, Germany)

Researcher • Alam Mohammad Shafiqul

Title

Reproductive Isolating Mechanisms and Genetic Divergences in the Genus *Hoplobatrachus* (Anura, Dicroglossidae) Based on Crossing Experiments, Chromosomal and Histological Observations, and Allozyme and Mitochondrial Analyses

Introduction

We studied detailed species composition, genetic relationships and phylogeographic patterns among *Hoplobatrachus* and *Euphlyctis* genera (Anura, Dicroglossidae) from Bangladesh and neighboring countries and discovered several cryptic species in this region and identified underestimation of richness of amphibian fauna (Alam et al., 2008). Later we described several new species (e.g. *E. aloysii*, *E. mudigere*) on the basis of our findings (Joshy et al., 2009). We also studied and determined the complete nucleotide sequences of mitochondrial genomes of *Hoplobatrachus tigerinus* (Indian Bullfrog) and *Euphlyctis hexadactylus* (Indian Green frog) and we found novel gene rearrangements among them (Alam et al., 2010). Interesting results found among these two genera inspired us to do more research with these groups. However, the post mating isolating mechanisms (i.e. genomic incompatibility, hybrid inviability or sterility etc.) among *Hoplobatrachus* and related genera were not studied yet.

Materials and Methods

The available live frogs from the genera *Hoplobatrachus*, *Euphlyctis* and *Fejervarya* were collected from Bangladesh and Thailand; and artificial insemination was conducted for crossing experiments. Developmental capacity of the hybrids and control were recorded for further comparison. The hybrid sex and karyotype were checked by chromosomal and histological observations. Furthermore, the genetic makeup of the hybrids and control were studied by allozyme and mitochondrial gene analyses.

Results

The developmental capacity of the intergenus hybrids between *Hoplobatrachus* and *Euphlyctis* with *Fejervarya* showed gametic isolation. The intergenus hybrids between *H. tigerinus* with *E. cyanophlyctis* were inviable at tadpole stage whereas hybrids between *H. chinensis* with *E. cyanophlyctis* were inviable at hatching stage. The interspecific hybrids between *H. tigerinus* and *H. chinensis* become metamorphosed and three of

them become matured. The morphology of the hybrids was similar to *H. tigerinus*.

We found underdeveloped or abnormal testis in hybrids compared with control after studying testis morphology. In fact, these are the first report of hybrids between *H. tigerinus* and *H. chinensis*. Interestingly, we found 39 chromosomes ($3n=39$) in hybrids whereas 26 chromosomes ($2n=26$) were found in *H. tigerinus* and *H. chinensis*. Thus, we confirmed the hybrids were the allotriploid between female *H. tigerinus* and male *H. chinensis*. Furthermore, we could not find normal sperm bundles in hybrids by histological observation, suggesting these allotriploids become sterile as it could not produce normal sperm. Actually, spermatogonium ($2N$) of hybrids could not proceed for further sperm maturation process and the cell can be treated as undifferentiated cell.

There are 15 enzymes were studied by allozyme analyses whereas 6 diagnostic enzymes were found in the control of *H. tigerinus* and *H. chinensis* with their hybrids. The allozyme data suggests that two genomes came from maternal origin and other genome from paternal origin. We hypothesized that more similar biological reproduction process between these two species allowed further survival of their hybrids than other distantly mating species through the production of triploid as we could not find any diploid hybrids. The spontaneous production of triploids due to the over ripening of eggs and temperature during fertilization and thus the inclusion of second polar body and finally formation of triploid frogs is also possible. The mitochondrial Cyt b, 12S and 16S rRNA genes were studied using hybrids and control to recheck the maternal inheritance nature of mitochondrial genes and 100% nucleotide sequences observed in the mother and their offspring confirm the maternal inheritance nature of mitochondrial genes. Furthermore, we could not observe any nucleotide sequence divergences in our present samples of *H. chinensis* from Thailand (Chachoengsao) by our mitochondrial data analyses. We found our present data was most similar with coastal type *H. chinensis* from Phang Nga, Thailand (Alam et al., 2008) by comparing gene bank database.

Conclusion

In the present crossing experiments, we found gametic isolation between *Fejervarya* and *Hoplobatrachus*, and *Fejervarya* and *Euphlyctis* genera from the family Dicroglossidae. By contrast, complete hybrid inviability at embryonic or tadpole stages were found between *Hoplobatrachus* and

Euphlyctis genera. The interspecific hybrids between female *H. tigrinus* and male *H. chinensis* became inviable at tadpole stage, but a small number of the hybrids developed normally and matured only three individuals. These mature hybrids were found to be triploid and sterile by the chromosomal and histological observations. These results, suggest incomplete hybrid inviability between these two species. The allozyme study showed 9 diagnostic loci among 24 loci investigated in *H. tigrinus* and *H. chinensis*, and parental allele constitutions at these loci in the triploid hybrids. The maternal inheritance of mitochondrial genomes was retained in the hybrids.

Future research plan

We could not include inland type *H. chinensis* in our crossing experiments at present and in future studies we have plan to collect and to check their post mating isolating mechanisms with related species. However, presently we are also doing crossing experiments among different cryptic species of *Euphlyctis* genus to know their reproductive isolating mechanisms.

Original Paper

1. Alam MS, Kurabayashi A, Hayashi Y, Sano N, Khan MMR, Fuji T and Sumida M. Complete mitochondrial genomes and novel gene rearrangements in two dicroglossid frogs, *Hoplobatrachus tigrinus* and *Euphlyctis hexadactylus*, from Bangladesh. *Genes and Genet. Syst.* 85 (3):219–232, 2010.

Meeting or conferences

(National Conference)

1. Alam MS, Kurabayashi A, Hayashi Y, Sano N, Khan MMR, Fuji T and Sumida M. Complete mitochondrial genomes and novel gene rearrangements in two dicroglossid frogs, *Hoplobatrachus tigrinus* and *Euphlyctis hexadactylus*, from Bangladesh. The 82nd Genetic Society of Japan, Hokkaido, Sep. 20–22, 2010.

2. Hasan M, Islam MM, Khan MMR, Alam MS, Igawa T, Kuramoto M and Sumida M (2010) Species diversity and phylogenetic relationships among frogs from Bangladesh revealed by nucleotide sequences of mitochondrial 15S rRNA gene. Presented in the 82nd annual meeting of The Genetics Society of Japan in Hokkaido University, Hokkaido, Japan.

3. Hasan M, Islam MM, Khan MMR, Alam MS, Djong TH, T Igawa, Kurniawan N, Kuramoto M and Sumida M (2010) Genetic divergences and phylogenetic

relationships in the frogs from South to East Asia. Presented in the annual meeting of Chugoku Shikoku branch of The Zoological Society of Japan, Yamaguchi University, Yamaguchi, Japan.

(International Conferences)

1. Hasan, M, Islam MM, Igawa T, Khan MMR, Alam MS, Djong TH, Kurniawan N, Kuramoto M and Sumida M “Genetic divergences and phylogenetic relationships in the frogs from South to East Asia.” Internatinal Congress of BioSystematics Berlin 2011 (Feb., 2011, Berlin, Germany)

プロジェクト研究①

内海耕髓（岡山大）、佐々木順造（岡山大）、竹原良記（岡山学院大）、柏木昭彦（三陽女子短期大）、花田秀樹（広島大）

1. 無尾両生類オタマジャクシ尾部アポトーシスの分子機構

Molecular mechanism for tadpole tail apoptosis in anurans

アポトーシスは、形態形成、神経ネットワーク形成、免疫システムの確立および器官の恒常性維持の過程で一役を担っている。アポトーシスの特徴として、細胞や細胞核の縮小および DNA の断片化があげられる。多くの研究によって、いくつかのアポトーシスは活性酸素が引き金となって起こることが明らかにされており、アンチアポトーシス遺伝子である *bcl-2* の発現はその活性酸素の発生を抑制することが示されている。変態期のオタマジャクシ尾部アポトーシスおよび甲状腺ホルモン誘導による尾部アポトーシスも同様に、活性酸素の発生を通じて起こると考えられている。私は、甲状腺ホルモンによって誘導される尾部アポトーシス機構の解明を目的とした研究グループの一員として、研究活動に参加している。我々のこれまでの研究結果から、1. 甲状腺ホルモン誘導による活性酸素の発生、2. ミトコンドリアの膨潤、3. ミトコンドリア MPT の開口、4. MPT 開口に伴うサイトクロム c の細胞質内への漏出、5. caspase 様酵素群の活性化、6. DNA の断片化が起こることが明らかとなった。今後も、多くの情報を発信していきたいと考えている。

柏木昭彦（三陽女子短期大）、古野伸明（広島大）、柏木啓子（広島大）、山下雅道（宇宙研）、谷本能文（大阪大谷大）、藤原好恒（広島大）、花田秀樹（広島大）

2. 無尾両生類の生活環に対する過重力および強磁場の影響

Effects of hypergravity environments and strong static magnetic fields on amphibian life cycle

地球温暖化、化学物質による汚染、一日当たり3桁に及ぶ生物の絶滅、人口爆発、食料不足など、将来への不安要因は増大している。そんな中でヒトを含めた生物種の他惑星への移住は重要な選択肢の一つとして取り上げられている。

私は、「宇宙環境利用化学委員会研究チーム」の一員として研究活動に参加している。我々は、地球とは異なる、宇宙空間における重力および磁場の生物種に与える悪影響を想定しながら、アフリカツメガエルの生物環について調べてきた。これまでに得られた研究結果から、過重力・強磁場の両生類に対する影響は著しく、特に発生のごく初期は感受性の非常に高いポイントで、この時期

に印加された受精卵から発生した胚では、発生率は大きく後退、いろいろな奇形が出現し、そのような異常個体の遺伝子発現は抑えられていること、などが明らかになった。今後も、多くの情報を発信していきたいと考えている。

原著論文：

1. Kashiwagi, K., Fujiwara, Y., Sakao, S., Furuno, N., Yanagisawa, M., Hanada, H., Tanimoto, Y., Yamashita, M., Watanabe, M., Shinkai, T., Yoshitome, S., Kubo, H., Sakai, M., Fujii, H., Naitoh, T., Suzuki, K. and Kashiwagi, A. (2010) Effect of strong static magnetic fields on the amphibian life cycle - morphological and molecular biological analyses of early development. Space Utiliz, Res. 26, 232-235.

国内発表：

1. 佐能正剛、柏木啓子、花田秀樹、古野伸明、松原加奈、柏木昭彦、杉原数美、北村繁幸、太田 茂。Estradiol and bisphenol A bioaccumulation and effect on development in clawed frogs (ツメガエルにおけるエストラジオールとビスフェノール A の生物蓄積、および発生に対する影響)。第 13 回環境ホルモン学会発表会 (2010 年 12 月、東京大学山上会館 東京)。

2. 柏木昭彦、柏木啓子、坂尾智美、古野伸明、藤原好恒、谷本能文、山下雅道、渡部稔、新海正、吉留賢、久保英夫、坂井雅夫、藤井博匡、柳澤誠、花田秀樹、内藤富夫。両生類の生活環に対する強磁場の影響—初期発生の形態学のおよび分子生物学的解析— 第 26 回宇宙利用シンポジウム (2010 年 1 月、相模原市神奈川)。

プロジェクト研究②

(1) 古野伸明、(2) 吉留賢 (3) 植木龍也、(3) 道端齊、(4) 渡部稔、(1) 柏木啓子、(5) 花田秀樹、(6) 新海正、(7) 久保英夫、(8) 坂井雅夫、(9) 藤井博匡、(10) 山下雅道、(11) 柏木昭彦、(12) 谷本能文、(13) 藤原好恒、(14) 関口猛、(16) 小林英紀、(13) 山本卓、(18) 鈴木賢一

- (1) 広島大学大学院理学研究科附属両生類研究施設分化制御機構部門
- (2) 鳥取大学医学部生命科学科医化学講座
- (3) 広島大学大学院理学研究科生物科学専攻情報生理学講座
- (4) 徳島大学大学院ソシオ・アーツ・アンド・サイエンス研究部
- (5) 広島大学大学院理学研究科附属両生類研究施設発生遺伝学部門
- (6) 東京都健康長寿医療センター研究所
- (7) 東京都医学総合研究所がん治療研究室
- (8) 鹿児島大学理学部・鹿児島大学院理工学研究科生命科学科
- (9) 札幌医科大学・医療人育成センター
- (10) ISAS/JAXA
- (11) 山陽女子短期大学臨床検査学科
- (12) 大阪大谷大学薬学部
- (13) 広島大学大学院理学研究科数理分子理学専攻生命理学
- (14) 九州大学医学研究院生命科学研究科細胞工学講座
- (15) 岡山大学教育開発センター教育システム部門
- (16) 愛媛大学沿岸環境科学研究センター

研究内容

[1] 両生類の生活環に対する過重力の影響

The effect of the hypergravity on the life cycle of amphibians

将来、人類が宇宙へ進出して行くためには地球とは異なった重力環境下でヒトを含めた動植物が正常で健康な子孫を作れるかどうかを知る事が重要であり、もし、正常な子孫が作れないようなら、どのようにすれば異なった重力環境で正常に生活環が回るかどうか調べる事が重要である。我々は、両生類をモデル生物として過重力が成長や内分泌系にどのような影響を与えるかを調べ、その改善方法を探っている。

[目的と成果]

両生類をモデル生物として、生活環の重要な時期（初期発生や減数分裂など）に焦点を絞って過重力の影響を調べたり、長期にわたる過重力暴露におけるホルモン分泌を含む生理的影響を追跡する。また、過重力で生じた異常を正常に

戻す手段を探索する。それらの実験を通じて、地上とは異なった重力環境下でヒトを含めた動植物の世代交代が可能かどうかを調べることを目標とする。その結果、過重力に感受性が高い時期は、受精後から卵割が始まるまでである事が判明した。また、卵減数分裂に影響を与える事がわかった。また、長期に渡る過重力曝露によって、甲状腺ホルモンによって支配されている変態が遅れる事がわかり、内分泌系にも影響を与える事が明らかになった。

[2] 両生類の生活環に対する強磁場の影響

The effect of strong static magnetic field (SMF) on the life cycle of amphibians

現在、携帯電話や高圧送電線、家電製品などから磁場にさらされる機会が多くなってきた。それにもかかわらず、脊椎動物の発生および遺伝子発現に対する強磁場の影響に関する研究は少ない。両生類を用いて、その生活環に対する影響を調べる。

[目的と成果]

カエル胚は、体外受精を行うので胚の観察が容易で、発生も早いことから、磁場の影響を調べるには有用と考えられる。アフリカツメガエルやニシツメガエルを用いて、卵減数分裂から変態までの磁場の影響を調べた。その結果、卵成熟過程において卵の色素の分布に影響を与える事や、初期発生にさまざまな影響を与える事が明らかになった。

[3] ZNF による甲状腺ホルモン受容体 b 遺伝子の破壊

Targeted mutagenesis of thyroid hormone receptor beta gene by ZNF in amphibian embryo

ノックアウトによる特定の遺伝子破壊は、その遺伝子の機能を探る上で非常に有効な手段である。この技術は、マウスでは ES 細胞を用いて確立されてポピュラーにつかわれるようになっているが、それ以外の動物では ES 細胞が確立されていない事で不可能である。しかしながら、最近、ZNF (Zinc finger nuclease) を使用すると、特定の配列に突然変異が入れられる事がわかり、コオロギやラットなどで応用されて来た。この技術をカエルで確立する事は、カエルの実験動物として有用性を飛躍的に高める。

[目的と成果]

カエルで ZNF が応用可能かどうか実験を行った。選んだ遺伝子は甲状腺ホルモン受容体 b 遺伝子である。この結果、TRb の遺伝子に変異を入れられる事がわかった。この変異を入ったカエルを育て、子孫をとったり、他の遺伝子を ZNF で破壊したい。

[4] 化学物質による両生類内分泌機構のかく乱

Disturbance of the endocrine system by chemical substances in amphibians

重大な地球環境問題の1つは世界中にばら撒かれた人工化学物質の存在である。それら中には、生体の内分泌系をかく乱し、悪性腫瘍を引き起こす可能性のあるものも含まれていると指摘されている。人工化学物質のどのような物が内分泌かく乱活性を持つのか調べる事は重要である。

[目的と成果]

多くの化学物質は甲状腺ホルモン機能を阻害する。甲状腺ホルモンは、ヒトを含むすべての脊椎動物において成長や発生、生体内部環境の恒常性維持、代謝などで重要な役割を果たしている。典型的な甲状腺ホルモン依存性発生過程である両生類オタマジャクシの変態は、化学物質の影響を受けやすいため、かく乱作用をもつと疑われる環境汚染物質の個体レベルでのスクリーニングに役立てることができる。甲状腺ホルモン受容体遺伝子を導入したトランスジェニックアフリカツメガエルを用いるなどして、さまざまな化学物質について形態学、生化学および分子細胞学レベルでの反応態様を解析したり、生殖機能に対する影響についても調べる。その結果、多くの人工化学物質について、甲状腺ホルモンにたいして、アゴニスト、アンタゴニスト活性がある事が明らかになった

[5] 卵成熟および初期発生におけるサイクリン B2 の 2 極紡錘体形成における機能

The role of the cyclin B2 in the bipolar spindle formation during oocyte maturation and early embryogenesis

MPF はサイクリン B と Cdc2 の複合体であり、M 期を引き起こす普遍的な因子である。MPF が活性化すると核膜崩壊、染色体凝縮、紡錘体の形成が起こり、M 期が開始する。サイクリン B は MPF の調節サブユニットであり、多くの種でサブタイプが複数存在し、また、それぞれのサブタイプの細胞内局在も違っている。しかしながらその機能に違いがあるかどうか報告はほとんどない。この研究ではサイクリン B1 と B2 の機能の違いについて研究している。

[目的と成果]

ツメガエルの卵母細胞や胚ではサイクリン B1 とサイクリン B2 が主に発現しており、機能差を解析する良い系である。今までに、この系を用いて、サイクリン B1 でなくサイクリン B2 が正常な紡錘体の形成に関与することを明らかにした。この系を用いてサイクリン B のサブタイプの機能を解析する事を目標とする。その結果、サイクリン B2 の N 末端から約 90 アミノ酸から 120 アミノ酸までに 2 極の紡錘体を形成するのに働く領域があることがわかった。

[6] Nramp ファミリーの新規バナジウム／プロトン共役輸送体
A novel vanadium/proton antiporter of a Nramp family

海産動物のホヤは体内に高濃度のバナジウムをもっている。これは、海中のバナジウムから濃縮されたもので、ホヤはバナジウムを高濃度に濃縮する機構を持っている。その機構を研究している。

[目的と成果]

Nramp/DCT ファミリーは、二価金属イオンの輸送に関わる膜輸送体である。我々はバナジウムを高度に濃縮する海産動物ホヤ類の血球から Nramp ファミリーの新規膜輸送体遺伝子を同定した。この遺伝子 AsNramp はヒトの Nramp1 および 2 と、アミノ酸レベルで約 60%の相同性があった。アフリカツメガエルの卵母細胞による発現系を用いて金属輸送活性を検証したところ、プロトンとの共役輸送によって四価バナジウムを取り込む共役輸送体であることがわかった。さらに、四価バナジウムの輸送は Na による阻害を受けること、AsNramp は血球の液胞膜画分に局在することも明らかになった。

[7] mTOR 情報伝達系の解析

Analysis of the mTOR signal transduction

炎症は、生体の損傷に対する組織の反応であり、その反応の一部には mTOR (mammalian target of rapamycin の略。ほ乳類などの動物の細胞内シグナル伝達に関与するタンパク質キナーゼ。最初に rapamycin の標的タンパク質として見つかったのでこの名前がついた) 情報伝達系が関与している。この情報伝達系の研究を進めている。

[目的と成果]

炎症に関与する mTOR 情報伝達系に関与するタンパク質や、その相互作用を調べる事でこの情報伝達系の全貌を解明しようとしている。その結果、mTOR 伝達系に Ego1, Ego3 と Gtr1, Gtr2 のタンパク質が関与していることがわかった。

研究業績

原著論文

1. Furuno, N., Futsuki, D., Kawasaki, T., Shiraga, M., Tanimoto, Y., Kashiwagi, K., Yamashita, M., Suzuki, K. and Kashiwagi, A (2010) Effect of strong static magnetic fields on the amphibian life cycle—Effect on oocyte maturation of *Silurana tropicalis*—. Space Utiliz. Res., 26, 228–231

2. Keiko Kashiwagi, Yoshihisa Fujiwara, Satomi Sakao, Nobuaki Furuno, Makoto Yanagisawa, Hideki Hanada, Yoshifumi Tanimoto, Masamichi Yamashita,

Minoru Watanabe, Tadashi Shinkai, Satoshi Yoshitome, Hideki Kubo, Masao Sakai, Fujii, Tomio Naitoh, Ken-ichi Suzuki, Akihiko Kashiwagi. (2010) Effect of strong static magnetic fields on amphibian life cycle-morphological and molecular biological analyses of early development-. Spce Utiliz. Res. 26, 232-235

3. Tatsuya Ueki, Nobuaki Furuno, Hitoshi Michibata. (2011) A novel vanadium transporter of the Nramp family expressed at the vacuole of vanadium-accumulating cells of the ascidian *Ascidia sydneiensis samea*. BBA - General Subjects 1810, 457-464

4. Yanagisawa, M., Furuno, N. *, Watanabe, M., Kashiwagi, K., Hanada, H., Shinkai, T., Yoshitome, S., Kubo, H., Sakai, M., Fujii, H., Suzuki, K., Yamashi, M. and Kashiwagi, A. (2011) Molecular analysys of the head-defects in the *Xenopus* embyos rased hyper gravity condition. II Space Utili. Res. 27, 198-200 (* Corresponding author)

学会発表

1. 古野伸明、夫津木大輔、川崎大志、白神聖也、谷本能文、柏木啓子、山下雅道、柏木昭彦 両生類の生活環に対する強磁場の影響-卵成熟に対する影響— 第26回宇宙利用シンポジウム 2010年1月26日 相模原市 神奈川

2. 柏木昭彦、柏木啓子、坂尾智美、古野伸明、藤原好恒、谷本能文、山下雅道、渡部稔、新海正、吉留賢、久保英夫、坂井雅夫、藤井博匡、柳澤誠、花田秀樹、内藤富夫 両生類の生活環に対する強磁場の影響—初期発生の形態学のおよび分子生物学的解析— 第26回宇宙利用シンポジウム 2010年1月26日 相模原市 神奈川

3. 関口猛、舟越稔、古野伸明、小林英紀 ヘテロ2量体Gタンパク質のGtr1、Gtr2は単独で相互作用タンパク質Ego3、Ego1に結合する。日本遺伝学会 第82回大会、札幌市 北海道大学 2010年 9月

4. 関口猛、舟越稔、古野伸明、小林英紀 Torシグナル伝達系のヘテロ2量体Gtr1-Gtr2のGtr1とGtr2の働きの違いの解析 日本分子生物学会、第33回大会、神戸市 ポートアイランドホテル 2010年12月

5. 佐能正剛、柏木啓子、花田秀樹、古野伸明、松原加奈、柏木昭彦、杉原数美。北村繁幸、太田茂 ツメガエルにおけるエストラジオールとビスフェノールAの生物蓄積、および発生に対する影響 第13回環境ホルモン学会 東京大学、東京 2010年12月16日

6. 柳澤誠、古野伸明、渡部稔、柏木啓子、花田秀樹、新海正、吉留賢、久保英夫、坂井雅夫、藤井博匡、鈴木賢一、山下雅道、柏木昭彦 過重力によって生じたアフリカツメガエル初期胚の頭部形成異常の解析 II 第27回宇宙利用シンポジウム 2011年 1月25日 相模原市 神奈川

科研費等の受け入れ状況

宇宙環境利用科学委員会研究班ワーキンググループ（2010）両生類の生活環境に対する過重力の影響、10万円、研究分但者

プロジェクト研究③

三浦郁夫、土井敏男¹⁾、湯浅義明²⁾、藤谷武史³⁾、伊藤邦夫⁴⁾

- (1) 神戸市環境局
- (2) 姫路水族館
- (3) 東山動物園
- (4) 川崎医科大学附属高等学校

1) ナゴヤダルマガエルの遺伝的地域分化

Genetic differentiation of Japanese Daruma frog *Rana porosa brevipoda*

西日本に生息するナゴヤダルマガエルは生息数が減少しており、近年とくに保全が叫ばれているカエルのひとつである。本種は、古典的に名古屋集団と岡山集団の大きく2つに分けられ、鳴き声、外部形態が異なり、遺伝的な違いも指摘されている。本研究では、2つの集団の遺伝的分化の違い、分布の広まりと、特に境界集団の同定を行った。その結果、ミトコンドリア遺伝子の配列は両集団で明らかな違いがあり、その境界は兵庫県西端部付近であった。一方、核遺伝子のひとつ Sox3 の解析では、名古屋集団の遺伝子型が岡山集団の中央部まで到達していることがわかった。以上から、2つの集団の間を構成する、岡山東部から名古屋西部に掛けて分布する集団では、核と細胞質の由来がことなる雑種から構成されることが示唆された。

2) アカハライモリの秋交配の証明

Evidence for true fall-mating in Japanese newt *Cynops pyrrhogaster*

三浦郁夫、秋山繁治¹⁾、岩尾康宏²⁾

- (1) 岡山清心女子高等学校
- (2) 山口大学理学部

アカハライモリは一般に春から初夏に掛けて交配、産卵、繁殖することが知られている。しかし、一方で、秋にも雄の婚姻食や求愛が観察されることから、秋からの繁殖(交配)の開始が示唆されてきた。そこで本研究は、イモリの生殖腺と生殖器官における成熟の年周期変化を観察し、とくに、雌貯精嚢内への秋の精子の取り込みについて調べた。その結果、生殖腺と生殖器官は春に成熟して夏には退化的になり、秋から再び成熟が開始すること、秋にはいずれの雌の貯精嚢にも十分な精子がとりこまれていること、そして、その秋精子は春の精子と共に、春から初夏にかけての産卵に使用されていることを明らかにした。よって、アカハライモリの繁殖(交配)は秋(10月)から開始し、冬眠の冬を挟んで初夏まで至る。従来考えられていた期間より6ヶ月早く開始すると結論した。

原著論文

1. Sekiya K, Ohtani H, Ogata, M, and Miura I (2010) Phyletic diversity in the frog *Rana rugosa* (Anura: Ranidae) with special reference to a unique

morphotype found from Sado Island, Japan. Current Herpetology 29(2): 69-78.

2. 尾形光昭、三浦郁夫 (2011) ツチカガエルの日本国内における生息場所について 爬虫両棲類学報 2011(1): 24-25.

学会発表

1. 秋山繁治、小泉雄紀、三浦郁夫 アカハライモリの秋から春をまたぐ多重交配について - 両季節の精子が受精に利用されている遺伝学的証拠 - 日本爬虫両生類学会第49回大会 10月9日-10日 横浜(神奈川県)

2. 長井悠佳里、土井敏男、湯浅義明、藤谷武史、伊藤邦夫、小泉雄紀、三浦郁夫 ナゴヤダルマガエルの遺伝的地域分化 - とくに岡山集団と名古屋集団が接する境界領域について - 日本爬虫両生類学会第49回大会 10月9日-10日 横浜(神奈川県)

3. 小泉雄紀、森淳、三浦郁夫 ニホンアカガエルの新規色彩変異 - 体色と眼は正常だがメスのもつ卵だけが白い - 日本爬虫両生類学会第49回大会 10月9日-10日 横浜(神奈川県)

4. 尾形光昭、関谷國男、三浦郁夫 佐渡島産ツチカガエルの外部形態について 日本爬虫両生類学会第49回大会 10月9日-10日 横浜(神奈川県)

5. 北本光、佐々木健、三浦郁夫 オタマジャクシの性を色で見分ける - 山口県産ツチカガエルの性に連鎖した色彩変異遺伝子の同定 - 日本爬虫両生類学会第49回大会 10月9日-10日 横浜(神奈川県)

6. 小泉雄紀、大谷浩己、三浦郁夫 XY型とZW型の遺伝子発現のちがい 染色体学会第61回年会 11月5日-7日 習志野(千葉県)

招待講演

1. 三浦郁夫 ツチカガエルの地域集団における生殖腺性差構築機構の解明 文部科学省：新学術領域研究「性差構築の分子基盤」 第2回領域会議・公開研究会 12月15日-17日 逗子(神奈川県)

2. 佐渡島で新種発見！ お腹まっ黄色のカエル 染色体学会公開シンポジウム「カエル・トカゲの生物学」 11月5日 2010年 習志野(千葉県)

高大連携

1. 「ヒトがヒト/動物たる由縁」 岡山清心女子高校 SSH 課題研究「生命科学基礎」 講義 2月1日(月) 倉敷市

2. 「遺伝子と生物学研究 -何を調べ、どう使うか-」 広島国泰寺高校 クラ
ブアシスタンス 12月19日(日) 広島市

プロジェクト研究④

I. 両生類における編集 ZFN による甲状腺ホルモン受容体 (TRb) 遺伝子の標的突然変異誘発

Targeted mutagenesis of thyroid hormone receptor beta gene by engineered zinc-finger nuclease in amphibian embryos

山本 卓 (広島大学)、古野伸明 (広島大学)、鈴木賢一 (愛媛大学)、落合 博 (広島大学)、柏木昭彦 (山陽女子短期大学)、坂本尚昭 (広島大学)、柏木啓子 (広島大学)

変態、再生いずれも両生類に見られる特異的現象であるが、それに関与する遺伝子を標的にして突然変異を誘発する手段はこれまでになかった。ところが近年になって、いろいろな生物種の標的遺伝子をノックアウトするのにジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) によるゲノム編集が利用されている。ZFN は、ジンクフィンガードメインと、II 型制限酵素である FokI 由来の DNA 切断ドメインから成る人工酵素であって、標的とする遺伝子シーケンスに二本鎖切断 (DSB) を導入するよう編集されている。ZFN により誘導された DSB が内因性の DNA 修復機構によって修復される際に挿入や欠失ができ、ヌル接合体や、正常なものより機能の劣る突然変異遺伝子 (hypomorphic alleles) を生じる。Ochiai ら (2010) は、大腸菌の one-hybrid スクリーニングと培養細胞を用いた SSA アッセイとを組み合わせることで 3 個のジンクフィンガーをもつ機能的な ZFN を選別するシステムを開発している。私たちの最近の研究で、甲状腺ホルモン受容体 (TRb) 遺伝子を標的とする ZFN を利用することによって破壊された対立遺伝子をもつ個体をつくりだすことが可能になった。私たちは、ZFN 誘発 TRb 遺伝子変異をコードする mRNA をニシツメガエルの受精卵に顕微注入した。その卵から発生した胚のヌクレアーゼ標的領域をシーケンスしたところ、挿入や欠失が認められた。この変異が生殖細胞系列を通して次世代にも伝えられるか否かを確かめるため、現在、ホモ接合の突然変異体 (TRb^{-/-}) を含む F1 作出を試みている。

II. アフリカツメガエルの発生における I 型ケラチンの新規遺伝子の特徴 Characterization of a novel type I keratin gene in *Xenopus laevis* during ontogenesis

鈴木賢一 (愛媛大学)、柏木昭彦 (山陽女子短期大学)、柏木啓子 (広島大学)

ケラチンは脊椎動物の上皮性細胞骨格繊維である中間系フィラメントの構成タンパク質で、生化学的性質の違いにより I 型と II 型に区別される。ヒトゲノムの場合、I 型遺伝子は 17 番染色体、II 型遺伝子は 12 番染色体に存在しクラ

スターを形成している。ニシツメガエルでも I 型および II 型ケラチン遺伝子がゲノム上にクラスターをなす。アフリカツメガエルのケラチン遺伝子は自然変態中に幼生型から成体型へと変化すること、遺伝子の中には尾部再生中に誘起されるも、肢芽では不活性化されるものがあること、などが私たちの研究等で明らかになっている。しかし、その制御機構についてはよくわかっていない。

ごく最近、私たちは、アフリカツメガエル尾部の再生中に傷つけた上皮細胞で誘導される I 型ケラチンの新規遺伝子 (Tazaki ら, 2005 ; クローン名 : XL073g19) に関する研究結果を公表した。まず、4.2-kb 上流域と連結させた EGFP レポーター遺伝子を持つトランスジェニック創始アフリカツメガエルを作製し、次いで F1 の胚およびオタマジャクシを用いて生体内における遺伝子の転写調節を調べた。この遺伝子の転写産物は胚発生中の鰭や外鰓に限定されるため、便宜上、鰭鰓ケラチン (FGK) 遺伝子と名づけた。自然変態の St. 40 オタマジャクシでは、EGFP 遺伝子発現は尾鰭、嗅上皮、外鰓、鰓弓で観察された。外鰓縮小後には強い EGFP 蛍光が St. 44 オタマジャクシの鰓弓で見られるようになった。しかし、レポーター発現は変態開始時の鰓吸収に伴って急速に消えていった。次に、甲状腺ホルモン (TH) によって変態を誘起された変態前期の F1 オタマジャクシにおける EGFP 発現変化について調べ、生体内での FGK プロモーター/エンハンサー活性の TH に対する反応性を明らかにした。TH 暴露後 5 日目に強烈な EGFP 蛍光が無処理対照群の内鰓で見られたが、一方、処理群では急速に弱まった。EGFP はよく発達した鰓弁にも強く発現したが、TH 誘導中に完全に消えてしまった。これに対して、レポーター発現は TH 投与によって発達中の前後肢でアップレギュレートしていた。

上述の如く、トランスジェニックガエル系統は鰓などいろいろな器官の形成、発生、吸収を客観的に明らかにするための有用な研究材料となりうる。

III. 両生類を用いた生活環に対する過重力および強磁場の影響に関する研究 Effects of hypergravity environments and strong static magnetic fields on amphibian life cycle

柏木昭彦 (山陽女子短期大学)、古野伸明 (広島大学)、花田秀樹 (広島大学)、坂井雅夫 (鹿児島大学)、渡部 稔 (徳島大学)、吉留 賢 (鳥取大学)、藤井博匡 (札幌医科大学)、新海 正 (東京都老人総合研究所)、久保英夫 (東京都臨床医学総合研究所)、藤原好恒 (広島大学)、谷本能文 (大阪大谷大学)、山下雅道 (宇宙航空研究開発機構)、柏木啓子 (広島大学)

地球とは異なる重力および磁場環境下に長期間留まったとき、ヒトを含め各生物種は果たして健康な生活を営むことができるであろうか、子孫はどうなるのか、などといった質問に対する正解はない。両生類は、重力変化に関する地上および宇宙実験によく用いられてきたため、かなりのデータが蓄積されている。一方、両生類には磁気受容能力があるとの報告もあるが、磁場影響に関する

る研究は少ない。私たち宇宙環境利用委員会研究チームのテーマである「両生類の生活環に対する過重力および強磁場の影響」は、平成16年度から今年度に至るまでJAXAで採択されている。主として、アフリカツメガエルを実験材料として用い、その生活環に対し過重力や強磁場がいかなる影響を与えるかについて研究を続けている。初期発生、特に受精直後の卵の感受性は著しく高く、この時期に過重力や強磁場を印加した場合、いろいろな奇形が出現し、頭部マーカ―やセメント腺マーカ―の遺伝子の発現が低下することなどが分かった。過重力や強磁場に対する感受性の高い時期の同定や発生・性分化への影響を簡潔かつ迅速に調べるため遺伝子レベルでの解析方法の開発も予定している。

研究業績

原著論文

1. Kashiwagi, K., Fujiwara, Y., Sakao, S., Furuno, N., Yanagisawa, M., Hanada, H., Tanimoto, Y., Yamashita, M., Watanabe, M., Shinkai, T., Yoshitome, S., Kubo, H., Sakai, M., Fujii, H., Naitoh, T., Suzuki, K. and Kashiwagi, A. (2010) Effect of strong static magnetic fields on the amphibian life cycle - morphological and molecular biological analyses of early development. *Space Utiliz. Res.* 26, 232-235.
2. Kashiwagi, K., Kashiwagi, A., Kurabayashi, A., Hanada, H., Nakajima, K., Okada, M., Takase, M. and Yaoita, Y. (2010) *Xenopus tropicalis*: An ideal experimental animal in amphibia. *Exp. Anim.* 59(4), 395-405.
3. Suzuki, K., Kashiwagi, K., Ujihara, M., Marukane, T., Tazaki, A., Watanabe, K., Mizuno, N., Ueda, Y., Kondoh, H., Kashiwagi, A. and Mochii, M. (2010) Characterization of a novel type I keratin gene and generation of transgenic lines with fluorescent reporter genes driven by its promoter/enhancer in *Xenopus laevis*. *Dev. Dyn.* 239, 3172-3181.
4. Furuno, N., Futsuki, D., Kawasaki, T., Shiraga, M., Tanimoto, Y., Kashiwagi, K., Suzuki, K., Yamashita, M. and Kashiwagi, A. (2010) Effect of strong static magnetic fields on the amphibian life cycle - Effect on oocyte maturation of *Silurana tropicalis*. *Space Utiliz. Res.* 26, 228-231.
5. Yanagisawa, M., Furuno, N., Watanabe, M., Kashiwagi, K., Hanada, H., Shinkai, T., Yoshitome, S., Kubo, H., Sakai, M., Fujii, H., Suzuki, K., Yamashita, M. and Kashiwagi, A. (2011) Molecular analysis of the head-defects in the *Xenopus* embryos raised under hypergravity conditions. II. *Space Utiliz. Res.* 27, 198-200.

総説・著書

なし

学会発表（国内）

1. 佐能正剛、柏木啓子、花田秀樹、古野伸明、松原加奈、柏木昭彦、杉原数美、北村繁幸、太田 茂. Estradiol and bisphenol A bioaccumulation and effect on development in clawed frogs (ツメガエルにおけるエストラジオールとビスフェノール A の生物蓄積、および発生に対する影響)。第 13 回環境ホルモン学会発表会（2010 年 12 月、東京大学山上会館 東京）
2. 柏木昭彦、柏木啓子、坂尾智美、古野伸明、藤原好恒、谷本能文、山下雅道、渡部稔、新海正、吉留賢、久保英夫、坂井雅夫、藤井博匡、柳澤誠、花田秀樹、内藤富夫. 両生類の生活環に対する強磁場の影響—初期発生の形態学および分子生物学的解析—第 26 回宇宙利用シンポジウム 2010 年 1 月 26 日 相模原市 神奈川
3. 古野伸明、夫津木大輔、川崎大志、白神聖也、谷本能文、柏木啓子、山下雅道、柏木昭彦. 両生類の生活環に対する強磁場の影響—卵成熟に対する影響—第 26 回宇宙利用シンポジウム 2010 年 1 月 26 日 相模原市 神奈川
4. 柳澤誠、古野伸明、渡部稔、柏木啓子、花田秀樹、新海正、吉留賢、久保英夫、坂井雅夫、藤井博匡、鈴木賢一、山下雅道、柏木昭彦. 過重力によって生じたアフリカツメガエル初期胚の頭部形成異常の解析 II 第 27 回宇宙利用シンポジウム 2011 年 1 月 25 日 相模原市 神奈川

科研費等の受け入れ状況

宇宙環境利用科学委員会研究班ワーキンググループ 2010 年 100 千円(分担)

その他

北九州市板櫃川後肢欠損ガエル調査検討委員会委員

第一回開会（2010 年 8 月 3 日 北九州市役所）セミナー

「北九州市板櫃川における後肢欠損ツチガエルについて考える」

プロジェクト研究⑤：先端的両生類研究の展開ー

両生類絶滅危惧種の効率的保存と遺伝的多様性の解明

¹⁾ 住田正幸, ¹⁾ 倉林敦, ¹⁾ 井川武, ¹⁾ Islam M. Mafizul, ¹⁾ Alam M. Shafiqul, ²⁾ 倉本満, ³⁾ 大海昌平, ⁴⁾ 勝連盛輝, ⁵⁾ 海野徹也, ⁶⁾ 浮穴和義, ⁷⁾ 藤井保, ⁸⁾ 井鷲裕司

¹⁾ 広島大学大学院理学研究科附属両生類研究施設

²⁾ 宗像市ひかりが丘 3-6-15

³⁾ 奄美市農林課

⁴⁾ 沖縄県環境衛生研究所

⁵⁾ 広島大学大学院生物圏科学研究科

⁶⁾ 広島大学大学院総合科学研究科

⁷⁾ 広島県立大学人間文化学部

⁸⁾ 京都大学大学院農学研究科

1. 絶滅危惧種イシカワガエル人工繁殖法の確立

Establishment of stable artificial breeding method for an endangered frog species *Odorrana ishikawae*

[目的]

近年国内において乱獲や自然破壊のため野外から激減が報告されており、環境省レッドリストで絶滅危惧 IB 類、かつ、沖縄県と鹿児島県では天然記念物に指定されている「イシカワガエル」について、重点的に効率的保全を試みる。これを達成するために、本研究施設の設備と 40 年以上に渡り蓄積されたノウハウを駆使することによって、実験室での効率的な人工繁殖・飼育維持方法の確立に取り組む。なお本種については、すでに予備実験によって人工繁殖に成功しているため、経代飼育法の確立を重点的に行う。

[材料・方法]

奄美大島と沖縄島からイシカワガエルの成体の雌雄を採集（許可取得済）し、これらを用いて、人工受精法による人工交配系を確立する。排卵はウシガエルの脳下垂体懸濁液を腹腔内に注射することによって誘導する。排卵した雌から、卵をスライドグラス上に絞り出す。絞り出した卵に雄から摘出した精巢の懸濁液を速やかにかき、媒精する。媒精の 20 分後、飼育水に移し、18°C で管理する。孵化後、徐々に温度を 22°C まで上げ、1 ヶ月目以降は温室の水槽に移し、変態期まで室温で飼育した。餌には茹でたホウレン草を与えた。変態後は 25°C の飼育室に移し、コオロギを餌に飼育した。

[結果]

イシカワガエルについては、上記の方法によって、人工繁殖・飼育維持法を確立することができた。さらに、実験室での完全飼育下で自然繁殖により、2 代

目を得ることに成功した。幼生の生活力は全体的に強くない。特に 60 日幼生から変態期にかけての死亡率が高かった。夏場の高水温期に感染症が発生しやすいので、この時期にできるだけ低めの水温、きれいな水質を保つことが重要である。変態直後に死亡率が特に高い。死亡した個体の多くは、変態が長引いて尾が完全に消失していないものや、痩せたものだった。この時期には、飼育容器を流れる水道水に含まれるカルキの影響が、考えられるため、飼育水には特に細心の注意を払う必要がある。

[考察と将来の展望]

本研究で得られた人工繁殖や自然繁殖および幼生の飼育に関する知見は、既に飼育下にあるイシカワガエルの維持増殖に有用だけでなく、野外のイシカワガエルの保全にも応用が期待できる。自力での将来的には、存続が困難なほどの個体数の減少や生息環境の悪化が起こった地域集団の一時的な保護に応用できる。しかしこの場合、事前にその集団の遺伝的多様性の評価や、人工繁殖個体の放逐による周辺の生態系への影響などについても検討が不可欠である。

2. 絶滅危惧種イシカワガエルの島嶼間の形態的分化・遺伝的分化・交配隔離の有無の解明と新種記載

Morphological and genetic divergences and reproductive isolation among inter-island populations of an endangered frog species *Odorrana ishikawae* with description of a novel species

[目的]

イシカワカエル (*Odorrana ishikawae*) は、奄美大島集団と沖縄島集団間で、形態・産卵生態・核型などに若干の分化があることが知られていた。両島嶼集団間の分類学的ステータスを明確にすることを目的として研究を行った。奄美大島内では、大型で他と区別される集団が存在することが知られていたため、この集団についても解析を行った。

[材料・方法]

本研究では、26 個体の奄美大島産個体（普通集団 14 個体、大型集団 12 個体）、20 個体の沖縄島産個体の計 46 個体のイシカワガエルの材料に用いた。研究は以下の方法で進めた。(1) 外部形態比較を行うために、31 カ所の部位を測定し、計測値を統計学的に処理した (Mann-Whitney U-test および主成分分析)。(2) 遺伝的分化を調べるために、ミトコンドリア 16SrRNA 遺伝子のおよそ 560 bp の部位を PCR 増幅・シーケンスし、得られた塩基配列に基づき系統解析を行った (ML と Bayes 法)。(3) 交配後隔離の有無と程度を調べるために、奄美大島産 13 個体 (大型個体 7、普通個体 6) と沖縄島産 6 個体を用いて、人工交配を行い、子孫の生活力 (生存率) を測定した。島間雑種と島内の F1 個体について、精子形成異常と減数分裂時の染色体について比較を行った。

[結果]

外部形態の比較から、奄美大島内の普通集団と大型集団は、大きさ以外にいく

つかの部位に差が見られるものの、全体としては非常に良く似たプロポーションを持っていた。一方で、奄美集団と沖縄集団間では、頭部の長さや体長の比など、8つの部位で相違が見られ、体型が異なっていることが分かった。主成分分析の結果は、奄美普通、奄美大型、沖縄の3つの全ての集団が明確に区別された。

16SrRNA 遺伝子に基づく解析では、奄美大型と奄美普通集団は、それぞれがクレードを作らず、系統学的には両集団は区別できなかった。一方で、奄美大島集団と沖縄島集団はそれぞれが明確なクレードを形成し、系統的に分かれたグループであることが明らかになった。

人工交配の結果、奄美普通と奄美大型集団間には明確な交配後隔離は見られなかった。しかし、奄美と沖縄集団では、沖縄♀×奄美♂の掛け合わせの子孫(F1)は、胞胚期～神経胚期に異常が生じ、1匹も孵化には至らず、明確な交配後隔離が見られた。奄美♀×沖縄♂の掛け合わせでは、F1の生存率はコントロールと違わなかった。しかし、この子孫の精巣では、異常な凝集精子核が多数観察された。さらに減数分裂時の染色体対合像においても、正常なリング構造ではなく、ロッド構造や未対合の染色体が散見され、奄美♀沖縄♂の組み合わせでも、ある程度の交配後隔離が存在することが示された。

[考察]

本研究の結果は、奄美大島内の普通集団と大型集団は、交配後隔離も無く、遺伝的にも区別できないことから、両者は同種であると考えられた。しかし、両者の外部形態には明瞭な違い(特に体長)があるため、大型集団は奄美集団のヴァリエーションの一つとして扱うことが妥当と考えられた。

奄美集団と沖縄集団間では、外部形態に明瞭な違いがあり、遺伝的にも区別でき(分化の程度はやや少ない)、さらに、明瞭な交配後隔離があることが示された。このことから、これまでにイシカワガエルとされていた奄美集団と沖縄集団は、それぞれ別種に相当することが妥当であると言える。さらに両者から、背面の斑紋のパターン、腹部の暗色模様の有無、中足の瘤の大きさ、頭部の形状など、区別が可能な表徴形質が見いだされた。イシカワガエル(*O. ishikawae*)の基準産地は沖縄であるので、奄美大島集団を別種とするのが妥当であった。

[成果]

今回の結果に基づき、奄美大島集団を、*Odorrana splendida* sp. nov. として新種記載した(Zootaxa 2767: 25-40)が、この成果は新聞(朝日新聞 2010年9月16日、2011年2月18日、朝日小学生新聞 2011年2月27日、奄美新聞 2010年9月16日、2011年2月20日、南海日々新聞 2011年2月20日)に掲載された。今回の研究から、琉球列島の両生類相には未解明の種多様性が残っており、現状以上の調査と、種多様性保全を行う上での単位の見直しが必須であることが明確になった。

[将来の展望]

この研究自体はよくまとまっており、完結した研究であるが、今後、イシカワガエルを研究する上では、沖縄島産と奄美大島産を別種として明確に区別する

必要がある。

3. 絶滅危惧種イシカワガエル・アマミイシカワガエルにおける新規マイクロサテライトマーカーの開発と景観遺伝学的手法による遺伝的多様性の解明

Development of new microsatellite markers and elucidation of genetic diversities based on landscape genetics of endangered frogs, *Odorrana ishikawae* and *O. splendida*.

[目的]

イシカワガエル（及び、アマミイシカワガエル）については、島間の分化はこれまでも知られてきたが、島内における遺伝的多様性については不明確なままであった。そこで、共優性かつ多型性に富んだ遺伝マーカーであるマイクロサテライトマーカーを開発し、これらを用いてイシカワガエル・アマミイシカワガエルにおける島内の遺伝的多様性を探索することを目的とした。

[材料・方法]

マイクロサテライトマーカーの開発については、イシカワガエル、アマミイシカワガエル各1個体を材料として、磁気ビーズハイブリダイゼーション法(Glenn and Schable 2005)と二重抑制PCR法(Lian and Hogetsu 2002)によって、マイクロサテライト領域を含むDNA断片を単離した。その後、これらに特異的なプライマーを設計した。両種の遺伝的多様性の解明については、イシカワガエル6集団33個体、アマミイシカワガエル18集団127個体、計160個体について、遺伝子型を決定し集団遺伝学的解析を行うとともに、景観遺伝学的手法により集団構造の説明要因を探索した。

[結果]

磁気ビーズ法及び、二重抑制PCR法によって単離されたマイクロサテライト領域を含む、542クローンから、両種において安定的に増幅され、かつ多型性が確認された12遺伝子座をマイクロサテライトマーカーとした。ハーディ・ワインベルグ平衡(HWE)及び、連鎖平衡について、統計テストを行ったところ、一部の遺伝子座でHWEからの逸脱と連鎖不平衡が確認された。

計160個体のイシカワガエルこれら12遺伝子座の遺伝子型STRUCTURE(Pritchard et al., 2000)を用いた集団構造解析の結果、イシカワガエルについては、階層的構造は見られなかったが、アマミイシカワガエルにおいては、5あるいは6個の遺伝的クラスターに分けられることが分かった。また、遺伝距離に基づく系統解析を行ったところ、アマミイシカワガエルの集団は地理的距離が単系統を形成した。さらに現在利用可能なほぼすべての地形データ（高度、植生、土壌、流量、土壌水分含有量）を用いて、生息適地モデルを構築し、これに基づくコスト距離と遺伝距離を比較した。その結果、高度と土壌に関する環境変数を当てはめた場合に遺伝距離と高い相関が見られた。

[考察]

イシカワガエルは遺伝的には単一の集団として見なせるのに対して、アマミイシカワガエルは階層的な集団構造を形成されていることが分かった。さらに、アマミイシカワガエルにおける集団構造は奄美大島の起伏に富んだ地形と、土壌の保水量に関連した生息適地の不連続性により、遺伝子流動が妨げられ、その結果、集団構造が形成されていると考えられた。一方で、イシカワガエルの現存集団は、沖縄島北部のヤンバルと呼ばれる原生林地帯に限られており、この地域は山脈が中央を貫く単純な地形である。このため遺伝子流動は制限されず、アマミイシカワガエルとは対照的に単一集団を形成していると考えられる。またイシカワガエルは、過去には山脈が分断された名護、本部といった地域にも生息していたことから、現在の集団構造は遺伝的多様性が一部喪失した状態であるとも考えられる。

[成果]

新規マイクロサテライトマーカー開発については、概ね中立的で集団解析・個体識別に適用できる有用なマーカーが作成できた。集団構造解析の結果、イシカワガエル・アマミイシカワガエルの島内の遺伝的多様性が明確になり、さらに、その形成要因についても明らかになった。

[将来の展望]

マイクロサテライトマーカーの一部は他の近縁種においても利用できる可能性がある。また、個体認識にも利用可能なことから、生態学的研究を行う上でも有用である。今回明らかになった集団構造とその形成要因については、周囲の生態系を含む包括的な保全活動を行う上での具体的な指針となり得る。

4. イシカワガエル青色突然変異体の組織学・遺伝学的研究

Histological and genetic studies on a “blue-colored” mutation of *Odorrana ishikawae*

[目的]

2010年3月、沖縄本島にて、通常は緑色の色彩を呈する皮膚部位が水色に置き換わった「青いイシカワガエル」を発見した（日本経済新聞他10国内紙2010年4月3日～6日報道）。青色の色彩変異個体は、他のカエルにおいても見つかっているが、本種についての色素細胞の研究は皆無である。本研究では、(1) イシカワガエル青色変異体は、どのような組織学的要因によって青色を呈するのか、(2) この色彩変異が遺伝形質であるか否かの2点を明らかにすることを目的とした。

[材料・方法]

イシカワガエル・青色の色彩変異個体（雄）、および通常の色調の野生個体の皮膚を材料に用いた。皮膚の細胞組織学的観察については、背面皮膚（およそ1cm²）を固定し、supper樹脂に包埋し、超薄切片と準超薄切片を作成した。前者を透過型電子顕微鏡で、後者を光学顕微鏡でそれぞれ観察した。遺伝学的研究としては、人工交配法を用いて、青色の色彩変異個体（雄）と、奄美大島産および

沖縄産の野生型雌それぞれ1個体と交配した。

[結果]

光学顕微鏡を用いて、皮膚の観察を行った結果、野生型イシカワガエルでは、両生類の基本色素パターンである、黄色素胞、虹色素胞、黒色素胞が層状に重なった真皮色素胞単位が見られた。一方で、青色変異型では、虹色素胞の上にあるはずの黄色素胞が観察できず、虹色素胞の直上に基底膜が存在していた。超薄切片を電子顕微鏡で観察したところ、野生型では、基底膜下に黄色、虹色、黒色の色素胞が存在し、それぞれの細胞の微細構造を確認することができた。青色変異型では、黄色素胞自体がなく、プテリノソームやカロテノイドの顆粒も見られなかったが、虹色素胞の反射小板、黒色素胞のメラノソームは野生型のものと同様の微細構造であった。

2対 (Amami Wild♀1×Okinawa Blue♂1、Okinawa Wild♀1×Okinawa Blue♂1) の人工交配を行い、1代目 (F1) を得た。成体の色彩は前肢が出る頃の幼生の時期から現れはじめるため、変態の段階で色彩の判別を行った。その結果、F1 全ての表現型が野生型と同様の色調を呈した。

[考察]

人工交配の結果から、青色突然変異は、遺伝的な要因であるとすれば優性形質ではなく、劣性形質であると推定された。また、青色変異個体の皮膚のごく一部に緑色の領域があるようにも見えた。この場合、青色という表現系は、一個体内でモザイク上に現れる環境要因に因る表現型である可能性がある。

[成果]

光学顕微鏡・電子顕微鏡の観察から、イシカワガエル青色突然変異体は、通常、真皮色素胞単位の最も皮膚側に存在する黄色素胞が欠損しており、これが原因で、虹色素胞の色だけが表現され結果、通常は緑の皮膚が青く見えることが明らかとなった。

[将来の展望]

青色突然変異が遺伝的要因に因るものか、さらに、いくつの遺伝子が関与しているかを明らかにするために、今回得られた F1 個体の性成熟を待ち、F2 を得る必要がある。例えば、F2 に青色個体と野生個体が 3 : 1 の割合で現れれば、青色突然変異が 1 遺伝子座に支配される劣勢形質であることが証明できる。

5. 絶滅危惧種イシカワガエルの皮膚に存在する抗菌ペプチドの最小発育阻止濃度決定

Minimal inhibitory concentration of antimicrobial peptides in the skin of an endangered frog *Odorrana ishikawae*

[目的]

日本で最も美しいといわれるイシカワガエル (*Odorrana ishikawae*) は、奄美大

島と沖縄本島の固有種である。近年個体数が減少しており、環境省レッドリストでは絶滅危惧IB類に分類されており、沖縄県と鹿児島県では天然記念物に指定されている。一方、本種は人工繁殖に成功しており、飼育室では感染症に対する抵抗性を示すことが分かっている。このことから絶滅危惧に瀕している原因の一つに、野生環境下での自然免疫システムの低下の可能性が考えられる。水辺という微生物の攻撃を受けやすい環境にいるカエルにとって、皮膚から分泌される抗菌ペプチドは重要な生体防御因子であり、自然免疫システムの要となっている。先行研究により、イシカワガエルの皮膚から生化学的手法により10種類の抗菌ペプチドが単離・同定されている。さらに、分子生物学的手法により12種類の分泌ペプチドが推定され、これらの中には既存の抗菌ペプチドファミリーとは全く異なる構造を持つ新奇なペプチドが含まれている。本研究では、これら22種類のペプチドのグラム陰性菌・グラム陽性菌・真菌に対する最小発育阻止濃度 (Minimal inhibitory concentration ; MIC) を測定し、有効菌種のレパートリーを示す抗菌スペクトルを評価することを目的とした。

[材料・方法]

最小発育阻止濃度測定は、96穴プレートの各ウェルに培地49レー、接種菌液50種菌、ペプチド1ペプ(2倍希釈系列で7段階の濃度)を加え100濃度とし、37℃で1晩静置培養した。培養後、マイクロプレートリーダーで吸光度の測定を行うとともに、ウェルに白濁や沈殿がないかを目視することにより、効果を判定した。評価菌種は、グラム陰性菌の大腸菌(*E. coli*)、グラム陽性菌の黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)・メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)・枯草菌(*B. subtilis*)、真菌のカンジダ菌(*C. albicans*)の計5種類を用いた。

[結果と考察]

全体的な傾向として、細菌の *E. coli* や *S. aureus* には強い抗菌活性を示すペプチドが多く確認されたが、真菌の *C. albicans* に対する抗菌活性は弱かった。これらのペプチドの中にはMRSAに対して強い抗菌活性を示すものもあった。また、皮膚から単離・同定されたペプチドは抗菌活性が強く、抗菌作用の有効菌種が多いことから広域の抗菌スペクトルを持つと考えられる。これに対して、遺伝子解析から推定された既存の抗菌ペプチドファミリーとは全く異なる構造を持つ新奇なペプチドには抗菌活性は認められなかったが、今回使用しなかった菌種に対し抗菌活性を持つ可能性も考えられる。以上の研究により、イシカワガエルは多種多様の抗菌ペプチドを備えており、人工繁殖された本種では抗菌ペプチドによる自然免疫システムは正常に働いていると考えられる。今後は野生環境下のイシカワガエルや他の *Odorrana* 属・*Rana* 属のカエルの遺伝子発現レベルや抗菌活性と水質悪化や環境ホルモンなどとの関係を解析することで、野生環境におけるイシカワガエルの絶滅危惧の要因を解明していきたいと考えている。

6. 絶滅危惧種イボイモリ飼育下繁殖と生殖行動の観察の試み

Attempt on captive breeding and observation of breeding behavior in an

endangered newt, *Echinotriton andersoni*

[目的]

イボイモリは南西諸島（奄美大島、請島、徳之島、沖縄島、瀬底島、渡嘉敷島）の固有種であり、イモリ科の中でも特に原始的な形態を残すことから、「生きている化石」と呼ばれる特徴的な種である。しかしながら、他の南西諸島固有種と同様に生息域の縮小により、IUCN レッドリストにおける絶滅危惧 II 類にリストされており、さらに、鹿児島県および沖縄県の天然記念物に指定されている。本研究では、これらの種を保護するための方策の一つとして、飼育下繁殖を試みるとともに、本種の依存する生態系の解明を目指して生殖行動の観察を行った。

[材料・方法]

イボイモリの飼育水槽として、縦 900 mm・横 900 mm・高さ 500 mm のステンレス水槽を 2 台設置し、それぞれに野外から採集した徳之島産個体、沖縄島産個体を放した。室温は 25℃に設定し、水槽には生息環境を模した土壌を敷き詰め、産卵場所として水道水をかけ流しにした水場を設備した。さらに、それぞれの飼育水槽の直上にネットワークカメラと赤外線灯光器を設置し、パソコンにて終日録画を行った。

[結果]

飼育下個体における前年度末から今年度初頭（2010 年 2 月～6 月）にかけて、徳之島産 5 個体、沖縄産 1 個体のメスが飼育水槽内で産卵した。これまでに徳之島産 57 個体、沖縄産 4 個体に変態しており、生活力はおおよそ 25～50%であった。それ以前に産卵した沖縄産個体の幼生を含めると現在、66 個体の幼生の飼育に成功している。生殖行動観察については、2010 年 10 月～2011 年 3 月までに 6 ヶ月間のデータを蓄積している。また、2011 年 1 月下旬には、飼育に供する個体を徳之島にて採集中に、産卵を目撃し始終をビデオ撮影に成功した。

[考察]

昨年度末から今年度にかけて産卵した個体のうち、徳之島産メスは、飼育を開始した時期から考えて、野外にてすでに生殖行動（精包の受け渡し）を終えていたと考えられる。一方、沖縄産メスはすでに飼育開始から 1 年以上の期間が経過しており、飼育下環境において生殖行動を行い、産卵した可能性が高い。イボイモリの産卵期は通常 1～5 月であり、野外での繁殖時期とも一致することから、何らかの環境変化を感知し産卵に至ったと考えられる。また、産卵行動を詳細に観察したところ、野外にて発見される落ち葉の下などに隠れて卵を産み落とす行動が確認された。

[成果]

少数個体ではあるが飼育下繁殖に成功するとともに、受精卵から幼生までの飼育技術を確立した。この成果は、新聞（読売新聞 2010 年 9 月 25 日）で報道された。また、野外における産卵状況を裏付ける産卵行動を明らかにした。

[将来の展望]

引き続き飼育下繁殖を試みるとともに、蓄積した映像記録を分析し、生殖行動のみならず年間を通じたイボイモリの行動周期を解明していく。

7. 絶滅危惧種イボイモリの新規マイクロサテライトマーカーの開発

Development of new microsatellite markers of endangered newt,
Echinotriton andersoni

[目的]

生物種を絶滅に追い込む要因の一つは、集団サイズの減少とそれに伴う近交弱勢による悪循環である。したがって、生物種の効率的な保全対策を行う上で、種内の遺伝的多様性を維持する必要がある。近年、種内の遺伝的に異なる集団を Evolutionary Significant Unit (ESU: 進化的に重要な単位) とし、管理区分に適応する動きが高まっている。特に、移動能力が他の両生類に比べて低いイボイモリでは、島嶼内で複雑な遺伝的集団構造が存在することが考えられる。そこで、本研究では、イボイモリの島嶼内の遺伝的多様性の探索に用いるのに有効な遺伝マーカーの開発を目的として、マイクロサテライトマーカーの開発を試みた。

[材料・方法]

奄美産及び、沖縄島産イボイモリ各 1 個体を材料として、磁気ビーズハイブリダイゼーション法 (Glenn and Schable 2005) と二重抑制 PCR 法 (Lian and Hogetsu 2002) によって、マイクロサテライト領域を含む遺伝子座を単離し、それぞれに特異的なプライマーを設計した。その後、徳之島産、沖縄島産の複数個体において、遺伝型決定を試み多型性を検討した。

[結果]

上記 2 つの方法において、マイクロサテライト領域が含まれる遺伝子座を合計 57 単離し、このうち 24 についてプライマーを設計し、複数個体について遺伝子座決定し多型性を検証した。その結果、5 つの遺伝子座について多型性が確認され、アレル数は 3~6 で、予測ヘテロ接合度は 0~0.716 であった。

[考察]

2 種のマイクロサテライト遺伝子座の単離方法を比較したところ、イボイモリにおいては磁気ビーズを利用した方法がより効率が良い。ただし、これは生物種によるため引き続き検証する必要がある。また、島内でのアレル数とヘテロ接合度を徳之島産と沖縄島産で比較したところ、若干ではあるが沖縄島産 2 集団の方が、より大きな値を示した。これは沖縄島産の方が、有効集団サイズが大きい可能性があるのかもしれない。

[成果]

一部の集団では多型性のない遺伝子座もあるものの、集団間の解析に用いるの

に十分な多型性のあるマイクロサテライトマーカーが開発できた。

[将来の展望]

今回開発できたマイクロサテライトマーカーを用いて、イボイモリの集団構造を明らかにするとともに、さらに遺伝子座の数を増やすために、研究を継続する必要がある。

8. 絶滅危惧種オットンガエル・ホルストガエルの人工繁殖の試み

Attempt on an artificial breeding for endangered frog species *Babina subaspera* and *B. holsti*

[目的]

オットンガエル (*Babina subaspera*) とホルストガエル (*Babina holsti*) は、前足に5本の指を持つという無尾両生類としては特異な形態を持つことで広く知られている。両種は、それぞれ奄美大島（加計呂麻島含む）と沖縄島（渡嘉敷島含む）固有のカエルである。生息面積が少ないことに加え、昨今の環境破壊による個体数減少から、IUCN レッドリストにおいて、絶滅危惧種 B1 類にリストされ、さらに、鹿児島県および沖縄県の天然記念物に指定されている。本研究では、これらの種を絶滅から防ぐ一つの方法として、人工繁殖法の確立を目指して研究を行った。

[材料・方法]

オットンガエル2個体（♂3、♀3）、ホルストガエル4個体（♂2、♀2）を人工交配に用いた。人工交配法は、イシカワガエルの場合に準拠した。ただし、オットンガエルとホルストガエルの場合、脳下垂体懸濁液を腹腔内に注射してから採卵まで25℃で、それぞれ29～30時間と20～21時間が適切であった。

[結果]

オットンガエル3ペアとホルストガエル2ペアをそれぞれ交配させ、正常卵割胚をそれぞれ1113個、853個ずつ得た。その後飼育を続けたところ、47%、44%が変態まで進み、2ヶ月幼体での生存率は、それぞれ47%と29%であった。

[考察]

両種ともに、孵化までには6～8日、変態までには64～127日を要した。ホルストガエルでは、変態後に生存率が下がったが、これは細菌の感染が原因であると考えられ、熱湯消毒や抗生剤で死亡数を抑えることができた。

[成果]

オットンガエル・ホルストガエル共に、人工繁殖によって子孫第1世代を得ることに成功した。現在、オットンガエルとホルストガエル、それぞれおよそ500個体、200個体を飼育中である。

[将来の展望]

今年度において、オットンガエル・ホルストガエル共に人工繁殖法によって、

子孫を得ることに成功した。しかし、人工繁殖個体から子孫第二世代を得るまでは実験室内飼育方法が確立したとは言えないので、今後も飼育を続け、性成熟に達した後、再び交配実験を行う予定である。また、沖縄島と奄美大島は、更新世（およそ 100 万年前）までは 1 つの島を形成しており、オットンガエルとホルストガエルは、両島の地理的分断によって系統的に分岐し、それぞれの島で生き残った近縁な遺存種であると考えられている。似たような例に、同じく両島固有のイシカワガエルがあるが、最近になり沖縄島と奄美大島のイシカワガエルには交配後隔離があることが証明され、両集団は、外部形態は極めて良く似ているものの別種とされた。一般的に、島嶼間のように地理的に完全に分断された集団間では、交配後隔離の成立は、側所的集団や同所的集団の場合よりも遅れても差し支えないが（後者の場合、交配前隔離が先に成立する傾向にある）、イシカワガエルの場合は、完全に分断された集団間で比較的早く交配後隔離が進んだグループであるといえる。同じ例が、オットンガエルとホルストガエル間にも当てはまるかを明らかにするために、両者間で人工交配を行うことを計画している。また、*Babina* 属に最も近縁な属は何かという点については現在複数の仮説が存在するが、その候補の一つ *Nidirana* 属（研究者に因っては *Babina* に含める）のヤエヤマハラブチガエルを用い、属間の交配後隔離の有無の検証も計画している。

9. 絶滅危惧種オットンガエル・ホルストガエルおよび近縁属のミトコンドリアゲノム解析

Mitochondrial genomic analyses in endangered species *Babina subaspera* and *B. holsit*

[目的]

種の保全を適切に行うためには、種内集団間の遺伝的多様性を調査し、保全すべき単位（集団）を決める必要がある。この作業を行う上では、分子マーカーが必須であり、進化速度の速いミトゲノムコード遺伝子がしばしばそのマーカーとして選択される。しかし、ミトゲノム遺伝子の中でも、進化速度の速い遺伝子と遅い遺伝子が存在し、また分類群によって、進化速度の速い遺伝子が異なる場合がある。そこで、絶滅危惧種であるオットンガエルとホルストガエルのミトゲノムの種内集団間の遺伝的多様性を調べる上で適切なミトゲノム遺伝子を調べるために、両者のミトゲノムの全塩基配列を決定した。

ミトゲノムにコードされている遺伝子の並んでいる順番（遺伝子配置）は、一般的にはあまり変化しないが、しばしば変化する。この場合、同じように変化した遺伝子配置を共有するグループは、その配置変化が生じた祖先に由来する単系統群であることが強く示唆される。先行研究において、ホルストガエルのミトゲノムの部分塩基配列が調べられ、本種のミトゲノムは、一般のアカガエル型（あるいはネオバトラキア型）の遺伝子配置から変化していることが報告されていた。本研究では、オットンガエルのミトゲノムの遺伝子配置を明らかにし、ホルストガエルで見ついていた遺伝子配置変化がオットンガエルでも見られるかを明らかにすることを目的とした。

[材料・方法]

オットンガエルとホルストガエル各 1 個体を材料に用いた。生体の足指から全 DNA を抽出し、その DNA を鋳型に、LA-PCR 法でミトゲノムの全長をカバーする PCR 断片を増幅し、プライマーウォーキング法を用いて、シーケンスを行った。また、オットンガエルのコントロール領域はリピートが長く、PCR 産物から直接シーケンスできなかつたため、サブクローニングを行った後にシーケンスを完了した。

[結果]

オットンガエルとホルストガエルのミトゲノムの全塩基配列を決定した。両種のミトゲノムの全長はそれぞれ XXXXX bp と 19113 bp であり、一般的な脊椎動物のミトゲノムよりやや長かつた。両ゲノム共に動物ミトゲノムに特有の 37 種類の遺伝子をコードしていた。また、オットンガエルとホルストガエルのミトゲノムの遺伝子配置は完全に一致していた。この遺伝子配置をアカガエル一般型と比較すると、tRNA-His/tRNA-Ser/ND5 遺伝子領域と tRNA-Glu 遺伝子の位置が異なっていた。オットンガエルとホルストガエルミトゲノムの ND6 遺伝子の下流には tRNA-Glu の偽遺伝子が、CR の下流 (ND5 遺伝子の上流) には tRNA-His の偽遺伝子がそれぞれ見いだされた。

[考察]

ミトゲノムニコードされる 2 種類のリボゾーム RNA 遺伝子と 13 種類のタンパク質遺伝子をオットンガエルとホルストガエル間で比較した所、タンパク質遺伝子の中でも ND1~5 と ATP6~8 遺伝子の進化速度が速いことが分かつた。さらに、アミノ酸置換率や、遺伝子の長さを考慮すると、ND2 と ND5 遺伝子がこれらの種の種内マーカーとして使いやすいと考えられた。

アカガエル一般型から変化した遺伝子配置が、オットンガエルとホルストガエルで共有されていたことから、両者で見られた遺伝子配置は少なくとも狭義の Babina 属の共有派生形質になることが分かつた。しかし、Nidirana 属の遺伝子配置が今のところ不明であることから、Nidirana と Babina 両者の共有派生形質である可能性も捨てきれない。また、両者のミトゲノムで見られた tRNA-Glu 偽遺伝子のゲノム上の位置は、一般的なアカガエル型の遺伝子配置における対応 tRNA-Glu の位置に相当するため、オットンガエルとホルストガエルの遺伝子配置の変化は、一度ゲノム内に遺伝子重複が起これりその片方が欠失した結果である、「重複-ランダムロス型 (Duplication & Random Loss)」のプロセスを経て生じたと考えられる。ただし、遺伝子配置の変化は、ゲノム上の離れた場所で起きているため、最も一般的なミトゲノム遺伝子配置変化様式である「縦列重複-ランダムロス型 (Tandem D-RL)」では無い可能性が高く、重複が生じたメカニズムは、組換えなどによる非縦列重複の生成によるものと考えられた。また、tRNA-His 偽遺伝子の位置は、*Odorrana* 属に見られる配置変化した tRNA-His の位置と相同であることから (CR の下流で LTPFtRNA クラスターの上流)、*Babina* と *Odorrana* 属の祖先で、CR の下流にこの tRNA 遺伝子が重複を起これた可能性がある。

[成果]

オットンガエルとホルストガエルのミトゲノム全長の決定に成功し、種内集団間の解析に適切な遺伝子を推定できた。さらに、アカガエル一般型から変化した遺伝子配置を見だし、配置変化が生じた系統的位位置や配置変化のプロセスを絞り込むことに成功した。

[将来の展望]

オットンガエルとホルストガエルは *Babina* 属に属するが、本属の最近縁属についてはいくつかの仮説がある。今後は、その候補である *Lithobates* 属や *Nidirana* 属、*Odorrana* 属のミトゲノム全情報を加えた大規模な系統解析を行うことにより、この問題に決着をつけられると期待される。また、*Nidirana* 属のミトゲノムを決定することで、ミトゲノムの遺伝子配置変化が生じた系統やその分子進化的プロセスがより明確にできるだろう。

研究業績

①原著論文

1. Kotaki, M., A. Kurabayashi, M. Matsui, M. Kuramoto, T. H. Djong and M. Sumida (2010) Molecular phylogeny for the diversified frogs of genus *Fejervarya* (Anura: Dicroglossidae). *Zool. Sci.*, 27 : 386-395.
2. Kurabayashi, A., N. Yoshikawa, N. Sato, Y. Hayashi, S. Oumi, T. Fujii and M. Sumida (2010) Complete mitochondrial DNA sequence of the endangered frog *Odorrana ishikawae* (family, Ranidae) and unexpected diversity of mt gene arrangements in ranids. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 56 : 543-553.
3. Alam M. S., A. Kurabayashi, Y. Hayashi, N. Sano, M. M. R. Khan, T. Fujii and M. Sumida (2010) Complete mitochondrial genomes and novel gene rearrangements in two dicroglossid frogs, *Hoplobatrachus tigerinus* and *Euphlyctis hexadactylus*, from Bangladesh. *Genes & Genet. Syst.*, 85: 219-232.
4. Kurniawan, N., T. H. Djong, M. M. Islam, T. Nishizawa, Daicus, M. B., H. S. Yong, R. Wanichanon, I. Yasir and M. Sumida (2011) Taxonomic status of three types of *Fejervarya cancrivora* from Indonesia and other Asian countries based on morphological observations and crossing experiments. *Zool. Sci.*, 28: 12-24.
5. Kuramoto, M., N. Satou, S. Oumi, A. Kurabayashi and M. Sumida (2011) Inter- and intra-island divergence in *Odorrana ishikawae* (Anura, Ranidae) of the Ryukyu Archipelago of Japan, with description of a new species. *Zootaxa*, 2767: 25-40.

6. Iwakoshi-Ukena, E., K. Ukena, A. Okimoto, M. Soga, G. Okada, T. Fujii, Y. Sugawara and M. Sumida (2011) Identification and characterization of antimicrobial peptides from the skin of the endangered frog *Odorrana ishikawae*. *Peptides*, 32: 670–676.

②総説・著書

該当なし

③学会発表

国際学会

1. Sumida, M. “Artificial breeding and genetic diversity in an endangered frog *Odorrana ishikawae*: Case study of fauna conservation from Japan.” 2010 International Meeting of the Association for Tropical Biology and Conservation (Jul., 2010. Bali, Indonesia)

2. Igawa, T., M. Okuda, S. Oumi, S. Katsuren, A. Kurabayashi, T. Umino and M. Sumida. “Development of microsatellite markers and population genetic analysis of the endangered frog, *Odorrana ishikawae* (Anura: Ranidae).” 2010 International Meeting of the Association for Tropical Biology and Conservation (Jul., 2010. Bali, Indonesia)

3. Kurniawan, N., T. H. Djong, T. Igawa, M. Kotaki and M. Sumida “Geographic distribution and phylogenetic relationship of genus *Fejervarya* from Indonesian Sunda Land inferred from 16S rRNA gene.” 2010 International Meeting of the Association for Tropical Biology and Conservation (Jul., 2010. Bali, Indonesia)

4. Kurabayashi, A., N. Yoshikawa, N. Sato, Y. Hayashi, S. Oumi, T. Fujii, and M. Sumida. “Mitochondrial genome of the endangered frog *Odorrana ishikawae* and unexpected diversity of mt genomic arrangements in the family Ranidae.” International Symposium on Biodiversity Sciences (ISBDS) 2010, “Genome, Evolution and Environment.” (Aug., 2010. Nagoya, Japan)

5. Sumida, M. “Attempt at artificial breeding for conservation and analyses of genetic divergences and postmating isolation mechanisms in an endangered frog *Odorrana ishikawae* from Japan.” Internatinal Congress of BioSystematics Berlin 2011 (Feb., 2011, Berlin, Germany)

6. Hasan, M., M. M. Islam, T. Igawa, Md. M. R. Khan, M. S. Alam, T. H. Djong,

N. Kurniawan, M. Kuramoto and M. Sumida. "Genetic divergences and phylogenetic relationships in the frogs from South to East Asia." Internatinal Congress of BioSystematics Berlin 2011 (Feb., 2011, Berlin, Germany)

国内学会

1. Hasan, M. • M. M. Islam • Md. M. R. Khan • M. S. Alam • T. H. Djong • T. Igawa • N. Kurniawan • M. Kuramoto • M. Sumida "Genetic divergences and phylogenetic relationships in the frogs from south to east Asia." 日本学会動物学会第 62 回中国四国支部大会 (2010 年 5 月, 山口)
2. Alam, M. S. • A. Kurabayashi • Y. Hayashi • N. Sano • M. M. R. Khan • T. Fujii • M. Sumida "Complete mitochondrial genomes and novel gene rearrangements in two dicroglossid frogs, *Hoplobatrachus tigerinus* and *Euphlyctis hexadactylus*, from Bangladesh." 日本遺伝学会第82回大会 (2010年9月, 札幌)
3. Hasan, M. • M. M. Islam • M. M. R. Khan • M. S. Alam • T. Igawa • M. Kuramoto • M. Sumida "Species diversity and phylogenetic relationships among frogs from Bangladesh revealed by nucleotide sequences of mitochondrial 16S rRNA gene." 日本遺伝学会第82回大会 (2010年9月, 札幌)
4. 井川武・奥田優・大海昌平・勝連盛輝・倉林敦・海野徹也・住田正幸 「マイクロサテライトマーカーを用いた絶滅危惧種および天然記念物イシカワガエルの遺伝的集団構造の解明」 日本遺伝学会第 82 回大会 (2010 年 9 月, 札幌)
5. 住田正幸・佐藤直樹・M. M. Islam・井川武・吉川夏彦・倉林敦・大海昌平・勝連盛輝・福庭博子・新谷望・藤井保・倉本満 「絶滅危惧種イシカワガエルにおける飼育下繁殖の試みと交配後隔離機構の解明」 日本遺伝学会第82回大会 (2010年9月, 札幌)
6. 住田正幸・西谷拓磨・菅原弘貴・倉林敦・勝連盛輝・大海昌平 「絶滅危惧種イボイモリの飼育下繁殖の試みとミトコンドリアゲノムの解析」 日本動物学会第81回大会 (2010年9月, 東京)
7. Islam, M. M. • M. M. R. Khan • M. Kuramoto • M. Sumida "Reproductive isolating mechanisms among frogs of genus *Fejervarya* elucidated by crossing experiments, histological and spermatogenesis observations." 日本動物学会第81回大会 (2010年9月, 東京)

Euphlyctis genera. The interspecific hybrids between female *H. tigrinus* and male *H. chinensis* became inviable at tadpole stage, but a small number of the hybrids developed normally and matured only three individuals. These mature hybrids were found to be triploid and sterile by the chromosomal and histological observations. These results, suggest incomplete hybrid inviability between these two species. The allozyme study showed 9 diagnostic loci among 24 loci investigated in *H. tigrinus* and *H. chinensis* and parental allele constitutions at these loci in the triploid hybrids. The maternal inheritance of mitochondrial genomes was retained in the hybrids.

Future research plan

We could not include inland type *H. chinensis* in our crossing experiments at present and in future studies we have plan to collect and to check their post mating isolating mechanisms with related species. However, presently we are also doing crossing experiments among different cryptic species of *Euphlyctis* genus to know their reproductive isolating mechanisms.

Original Paper

1. Alam MS, Kurabayashi A, Hayashi Y, Sano N, Khan MMR, Fuji T and Sumida M. Complete mitochondrial genomes and novel gene rearrangements in two dicroglossid frogs, *Hoplobatrachus tigrinus* and *Euphlyctis hexadactylus* from Bangladesh. *Genes and Genet. Syst.* 85 (3):219-232, 2010.

Meeting or conferences

(National Conference)

1. Alam MS, Kurabayashi A, Hayashi Y, Sano N, Khan MMR, Fuji T and Sumida M. Complete mitochondrial genomes and novel gene rearrangements in two dicroglossid frogs, *Hoplobatrachus tigrinus* and *Euphlyctis hexadactylus* from Bangladesh. The 82nd Genetic Society of Japan, Hokkaido, Sep. 20-22, 2010.

2. Hasan M, Islam MM, Khan MMR, Alam MS, Igawa T, Kuramoto M and Sumida M (2010) Species diversity and phylogenetic relationships among frogs from Bangladesh revealed by nucleotide sequences of mitochondrial 15S rRNA gene. Presented in the 82nd annual meeting of The Genetics Society of Japan in Hokkaido University, Hokkaido, Japan.

3. Hasan M, Islam MM, Khan MMR, Alam MS, Djong TH, T Igawa, Kurniawan N, Kuramoto M and Sumida M (2010) Genetic divergences and phylogenetic

8. 小巻翔平・倉林敦・Mohammed Mafizul Islam・住田正幸・東城幸治 「中部日本のトノサマガエル種群の交雑帯における遺伝子浸透」 日本爬虫両棲類学会第81回大会 (2010年10月, 横浜)

④科研費等の受け入れ状況

1. 文部科学省特別教育研究経費-国際的に卓越した教育研究拠点機能の充実先駆的両生類研究の展開-両生類絶滅危惧種の保全 14,900 千円 (担当: 住田正幸、矢尾板芳郎)

2. 日本学術振興会科学研究費補助金・基盤研究(C)「絶滅危惧種イシカワガエルの保全と遺伝的多様性に関する研究」1,040 千円 (代表者: 住田正幸, 分担者: 倉林敦)

3. 奨学寄付金 500 千円 (担当: 住田正幸)