

A green frog with dark spots is perched on a leafy background. The frog is the central focus, with its body and legs visible. The background is a dense, green, textured surface, likely foliage.

2011年度両生類研究施設研究活動及び研究成果報告書

平成24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

背景写真の撮影：檜垣俊忠

目次

I. 施設概要	2
II. 教育活動	4
III. 研究活動と研究内容現況	6
IV. 社会活動	17
V. 国際交流活動	18
VI. その他（特記事項）	19
VII. 各部門の研究内容と研究業績	20
発生遺伝学研究部門	20
分化制御機構研究部門	39
多様化機構研究部門	49
生理生態学研究部門（客員部門）	
プロジェクト研究 ①	81
プロジェクト研究 ②	83
プロジェクト研究 ③	88
プロジェクト研究 ④	89
プロジェクト研究 ⑤	93

I. 施設概要

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23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：施設長）、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、浅島誠）、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（平成23年4月から平成24年2月まで落恵子／平成24年3月は島田歩稀）がいる。

系統維持班では、両生類36種178系統2万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57系統にのぼる。系統維持班では平成23年度には、交配系統数：25系統、飼育幼生数：982匹、新しい系統数：14系統、

新しい系統の飼育幼生数：499 匹を飼育維持しており、7 系統 496 個体を研究・教育用として大学および高等学校に配布した。特に、広島県教育バザールへ参加し、生物教材として両生類を提供した。系統維持班には 27 件約 267 人の見学者があった。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、今年度は第 2 期の最後の年として、同様の事業を継続している。このプロジェクトには 5 名の契約技術職員（小林里美，榎本美香，西口祐子，濱中かおり，坂口玲子）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 年プロジェクトとして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。

今年度から研究活動の活性化を目指して、研究員体制をはじめた。学内から 10 名の研究員、学外海外から 30 名の客員研究員が推薦され、共同研究を展開している。今年度は、5 月 13 日と 12 月 22 日に両生類研究施設運営委員会を開催し、施設の活動実績や活動計画の報告や平成 24 年度の客員教員や研究員/客員研究員の推薦を行った。

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2名、2年に5名、後期2年に1名、2年に1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4件であり、博士課程後期学生の国際学会発表は2件、国内学会発表は11件である。原著論文発表は博士課程前期学生で1編、博士課程後期学生で6編である。大学院生によるRAは1件であり、TAは3件である。今年度は、博士課程前期学生4名が以下の修士論文により修士号を取得しており、博士課程後期学生3名が、以下の学位論文により博士号を取得している。

修士論文発表実績

- 掛橋竜祐「絶滅危惧カエル類 *Babina* 属におけるミトコンドリアゲノム全塩基配列に基づく分子系統解析と人工繁殖の試み」2012年2月
- 小巻翔平「日本産トノサマガエル種群の分布重複域における浸透交雑と30年間で生じた分布変化」2012年2月
- 菅原弘貴「絶滅危惧種・イボイモリにおけるマイクロサテライトDNAを用いた集団構造解析と飼育下繁殖および行動解析」2012年2月
- 長井悠佳里「ナゴヤダルマガエルの遺伝的地域分化 -とくに東西2大集団が接触する境界領域について-」2012年2月

博士学位授与実績

岡田守弘

Translational regulation by the 5'-UTR of thyroid hormone receptor α (TR α) mRNA
(甲状腺ホルモン受容体 α mRNAの5'非翻訳領域による翻訳制御)
平成24年3月23日

Hasan Mahmudul

Cryptic anuran biodiversity in Bangladesh with description of a new species of genus *Hoplobatrachus* (Anura, Dicroglossidae)
(バングラデシュの無尾両生類における種多様性と *Hoplobatrachus* 属の新種記載)
平成24年3月23日

秋山繁治

Evidence for the true fall-mating in Japanese newt *Cynops pyrrhogaster*
(日本産アカハライモリにおける秋交配の証明)
平成23年4月25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「オスとメス、男と女の生物学的お話」という題名で模擬授業を行っている。（2010年12月17日 広島市）

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

○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23年度には本研究部門では、原著論文3編、総説・解説1編、国際学会での一般講演2件、国内学会での一般講演8件、研究助成金の受入は5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

発生過程の血中甲状腺ホルモン濃度の増加に伴い、変態において全身の器官の形態変化が決まった順序で起きる。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。

本研究は、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、形態変化のタイミングを決めている要因を調べることを目的とする。

(i) 甲状腺ホルモン活性化酵素のひとつであるD1の発現プロファイルを調べた。

(ii) 甲状腺ホルモン受容体を過剰発現させた尾の筋細胞と後肢は、低濃度の甲状腺ホルモン前駆体T4で処理された時、最終的な運命は大きく違うが、甲状腺ホルモン受容体betaや甲状腺ホルモン活性化酵素D2や不活性化酵素D3遺伝子の発現のパターンは似ていた。今までの結果をまとめて論文として発表した。

2) ツメガエル甲状腺ホルモン受容体alpha mRNAの5'-UTR領域による翻訳抑制

頭部と尾では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。

(i) 甲状腺ホルモン受容体alpha mRNAの開始コドンの上流、161 bpが生体内でも甲状腺ホルモン受容体の発現を抑制した。

(ii) 翻訳抑制のシスエレメントが5領域程同定された。様々な塩基置換を導入した結果、エレメントIVではループを形成する3塩基中の1塩基を除き、変異を入れると翻訳抑制活性が失われた。しかし、uORFであるエレメントVでは塩基期配列特異性は低く、ORF構造が保たれば、概ね、活性を保持していた。

(iii) 翻訳抑制活性を持つ各シスエレメントを他の遺伝子の前に挿入しても、また、*in vitro*の翻訳システムでも翻訳抑制活性を示した。成果を論文にまとめて発表した。

3) ネットアイツメガエルでの遺伝子破壊法の確立およびアルビノ系統の確立

ZFN法は標的遺伝子を破壊するのに優れた方法である。これらの方法を用いて二倍体のネットアイツメガエルでの標的遺伝子破壊方法を確立し、その上でネットアイツメガエルのアルビノ系統を確立することを目的とする。ネットアイツメガエルには現在、アルビノ系統が無く、その作製が望まれている。メラニン色素合成に重要な役割を果たすtyrosinase遺伝子を標的としてZFNを合成して、そのmRNAをネットアイツメガエル受精卵に注入した。皮膚のメラニン色素を一部欠損するキメラ個体を複数得た。

4) ツメガエル幼生の変態での尾の退縮における *ouro* 遺伝子の機能の再評価

井筒らが2009年にPNASに発表した「*Ouro* 蛋白質を発現している尾が免疫系により拒絶されて退縮する。」という説を幼生の尾の筋細胞で検証することを目的としている。

(i) 尾の表皮ではNF-stage 58をピークとして *ouro 1* と *ouro 2* の両遺伝子が発現していたが、尾の筋肉には両遺伝子共に1/1000程度しか発現していなかった。

(ii) *ouro 1* 遺伝子と *ouro 2* 遺伝子の発現を生きた状態で区別するために、*ouro 1* 遺伝子にEGFP遺伝子を *ouro 2* 遺伝子にmCherry遺伝子を融合させた発現型ベクターを作製して、幼生尾の筋細胞に導入させて、経過観察している。

自然変態の経過で *ouro 1* 遺伝子と *ouro 2* 遺伝子を共発現している筋細胞が両遺伝子を発現していない筋細胞より早く死ぬかどうか、甲状腺ホルモンシグナルを抑制するDNTR遺伝子を強制発現させた条件下では *ouro 1*、*ouro 2* 遺伝子発現が細胞死に影響を与えるかどうか、次年度の成果に期待している。

5) 性転換機構の解析：ツチガエルへの性ホルモン投与についての基盤的研究

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。本研究では、ツチガエル (*Rana rugosa*) を用いて、性ホルモン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。

雄と雌の両方に性転換が誘導される東広島集団ツチガエルと性転換がほとんど誘導されない浜北集団ツチガエルを用いて集団間雑種個体を作成し、すでに精巣または卵巣への分化が起こっているステージII-IIIおよびステージXの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。その後、変態期に生殖腺を取り出して組織学的に解析したところ、どちらのTP処理においても精巣を持つ個体が対照群に比べて有意に多かった。また、ステージII-IIIとステージXの投与群における性転換率について顕著な違いは認められなかった。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が不完全であることが考えられる。また、浜北集団での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と考えている。

6) 性転換機構の解析：ツチガエル性転換過程におけるアンドロゲン受容体およびLM04の遺伝子発現

ツチガエル地方集団間雑種へのアンドロゲン投与実験により、集団間における雌から雄への性転換能の違いは機能的な性転換機構の有無に因ることが考えられた。その違いを知るために、東広島集団および浜北集団、それらの集団間雑種のそれぞれの幼生生殖腺におけるアンドロゲン受容体 (AR) 遺伝子発現を解析したところ、発現量に有意な差は認められなかった。従って、2集団間における性転換機構の違いは、AR mRNAの転写以降の違いに因ることが考えられる。

また、これまでネッタイツメガエル (*Silurana tropicalis*) 生殖腺を用いてマイクロアレイ解析を行ったところ、オンコジーンであるLM04 遺伝子が卵巣において高い発現を示した。そこで、LM04 遺伝子のツチガエルホモログを単離し、性転換過程における遺伝子発現変化を解析した。その結果、卵巣において高い発現を示した後、分化転換過程において一時的に発現量は低くなったが、精巣への分化転換が進むにつれて再び増加した。この変化は、生殖細胞数の変化と良く似ていることから、ツチガエルLM04は生殖細胞分化に関与している可能性が考えられる。

7) 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するビタミンE抗酸化機能のかく乱

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である。除草剤パラコート (PQ) は活性酸素の発生を通じて、チャイニーズハムスター由来の培養細胞の染色体に損傷を与えることが知られている。多くの研究者によって推定される PQ の遺伝毒性の発生機構は下記の通りである。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脂質過酸化物の発生⑥染色体損傷の発生。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ビタミンEによる PQ 遺伝毒性の強化機構を調べた。その結果、PQ 共存下のビタミンE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。

8) 無尾両生類の変態期尾退縮に於けるHox 遺伝子の機能

無尾両生類幼生の胴部と尾部は、変態後の運命が全く異なる。変態期に両部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。我々は「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。

ネッタイツメガエルの全ての Hox 遺伝子について発現解析したところ、これらの発現パターンは、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明らかになった。このことから Hox 遺伝子が胚期だけではなく幼生期以降の部域性決定にも関わっているものと推測される。また、この発現解析により、尾部特異的発現をする Hox 遺伝子は *Hoxa13* など複数あることも判明した。

アフリカツメガエル幼生をレチノイドで処理したところ、初期胚でのレチノイド処理同様 Hox 遺伝子発現パターンに変化が起きた。これはレチノイン酸を介した Hox コード調節が胚同様幼生でも行われていることを示唆する。

Hoxa13 など尾部特異的な発現をする Hox 遺伝子の幼生生体での機能検定を行うことが、本研究の仮説を証明する上で必要である。また、幼生をレチノイドにより Hox コードを変化させ、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、仮説検証を補助する実験である。このような実験を行い、仮説検証作業を進めることを予定している。

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23年度には本研究部門では、原著論文9編、著書1編、国際学会での一般講演1件、国内学会での招待講演3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) 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10kbp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。今年度は ZNF を用いて、mos の遺伝子破壊を試みて positive な結果を得ている。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

今年6月18日午後2時(日本時間同3時)すぎに、中国が有人宇宙船での初のドッキングを成功させ、2020年ごろを目指す宇宙ステーション建設に向けて大きな弾みをつけた。近い将来、月や火星探査へも参入していくであろう。このため、ヒトの長期間滞在に対する宇宙環境の影響に関しては今後も引き続いて数多くの研究が行われ詳細なデータの蓄積が必要である。両生類は宇宙環境が生物に及ぼす影響を調べる上で格好のモデル動物であって多くの地上および宇宙実験がなされ

てきた。我々は、地上において過重力を印加する事によって正常に生活環が回るかどうか、発生や内分泌系に注目して研究してきている。具体的には、2 G、5 Gを媒精後 10 分、20 分の未受精卵、2 細胞期の胚、原腸胚に印加して調べた。強磁場影響は 11T(-1400T²m⁻¹)、15T(0T²m⁻¹)、12T(+1200T²m⁻¹)を印加した。

その結果、アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)を用いた過重力影響に関する私達の一連の研究から、負荷は受精直後に特に強くかかり、印加された受精卵から発生した胚には双頭・小頭・小眼などの奇形が発症した。これらの異常個体ではセメント腺のマーカであるXag、また前脳・中脳・眼のマーカであるXotx2の発現が抑えられていることや、頭部形成異常はWntシグナルの抑制が原因であることが明らかになった。過重力影響としてはこの他に、卵減数分裂における白斑や紡錘体の形成異常、アポトーシスの促進、ホルモンによる生体機能調節の異常等が見られた。

宇宙では磁場も地球上とは異なっている。アフリカツメガエルを用いた強磁場影響については、処理受精卵のその後の発生率は悪く、頭部やセメント腺の形成不全、頭部長一胴部長一尾部長の比率の変化、Xotx2 や Xag1 の発現低下、卵母細胞における色素分布の異常が認められた。なお、磁場内での遊泳運動はアフリカツメガエル幼生よりもネッタイツメガエル[*Xenopus (Silurana) tropicalis*]幼生の方に甚大な影響が見られることもわかった。これらの結果から、重力や磁場の変化は生物の発生、成長、ホルモン分泌等に多大な影響を与えることが示唆された。今後さらに両生類を用いて、発生・性分化に対する重力・磁場影響を遺伝子レベルをも含めて、さらに調べる。

3) トランスジェニックガエルを用いた甲状腺ホルモンかく乱物質スクリーニングシステムの開発

現在、地球上に存在する人為起源の化学物質は十万種類以上と言われており、これらの化学物質が大量に環境中に放出され、生物に多大な影響を及ぼす可能性(特に内分泌かく乱作用)が危惧されている。無尾両生類は甲状腺ホルモン(TH)により幼生から成体へと変態することから、甲状腺ホルモンかく乱作用を持つ化学物質の生体影響を試験評価するために適した実験動物である。私達は、THにより活性化される TRbeta 遺伝子のプロモーター/エンハンサーとホタルルシフェラーゼ遺伝子を連結させてつくったレポーター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(Tg)システムを既に確立している。この Tg システムを利用した TH かく乱物質を評価する試験系の確立を目的として、F1 世代の TH 反応性や化学物質の影響をルシフェラーゼ活性により評価する方法を検討した。具体的には、すでに樹立している TRbeta promoter/enhancer/Luciferase Tg システムの F1 幼生に様々な濃度の TH(T3)を加え、個体レベルでのルシフェラーゼ活性をルミノメーターにより測定した。また、オリンパス LV200 発光顕微鏡を用いて *in vivo* ルシフェラーゼイメージング解析を行った。

その結果、*in vivo* ルシフェラーゼイメージング解析から、TH に高い反応性を示すことが知られている幼生の脳や四肢において、強いルシフェラーゼ活性の誘導を確認した。また、TH 暴露した Tg 幼生個体のホモジェネートを用いてルシフェラーゼ活性を測定した結果、濃度依存的なレポーター活性の増大も確認された。以上の

結果により、この Tg 系統は、個体レベルでの TH 応答性をルシフェラーゼ活性によりモニターすることが可能であることが証明された。

現在、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 TH 作用をかく乱するものが含まれ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は少なく、その開発が喫緊の課題である。本研究課題で開発したルシフェラーゼ遺伝子を導入したアフリカツメガエル Tg 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・高感度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スクリーニングしていく予定である。

4) ZNF による遺伝子の破壊

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ュ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 遺伝子と mos である。この結果、TRb の遺伝子に変異を導入する事ができた。さらに、mos 遺伝子にも変異を導入できた。これ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。しかしながら、最近、TALEN という ZNF より簡便で有効な遺伝子破壊の方法が報告され、継続するかが課題である (TALEN については事項参照)。

5) 両生類における TALEN 技術を用いた標的遺伝子の破壊

両生類の変態および再生は魅力的な生命現象であり、オタマジャクシの発生過程における体の作り換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。これらの生命現象に関与する遺伝子の機能を明らかにするために、特定の遺伝子を個体レベルで破壊する技術の確立は必要不可欠であった。私たちは、カスタマイズ TALE ヌレアーゼ (TALENs) を用いて、ツメガエルの標的遺伝子破壊を試みた。両生類で TALENs が働くかどうか調べるため、緑色蛍光タンパク質 (EGFP) 遺伝子のターゲット配列を認識する TALEN ペアの mRNA を EGFP トランスジェニックツメガエルの受精卵に顕微注入した。その後、標的遺伝子の破壊を EGFP 蛍光観察、Cel-1 アッセイ、及びシークエンス解析により検証した。

TALEN は標的 DNA 配列を認識する TALE ドメインのリピートと、II 型制限酵素である FokI 由来のヌクレアーゼドメインから成る人工酵素である。標的配列に Double Strand Breaks (DSB) を高頻度に導入し、非相同末端結合 (NHEJ) によって修復される際に挿入や欠失を引き起こす。その結果、フレームシフトにより遺伝子破壊を高頻度で生じさせる。EGFP TALENs mRNA を注入した受精卵から発生したトラ

ンスジェニック胚では、顕著に EGFP 蛍光の減少が確認された。さらに、TALEN 標的領域を Cel-1 アッセイやシーケンスにより解析したところ、高頻度で挿入や欠失による変異が確認された。今後、TALEN 技術を用いて変態や再生現象に重要な遺伝子の破壊を行っていく予定である。

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

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。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。さらに、この領域が NES (Nuclear export signal) として働くことや、その NES の機能と 2 極の紡錘体の形成能が関係していることが明らかになった。

7) Nramp ファミリーの新規バナジウム/プロトン共役輸送体

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。

8) 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。

9) 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。2011年度は以下の成果を挙げた。

(i) W染色体とY染色体の退化は独立に生じる

Independent degeneration of the W and Y sex chromosomes

XY型のY染色体は構造の変化によってX染色体との乗り換えが抑制されると、自身の遺伝子が退化し、染色体にも欠失が生じて次第に矮小化していく。ZW型ではW染色体が同様の退化の運命を辿る。ツチガエルはXY型とZW型の両方のタイプを地域集団に有しており、Y染色体とW染色体はいずれも第7染色体で相同でしかも異型化している。そこで、それぞれの退化の過程を調べるため、致死遺伝子の比較を行った。その結果、遺伝子退化によって生じた致死遺伝子はお互いに共有されていないことがわかった。しかも、W染色体上の致死遺伝子は2つの地方グループ間においても異なっていた。したがって、W染色体やY染色体の遺伝子退化は進化上、事前のシナリオを共有しておらず、それぞれ独立に進行していくものと考えられる。

(ii) X染色体に連鎖した色彩遺伝子の同定

Identification of an X-linked body color gene in the frog *Rana rugosa*

ツチガエルのX染色体に連鎖する色彩決定遺伝子 (white-yellow, w) を同定し、体色で雌雄を判別できる系統 ($X^wX^w♀/X^wY^+♂$) を確立した。この性連鎖色彩遺伝子の発見は両生類において初めてのケースである。この系統により受精後5日目から遺伝的雌雄の同定が可能になった。そこで幼生の生殖腺における遺伝子発現を調べたところ、性ステロイド産生に関与する2つの遺伝子 *Cyp17* と *Cyp19* (aromatase) が幼生初期の生殖腺で顕著な雌雄差発現を示すこと、さらに、*Dmrt1* と *Rspo1* がそれらに先んじて雄ないし雌で高い発現を示すことがわかった。

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23年度には本研究部門では、原著論文12編、総説・解説5編、国際会議での招待講演1件、国際会議での一般講演4件、国内学会での招待講演1件、国内学会での一般講演14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) バングラデシュの無尾両生類における種多様性と *Hoplobatrachus* 属の新種記載

これまでバングラデシュにおける無尾両生類の種多様性に関する研究は、限定的であり、体系的な無尾両生類のリストはなく、外部形態や野外観察のみに基づいた

分類に関する研究が断片的に行われているにすぎない。本研究では、バングラデシュにおける無尾両生類の種多様性の一端を明らかにするとともに、隠蔽種の存在について検証することを目的として、バングラデシュの広範な地域から無尾両生類を採集し、16SrRNA 遺伝子の解析を行った。その結果、本研究で収集したバングラデシュのカエルには、5科8属19種が含まれ、そのうち少なくとも8種が、未記載種・新地産種・隠蔽種に相当することが明らかになった。本研究では、これらのうち、Cox's Bazar から採集した *Hoplobatrachus* 属の1種を、新種 *Hoplobatrachus litoralis* として記載した。新種の分布範囲は、バングラデシュの南東部の沿岸部に限定され、*H. tigerinus* の分布範囲とは明らかに分離していた。

2) 日本産ヌマガエルの新種記載

Fejervaraya 属はアジアに広く分布しており、形態的によく似ていて分類が困難である。遺伝的に2グループ（東南アジアと南アジア）に分けられるが、東南アジアグループの分類学的研究は、ジャワで *F. limnocharis* の隠蔽種である *F. iskandari* が発見されたことにさかのぼる。その後、日本本土産ヌマガエルの集団は形態学的にも、遺伝学的にも、繁殖生理学的にも、明らかに *F. limnocharis* とは異なることが分かった。本研究では、これらの結果に基づいて、東広島市で採集された雄を基準標本として、日本本土産のヌマガエルを新種として記載した。本種の日本本土内における遺伝的変異は小さい一方で、中部琉球集団は本土集団とはやや分化しており、さらに分類学的研究が必要である。

3) 中央琉球産絶滅危惧両生類5種の飼育下繁殖

中央琉球に分布する絶滅危惧(および天然記念物)の両生類5種イシカワガエル、アマミイシカワガエル、イボイモリ、ホルストガエル、オットンガエルは、奄美大島や沖縄島北部などに分布する両生類で、鹿児島県と沖縄県の天然記念物に、環境省レッドリストの絶滅危惧 IB 類または II 類に指定されるなど、早急な保護対策が求められている。本研究では、これら絶滅危惧種について効率的な域外保全に資することを目的に、実験室での適切な人工繁殖・飼育維持方法を確立した。将来的には必要に応じてリリースも考慮に入れ、これらの絶滅危惧種について飼育下繁殖と域外保全を行い、「両生類ノアの方舟」を目指している。

4) 絶滅危惧種イボイモリのミトコンドリアゲノムの分子進化と分岐年代推定に基づく系統地理学的考察

イボイモリ類(有尾目イモリ科)は、*Echinotriton* 属の *E. andersoni* と *E. chinhaiensis* および8種の *Tylototriton* の2属10種からなる。これらの多くが絶滅危惧種に指定されている。本研究では、(1) ミトゲノムの中でも、イボイモリの集団解析に適した進化速度の速い遺伝子や領域を決定した。(2) 日本の西南諸島の限られた島にのみ分布するイボイモリの島間の分岐年代を推定し、現在の分布が、島の分断とは独立に成立したことを明らかにした。(3) 一部のイボイモリ類のミトゲノムには、他の脊椎動物や有尾類には見られない、複数の遺伝子を含んだ直接反復配列が存在することが分かった。その起源は、一部の *Tylototriton* の共通祖先に由来しており、また、協調進化の起きた時期と回数によってリピート間の塩基配列相同性に違いが生じていることを示した。

5) 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、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る。そこで、本研究では、12 遺伝子座のマイクロサテライトマーカー (Igawa et al., 2011) を用いて集団構造解析を行った。その結果、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。

6) 絶滅危惧種イボイモリにおけるマイクロサテライトマーカーの開発と遺伝的多様性の解明

イボイモリ *Echiinotriton andersoni* は、奄美大島、請島、徳之島、沖縄島、瀬底島、渡嘉敷島の 6 島に生息する西南諸島固有種である。しかしながら、他の絶滅危惧種と同様に、生息地の消失や、環境改変、ジャワマングースによる食害により個体数が激減しており、本種は IUCN レッドリストにおける絶滅危惧 IB 類に指定されている。そこで本研究では種内の遺伝的構造と、集団内の遺伝的多様性を評価することを目的として、イボイモリにおけるマイクロサテライトマーカーの開発及び、それらマーカーに基づく集団遺伝学的解析を行った。その結果、10 遺伝子座が単離され、これらの遺伝子座について奄美大島、徳之島、沖縄島の各集団で遺伝子型を決定したところ、十分な多型性が確認できた。さらに、集団間の遺伝的距離を算出したところ、3 つの島で遺伝的に大きく異なり、さらに沖縄島内の 3 集団においてもある程度分化が見られた。

7) 透明ガエル「スケルピオン」の量産化 (継続)

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ており、「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、引き続き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。2 代目の「透明ガエル」は生活力が弱いため、以降の継代飼育が困難であるため、生活力改善のために、改良を続けている。さらに実用化に向けては、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。

8) 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、Oct-25転写因子がBMPに対する細胞応答を抑制することを明らかにしている。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だけでなく、Wnt・FGF経路を活性化して胚を後方化することを示した。すなわち、FoxB1は、胚の背腹軸と頭尾軸の形成を制御し、これらの軸形成システムを連携させる遺伝子であることが分った。さらに、FoxB1が、上流で働くOct-25転写因子と協調して制御ネットワークを形成することを明らかにし、FoxB1が神経誘導を安定的に行うために働いている可能性を提示した。本年度は、これらの知見を論文発表 (Takebayashi-Suzuki et al., *Developmental Biology* 2011) することに加えて、神経外胚葉で発現しているFoxB1が外胚葉の裏打ちをしている中胚葉と協調的に働いて、神経誘導を促進していることを見出し、その分子メカニズムを解析した。

IV. 社会活動

- 矢尾板芳郎：「Metamorphosis (変態)」Bio-Olympic 2011年8月19日
広島大学マーメイドカフェ
- 矢尾板芳郎：「免疫学とは？自然免疫とは？」2011年ノーベル賞解説
セミナー 2011年11月21日 広島大学理学部
- 花田秀樹：広島県立教育センター主催「第14回生物教材バザール」に
参加し教材の提供2011年5月00日 東広島市
- 田澤一朗：広島県立教育センター主催「第14回生物教材バザール」に
参加し教材の提供2011年5月00日 東広島市
- 三浦郁夫：“男と女の生物学 -恋人の見つけ方と夫婦のつきあい方-”
和光純薬販売店 2011 年度中堅社員夏期研修会 2011 年 8 月
23 日 広島県安芸郡府中市
- 三浦郁夫：“男と女の生物学” PechyaKuchya Night 広島 2011年10月12日
広島市
- 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報告「板櫃川で
発見された後肢欠損ガエルの発生原因について」2011年11月
19日 北九州市市役所
- 住田正幸：北九州市立いのちのたび博物館 夏の特別展 2011年7月16日～
9月4日「世界の両生類・爬虫類大集合」（イシカワガエルと
イボイモリの繁殖個体の展示）
- 住田正幸：はばたき学習『かがやけいのち』講座の講師 高見が丘小学校
2011年11月7日 東広島(3年生 88名)
- 鈴木厚：広島県高等学校教育研究会理科部会・講師 広島市 2012年3月15日

○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：日本生物学オリンピック2011・組織委員
- 竹林-鈴木公子：日本生物学オリンピック2011・組織委員

V. 国際交流活動

○国際共同研究

三浦郁夫

- ・成都生物學研究所（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-」
- ・キャンペラ大学（豪州）Associate 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
研究テーマ：「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」

○外国人留学生の受入れ

住田正幸

- ・文部科学省国費留学生（Hasan Mahmudul, バングラデシュ）（D3）

VI. その他（特記事項）

- 理学部・大学院理学研究科公開（2011年11月5日）において研究施設を公開し、およそ200名が見学した。上記とは別に、2011年度には26件総数267名が施設見学をしている。施設見学には、下村脩先生（ノーベル化学賞受賞）ご夫妻（2011年5月27日）および 秋篠宮殿下（2012年1月24日）がある。
- 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。また、統維持班の一員として両生類研究施設一階ロビーを総合博物館サテライト化に貢献している。
- 新種「アマミイシカワガエル」（共同通信 2011年9月29日、毎日新聞 2011年8月18日、南日本新聞 2012年1月23日）が紹介された。
- 透明ガエル「スケルピオン」について、新聞（中国新聞 2011年6月4日、読売新聞 2012年3月25日）やテレビ（TBS テレビ 2011年11月26日）で紹介された。

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 during *Xenopus* metamorphosis

[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。

本研究は、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、形態変化のタイミングを決めている要因を調べることを目的とする。

去年に引き続き、研究を進め、成果をまとめ、発表した。

(共同研究者：中島圭介、藤本健太)

[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。

i) 甲状腺ホルモン活性化酵素にはD1とD2があり、D2の方は薄い生理的甲状腺ホルモン濃度の条件下でも活性を有するが、D1は濃い濃度下でしか、活性を持たない。D1の発現プロファイルも調べた。

ii) 去年度、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前駆体T4で処理した時に甲状腺ホルモン活性化酵素D2 mRNAの誘導が観察されたが、甲状腺ホルモン受容体betaや甲状腺ホルモン不活性化酵素D3の発現を調べていなかった。両遺伝子のmRNAとも低濃度の甲状腺ホルモンにより発現は上昇するが、甲状腺ホルモン受容体alphaや甲状腺ホルモン活性化酵素D2mRNAと比較する

と、絶対量は極めて低かった。

iii) 甲状腺ホルモン合成阻害剤で長期間、幼生を処理すると、後肢でもD2 mRNA量が減少するが、更に、低濃度の甲状腺ホルモンで刺激すると、元の状態に復帰する。この時に甲状腺ホルモン受容体betaや甲状腺ホルモン不活性化酵素D3の発現を調べてみると、両遺伝子のmRNAとも低濃度の甲状腺ホルモンにより発現は上昇するが、甲状腺ホルモン受容体を過剰発現させた尾の筋細胞と同様に絶対量は極めて低かった。

甲状腺ホルモン受容体を過剰発現させた尾の筋細胞と後肢は、低濃度の甲状腺ホルモン前駆体T4で処理された時、最終的な運命は大きく違うが、甲状腺ホルモン受容体betaや甲状腺ホルモン活性化酵素D2や不活性化酵素D3遺伝子の発現のパターンは似ている。

2. ツメガエル甲状腺ホルモン受容体alpha mRNAの5'-UTR領域による翻訳抑制

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の発現量は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。

去年に引き続き、研究を進め、成果をまとめ、発表した。

[成果・考察]

i) 開始コドンの上流、161 bpがある甲状腺ホルモン受容体発現型ベクターと161 bpが無いものを幼生尾の筋細胞に導入させて、低濃度の甲状腺ホルモン前駆体T4で処理すると、5'-UTRの無い甲状腺ホルモン受容体発現型ベクターを発現させた筋細胞の方が早く死んだ。これは、生体内でも5'-UTRが甲状腺ホルモン受容体の発現を抑制したことを示す。

ii) 各種の両生類の甲状腺ホルモン受容体 alphaで保存されている翻訳抑制のシスエレメントに様々な塩基置換を導入して、培養細胞下での翻訳抑制活性への影響を調べた。エレメントIVではループを形成する3塩基中の1塩基を除き、変異を入れると翻訳抑制活性が失われた。しかし、uORFであるエレメントVでは塩基期配列特異性は低く、ORF構造が保たれば、概ね、活性を保持していた。

iii) 甲状腺ホルモン受容体 alpha mRNA 5'-UTRの翻訳抑制活性を持つ各シスエレメントをfirefly luciferase遺伝子や*Renilla luciferase*遺伝子の前に挿入したmRNAを合成して、in vitro麦芽抽出翻訳系で翻訳させてluciferase活性を調べた。各シスエレメントはin vitroの翻訳システムでも翻訳抑制活性を示した。

[将来の展望]

成果をまとめて発表した。現在は、各シスエレメントが生体内でも活性を示すかを調べるために遺伝子組換えガエルを作製する予定である。

3. ネットイツメガエルでの遺伝子破壊法の確立およびアルビノ系統の確立

The establishment of the gene knockout methods to produce the albino *Xenopus tropicalis* line

[目的]

Zinc-finger nuclease (ZFN)法やTranscription activator-like effector nuclease (TALEN)法は標的遺伝子を破壊するのに優れた方法である。これらの方法を用いて二倍体のネットイツメガエルで標的遺伝子破壊方法を確立し、その上でネットイツメガエルのアルビノ系統を確立することを目的とする。ネットイツメガエルには現在、アルビノ系統が無く、その作製が望まれている。

[成果・考察]

メラニン色素合成に重要な役割を果たす tyrosinase 遺伝子を標的として ZFN を合成して、その mRNA をネットイツメガエル受精卵に注入した。皮膚のメラニン色素を一部欠損するキメラ個体を複数得た。

[将来の展望]

今回得られた個体が性的に成熟した時に交配してアルビノネツタイツメガエルを作出する。

4. ツメガエル幼生の変態での尾の退縮における *ouro* 遺伝子の機能の再評価 Reexamination of *ouro* gene function in tail regression during metamorphosis of *Xenopus* tadpole

[目的]

井筒らが 2009 年に PNAS に発表した「Ouro 蛋白質を発現している尾が免疫系により拒絶されて退縮する。」という説は斬新なものであった。当時は私たちの研究室等が「変態クライマックス初期では尾の筋細胞が直接に甲状腺ホルモンに反応してアポトーシスをおこし、後半はそれに加えて細胞外基質分解酵素が甲状腺ホルモン反応遺伝子として誘導され、細胞が足場を失い、死んでいき、尾が退縮する。」と考えていた。前者の説によれば「Ouro 蛋白質を変態クライマックスに発現すれば拒絶されて死が促進される。」、後者の説は「甲状腺ホルモンシグナルを阻止すれば死なない。」となる。本研究は、この 2 つの説が共に正しいのか、またその時は、どちらの効果が大きいのかを明らかにすることを目的とする。

[成果・考察]

1) 変態クライマックス前後の尾における *ouro* 1 遺伝子と *ouro* 2 遺伝子の発現を解析した。尾の表皮には NF-stage 58 をピークとして両遺伝子が発現していたが、尾の筋肉には両遺伝子共に 1/1000 程度しか発現していなかった。

2) *ouro* 1 遺伝子と *ouro* 2 遺伝子の発現を生きた状態で区別するために、*ouro* 1 遺伝子に EGFP 遺伝子を *ouro* 2 遺伝子に mCherry 遺伝子を融合させた発現型ベクターを作製して、幼生尾の筋細胞に導入させて、経過観察している。

[将来の展望]

自然変態の経過で *ouro* 1 遺伝子と *ouro* 2 遺伝子を共発現している筋細胞が両遺伝子を発現していない筋細胞より早く死ぬかどうか、甲状腺ホルモンシグナルを抑制する DNTR 遺伝子を強制発現させた条件下では *ouro* 1、*ouro* 2 遺伝子発現が細胞死に影響を与えるかどうか、次年度の成果に期待している。また、筋細胞だけの導入だけでなく、今後は受精卵へ *ouro* 発現型ベクターを注入してキメラの遺伝子組換えガエルを作製して、筋組織以外での *ouro* 遺伝子の発現が細胞死に与える影響を見ていきたい。

5. 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 *Xenopus* tadpole tail resorption

[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決まった位置で発現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、本研究では、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。その発現パターンへのレチノイド処理による影響も解析する。最終的にはHox遺伝子が尾の退縮する運命を決定づけているのかどうかを明らかにする。

[成果・考察]

成熟個体でも Hox 遺伝子が相当な量で発現していることを発見した。その発現パターンは変態完了直後の小カエルと基本的に同じであった。ただし、小カエル後端において検出された *HoxA13* が成熟個体ではほぼ検出されなかった。

幼生をレチノイドで処理したところ、初期胚でのレチノイド処理同様 Hox 遺伝子発現パターンに変化が起きた。

[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. Keisuke Nakajima, Kenta Fujimoto and Yoshio Yaoita. Regulation of thyroid hormone sensitivity by differential expression of the thyroid hormone receptor during *Xenopus* metamorphosis. *Genes to Cells* (in press).

2. Morihiro Okada, Keisuke Nakajima, Yoshio Yaoita (2012) Translational regulation by the 5'-UTR of thyroid hormone receptor α (TR α) mRNA. *J. Biochemistry* 151: 519-531.

②総説・著書・その他

1. 矢尾板芳郎 (2012) 「蛙や昆虫の変態について」日本医事新報 No. 4584: 62-64.

③学会発表

国内学会

1. 中島圭介、藤本健太、矢尾板芳郎. 両生類変態における組織感受性は甲状腺ホルモン受容体 α の発現量によって決められる. 日本動物学会第82回大会 2011年9月22日 旭川市 大雪クリスタルホールなど

2. 田澤一朗、石田雄二、吉里勝利、矢尾板芳郎. 無尾両生類の尾域消失期に於ける Hox 遺伝子の発現プロファイル. 日本動物学会第82回大会 2011年9月21日

旭川市 大雪クリスタルホールなど

3. 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 84 回 日本生化学会大会 2011 年 9 月 24 日 京都市
4. 岡田守弘、中島圭介、矢尾板芳郎. 甲状腺ホルモン受容体 α mRNA の 5' 非翻訳領域に存在する翻訳制御配列に関する解析. 第 5 回日本ツメガエル研究集会、2011 年 10 月 6 日 静岡市
5. 岡田守弘、中島圭介、矢尾板芳郎. 甲状腺ホルモン受容体 α mRNA の 5' 非翻訳領域に存在する翻訳制御配列に関する解析. 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 16 日 横浜市
6. 田澤一朗、石田雄二、吉里勝利、矢尾板芳郎. 無尾両生類の尾域消失期に於ける Hox 遺伝子ファミリーの発現プロファイル. 2011 年度日本動物学会中国四国支部広島県例会 2012 年 3 月 3 日 東広島市 広島大学東広島キャンパス

国際学会

1. Morihiko Okada, Keisuke Nakajima, Yoshio Yaoita. Molecular analysis of translational regulation of thyroid hormone receptor alpha mRNA. Experimental Biology 2011 (ASBMB), Walter E Washington Convention Center, Washington, D. C. USA (2011. 4. 13)
2. Morihiko Okada, Keisuke Nakajima, Yoshio Yaoita. Molecular analysis of translational regulation of thyroid hormone receptor alpha mRNA. Seminar in Section on Molecular Morphogenesis Laboratory of Gene Regulation and Development Program on Cell Regulation and Metabolism Eunice Kennedy Shriver National Institute Child Health and Human Development (NICHD) National Institutes of Health (NIH), Bethesda, USA, April 2011.

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) 「甲状腺ホルモン受容体 alpha mRNA の uORF による翻訳抑制機構」 (代表) 1,560 千円

准教授・高瀬 稔 (Minoru Takase)

研究内容

1. 性転換機構の解析：ツチガエルへの性ホルモン投与についての基盤的研究

Analysis of mechanism of sex reversal: basic studies on effects of sex hormones on the frog *Rana rugosa*

[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、

(i) 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および生殖細胞などの生殖腺を形成する細胞の性分化機構

(ii) 幹細胞から生殖細胞などの生殖腺を形成する細胞への性分化機構

のどちらかの作用機構が働いていることが考えられる。本研究では、ツチガエル (*Rana rugosa*) を用いて、性ホルモン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]

雄と雌の両方に性転換が誘導され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地方集団間雑種個体を作成し、すでに精巣および卵巣への分化が起こっているステージ II-III およびステージ X の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。その後、飼育を継続し、変態期に生殖腺を取り出して組織学的に解析した。

[成果]

浜北集団と東広島集団を用いたステージ II-III およびステージ X の雑種幼生に TP 処理を行ったところ、それぞれ精巣を持つ個体が対照群に比べて有意に多かった。また、ステージ II-III とステージ X の投与群における性転換率に関して、顕著な違いは認められなかった。

[考察]

性転換し易い集団と性転換し難い集団の種内地方集団間雑種個体へ性ホルモンを投与したところ、性転換が誘導されたことから、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が不完全であることが考えられる。従って、2集団間の性転換能の違いは、主に性転換機構の有無に因ると考えられる。今回、性分化がすでに完了している幼生のステージ II-III およびステージ X の間で、アンドロゲンによる雄への性転換作用に顕著な差は認められなかったことから、浜北集団には性転換抑制機構は無いと思われるが、さらに様々な投与条件を検討する必要があると考えている。

[将来の展望]

今後、東広島集団ツチガエル幼生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とも考えられ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。また、東広島集団は強い性転換能を有することから、性転換抑制機構の有無については今後さらに解析する必要があると考える。性転換抑制機構が見つかった場合、両生類における性転換の多様性を理解するための有用な情報になると考える。また、他のツチガエル地方集団を用いて性ホルモン投与実験を行い、性転換能に関する多様性について検討する必要がある。新たな性転換型が見つかった場合、ツチガエルにおける性転換機構を解析するための有用な材料になると考える。

2. 性転換機構の解析：ツチガエル性転換過程におけるアンドロゲン受容体および LM04 の遺伝子発現

Analysis of mechanism of sex reversal: Expression of genes encoding androgen receptor and LM04 during sex reversal of the frog *Rana rugosa* tadpoles exposed to androgen

[目的]

ツチガエル地方集団間雑種へのテストステロンプロピオネート (TP) 投与実験により、集団間の違いは性転換機構の有無に因ることが考えられた。TP はアンドロゲン受容体 (AR) を介して性転換を誘導していることが考えられる。また、これまでネッタイツメガエル (*Silurana tropicalis*) の生殖腺を用いてマイクロアレイ解析を行ってきた。その結果、精巣と卵巣において、LM02 と LM04 がそれぞれ高い遺伝子発現を示した。そこで今回は、東広島集団または浜北集団、それらの集団間雑種の生殖腺における AR または転写調節因子もしくはオンコジーンとして機能していると考えられている LM04 の遺伝子発現を解析した。

[材料・方法]

ツチガエルの東広島集団幼生 (ステージ X) にテストステロンプロピオネート (TP) を 1 回腹腔内注射した後に経時的に生殖腺を取り出し、RNA を精製した。対照群には溶媒を腹腔内注射した。また、浜北集団および 2 集団間雑種の幼生 (ステージ X) から生殖腺を取り出し、RNA を精製した。それらの RNA を用いてアンドロゲン受容体 (AR) および LM04 をコードする遺伝子の単離および遺伝子発現解析を行った。また、成体ネッタイツメガエルの精巣および卵巣から RNA を精製し、RT-PCR 法により LM04 の遺伝子発現を解析した。

[成果]

(i) これまでに単離した東広島集団 AR cDNA に加え、今回は浜北集団の AR cDNA を単離した。それらの塩基配列を基にプライマーを設定し、東広島集団および浜北

集団、2集団間雑種集団の幼生（ステージX）におけるAR遺伝子発現を調べたところ、発現量に有意な差は認められなかった。また、東広島集団の性転換過程におけるAR遺伝子発現を調べたところ、顕著な変化は見られないことが確かめられた。

(ii) マイクロアレイの結果を確かめるために、成体ネッタイツメガエルの精巣および卵巣におけるLM04遺伝子発現を半定量性のあるRT-PCR法により解析したところ、同じく卵巣において有意に高い発現を示した。そこで次に、ツチガエル幼生の卵巣から精巣への分化転換過程におけるLM04遺伝子発現を解析した。まず東広島集団の生殖腺からLM04 cDNAを単離した。その塩基配列を基に設定したプライマーを用いてRT-PCR解析を行ったところ、ネッタイツメガエルと同じく卵巣において高い発現を示し、その後の分化転換過程において一時的に発現量が低くなったが、精巣に分化転換した後には発現量は再び増加した。

[考察]

(i) 東広島集団および浜北集団の2集団間においてAR遺伝子発現に顕著な差が認められなかったことから、2集団間の雄への性転換に関する遺伝的な違いは、AR mRNAの翻訳以後の違いに因ると考えている。

(ii) ツチガエルでは卵巣のみではなく、分化転換した精巣においても高いLM04遺伝子発現が観察され、分化転換過程では低いLM04遺伝子発現が観察された。ツチガエルの幼生では、分化した精巣と卵巣において共通の機能に参与していることが考えられた。ツチガエルの性転換過程の途中では生殖細胞数の減少が観察されることから、一つの可能性としてツチガエルLM04遺伝子は分化した生殖細胞の機能に参与していることが考えられる。

[将来の展望]

今後、ツチガエル幼生の精巣および卵巣においてLM04遺伝子を発現している細胞の同定が必用であると考えられる。さらに、これまでのマイクロアレイ解析によって同定されたネッタイツメガエル生殖腺における他の性差発現遺伝子に関して、ツチガエル性転換過程における遺伝子発現の変化を解析する必用がある。

研究業績

①原著論文

該当なし

②総説・著書・その他

該当なし

③学会発表

国内学会

1. 高瀬 稔「ツチガエルの2集団間雑種へのアンドロゲン投与による性転換の誘導」日本動物学会第82回大会 2011年9月21-23日 旭川.

2. 高瀬 稔「ツチガエル性転換過程におけるLM02およびLM04の遺伝子発現」第34回日本分子生物学会年会 2011年12月13-16日 横浜.

国際学会

該当なし

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)「カエル精巣卵形成に対する内分泌かく乱物質のエストロゲン作用とは異なる遺伝子発現」(代表) 1,700千円

助教・中島圭介 (Keisuke Nakajima)

研究内容

ネッタイツメガエルにおける遺伝子破壊法の確立およびアルビノ系統の作出
The establishment of the gene knockout methods to produce the albino
Xenopus tropicalis line

[目的]

近年開発された Zinc-finger nuclease (ZFN) 法はゲノム中の目的遺伝子を破壊することができる極めて効果的な手法である。本研究はこれらの手法をネッタイツメガエルで有効に利用することが可能であるか否かを検討するとともに、色素の沈着に必須な tyrosinase 遺伝子を破壊することにより、アルビノ系統を作出することを目的とする。

[材料・方法]

tyrosinase 遺伝子を破壊する ZFN の mRNA をネッタイツメガエルの受精卵にインジェクションし、体の一部で tyrosinase 遺伝子を決失した個体、つまり体の一部が白い個体を作成する。将来この個体同士を掛け合わせ、tyrosinase 遺伝子を全く持たないアルビノ系統を確立する。

[成果と考察]

ZFN 法により tyrosinase 遺伝子を一部決失したキメラ個体を得ることができた。ZFN 法は効果的では有るが、自分で作成するには技術的な困難が伴い、多種類の遺伝子破壊を行うことは現実的に不可能である。一方、新たな標的遺伝子破壊法として注目を集め始めた TALEN 法は低予算で自作できるという利点がある。このことから今後は TALEN 法がネッタイツメガエルで有効に利用することが可能であるか否かを検討する。

[将来の展望]

2011年度に得られたキメラ個体同士を掛け合わせ、tyrosinase 遺伝子を決失したホモ個体を得る。ネッタイツメガエルでは今のところ標的遺伝子破壊されたホモ個体を得られたという報告は無く、成功すれば大きな成果である。さらに本研究が成功した場合、アルビノのネッタイツメガエルが作成されることになり、様々な実験に役立つ貴重な遺伝子資源となることが考えられる。

研究業績

① 原著論文

1. Keisuke Nakajima, Kenta Fujimoto and Yoshio Yaoita. Regulation of thyroid hormone sensitivity by differential expression of the thyroid hormone receptor during *Xenopus* metamorphosis. *Genes to Cells* (in press).

2. Morihiro Okada, Keisuke Nakajima, Yoshio Yaoita (2012) Translational regulation by the 5'-UTR of thyroid hormone receptor α (TR α) mRNA. J. Biochemistry 151: 519-531.

② 総説・著書・その他

該当なし

③ 学会発表

国内学会

1. 岡田守弘、中島圭介、矢尾板芳郎. 甲状腺ホルモン受容体 α mRNA の5' 非翻訳領域に存在する翻訳制御配列に関する解析. (ポスター発表) 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月15日 横浜

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 mRNA の5' 非翻訳領域に存在する翻訳制御配列に関する解析. (口頭発表) 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月16日 横浜

3. 岡田守弘、中島圭介、矢尾板芳郎. 甲状腺ホルモン受容体 α mRNA の5' 非翻訳領域に存在する翻訳制御配列に関する解析. 第5回日本ツメガエル研究集会 2011年10月6日 静岡

4. 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84回日本生化学会大会 2011年9月24日 京都

5. 中島圭介、藤本健太、矢尾板芳郎. 両生類変態における組織感受性は甲状腺ホルモン受容体 α の発現量によって決められる. 第82回日本動物学会 2011年9月22日 旭川

国際学会

1. Molecular analysis of translational regulation of thyroid hormone receptor alpha mRNA. Morihiro Okada, Keisuke Nakajima, Yoshio Yaoita. ASBMB Annual Meeting, Washington DC, USA (2011, 00, April)

2. Morihiro Okada, Keisuke Nakajima, Yoshio Yaoita. Molecular analysis of translational regulation of thyroid hormone receptor alpha mRNA. Seminar in Section on Molecular Morphogenesis Laboratory of Gene Regulation and Development Program on Cell Regulation and Metabolism Eunice Kennedy Shriver National Institute Child Health and Human Development (NICHD) National Institutes of Health (NIH), Bethesda, USA, April 00, 2011.

- 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を調べた。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こし、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するビタミン E の抗酸化機能のかく乱

Disruption of Vitamin E-antioxidant-function in response to paraquat (herbicide)-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。ビタミン E は生体を脂質過酸化から防御するために欠かせない物質である。もし、ビタミン E の機能が農薬など化学物

質によってその機能がかく乱されたとしたなら、生体内に発生する活性酸素を除去できず、悪影響を及ぼすことに疑いはない。農薬の一つである除草剤パラコート (PQ) の遺伝毒性には脂質過酸化物が発生すると考えられており、ビタミンEはこの脂質過酸化物の発生を抑えることで染色体異常の誘起を阻害すると考えられた。しかしながら、PQと共存下にあるビタミンEはPQの遺伝毒性を阻害せず、むしろ、PQの電子ドナーとなって遺伝毒性を強化することがわかった。

3. ブチル化ヒドロキシトルエンは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を抑制しない

Butylated hydroxytoluene does not inhibit paraquat-induced structural chromosomal damage in cultured anuran leukocytes

化学物質が複合的反応し、それらの化学的変化が生物に与える影響はよくわかっていない。ビタミンEの合成アナログである抗酸化物質のブチル化ヒドロキシトルエンはビタミンEと同様に脂質過酸化を抑制する。しかしながら、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抑制することはせず、むしろ染色体損傷を増加させる結果となった。このようなことから、ビタミンE同様に、パラコートの共存下にあるヒドロキシトルエンは本来の働きである抗酸化作用をかく乱され、パラコートの電子ドナーとなることがわかった。化学物質が単独で働く場合と、複合的に作用する場合とではその働きが異なる一つの例である。

研究業績

①原著論文

1. Hanada, H. (2012) Phenolic antioxidant 2,6-di-tert-butyl-p-cresol (vitamin E synthetic analogue) does not inhibit 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridium dichloride (paraquat)-induced structural chromosomal damage in cultured leukocytes of the dark-spotted-frog *Pelophylax (Rana) nigromaculatus*. Hereditas (accepted).
2. Hanada, H. (2011) D1- α -tocopherol enhances the herbicide 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridium dichloride (paraquat, PQ) genotoxicity in cultured anuran leukocytes. Hereditas 148, 118-124.

②総説・著書・その他

該当なし

③学会発表

国内学会

該当なし

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* およびネッタイツメガエル *Xenopus tropicalis* を用いる。

[2011年度まで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。つまり脊髄に発現局在があり、番号の大きな遺伝子ほど、後方に発現していた。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* など複数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尾部における甲状腺ホルモン誘導性細胞死に影響を与えられない可能性がある。実際、幼生生体尾部の筋管での *Hoxa13* 機能阻害実験を行ったところ、*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。

[2011年度内に得られた結果と考察]

成熟個体でも Hox 遺伝子が相当な量で発現していることを発見した。その発現パターンは変態完了直後の小カエルと基本的に同じであった。ただし、小カエル後端において検出された *HoxA13* が成熟個体ではほぼ検出されなかった。この結果には2通りの解釈が可能である。1つは、小カエルにはまだ尾部由来の細胞（いずれ全て死滅する）が残っており、それが *HoxA13* を発現していたというもの。もう一つはこの遺伝子の発現領域が変態に伴って尾部より前方へシフトしたというもの。本研究の仮説と矛盾しないのは前者である。

幼生をレチノイドで処理したところ、初期胚でのレチノイド処理同様 Hox 遺伝子発現パターンに変化が起きた。これはレチノイン酸を介した Hox コード調節が胚同様幼生でも行われていることを示唆する。

[これからの展開]

脊髄や筋管での *Hoxa13* など尾部特異的の発現をする Hox 遺伝子の機能検定を *in vivo* で行うことが、本研究の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

該当なし

② 総説・著書・その他

該当なし

③ 学会発表

国内学会

1. 田澤 一郎（発表者）、石田雄二、吉里勝利、矢尾板 芳郎「無尾両生類の尾域消失期に於ける Hox 遺伝子の発現プロファイル」日本動物学会第82回大会 旭川市 大雪クリスタルホールなど 2011年9月21-23日

2. 田澤 一郎（発表者）、石田雄二、吉里勝利、矢尾板 芳郎「無尾両生類の尾域消失期に於ける Hox 遺伝子ファミリーの発現プロファイル」2012 年度 日本動物学会 中国四国支部広島県例会 東広島市 広島大学東広島キャンパス 2012 年 3 月 3 日

国際学会

該当なし

④科研費等の受け入れ状況

1. 平成 23 年度広島大学後援会サタケ教育研究助成「無尾両生類の変態における Hox 遺伝子の機能」300 千円

[分化制御機構研究部門]

准教授・古野伸明 (Nobuaki Furuno)

研究内容

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。

[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。去年はZNFを用いて、mosの遺伝子破壊を試みてpositiveな結果を得ている。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。

研究業績

①原著論文

1. Ueki, T., Furuno, N., Michibata, H. (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.
2. 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 analysis of the head-defects in the *Xenopus* embryos raised under hypergravity condition. *Space Util. Res.* 27: 198-200. (* Corresponding author)

4. Yanagisawa, M., Kashiwagi, K., Hanada, H., Shinkai, T., Yoshitome, S., Kubo, H., Sakai, M., Fujii, H., Yamashi, M., Kashiwagi, A., Furuno, N. *, Watanabe, M*. (2012) Analysis of the head-defects caused by hypergravity in early *Xenopus* embryos. *Biol. Sci. Space*, 26: 1-6. (* Corresponding author)

5. Yoshitome, S., Furuno, N., Prigent, C. and Hashimoto, E. (2012) The subcellular localization of cyclin B2 is required for bipolar spindle formation during *Xenopus* oocyte maturation. *Biochemical and Biophysical Research communication*, 422: 770-775.

6. 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. Hypergravity specifically affects head formation in the *Xenopus* embryos raised under hypergravity condition. *Space Util. Res.* 2012, in press. (* Corresponding author)

7. Fujiwara, Y., Kashiwagi, K., Nakagawa, M., Shinkai, T., Yanagisawa, M., Furuno, N., Hanada, H., Suzuki, K., Katsu, K., Yamashita, M., Yamamoto, T., Tanimoto, Y. and Kashiwagi, A. Effects of magnetically controlled microgravity and hypergravity environment on amphibian behavior. *Space Util. Res.* 2012, in press.

②総説・著書・その他

該当なし

③学会発表

国内学会

1. 関口 猛、鎌田 芳彰、古野 伸明、小林 英紀 ヘテロ 2 量体 G タンパク質の Gtr1、Gtr2 と Tor 複合体 1 との相互作用 日本遺伝学会第 83 回大会 2011 年 9 月 20 日 京都.

2. 藤原好恒、柏木啓子、中川真依、新海正、柳澤誠、古野伸明、花田秀樹、鈴木賢一、勝賢二郎、山下雅道、山本卓、谷本能文、柏木昭彦 両生類の行動に対する強磁場制御による微小および過重力の影響 第 28 回宇宙利用シンポジウム 2012 年 1 月 23 日 日本学術会議 東京.

3. 柳澤誠、古野伸明、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、山下雅道、柏木昭彦、渡部稔、鈴木賢一 過重力はフリカツメガエルの頭部形成（特に眼と脳）に特異的に影響を与える 第 28 回宇宙利用シンポジウム 2012 年 1 月 23 日 日本学術会議 東京.

4. Suzuki, K., Kashiwagi, K., Ochiai, H., Sakuma, T., Sakamoto, N., Kashiwagi, A., Yamamoto, T. and Furuno, N. Targeted mutagenesis of thyroid hormone receptor beta gene by engineered zinc finger nuclease in amphibian embryo. 第 44 回日本発生生物学会年会 2011 年 5 月 20 日 沖縄コンベンションセンター 宜野湾市.

5. 鈴木賢一、落合博、柏木啓子、古野伸明、山本卓、柏木昭彦「両生類の変態・再生研究における遺伝子改変動物の必要性」遺伝子機能解析の最前線-ZFN 及び TALEN を用いた遺伝子改変の実際- 2011 年 7 月 11 日 基礎生物学研究所 岡崎.

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 過重力はツメガエルの頭部形成に特異的に影響を与える。日本動物学会第 82 回大会 2011 年 9 月 22 日 旭川市大雪クリスタルホール 旭川.

国際学会
該当なし

④科研費等の受け入れ状況

1. 宇宙環境利用科学委員会研究班ワーキンググループ (2011) 両生類の生活環に対する過重力の影響 (分担) 150 千円

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。2011年度は以下の成果を挙げた。

(i) W染色体とY染色体の退化は独立に生じる

Independent degeneration of the W and Y sex chromosomes

XY型のY染色体は構造の変化によってX染色体との乗り換えが抑制されると、自身の遺伝子が退化し、染色体にも欠失が生じて次第に矮小化していく。ZW型ではW染色体が同様の退化の運命を辿る。ツチガエルはXY型とZW型の両方のタイプを地域集団に有しており、Y染色体とW染色体はいずれも第7染色体で相同でしかも異型化している。そこで、それぞれの退化の過程を調べるため、致死遺伝子の比較を行った。その結果、遺伝子退化によって生じた致死遺伝子はお互いに共有されていないことがわかった。しかも、W染色体上の致死遺伝子は2つの地方グループ間においても異なっていた。したがって、W染色体やY染色体の遺伝子退化は進化上、事前のシナリオを共有しておらず、それぞれ独立に進行していくものと考えられる。

(ii) X染色体に連鎖した色彩遺伝子の同定

Identification of an X-linked body color gene in the frog *Rana rugosa*

ツチガエルのX染色体に連鎖する色彩決定遺伝子 (white-yellow, w) を同定し、体色で雌雄を判別できる系統 (X^wX^w ♀ / X^wY^+ ♂) を確立した。この性連鎖色彩遺伝子の発見は両生類において初めてのケースである。この系統により受精後5日目から遺伝的雌雄の同定が可能になった。そこで幼生の生殖腺における遺伝子発現を調べたところ、性ステロイド産生に関与する2つの遺伝子 *Cyp17* と *Cyp19* (aromatase) が幼生初期の生殖腺で顕著な雌雄差発現を示すこと、さらに、*Dmrt1* と *Rspo1* がそれらに先んじて雄ないし雌で高い発現を示すことがわかった。

研究業績

①原著論文

1. Miura I, Ohtani H, and Ogata M (2012) Independent degeneration of the W and Y sex chromosomes in frog *Rana rugosa*. *Chromosome Research* 20: 47-55.

2. Miura I, Kitamoto H, Koizumi Y, Ogata M, and Sasaki K (2011) An X-linked body color gene of the frog *Rana rugosa* and its application to the molecular analysis of gonadal sex differentiation. *Sexual Development* 5: 250-258.

②総説・著書・その他

該当なし

③学会発表

国内学会

1. 原とおる、山本博章、三浦郁夫、古賀章彦. 脊椎動物の体色変異体を用いた活性型トランスポゾンの探索 日本遺伝学会 2011年9月21日 京都市

2. 三浦郁夫、小泉雄紀、大谷浩己、尾形光昭. 生殖腺の性分化決定機構の進化 - 性ホルモン依存から非依存へ- 染色体学会 2011年11月11日 平塚市

3. 三浦郁夫、綿貫岳人、市川洋子、藤田宏之. ナガレタゴガエルの性染色体 日本爬虫両生類学会 2011年10月10日 京都市

4. 尾形光昭、関谷國男、長谷川嘉則、大谷浩己、三浦郁夫. 佐渡島産ツチガエルの鳴き声について 日本爬虫両生類学会 2011年10月10日 京都市

5. 長井悠佳里、土井敏男、伊藤邦夫、藤谷武史、湯浅義明、小泉雄紀、尾形光昭、三浦郁夫. ナゴヤダルマガエルの遺伝的地域分化(II) -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 2011年10月10日 京都市

国際学会

1. Miura I. Recent topics on sex of the frog *Rana rugosa*. Workshop “Evolution of sex chromosomes and sex determination in vertebrates. 20-22 April 2011, Canberra, Australia

④ 科研費等の受け入れ状況

1. 科学研究費基盤C「性決定元祖遺伝子の双方向進化」(代表) 600千円

2. 新学術領域研究「ツチガエル地域集団における生殖腺性差構築システムの多様性と普遍性」(代表) 4,500千円

特任助教・柏木啓子 (Keiko Kashiwagi)

研究内容

1. 両生類における TALEN 技術を用いた標的遺伝子の破壊

Targeted gene disruption by TALENs in amphibians

[目的]

両生類の変態および再生は魅力的な生命現象であり、オタマジャクシの発生過程における体の作り換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。これらの生命現象に関与する遺伝子の機能を明らかにするために、特定の遺伝子を個体レベルで破壊する技術の確立は必要不可欠であった。私たちは、カスタマイズ TALE ヌレアーゼ (TALENs) を用いて、ツメガエルの標的遺伝子破壊を試みた。

[方法]

緑色蛍光タンパク質 (EGFP) 遺伝子のターゲット配列を認識する TALEN ペアの mRNA を EGFP トランスジェニックツメガエルの受精卵に顕微注入した。標的遺伝子の破壊を EGFP 蛍光観察、Cel-1 アッセイ、及びシーケンス解析により検証した。

[成果と考察]

TALEN は標的 DNA 配列を認識する TALE ドメインのリピートと、II 型制限酵素である FokI 由来のヌクレアーゼドメインから成る人工酵素である。標的配列に Double Strand Breaks (DSB) を高頻度に導入し、非相同末端結合 (NHEJ) によって修復される際に挿入や欠失を引き起こす。その結果、フレームシフトにより遺伝子破壊を高頻度で生じさせる。EGFP TALENs mRNA を注入した受精卵から発生したトランスジェニック胚では、顕著に EGFP 蛍光の減少が確認された。さらに、TALEN 標的領域を Cel-1 アッセイやシーケンスにより解析したところ、高頻度で挿入や欠失による変異が確認された。

[将来の展望]

今後、TALEN 技術を用いて変態や再生現象に重要な遺伝子の破壊を行っていく予定である。

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

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

[目的]

今年 6 月 18 日午後 2 時 (日本時間同 3 時) すぎに、中国が有人宇宙船での初のドッキングを成功させ、2020 年ごろを目指す宇宙ステーション建設に向けて大きな弾みをつけた。近い将来、月や火星探査へも参入していくであろう。

ヒトの長期間滞在に対する宇宙環境の影響に関しては今後も引き続いて数多くの研究が行われ詳細なデータの蓄積が必要である。両生類は宇宙環境が生物に及ぼす影響を調べる上で格好のモデル動物であって多くの地上および宇宙実験がなされてきた。

[方法]

過重力影響については2 G、5 Gを媒精後10分、20分の未受精卵、2細胞期の胚、原腸胚に印加して調べた。強磁場影響は11T(-1400T²m⁻¹)、15T(0T²m⁻¹)、12T(+1200T²m⁻¹)を印加した。

[成果と考察]

アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)を用いた過重力影響に関する私達の一連の研究から、負荷は受精直後に特に強くかかり、印加された受精卵から発生した胚には双頭・小頭・小眼などの奇形が発症した。これらの異常個体ではセメント腺のマーカであるXag、また前脳・中脳・眼のマーカであるXotx2の発現が抑えられていることや、頭部形成異常はWntシグナルの抑制が原因であることが明らかになった。過重力影響としてはこの他に、卵減数分裂における白斑や紡錘体の形成異常、アポトーシスの促進、ホルモンによる生体機能調節の異常等が見られた。

宇宙では磁場も地球上とは異なっている。アフリカツメガエルを用いた強磁場影響については、処理受精卵のその後の発生率は悪く、頭部やセメント腺の形成不全、頭部長-胴部長-尾部長の比率の変化、Xotx2やXag1の発現低下、卵母細胞における色素分布の異常が認められた。なお、磁場内での遊泳運動はアフリカツメガエル幼生よりもネッタイツメガエル[*Xenopus (Silurana) tropicalis*]幼生の方に甚大な影響が見られることもわかった。

重力や磁場の変化は生物の発生、成長、ホルモン分泌等に多大な影響を与えることが示唆された。

[将来の展望]

両生類を用いて、発生・性分化に対する重力・磁場影響を遺伝子レベルをも含めて、さらに調べる。

3. トランスジェニックガエルを用いた甲状腺ホルモンかく乱物質スクリーニングシステムの開発

Development of a screening system for thyroid hormone disrupting chemicals using transgenic *Xenopus laevis*

[目的]

現在、地球上に存在する人為起源の化学物質は十万種類以上と言われており、これらの化学物質が大量に環境中に放出され、生物に多大な影響を及ぼす可能性(特に内分泌かく乱作用)が危惧されている。無尾両生類は甲状腺ホルモン(TH)により

幼生から成体へと変態することから、甲状腺ホルモンかく乱作用を持つ化学物質の生体影響を試験評価するために適した実験動物である。私達は、THにより活性化される TRbeta 遺伝子のプロモーター/エンハンサーとホタルルシフェラーゼ遺伝子を連結させてつくったレポーター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 (Tg) 系統を既に確立している。この Tg 系統を利用した TH かく乱物質を評価する試験系の確立を目的として、F1 世代の TH 反応性や化学物質の影響をルシフェラーゼ活性により評価する方法を検討した。

[方法]

すでに樹立している TRbeta promoter/enhancer/Luciferase Tg 系統の F1 幼生に様々な濃度の TH (T3) を加え、個体レベルでのルシフェラーゼ活性をルミノメーターにより測定した。また、オリンパス LV200 発光顕微鏡を用いて *in vivo* ルシフェラーゼイメージング解析を行った。

[成果と考察]

in vivo ルシフェラーゼイメージング解析の結果、TH に高い反応性を示すことが知られている幼生の脳や四肢において、強いルシフェラーゼ活性の誘導を確認した。また、TH 暴露した Tg 幼生個体のホモジェネートを用いてルシフェラーゼ活性を測定した結果、濃度依存的なレポーター活性の増大も確認された。以上の結果により、この Tg 系統は、個体レベルでの TH 応答性をルシフェラーゼ活性によりモニターすることが可能であることが証明された。

[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 TH 作用をかく乱するものが含まれている。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は少なく、その開発が喫緊の課題である。本研究課題で開発したルシフェラーゼ遺伝子を導入したアフリカツメガエル Tg 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・高感度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スクリーニングしていく予定である。

研究業績

① 原著論文

1. 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 analyses of the head-defects in the *Xenopus* embryos raised under hypergravity conditions. II Space Utili. Res. 27: 198-200.

2. Yanagisawa, M., Kashiwagi, K., Hanada, H., Shinkai, T., Yoshitome, S., Kubo, H., Sakai, M., Fujii, H., Yamashi, M., Kashiwagi, A., Furuno, N. and Watanabe, M. (2012) Analyses of head-defects caused by hyper-gravity in early *Xenopus* embryos. Biol. Sci. Space, 26: 1-6.

② 総説・著書・その他

1. 「板櫃川で発見された後肢欠損ガエルの発生原因について」2011年11月発行 北九州市環境局

③ 学会発表

国内学会

1. Suzuki, K., Kashiwagi, K., Ochiai, H., Sakuma, T., Sakamoto, N., Kashiwagi, A., Yamamoto, T. and Furuno, N. Targeted mutagenesis of thyroid hormone receptor beta gene by engineered zinc finger nuclease in amphibian embryo. 第44回日本発生生物学会年会 2011年5月20日 沖縄コンベンションセンター 宜野湾市

2. 鈴木賢一、落合 博、柏木啓子、古野伸明、山本 卓、柏木昭彦. 遺伝子機能解析の最前線-ZFN 及び TALEN を用いた遺伝子改変の実際ー両生類の変態・再生研究における遺伝子改変動物の必要性 ZFN 研究会 2011年7月11日 基礎生物学研究所 岡崎市

3. Yanagisawa Makoto, Furuno Nobuaki, Watanabe Minoru, Kashiwagi Keiko, Hanada Hideki, Shinkai Tadashi, Yoshitome Satoshi, Kubo Hideo, Sakai Masao, Fujii Hirotsada, Suzuki Ken-ichi, Yamashita Masamichi, Kashiwagi Akihiko. Molecular analysis of the head-defects in the *Xenopus* embryos raised under hypergravity conditions. II. 第82回日本動物学会 2011年9月22日 旭川

4. 藤原好恒、柏木啓子、中川真依、新海 正、柳澤 誠、古野伸明、花田秀樹、鈴木賢一、勝賢二郎、山下雅道、山本 卓、谷本能文、柏木昭彦. Effects of magnetically controlled microgravity and hypergravity environments on amphibian behavior. 第28回宇宙利用シンポジウム 2012年1月23日 日本学術会議 東京

5. 柳澤 誠、古野伸明、柏木啓子、花田秀樹、新海 正、久保英夫、坂井雅夫、藤井博、山下雅道、柏木昭彦、渡部稔、鈴木賢一. 過重力はアフリカツメガエルの頭部形成（特に眼と脳）に影響を与える。第28回宇宙利用シンポジウム 2012年1月23日 日本学術会議 東京

6. Seigo Sanoh, Keiko Kashiwagi, Hideki Hanada, Kana Matsubara, Kohei Kawabata,

Tadashi Shinkai, Takashi Yamamoto, Ken-ichi Suzuki, Nariaki Fujimoto, Kazumi Sugihara, Shigeyuki Kitamura, Akihiko Kashiwagi, Shigeru Ohta. Effects of exposure to thyroid hormone disrupting chemicals on amphibian metamorphosis. 環境ホルモン学会 2011年12月2日 東京大学 山上会館 東京

7. 鈴木賢一、柏木啓子、佐久間哲史、落合 博、礪山由樹子、柏木昭彦、山本 卓. 両生類における ZFN/TALEN を用いた遺伝子破壊の実施例 第一回ゲノム編集研究会 2012年2月28日 広島大学

④ 科研費等の受け入れ状況

1. 平成 23 年度化学物質の内分泌かく乱作用に関するフェーズビリティステージⅡ研究「脳神経発達へ影響を及ぼす甲状腺ホルモンかく乱化学物質のスクリーニングシステム開発」(分担) 3,000 千円
2. 宇宙環境利用科学 WG「両生類の生活環に対する重力影響」(分担) 300 千円

[多様化機構研究部門]

教授・住田正幸 (Masayuki Sumida)

研究内容

1. バングラデシュの無尾両生類における種多様性と *Hoplobatrachus* 属の新種記載

Cryptic anuran biodiversity in Bangladesh with description of a new species of genus *Hoplobatrachus* (Anura, Dicroglossidae)

[目的]

これまでバングラデシュにおける無尾両生類の種多様性に関する研究は、限定的であり、体系的な無尾両生類のリストはなく、外部形態や野外観察のみに基づいた分類に関する研究が断片的に行われているにすぎない。近年、両生類においては、ミトコンドリア DNA の 16SrRNA 遺伝子が、無尾両生類の種の判別や、形態的に識別が困難な隠蔽種を見いだす上で有効なマーカーとなることが示唆されている。本研究では、バングラデシュにおける無尾両生類の種多様性の一端を明らかにするとともに、隠蔽種の存在について検証することを目的として、バングラデシュの広範な地域から無尾両生類を採集し、16SrRNA 遺伝子の解析を行った。

[材料・方法]

バングラデシュの 14 集団から集めた 107 個体のカエルを用いて、ミトコンドリア DNA の 16SrRNA 遺伝子の 1.4kbp の塩基配列を決定し、塩基置換率や系統関係を解析して、それらの結果に基づいて種の多様性を解明した。

[成果・考察]

本研究で収集したバングラデシュのカエルには、5 科 8 属 19 種が含まれ、そのうち少なくとも 8 種が、未記載種・新地産種・隠蔽種に相当することが明らかになった。これらのうち、バングラデシュの異なる 2 地域 (Cox's Bazar と Mymensingh) から採集された *Hoplobatrachus tigerinus* は遺伝的に大きく分化した隠蔽種を含んでおり、少なくともどちらか一方が、未記載種であることが明らかになった。*Fejervarya* 属の 2 種 (Large タイプと Small タイプ) および *Hylarana* cf. *taipehensis* は、それぞれ最近縁種から遺伝的に大きく分化しており、未記載種か、これまでにバングラデシュから知られていない種に相当すると考えられた。*Microhyla* cf. *ornata* サンプルには、基準産地から得られた *M. ornata* と遺伝的に全く異なる 2 つのタイプが含まれていたため、2 種の未記載種を含むと考えられた。さらに、*Hylarana* sp. と *Microhyla* sp. は、外部形態においても、16SrRNA データにおいても、これまでに報告されている同属のどの種にも該当せず、少なくともバングラデシュ新地産種であることが示された。また、*M. fissipes* がバングラデシュ新地産種として記録された。

さらに本研究では、前述の Cox's Bazar から採集した *Hoplobatrachus* 属の 1 種

を、新種 *Hoplobatrachus litoralis* として記載した。*Hoplobatrachus* 属の種は大型のがっしりしたカエルで、背中に多数の襞と肢指の間に発達した水かきをもつのが特徴であり、現在、4種 (*H. crassus*; *H. occipitalis*; *H. rugulosus*; *H. tigrinus*) が認められているが、これらは、19世紀半ばに記載されたもので、それ以来150年以上の間、本属には新種は記載されていなかった。Cox's Bazar サンプル (*H. litoralis*) の外部形態を、同属の種と比較したところ、新種 *H. litoralis* は、目から外鼻孔を通して上顎の前端までと、上顎の周辺部とに、顕著な幅の広い黒いバンドを有すること、眼瞼幅と外鼻孔間距離に比べて、上眼瞼間距離がせまいことなどで、近縁な *H. tigrinus* とは明らかに異なることが分かった。また、mtDNA 遺伝子の塩基配列に基づく、新種は16SrRNA 遺伝子で3.2%、Cyt *b* 遺伝子で14.2%も分化していることが分かった。新種の分布範囲は、バングラデシュの南東部の沿岸部に限定され、*H. tigrinus* の分布範囲とは明らかに分離していた。

[将来の展望]

本研究では、バングラデシュに分布する無尾両生類における種多様性に、分子情報を用いてアプローチした、ほぼ初めての研究である。DNA解析によりタクサ間での遺伝的分化の程度の定量化を行ない、その結果を、従来の形態に基づく分類と比較することによって、未記載種・新地産種・隠蔽種の存在を明らかにした。本研究の成果は、バングラデシュにおける無尾両生類における種の多様性の実態の把握に、先駆的な役割を果たすとともに、バングラデシュの無尾両生類の分類体系構築に、きわめて重要な貢献を果たした。バングラデシュは単純な地形だが、東部および南東部では種が多様に分化しており、これまでのところ、この他の属にもいくつかの新種があると推定され、今後の研究の発展が期待される。

2. 日本産ヌマガエルの新種記載

A new species of the *Fejervarya limnocharis* complex from Japan (Anura, Dicroglossidae)

[目的]

Fejervarya 属はアジアに広く分布しており、形態的によく似ていて分類が困難である。遺伝的に2グループ(東南アジアと南アジア)に分けられるが、東南アジアグループの分類学的研究は、ジャワで *F. limnocharis* の隠蔽種である *F. iskandari* が発見されたことにさかのぼる。その後、日本本土産ヌマガエルの集団は形態学的にも、遺伝学的にも、繁殖生理学的にも、明らかに *F. limnocharis* とは異なることが分かった。本研究では、これらの結果に基づいて、日本本土産のヌマガエルを新種として記載した。

[材料・方法]

F. limnocharis グループにおける基準産地インドネシア、マレーシアおよび日本本土(広島)の3集団のヌマガエル種群を用いて、外部形態を観察するとともに、

分子生物学的手法によるゲノム解析を行なった。また、交配実験によって生じたこれらの集団間雑種を用いて、精巢の組織学的観察および精子形成における減数分裂の観察を行なった。

[成果・考察]

外部形態計測に基づく判別分析の結果、これら3集団は形態学的に互いに明確に識別できた。また、雑種の精巢の組織学的観察や減数分裂の観察により、日本本土集団とインドネシア集団との雑種および日本本土集団とマレーシア集団との雑種においては、減数分裂において一価染色体や棒状染色体がかなり見られ、精子形成にかなりの異常があるが、インドネシア集団とマレーシア集団との雑種においては、精子形成は全く正常であることを明らかにした。さらに、マレーシア集団とインドネシア集団との塩基置換率はかなり小さく16S rRNA 遺伝子で0.2%、Cyt *b* 遺伝子で1.0%、インドネシア集団と日本本土集団との塩基置換率はかなり大きく16S rRNA 遺伝子で2.5%、Cyt *b* 遺伝子で11.5%であった。以上の形態学的、細胞学的、分子生物学的手法によって得られた結果に基づき、マレーシア集団は基準産地 *F. limnocharis* の亜種、日本集団は基準産地の *F. limnocharis* とは別種とするのが妥当であると考えられた。そこで、東広島市で採集された雄を基準標本として、新種記載を行った。本種は比較的小型で、遺伝的には *F. limnocharis* よりサキシマヌマガエルに近縁であるが、それより鼓膜、頭、前肢、後肢、足および脛の体長比が小さい。また、*F. multistriata*、*F. limnocharis* や *F. iskandari* より前肢、後肢、足、脛の長さが相対的に短い。

[将来の展望]

本種の日本本土内における遺伝的変異は小さい一方で、中部琉球集団は本土集団とはやや分化しており、さらに分類学的研究が必要である。中国には異なる2種 (*F. multistriata* と本種) の存在が示唆され、それぞれ南部と揚子江部に分布するようである。台湾産集団の分類学的位置もまだ明確には分かっていないため、今後の研究が必要である。

3. 中央琉球産絶滅危惧両生類5種の飼育下繁殖

Attempts at natural reproduction in five endangered amphibian species from Central Ryukyus

[目的]

中央琉球に分布する絶滅危惧(および天然記念物)の両生類5種イシカワガエル、アマミイシカワガエル、イボイモリ、ホルストガエル、オットンガエルは、奄美大島や沖縄島北部などに分布する両生類で、鹿児島県と沖縄県の天然記念物に、環境省レッドリストの絶滅危惧IB類またはII類に指定されるなど、早急な保護対策が求められている。本研究では、これら絶滅危惧種について効率的な域外保全に資することを目的に、実験室での適切な人工繁殖・飼育維持方法を確立した。

[材料・方法]

イシカワガエル、アマミイシカワガエル、ホルストガエル、オットンガエル、イボイモリは鹿児島県と沖縄県で天然記念物に指定されているため、採集には各県の許可申請が必要であるが、著者らは、これら全ての種について、既に天然記念物現状変更許可申請を得ている。各カエルについては、採集した雌個体に、ウシガエルの脳下垂体懸濁液を腹腔注射した。排卵した個体から採卵して、人工受精法により人工交配法を試みた。成熟した人工繁殖個体については、実験室での自然繁殖と飼育維持を試み、継代飼育維持システムを確立した。なお、イボイモリについては飼育下繁殖を試みるため、野外の産卵場所を確認し、その状況をもとに飼育装置を作製して、その中で自然繁殖を試みた。

[成果・考察]

2011年現在、奄美産アマミイシカワガエルの人工繁殖によって生まれた7年齢の人工繁殖個体500個体、人工繁殖個体から完全飼育下で自然繁殖によって誕生した2代目で1～2年齢1000個体を飼育維持している。また、沖縄産イシカワガエルについては、人工繁殖個体の2年齢100個体が順調に生育している。さらに、オットンガエルとホルストガエルについても、人工繁殖した2年齢の個体、それぞれ500個体と250個体が順調に発育している。イボイモリでは、沖縄産と徳之島産で実験室に作製した飼育装置の中で自然産卵に成功した。産卵行動は2月下旬から6月上旬まで行われ、産卵場所は野外における産卵と同様に、水辺付近の直接水に浸らない斜面であった。実験室で自然繁殖した1～2年齢100個体が順調に生育している。将来的には必要に応じてリリースも考慮に入れ、これらの絶滅危惧種について飼育下繁殖と域外保全を行い、「両生類ノアの方舟」を目指している。

4. 透明ガエル「スケルピオン」の量産化（継続）

Mass production of see-through frogs

[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ており、「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・将来の展望]

「透明ガエル」を増やし、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」への関心は高い。ただ、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。さらに今後は、実用化に向けては、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. Nishizawa, T., A. Kurabayashi, T. Kunihara, N. Sano, T. Fujii and M. Sumida (2011) Mitochondrial DNA diversification, molecular phylogeny, and biogeography of the primitive rhacophorid genus *Buergeria* in East Asia. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 59: 139-147.
2. Igawa, T., M. Okuda, S. Oumi, S. Katsuren, A. Kurabayashi, T. Umino and M. Sumida (2011) Isolation and characterization of twelve microsatellite loci of endangered Ishikawa's frog (*Odorrana ishikawae*). *Conservation Genet. Resour.*, 3: 421-424.
3. Sumida, M., N. Satou, N. Yoshikawa, A. Kurabayashi, M. M. Islam, T. Igawa, S. Oumi, S. Katsuren, H. Ota, N. Shintani, H. Fukuniwa, N. Sano and T. Fujii (2011) Artificial production and natural breeding of the endangered frog species *Odorrana ishikawae*, with special reference to fauna conservation in the laboratory. *Zool. Sci.*, 28: 834-839.
4. Djong, H. T., M. Matsui, M. Kuramoto, M. Nishioka and M. Sumida (2011) A new species of the *Fejervarya limnocharis* complex from Japan (Anura, Dicroglossidae). *Zool. Sci.*, 28 : 292-299.
5. Kurabayashi, A., M. Matsui, Daicus, M. B., H. S. Yong, N. Ahmad, A. Sudin, M. Kuramoto, A. Hamidy and M. Sumida (2011) From Antarctica or Asia? New

colonization scenario for Australian–New Guinean narrow mouth toads suggested from the findings on a mysterious genus *Gastrophrynoides*. BMC Evol. Biol., 11: 175.

6. Iwakoshi-Ukena, E., M. Soga, G. Okada, T. Fujii, M. Sumida and K. Ukena (2011) Characterization of novel antimicrobial peptides from the skin of the endangered frog *Odorrana ishikawae* by shotgun cDNA cloning. Biochem. Biophys. Res. Commun., 412 : 673–677.

7. Iwakoshi-Ukena, E., G. Okada, A. Okimoto, T. Fujii, M. Sumida and K. Ukena (2011) Identification and structure–activity relationship of an antimicrobial peptide of the palustrin-2 family isolated from the skin of the endangered frog *Odorrana*. Peptides, 32: 2052–2057.

8. Hasan, M., M. M. Islam, M. M. R. Khan, M. S. Alam, A. Kurabayashi, T. Igawa, M. Kuramoto and M. Sumida (2012) Cryptic anuran biodiversity in Bangladesh revealed by mitochondrial 16S rRNA gene sequences. Zool. Sci., 29: 162–172.

9. Sugawara, H., T. Igawa, M. Yokogawa, M. Okuda, S. Oumi, S. Katsuren, S. Kaneko, T. Umino, Y. Isagi and M. Sumida (2012) Isolation and characterization of ten microsatellite loci of endangered Anderson’s crocodile newt, *Echinotriton andersoni*. Conservation Genet. Resour., 4 : 595–598.

10. Kurabayashi, A., T. Nishitani, S. Katsuren, S. Oumi and M. Sumida (2012) Mitochondrial genomes and divergence times of crocodile newts: Inter-islands distribution of *Echinotriton andersoni* and the origin of a unique repetitive sequence found in *Tylototriton* mt genomes. Genes Genet. Syst., 87: 39–51.

②総説・著書・その他

1. Hasan, M., Khan, M. M. R. and Sumida, M. (2011) “Geographic distribution. *Hylarana leptoglossa* (Long-tongued Frog)” Herpetological Review 42: 562–563.

2. Hasan, M. and Sumida, M. (2012) “Geographic distribution. *Kaloula taprobanica* (Sri Lankan Bull Frog)” Herpetological Review, 43: 97.

3. Khan., M.M.R. and M. Sumida (2012) “Collaborative frog research of Bangladesh–updated information” Proceeding of 5th Fisheries Conference and Research Fair–2012, Bangladesh Fisheries Research Forum. Workshop held on BARC dated 18 January 2012, p 182. Dhaka, Bangladesh.

4. 菅原弘貴・井川武・岩井紀子・山室一樹・大海昌平・住田正幸「徳之島産イボイモリ (*Echinotriton andersoni*) の産卵行動の記録」爬虫両棲類学会報 2011 : 115-118.

③学会発表

国際学会

1. Alam, M. S., M. M. Islam, M. M. R. Khan and M. Sumida “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” 2011 Joint Meeting of Ichthyologists and Herpetologists (July 9, 2011, Minneapolis, USA)
2. Islam, M. M., M. M. R. Khan, M. Kuramoto, T. H. Djong and M. Sumida “Genetic divergence and reproductive isolation among the frogs of the genus *Fejervarya* from several Asian countries” (July 11, 2011, Minneapolis, USA)
3. Sumida, M., N. Satou, S. Oumi, A. Kurabayashi and M. Kuramoto “Inter- and intra-island divergence in *Odorrana ishikawae* (Anura, Ranidae) of the Ryukyu Archipelago of Japan, with description of a new species” 2011 Joint Meeting of Ichthyologists and Herpetologists (July 10, 2011, Minneapolis, USA)
4. Igawa, T., Oumi, S., Katsuren, S., Sumida, M. “Population structures and its causal landscapes of two endangered frog species of genus *Odorrana* – Different scenarios in two islands” Annual Conference of Society for Molecular Biology and Evolution (SMBE) 2011 (July, 27, 2011, Kyoto, Japan)
5. Igawa, T., Oumi, S., Katsuren, S., Sumida, M. “A case study of conservation genetics for endangered species in Japan: Population structures and its causal landscapes of two endangered frog species of genus *Odorrana*” Basic Science International Conference 2012 (February, 2012, Malang, Indonesia)

国内学会

1. 岩越-浮穴栄子・浮穴和義・沖本愛子・曾我美幸・岡田玄也・佐野尚美・藤井保・菅原芳明・住田正幸「絶滅危惧両生類イシカワガエルの皮膚から単離した9種類の抗菌ペプチド」日本動物学会第63回中国・四国支部大会 2011年5月14日 高松
2. 住田正幸・佐藤直樹・倉林敦・大海昌平・倉本満「奄美大島のイシカワガエルは沖縄とは別種 — 新種『アマミイシカワガエル』誕生」日本遺伝学会第83回大

会 2011年9月22日 京都

3. Djong, T. H.・M. Matsui・M. Kuramoto・M. Nishioka・M. Sumida “A new species of the *Fejervarya limnocharis* complex from Japan (Anura, Dicroglossidae)” 日本爬虫両棲類学会第50回記念大会 2011年10月8～10日 京都

4. 菅原弘貴・井川武・大海昌平・勝連盛輝・横川昌史・井鷲裕司・住田正幸 「絶滅危惧種イボイモリのマイクロサテライト DNA を用いた集団構造解析と飼育下繁殖の試み」 日本爬虫両棲類学会第50回記念大会 2011年10月9日 京都

5. 井川武・大海昌平・勝連盛輝・住田正幸 「絶滅危惧種イシカワガエルにおける集団構造とその景観要因」 日本爬虫両棲類学会第50回記念大会 2011年10月10日 京都

6. 倉林敦・松井正文・Amir Hamidy・Daicus M. Belabat・倉本満・住田正幸 「オセアニアヒメアマガエル亜科はどこからきたのか？：亜科所属不明属 *Gastrophrynoidea* の系統的 position に基づく推定」 日本爬虫両棲類学会第50回記念大会 2011年10月8～10日 京都

7. 掛橋竜祐・倉林敦・大海昌平・勝連盛輝・細将貴・住田正幸 「ミトコンドリアゲノム情報に基づく *Babina* 属の系統的 position」 日本爬虫両棲類学会第50回記念大会 2011年10月10日 京都

8. 新谷望・嶋村正樹・勝連盛輝・倉林敦・住田正幸 「イシカワガエル青色変異個体の皮膚色素胞単位の観察」 日本爬虫両棲類学会第50回記念大会 2011年10月10日 京都

9. 宇野好宣・西田千鶴子・高木知世・井川武・上野直人・住田正幸・松田洋一 「無尾両生類における性染色体の起源とその進化に関する分子細胞遺伝学的研究」 日本染色体学会第62回年会 2011年11月12日 平塚

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 13,410千円 (担当 住田正幸、
矢尾板芳郎)

2. 奨学寄付金 50千円

准教授・鈴木 厚 (Atsushi Suzuki)

研究内容

胚発生初期に背腹と頭尾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、背腹と頭尾の体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、基本的な体の体制（ボディープラン）が確立する。近年の研究から、様々な細胞増殖因子によって体軸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（Bone Morphogenetic protein, BMP）によって、頭尾軸は後方化因子（Wnt・FGF・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、背腹と頭尾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、ほとんど理解が進んでいなかった。最近、私達の発見を含めて、体軸形成の調和機構に関する知見が得られつつある（Fuentealba *et al.* *Cell* 131, 980-993, 2007; Eivers *et al.* *Science Signaling* 4, ra68, 2011; Takebayashi-Suzuki *et al.* *Developmental Biology* 360, 11-29, 2011）。本研究では、アフリカツメガエル胚を用いた機能スクリーニングにより新たに単離した Biz (BMP inhibitory zinc-finger) が、背腹軸と頭尾軸の制御に関わることから、Biz の機能解析を通じて体軸形成の調和機構を明らかにすることを目的とした。

[成果と考察]

昨年度までの研究により、Biz が腹側化因子 BMP のシグナルを抑制して神経誘導（背側化）を引き起こすこと、および、他の細胞増殖因子シグナル（Wnt）と協調して頭尾軸形成を調節することを明らかにしてきた。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）をアフリカツメガエル初期胚に注入して機能阻害実験を行った。Biz 阻害胚において、頭尾（前後）軸と背腹軸で異なった発現を示す様々なマーカー遺伝子の発現変化を解析することで、体軸形成における Biz の必要性を検討した。

頭尾軸形成について調べてみると、後方神経マーカーの1つである HoxB9 の発現が著しく低下することが分かった。また、この表現型は、Biz MO の標的配列をもたない変異型 Biz の過剰発現によって回復することから、Biz 機能阻害による特異的な表現型であることが確認できた。したがって、Biz は、胚の後方領域の形成に重要であり、頭尾軸の制御に必要であると考えられた。一方、背腹軸形成について調べると、Biz MO 注入胚では、神経マーカー NCAM の発現が著しく低下することが分かった。しかし、興味深いことに、別の神経マーカー Sox2 の発現は、ほとんど影響を受けていなかった。背腹軸形成が進行して背側と腹側にそれぞれ神経と表皮が分化し始めると、神経領域では、最初に Sox2 が発現して神経分化への方向付けが行われ、続いて最終的な神経分化が進むと NCAM の発現が始まることが知られて

いる。したがって、Biz 機能阻害により、Sox2 の発現が変化せずに NCAM の発現が抑制されていることは、Biz が神経分化の方向付けの段階ではなく、より後期の神経分化段階に必要であることを示している。現在、神経の終末分化に対する影響や、胚の後方領域だけでなく前方（頭部）領域の変化についても詳細な検討を行っている。

[将来の展望]

これまでの研究では、Biz 過剰発現と機能阻害の表現型を解析することによって、体軸形成における Biz の重要性が明らかになりつつある。今後は、Biz による背腹軸と頭尾軸の制御機構を分子レベルで解明することが、体軸形成の連携機構を明らかにするうえで非常に重要になると考えている。背腹軸の制御については、Biz が腹側化因子 BMP のシグナル伝達を Smad レベルで抑制することを既に明らかにしているので、Biz が Smad を調節する機構を中心に解析を進めていく。一方、頭尾軸の制御については、Biz が Wnt シグナルと協調的に働くことに着目し、Biz による Wnt シグナルの制御機構を明らかにしたいと考えている。さらに、私達が既に論文発表をした FoxB1 転写因子も Biz と同様に体軸形成の調和に関与するので（詳細については本研究部門・竹林公子特任助教の項目を参照）、FoxB1 と Biz の機能的な関連や役割分担についても明らかにしたい。これらの研究から、頭尾軸と背腹軸の調和機構の全体像や制御ネットワークが明らかになり、ボディープランの成立機構が明確になると考えている。最終的には、ボディープランの成立機構が明らかになることで、動物の多様な形態が生じる機構の理解に繋がると期待している。

研究業績

①原著論文

1. Takebayashi-Suzuki, K., Kitayama, A., Terasaka-Iioka, C., Ueno, N. and Suzuki, A. (2011) “The forkhead transcription factor FoxB1 regulates the dorsal-ventral and anterior-posterior patterning of the ectoderm during early *Xenopus* embryogenesis.” *Developmental Biology* 360, 11-29
2. Katsu, K., Tokumori, D., Tatsumi, N., Suzuki, A., and Yokouchi, Y. (2012) “BMP inhibition by DAN in Hensen’s node is a critical step for the establishment of left-right asymmetry in the chick embryo.” *Developmental Biology* 363, 15-26

②総説・著書

該当なし

③学会発表

(国内学会)

1. Kimiko Takebayashi-Suzuki, Atsushi Kitayama, Chie Terasaka-Iioka, Naoto

Ueno and Atsushi Suzuki “A mechanism coordinating the establishment of the dorsal-ventral and anterior-posterior axes during early *Xenopus* embryogenesis” 「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44回 日本発生生物学会 2011年5月20日 沖縄

2. 竹林-鈴木公子、小西秀典、鈴木 厚 「両生類の神経誘導を保証する fail-safe 機構」第5回 日本ツメガエル研究集会 2011年10月6日 熱海

3. 竹林-鈴木公子、小西秀典、鈴木 厚 “A fail-safe mechanism assuring the induction of neural tissue during amphibian embryogenesis” 「両生類の神経誘導を保証する fail-safe 機構」第34回 日本分子生物学会 2011年12月13日 横浜

4. 鈴木 厚 「FoxB1 によるボディープランの制御と神経誘導の保証機構」日本発生生物学会 秋期シンポジウム 2011 2011年12月19日 岡崎

5. 竹林-鈴木公子、小西秀典、鈴木 厚 「両生類の神経誘導を保証する分子機構」日本動物学会中国四国支部 広島県例会 2012年3月3日 東広島

6. 小西秀典、竹林-鈴木公子、宮本達雄、永田智子、鈴木 厚 「胚発生過程で背腹軸と頭尾軸形成が調和する分子機構の解析」日本動物学会中国四国支部 広島県例会 2012年3月3日 東広島

(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・倉林 敦 (Atsushi Kurabayashi)

研究内容

絶滅危惧種イボイモリのミトコンドリアゲノムの分子進化と分岐年代推定に基づく系統地理学的考察

Mitochondrial genomes and divergence times of crocodile newts: Inter-islands distribution of *Echinotriton andersoni* and the origin of a unique repetitive sequence found in *Tylototriton* mt genomes

[目的]

現在、イボイモリ類(有尾目イモリ科)としては、*Echinotriton* 属の *E. andersoni* と *E. chinhaiensis* および 8 種の *Tylototriton* の 2 属 10 種が記載されている。これらのイモリは、原始的な体制を残していることから生きた化石と呼ばれ、また、その多くが絶滅危惧種に指定されている。本研究では、以下の点を明らかにすることを目的として研究を行った。(1) ミトゲノムの中でも、イボイモリの集団解析に適した進化速度の速い遺伝子や領域を明らかにし、将来的に絶滅危惧種の保全研究に資する。(2) 日本の西南諸島の限られた島にのみ分布するイボイモリ (*E. andersoni*) の島間の分岐年代を推定し、現在の分布が、島の分断によって形成されたのか、島の分断とは独立に成立したのかを検証する。(3) 本研究の過程で、一部のイボイモリ類のミトゲノムには、他の脊椎動物や有尾類には見られない、複数の遺伝子を含んだ直接反復配列が存在することが分かった。その起源および分子進化様式を明らかにする。

[材料・方法]

沖縄島産および奄美大島産イボイモリ (*E. andersoni*) とさらに、*Tylototriton* 6 種 (*T. asperrimus*, *T. taliangensis*, *T. kweichowensis*, *T. shanjing*, *T. verrucosus*, *T. cf. wenxianensis*) を材料に用いた。沖縄島産イボイモリと *T. verrucosus* については、ミトゲノムの全塩基配列を決定し、その他の種については、部分塩基配列 (tRNA-LeuUUR~cox1 遺伝子までの領域および cob~tRNA-Pro 遺伝子までの領域) を決定した。

LA-PCR 法によるミトゲノム増幅と、プライマーウォーキング法によるシーケンスによってミトゲノム配列を決定した。この操作のために、44 種のプライマーを用いた。このうち、23 種のプライマーは、本研究で新たにデザインした。

得られた塩基配列情報を用いて、系統解析および分岐年代解析を行った。系統解析には、最尤法とベイズ法を用い、分岐年代解析には、Bayesian relaxed clock 法を用いた。それぞれの解析は、Treefinder、MrBayes3.12、Multidivetime プログラムを用いて実施した。

[結果・考察・成果]

沖縄島産イボイモリ *E. andersoni* と、*T. verrucosus* のミトゲノムの全長を決

定した。それぞれ 16268bp と 17100bp のゲノムサイズであり、後生動物のミトゲノムに一般的に見られる 37 種類の遺伝子がコードされていた。しかし、後者のゲノムでは、cob 遺伝子の下流、tRNAThr 遺伝子、その下流の非コード領域を含む部位が 3 重重複していた。この結果、本種のゲノムはやや長くなっており、また 2 つの完全な tRNA-Thr 遺伝子をコードしていた（重複 3 コピーめの tRNA-Thr 遺伝子は偽遺伝子となっていた）。他の *Tylototriton* 属を調査した所、*T. kweichowensis* と *T. shanjing* のミトゲノムで、同じ領域が 2 重重複していることが明らかになった。

今回決定した 2 種のイボイモリ類のミトゲノムと、既に報告されていた 3 種のイボイモリのミトゲノムを比較し、イボイモリ類の中で、最も進化速度の速いミトゲノム領域を検索した。その結果、イボイモリ類では、*nad1*、*nad2*、*atp6*、*nad4*、*nad3* などのタンパク質遺伝子の進化速度が速いことが分かり、これらの遺伝子が種内や近縁種間の遺伝的解析や系統解析に有用であることが示唆された。一方で、多くの脊椎動物のミトゲノムに置いて最も進化速度が速いとされているコントロール領域（D-loop 領域）は、イボイモリ類では非常に進化速度が遅いことが分かった（*12SrRNA* に次いで 2 番目に遅い）。

ミトゲノム全遺伝子の塩基配列データ（13519 塩基座位）、および、tRNA-LeuUUR～*cox1* 遺伝子までの領域（2497 塩基座位）を用いて、系統解析および分岐年代推定を行った。系統解析の結果、イボイモリ類は単系統群であり、イモリ科 *Pleurodelinae* 亜科のクレードに含まれ、*Pleurodeles* 属がその姉妹群となるという従来の仮説が確かめられた。また、先行研究のデータとあわせ、本研究では全てのイボイモリ種を系統解析に含めたが、本研究で用いた *T. cf. wenxianensis* はどの種とも単系統群を形成せず、むしろ *T. asperrium* と *T. wenxianensis* を含むクレードの姉妹群となった。このことは、本研究で用いた *T. cf. wenxianensis* は、既に記載されているどのイボイモリ種にも該当しない可能性が高いことを示しており、同時に、イボイモリ類の種多様性が未だ十分に解明されていないことを示唆するものであった。また、cob 遺伝子から非コード領域までが重複している 3 種のイボイモリ類（*T. kweichowensis*、*T. shanjing*、*T. verrucosus*）は単系統群を形成した。この結果と、他のイボイモリ類や有尾類のミトゲノムに相同の重複が見られないことから、本重複は、これら 3 種のイボイモリ種の共通祖先（およそ 1500～800 万年前）で生じた共有派生形質であると考えことができ、今後のイボイモリの進化研究に利用可能な系統マーカーとして活用しうる可能性がある。

南西諸島産（沖縄島・奄美大島・徳之島産）の *E. andersoni* と、中国浙江省にのみ分布する *E. chinhaiensis* の分子系統学的分岐年代を、琉球弧とユーラシア大陸および、各島の古地理学上の推定分断時期と比較した。その結果、各地域のイボイモリ類の系統分岐年代は、大陸と琉球弧および琉球各島が分断したと推定される時期よりも遥かに古いと推定された。具体的には以下の通りである。① *E. andersoni* と *E. chinhaiensis* の分岐年代：1800–1650 万年前、ユーラシア大陸と琉球弧：350–100 万年前、② 沖縄島産イボイモリと奄美大島–徳之島産イボイモリの分岐年代：900–700 万年前、同地域の分断時期 150–100 万年前、③ 奄美大島と徳之島産イボイモリの分岐年代：およそ 150 万年前、同地域の分断時期 100–2 万年

前。南西諸島産の両生類の系統分岐と分布域形成は、古地理学的な分断イベントによって生じたとする例が見られ、実際に分岐年代と地理的分断年代が一致する場合もある。しかし、本研究の結果は、南西諸島に関わる *Echinotriton* 属の系統分岐と現在の分布域形成は、島の形成などの地理的な分断によらず、むしろ、そのようなイベントに先立って生じたことを明確に示している。(筆者は、イボイモリの移動能力が低いため、集団が孤立する頻度が高いことが原因と考えている。)

3種のイボイモリ類で見つかった重複領域が単一起源である(かつ、この領域に生じる変異が選択的に中立である)ならば、各イボイモリにおいて重複領域間の塩基置換数はほぼ同一になるはずである。しかし、実際には、重複領域間の塩基相同性はイボイモリ種間で異なっていた。具体的には、*T. verrucosus* の3重重複におけるリピート1とリピート2の相同性は98.2%である(この高い相同性は、本種の系統で最近になってリピート1から2がコピーされたと考えられる)が、リピート1とリピート3では68.4%、リピート2と3では66.2%である。また、*T. kweichowensis* の2つのリピートは、79.1%で、*T. shanjing* では、64.6%である。これらの違いは、各種に至系統で独立に相同部位がリピートを生じたと考えるよりも、むしろ「協調進化」イベントの生じた回数と時期、および協調進化に含まれた領域の違いによって説明可能である(なお、協調進化は、複数の動物ミトゲノムの重複領域でよく見られる塩基配列均一化現象である。)特に、*T. verrucosus* の3重重複のリピート1・2は非常に相同性が高いが(ともに439bpで、98.2%)、リピート3は、両者と相同性が低い(68.4%と66.2%)。しかし、リピート3の上流域57bpは、リピート2の相同部位と非常に良く似ており(57bp中1塩基のみが違う)、リピート2の同部位は、リピート1の相同部位とはあまり似ていない(87.7%:57bp中7塩基が異なっている)。このことは、比較的最近に、リピート2と3の上流57bp部位に協調進化イベントによる塩基配列の均一化が生じたことを示している。また、協調進化の分子メカニズムには、ストランドスリッページとその後のループアウトを伴う複製エラーモデルと、一般的な相同組換えモデルが提唱されているが、前者のモデルでは、*T. verrucosus* の3重重複のような入れ子式の部位での塩基配列均一化を説明することが難しいため、イボイモリ類のミトゲノムでは、相同組換えを介した協調進化が生じたことが示唆された。

以上の成果を論文にまとめ、Genes & Genetic Systems 誌に公表した。

研究業績

① 原著論文

1. Nishizawa, T., A. Kurabayashi, T. Kunihara, N. Sano, T. Fujii & M. Sumida. Mitochondrial DNA diversification, molecular phylogeny, and biogeography of the primitive rhacophorid genus Buergeria in East Asia. Mol. Phylogenet. Evol. 59: 139-147 (2011).
2. Igawa, T., M. Okuda, S. Oumi, S. Katsuren, A. Kurabayashi, T. Umino & M. Sumida. Isolation and characterization of twelve microsatellite loci of

endangered Ishikawa's frog (*Odorrana ishikawae*). *Conservation Genet. Resources* 3: 421-424 (2011).

3. Sumida, M., N. Satou, N. Yoshikawa, A. Kurabayashi, M.M. Islam, T. Igawa, S. Oumi, S. Katsuren, H. Ota, N. Shintani, H. Fukuniwa, N. Sano & T. Fujii. Artificial production and natural breeding of the endangered frog species *Odorrana ishikawae*, with special reference to fauna conservation in the laboratory. *Zoological Science* 28: 834-839 (2011).

4. Kurabayashi, A., M. Matsui, M. B. Daicus, H.-S. Yong, N. Ahmad, A. Sudin, M. Kuramoto, A. Hamidy & M. Sumida. From Antarctica or Asia? New colonization scenario for Australian-New Guinean narrow mouth toads suggested from the findings on a mysterious genus *Gastrophrynoidea*. *BMC Evol. Biol.* 11: 175 (2011).

5. Kurabayashi, A.+, T. Nishitani+, S. Katsuren, S. Oumi & M. Sumida (2012) Mitochondrial genomes and divergence times of crocodile newts: Inter-islands distribution of *Echinotriton andersoni* and the origin of a unique repetitive sequence found in *Tylosotriton* mt genomes. *Genes & Genetic Systems* 87: 39-51 (2012). +equally contribution.

6. Hasan, M., M.M. Islam, M.R. Khan, M.S. Alam, A. Kurabayashi, T. Igawa, M. Kuramoto & M. Sumida. Cryptic anuran biodiversity in Bangladesh revealed by mitochondrial 16S rRNA gene sequences. *Zoological Science* 29: 162-172 (2012).

② 総説・著書・その他
該当なし

③ 学会発表
国際学会

1. Sumida, M., Satou, N., Oumi, S., Kurabayashi, A. and Kuramoto, M. "Inter- and intra-island divergence in *Odorrana ishikawae* (Anura, Ranidae) of the Ryukyu Archipelago of Japan, with description of a new species" 2011 Joint Meeting of Ichthyologists and Herpetologists (July 10, 2011, Minneapolis, USA)

国内学会

1. 倉林敦・松井正文・Amir Hamidy・Daicus M. Belabat・倉本満・住田正幸「オセアニアヒメアマガエル亜科はどこからきたのか? : 亜科所属不明属

Gastrophrynoideaの系統的位罫に基づく推定」日本爬虫両棲類学会 第50回記念大会 2011年10月8～10日 京都

2. 掛橋竜祐・倉林敦・大海昌平・勝連盛輝・細将貴・住田正幸「ミトコンドリアゲノム情報に基づく Babina 属の系統的位罫」日本爬虫両棲類学会 第 50 回記念大会 2011 年 10 月 10 日 京都
3. 新谷望・嶋村正樹・勝連盛輝・倉林敦・住田正幸「イシカワガエル青色変異個体の皮膚色素胞単位の観察」日本爬虫両棲類学会 第50回記念大会 2011年10月10日 京都
4. 住田正幸・佐藤直樹・倉林敦・大海昌平・倉本満「奄美大島のイシカワガエルは沖縄とは別種 — 新種『アマミイシカワガエル』誕生」日本遺伝学会第83回大会 2011年9月22日 京都

④ 科研費等の受け入れ状況

1. 日本学術振興会科学研究費補助金・若手研究 (B) (代表) 2,200 千円

特任助教・竹林公子 (Kimiko Takebayashi-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て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。

特に、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ている。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ている。本年度は、複数の制御因子が協調して BMP 応答を制御していることから、これらの因子による制御ネットワークを明らかにすることを目的とした。

[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だけでなく、Wnt・FGF 経路を活性化して胚を後方化することを示した。すなわち、FoxB1 は、胚の背腹軸と頭尾軸の形成を制御し、これらの軸形成システムを連携させる遺伝子であることが分った。さらに、FoxB1 が、上流で働く XOct-25 と協調して制御ネットワークを形成することを明らかにし、FoxB1 が神経誘導を安定的に行うために働いている可能性を提示した。本年度は、神経外胚葉で発現している FoxB1 が、外胚葉の裏打ちをしている中胚葉と協調的に働いて、神経誘導を促進していることを見出し、その分子メカニズムを解析した。

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、FoxB1 が後方神経の形成に必要であることが確認できる。しかしながら、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。昨年度までに FoxB1 遺伝子の上流で働く XOct-25 遺伝子が FoxB1 機能阻害の影響を補っていることを明らかにした。しかし、FoxB1 と XOct-25 を発現する外胚葉の直下には、神経誘導因子を分泌

している中胚葉組織が存在しており、中胚葉からの神経誘導因子が FoxB1 機能阻害の影響を補うことも予想された。そこで、原腸胚期において、外胚葉-中胚葉間の相互作用を外原腸胚作製法や外植体法を用いて部分的に抑制し、神経誘導における FoxB1 と中胚葉の協調的な働きを調べた。その結果、FoxB1 単独の阻害では神経形成がほぼ正常に行われるのに対して、FoxB1 機能阻害と外胚葉-中胚葉間相互作用の抑制を組み合わせた場合は、神経誘導が著しく低下することが分った。すなわち、外胚葉に発現する FoxB1 と中胚葉との間で、協調的な神経促進作用が存在することが確認できた。以上の結果から、FoxB1 は、外胚葉内において XOct-25 と制御ネットワークを形成するだけでなく、中胚葉との組織間相互作用を介して神経形成を促進することが明らかになった。中胚葉には複数の神経誘導因子 (noggin, chordin, follistatin, cerberus 等) が発現していることが知られており、現在、これらの因子と FoxB1 の機能的関連について解析を進めている。

[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に比べ、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 (本研究部門・鈴木准教授の項目を参照)。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。背腹軸と頭尾軸の連携機構が明らかになることによって、個体のボディープランの成立機構や多様な形態が生じる機構を理解することが可能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いることや、外胚葉で発現する FoxB1 が中胚葉との協調作用を介して神経誘導を促進していることが明らかになり、FoxB1 は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、実験的な裏付けをおこなって、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

1. Kimiko Takebayashi-Suzuki, Atsushi Kitayama, Chie Terasaka-Iioka, Naoto Ueno and Atsushi Suzuki (2011) The forkhead transcription factor FoxB1 regulates the dorsal-ventral and anterior-posterior patterning of the ectoderm during early *Xenopus* embryogenesis. *Developmental Biology*, 360: 11

②総説・著書・その他

該当なし

③学会発表

(国内学会)

1. Kimiko Takebayashi-Suzuki, Atsushi Kitayama, Chie Terasaka-Iioka, Naoto Ueno and Atsushi Suzuki. “A mechanism coordinating the establishment of the dorsal-ventral and anterior-posterior axes during early Xenopus embryogenesis” 「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44回 日本発生生物学会 2011年5月20日 沖縄

2. 竹林-鈴木公子、小西秀典、鈴木 厚 「両生類の神経誘導を保証する fail-safe 機構」 第5回 日本ツメガエル研究集会 2011年10月6日 熱海

3. 竹林-鈴木公子、小西秀典、鈴木 厚 「A fail-safe mechanism assuring the induction of neural tissue during amphibian embryogenesis 両生類の神経誘導を保証する fail-safe 機構」 第34回 日本分子生物学会 2011年12月13日 横浜

4. 竹林-鈴木公子、小西秀典、鈴木 厚 「両生類の神経誘導を保証する分子機構」 日本動物学会中国四国支部 広島県例会 2012年3月3日 東広島

5. 小西秀典、竹林-鈴木公子、宮本達雄、永田智子、鈴木 厚 「胚発生過程で背腹軸と頭尾軸形成が調和する分子機構の解析」 日本動物学会中国四国支部 広島県例会 2012年3月3日 東広島

(国際学会)

該当なし

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

1. 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、12 のマイクロサテライト遺伝子座 (Igawa et al., 2011) を利用し、オキナワイシカワガエル・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]

現存する生息域を網羅したオキナワイシカワガエル 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、集団遺伝学的解析を行った。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]

STRUCTURE (Pritchard et al., 2000) を用いた集団構造解析の結果、オキナワ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、ところ、アマミイシカワガエルの集団は地理的に近い集団が単系統となった。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。

本研究の成果は *Heredity* 誌に投稿し、現在、改稿中である。

2. 絶滅危惧種イボイモリにおけるマイクロサテライトマーカーの開発と

遺伝的多様性の解明

Isolation and development of microsatellite markers and detection of genetic diversity for Crocodile Newt, *Echinotriton andersoni*

[目的]

イボイモリ *Echinotriton andersoni* は、奄美大島、請島、徳之島、沖縄島、瀬底島、渡嘉敷島の6島に生息する西南諸島固有種である。しかしながら、他の絶滅危惧種と同様に、生息地の消失や、環境改変、ジャワマンングースによる食害により個体数が激減しており、本種はIUCNレッドリストにおける絶滅危惧IB類に指定されている。本種の包括的かつ、効率的な保全には種内の遺伝的多様性に関する知見が不可欠である。マイクロサテライト遺伝子座は共優性であり、さらに多型性の高い分子マーカーであり、保全遺伝学の分野で広く用いられている。そこで本研究では種内の遺伝的構造と、集団内の遺伝的多様性を評価することを目的として、イボイモリにおけるマイクロサテライトマーカーの開発及び、それらマーカーに基づく集団遺伝学的解析を行った。

[材料・方法]

(i) マイクロサテライトマーカーの開発

マイクロサテライト遺伝子座の単離および、マーカー開発は、三つの方法：磁気ビーズ法 (Glenn and Schable, 2005)、二重抑制PCR法 (Lian and Hogetsu, 2002)、複合型二重抑制PCR法 (Lian et al., 2006) に従って行った。また、徳之島産および沖縄産イボイモリの各1個体の尾の先端からゲノムDNAを抽出し、遺伝子座の単離に用いた。

(ii) マイクロサテライトマーカーを用いた集団遺伝学的解析

奄美大島産12個体、徳之島産36個体、沖縄島産30個体からゲノムDNAを抽出し、(i)において開発したマイクロサテライトマーカーの遺伝子型を決定した。その後、これらの各集団のデータに基づいて集団遺伝学的解析を行った。

[結果・考察]

マイクロサテライト遺伝子座の単離および、マーカー開発を試みた結果、磁気ビーズ法によって4遺伝子座、二重抑制PCR法によって2遺伝子座、複合型二重抑制PCR法によって4遺伝子座が単離された。また、これらの遺伝子座について奄美大島、徳之島、沖縄島の各集団で遺伝子型を決定したところ、十分な多型性が確認できた。これらの遺伝子座については、集団遺伝学的解析および、個体識別に有用なマイクロサテライトマーカーとして *Conservation Genetics Resources* 誌に掲載予定である。

次に、今回決定した遺伝子型に基づいて集団間の遺伝的距離を算出したところ、3つの島で遺伝的に大きく異なり、さらに沖縄島内の3集団においてもある程度分化が見られた。Structure (Pritchard et al., 2000) による解析でも同様の結果が見られ、島内でも遺伝的に異なる集団が存在することが示唆された。

3. カジカガエルにおける性連鎖遺伝子 GOT-1 の分子進化学的研究

Study on molecular evolution of sex-linked GOT-1 gene in *Buergeria buergeri*

[目的]

カジカガエルは西南諸島を除く日本列島の全域に分布しており、これまでに地域個体群の遺伝的関係について、アロザイムを用いた研究が行われている。その結果、カジカガエルは近畿地方を境界とし、東日本と西日本の間で遺伝的に大きく分化していることが明らかになっている (Atsumi et al., 1998; Sumida et al., 1999)。

のアロザイム分析に用いられた遺伝子座のうち、性連鎖遺伝子アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ-1 (GOT-1) 遺伝子には、興味深い特徴がある。カジカガエルの性染色体は ZW 型 (メスがヘテロ) であり、Z 染色体上の GOT-1 遺伝子産物は東日本と西日本の個体で通常の酵素活性を示す。一方、W 染色体上の GOT-1 では、西日本集団の W 染色体上の GOT-1 が発現していないか、その遺伝子産物は酵素活性を持っていないことが分かっている (東日本集団の W 染色体上の GOT-1 は正常に発現) (Sumida et al., 2004)。本研究では分子生物学的方法を用いて、この発現様式の違いを生じさせるメカニズムを明らかにすることを目的とした。

[材料・方法]

広島産、京都産、および岩手産の雌雄それぞれ 2 個体のカジカガエルを用いて、以下の実験を行った。

(i) GOT-1 遺伝子の cDNA 配列の決定

まず、*Xenopus laevis* と他の脊椎動物において相同性のあるエキソン領域から degenerate プライマーを作成し、カジカガエル広島集団のオス (ZZ) の GOT-1 遺伝子の部分塩基配列を決定したのち、5' RACE 法、3' RACE 法を用いて、最終的に下記の約 1.5kbp の全長配列を決定した。さらに、cDNA の末端部分にプライマーを作成し、これを用いて、広島産メス、および広島集団以外の西日本集団 (京都産) と東日本集団 (岩手産) のオス・メス個体の GOT-1cDNA 全長を解読した。

(ii) GOT-1 遺伝子の構造の決定

上記 cDNA の配列を基にプライマーを作成し、それぞれのカジカガエルについて、GOT-1 遺伝子のエクソン・イントロン構造を決定した。また、インバース PCR 法で、本遺伝子のプロモーター領域の増幅・塩基配列決定を行った。

(iii) GOT-1 遺伝子の配列比較と遺伝子系統樹の作成

得られた塩基配列に基づき、分子系統樹を作成し、GOT-1 遺伝子における進化プロセスの解明を試みた。

[結果・考察]

広島産カジカガエルのうち、GOT-1 遺伝子座のアロザイム電気泳動においてホモ接合 (b/b) を示すオス個体の cDNA、約 1.5kbp の全長配列を決定した。さらに、この配列と DNA database に登録されている GOT 遺伝子を網羅的に収集し、分子系統学的手法を用いてクラスタリングを行ったところ、今回得られた cDNA はアフリカツメガエル *Xenopus laevis* GOT-1 と同じクレードに属していた。したがって、今回決定した cDNA は GOT 遺伝子ファミリーにおける GOT-1 遺伝子に由来すること

が確認された。また、この cDNA 配列に基づいて設計したプライマーを用いて、広島集団の雌雄のそれぞれ 2 個体の cDNA 配列をダイレクトシーケンス法にて解析した。その結果、広島集団のオス個体において、シグナルが重複する箇所が検出された。一方、メス個体については、検出されなかった。広島集団のメス個体の W 上の GOT-1 が転写され、mRNA として存在していれば、cDNA 配列をダイレクトシーケンス法によって解読した場合にはシグナルが重複している箇所が確認されると考えられる。したがって、広島集団のメスの W 染色体上の GOT-1 は転写されていない可能性が高いと考えられた。さらに、広島集団のアロザイム分析において b/c アリルを持つ個体においては、6 つのシグナル重複サイトが確認され、2 つの部位についてはアミノ酸変異をもたらすと推測された。このうち、アミノ酸の極性を考慮すれば、ORF の 367 番目塩基の変異に由来するアスパラギン酸からヒスチジンへの変化が、アロザイムにおける b、c アリルとしての電気泳動度の違いとして検出されることが分かった。

5' 側非翻訳領域から、2nd Exon を挟む領域において、ゲノム上の遺伝子配列を決定したところ、広島、京都、岩手の 3 集団の雌雄から Z、W 両染色体上の GOT-1 遺伝子領域に由来する塩基配列 (約 6kbp) を得た。このうち、広島集団のメスの W 染色体に由来する配列については、イントロン上に大規模な欠失や変異が観察されたが、エキソン配列上には変異は見られなかった。また、これらの配列に基づき、GOT-1 の遺伝子系統樹を近隣結合法 (Kimura-2-parameter) により構築したところ、まず、Z 染色と W 染色体と W 染色体上の GOT-1 が分化し、その後、各地域でさらに分化していることが明らかになった。意外なことに、地域間の分化のパターンは Nishizawa et al. (2011) によって得られた結果と異なり、Z と W の両染色体に由来するどちらの GOT-1 でも岩手と広島の遺伝子が、京都に対して近縁となっていた。

以上の結果から、カジカガエル広島集団の W 染色体上の GOT-1 は、正常な mRNA に転写されていないか、転写産物が非常に少なく、また、少なくとも 1st Exon、2nd Exon とともに正常なアミノ酸配列をコードしていたことから、他の Exon か、5' 側非翻訳領域、あるいはイントロン内に存在する転写制御配列における変異が原因であることが考えられた。また、遺伝子系統樹の結果から、広島集団の W 染色体上の GOT-1 は、7 番染色体が性染色体に分化した後に、Z 染色体上の GOT-1 との相同組み換えが抑制されることにより分化し、その後、西日本集団において変異を蓄積して偽遺伝子化したことが推測された。また、今回の遺伝子系統樹とミトコンドリア遺伝子に基づく系統樹 (Nishizawa et al., 2011) の不一致は、核とミトコンドリア、あるいは染色体レベルでの遺伝子の系譜が不均一に選択されるという、incomplete lineage sorting が生じている可能性を示唆している。したがって、偽遺伝子化の時期は少なくとも、ミトコンドリア遺伝子における京都以北の集団と西日本の分岐年代である 500-600 万年前とは完全には一致しないことが分かった。

研究業績

①原著論文

1. Hasan, M., Islam, M. M., Khan, M. M. R., Alam, M. S., Kurabayashi, A., Igawa, T., Kuramoto, M., and Sumida, M. (2012) Cryptic anuran biodiversity in Bangladesh revealed by mitochondrial 16S rRNA gene sequences. *Zool. Sci.* 29: 162-172.

2. Sumida, M., Satou, N., Yoshikawa, N., Kurabayashi, A., Islam, M. M., Igawa, T., Oumi, S., Katsuren, S., Ota, H., Shintani, N., Fukuniwa, H., Sano, N., and Fujii T. (2011) Artificial production and natural breeding of the endangered frog species *Odorrana ishikawae*, with special reference to fauna conservation in the laboratory. *Zool. Sci.*, 28: 834-839.

3. Igawa, T., Okuda, M., Oumi, S., Katsuren, S., Kurabayashi, A., Umino, T., Sumida, M. (2011) Isolation and characterization of twelve microsatellite loci of endangered Ishikawa's frog (*Odorrana ishikawae*). *Conserv. Genet. Res.* 3: 421-424.

② 総説・著書・その他
該当なし

③ 学会発表
国際学会

1. Igawa, T., Oumi, S., Katsuren, S., Sumida, M. "Population structures and its causal landscapes of two endangered frog species of genus *Odorrana* – Different scenarios in two islands" Annual Conference of Society for Molecular Biology and Evolution (SMBE) 2011 (July, 2011. Kyoto, Japan)

2. Igawa, T., Oumi, S., Katsuren, S., Sumida, M. "A case study of conservation genetics for endangered species in Japan: Population structures and its causal landscapes of two endangered frog species of genus *Odorrana*" Basic Science International Conference 2012 (February, 2012. Malang, Indonesia 招待講演)

国内学会

1. 井川武, 大海昌平, 勝連盛輝, 住田正幸 「絶滅危惧種イシカワガエルにおける集団構造とその景観要因」日本爬虫両棲類学会 第50回記念大会 (2011年10月10日, 京都)

2. 菅原弘貴, 井川武, 大海昌平, 勝連盛輝, 横川昌史, 井鷲裕司, 住田正幸 「絶滅危惧種イボイモリのマイクロサテライト DNA を用いた集団構造解析と飼育下繁殖の試み」日本爬虫両棲類学会 第50回記念大会 (2011年10月9日, 京都)

④ 科研費等の受け入れ状況

1. 科学研究費補助金 若手研究(B) 「西南諸島に産する両生類絶滅危惧種の遺伝的多様性の解明と飼育繁殖における遺伝的管理」 (代表) 1,500千円

2. 日本科学協会 笹川科学研究助成 「カジカガエルにおける性連鎖遺伝子 GOT-1 の分子進化学的研究」800千円

Assistant Professor • Islam Mohammed Mafizul

Title:

Genetic divergence and postmating isolation among the brown frogs from Ryukyu Archipelago, Japan, elucidated by allozyme and mitochondrial gene sequence analyses, crossing experiments and cytological observations

Summary:

In order to elucidate the genetic divergence among brown frogs from the Ryukyu Archipelago, I conducted allozyme electrophoresis using 27 loci and mitochondrial gene sequencing of 16S rRNA and Cyt *b* genes using frogs from Okinawa and Kumejima Islands of Okinawa prefecture and Amami and Tokunoshima Islands of Kagoshima prefecture. To understand postmating isolation, I did crossing experiments between brown frogs from Okinawa and Amami Islands, and subsequently observed histology of testes and spermatogenesis using the reciprocal male hybrids. Although brown frogs of the Ryukyu Archipelago have been considered to be a single species *Rana okinavana*, Matsui (2012) recently suggested that these frogs from Okinawa and Amami Islands should be considered as *R. ulma* and *R. kobai* respectively. Thus I used *R. ulma* from Okinawa and Komejima Islands and *R. kobai* from Amami and Tokonoshima Islands. Based on the allozyme data, Ryukyu's brown frog from Okinawa prefecture significantly diverged from the frogs from Kagoshima prefecture by means of large genetic distances (up to 0.43) and presence of diagnostic alleles, although some degrees of divergence was found at populational level between frogs of Amami and Tokunoshima Islands with a genetic distance of 0.23. Molecular data also indicated significant divergence between frogs from two prefectures, while 3 populations of each prefecture made a single clade, where Tokunoshima population comparatively diverged from the other two Amami populations. Based on both allozyme and molecular data, they can reasonably be regarded as different species. Although crossing experiments revealed that they are not completely isolated by hybrid inviability; but the reciprocal hybrids show abnormal testes by presence of picnotic nuclei, and abnormal spermatogenesis due to presence of higher ratio of rod shaped bivalent and univalent chromosomes. These results conclude that although all the Ryukyu brown frogs are similar in external morphology, the Amami and Okinawa groups should be regarded as separated species as noticed by Matsui (2012), where some populational variations are found within the species, especially between Tokonoshima and Amami populations.

Methods:

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

Allozyme electrophoresis: A total of 50 individuals of both male and female individuals of the Ryukyu Brown frogs were used for allozyme study, where as 2 individuals of each *R. tsushimensis*, *R. japonica* and *R. temporaria* were used as outgroup. Muscle samples were collected from thigh region of the frogs immediately after sacrificing them and same time blood samples were also collected and stored in freezer. Sixteen enzymes and two blood proteins were analysed by Horizontal starch gel electrophoresis that was conducted based on the technique described by Nishioka *et al.* 1980 and 1992 with some modification. The detection of the enzyme was carried out after staining of the gel performed by agar overlay method outline by Harris and Hopkins, 1976. The detection of blood proteins were made by amino-black staining. Analysis were done by using the Phylip version 3.65 and POPGENE version 1.32 computer software.

Mitochondrial 16S rRNA and Cyt *b* gene sequence analyses: Direct sequencing of mitochondrial 16S rRNA and Cyt *b* genes were conducted by using F51 and R51 primers for 16S rRNA and Fow 1-1 and Rev-1 for Cyt *b* genes. In this experiment I have used representative samples from each 3 population from Okinawa and Kagoshima prefectures. I have also used other brown frogs such as *R. japonica*, *R. tsushimensis*, *R. temporaria* and *R. amurensis* and used *Lithobates catesbeianus* as outgroup. Nucleotide sequences were aligned with ClustalW, and ambiguous sites were manually eliminated. Based on the aligned data phylogenetic analyses were performed with the maximum likelihood (ML), maximum parsimony (MP), and neighbor joining (NJ) methods implemented in PAUP version 4.10b.

Crossing experiments: A total of 15 mature male and female individuals were used for crossing experiments. Females were injected with *Lithobates catesbeianus* pituitary gland, where sperm suspension was made after crushing the testes during fertilization. After ovulation eggs were stripped from female, placed on glass slide and fertilized with the sperm suspension. The fertilized eggs of the controls and hybrids and the resultant embryos as well as tadpoles are reared in glass petridishes in a controlled temperature of 22 in incubator. The tadpoles were feed with boiled spinach and the metamorphose frogs were feed with cricket.

Cytological observations: The cytological observation includes histological observations of testes of mature control and hybrids and the spermatogenesis observation in 1st meiosis.

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 and mounted with Canada balsam. The prepared slides were observed under optical microscope and necessary photos were taken using digital camera.

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:

Allozyme analyses: Frogs belongs to Okinawa and Amami Islands, each form their separate clades with high bootstrap value although there is high degree of populational variation between Amami and Tokunoshima populations. Also I have several diagnostic alleles such as, in case of LDH-B locus the d allele is diagnostic for Okinawa population and the f allele is diagnostic for Amami population. Besides I have for diagnostic allele for Amami and Okinawa populations in all case of ME-1, MPI and Hb-1 loci. High value of Nei's genetic distance (average 0.366) also indicates these two groups should merit different taxa.

Mitochondrial 16S rRNA and Cyt b gene sequence analyses: According to both 16S rRNA and Cyt b gene sequence data, Frogs belongs to Okinawa and Amami Islands, each form their separate clades with high bootstrap value where, there is some populational variation among Amami and Okinawa populations. Although the Tokunoshima population did not differ as high as found in allozyme analyses, in all cases of similar frog from different islands (e.g., between Amami and Tokunoshima, Okinawa and Kumejima) comparative high value of genetic divergence were found by means of uncorrected p distance.

Crossing experiments: Crossing experiments between the Ryukyu Brown Frogs from Amami and Okinawa indicated that interspecific hybrids are viable although less compare to the control. It is also noticed that both the male and females of the hybrids are fertile and they also produced viable F2 generation indicating there is no direct reproductive isolation.

Histological observations: The testes of controls of both Amami and Okinawa are completely normal in inner structure with bundle of normal spermatozoa, where there is also no presence of picnotic nuclei. The testes of hybrids between Okinawa and Amami is partially abnormal, although there is presence of normal sperm bundle but there is also presence of picnotic nuclei which

indicate being fertile the hybrids are abnormal to some extents.

Spermatogenesis observations: Spermatogenesis observation indicates that the control of both Amami and Okinawa populations are normal by means of percent bivalent chromosome and no of ring shaped chromosome. In case of both reciprocal hybrids I have found significant high number of rod-shaped bivalent as well as high number of univalent. It is comparatively higher in hybrid between Amami female and Okinawa male. The result of spermatogenesis indicate although the hybrids are viable and fertile but there is some extent of abnormalities which support there different entities.

After completion of all allozyme and molecular analyses, crossing experiments and subsequent cytological observation of the testes of mature male hybrids it was confirmed that the Ryukyu Brown frogs from Okinawa Prefecture and Kagoshima Prefecture should merit as different taxa.

Discussion :

The taxonomy of Brown frogs from the Ryukyu Archipelago is complicated. Nishioka et al 1992 studied genetic variation of 30 populations of 12 brown frog species including Ryukyu Brown frogs from Yona, Okinawa. Other scientists who have worked with these frogs. Most of them mentioned them as *R. okinavana*. Tanaka et al (1996) noticed high degree of genetic differentiation between *R. okinavana* from Amami and Okinawa populations. They also mentioned that extensive genetic differentiation between these two populations might be the result of bottleneck effects. The Ryukyu's brown frog which was considered as *Rana okinavana* has recently been identified as 2 distinct species *Rana ulma* and *Rana kobai* (Matsui, 2011). Our finding also support Matsui (2011) identification, thus the Ryukyu brown frogs from Okinawa should be considered as *Rana ulma* where as those from Amami should be considered as *Rana Kobai*.

Future research plan:

Research is going on to clarify the genetic divergence, relationship and postmating isolation among different brown frogs using Japanese brown frog and Ryukyu brown frogs and *Rana tsushimensis* from Japan and *R. amurensis* from Mongolia and *R. temporaria* from Russia. For that I have conducted crossing experiments among the brown frogs and the maintaining the hybrids to make cytological observation their testes. Molecular data along with postmating isolation will clarify more the divergence between these brown frogs.

Research Achievements:

Original paper:

1. Hasan M, Kuramoto M, Islam MM, Alam MS, Khan MMR and Sumida M (2012) A new species of genus *Hoplobatrachus* (Anura, Dicroglossidae) from the coastal belt

of Bangladesh. Zootaxa, 3312: 45–58.

2. Komaki S, Kurabayashi A, Islam MM, Tojo K, and Sumida M (2012) Distributional change and epidemic introgression in overlapping areas of Japanese pond frog species over 30 years. Zool. Sci., 29: 351–358.

3. Hasan M, Islam MM, Khan MMR, Alam MS, Kurabayashi A, Igawa T, Kuramoto M, and Sumida M (2012) Cryptic anuran biodiversity in Bangladesh revealed by mitochondrial 16S rRNA gene sequences. Zool. Sci., 29: 162–172.

4. Sumida M, Satou N, Yoshikawa N, Kurabayashi A, Islam MM, Igawa T, Oumi S., Katsuren S., Ota H, Shintani N, Fukuniwa H, Sano N and Fujii T, Artificial production and natural breeding of the endangered frog species *Odorrana ishikawae*, with special reference to fauna conservation in the laboratory., Zoological Science, 28: 834–839.

Presentations in Conference:

(International Conference)

1. Islam MM, Khan MMR, Kuramoto M, Djong TH and Sumida M (2011) Genetic divergence and reproductive isolation among the frogs of the genus *Fejervarya* from several Asian countries. Joint Meeting of Ichthyologists and Herpetologists 2011 (July 11, 2011, Minneapolis, Minnesota, USA)

2. Alam MS, Islam MM, Khan MMR, Hasan M, and Sumida M (2011) Reproductive isolating mechanisms and genetic divergences in the genus *Hoplobatrachus* (Anura, Dicroglossidae) based on crossing experiments, chromosomal and histological observations, allozyme and mitochondrial analyses. Joint Meeting of Ichthyologists and Herpetologists 2011 (July 9, 2011, Minneapolis, Minnesota, USA)

Researcher • Alam Mohammad Shafiqul

Title:

Postmating isolation in six species of three genera (*Hoplobatrachus*, *Euphlyctis* and *Fejervarya*) from family Dicroglossidae (Anura), with special reference to spontaneous production of allotriploids

Introduction:

In light of reproductive isolation being a fundamental aspect of the biological species concept, we performed crossing experiments using six species from three genera (*Hoplobatrachus*, *Euphlyctis* and *Fejervarya*) of family Dicroglossidae to explore postmating isolation in dicroglossid frogs. Furthermore, we focus on the remarkable survival of allotriploids and their possible relevance to speciation elucidated by chromosomal and histological observations, as well as allozyme and mitochondrial analysis.

Materials and Methods:

Frogs from genera *Hoplobatrachus*, *Euphlyctis*, and *Fejervarya* were collected from Bangladesh and Thailand and were used for crossing experiments. Artificial insemination was conducted for crossing experiments according to the procedure by Sumida et al. (2011) with a slight modification. Chromosomes were observed in metaphase plates of bone marrow cells of 3-year-old mature interspecific 3 hybrids (tigr. × chin.), 2 controls (tigr. × tigr.), as well as their parent's (*H. tigerinus* and *H. chinensis*) by Omura's method (1967). The same samples were also used for histological observation. A total of 25 frogs were used for allozyme electrophoresis. Fourteen enzymes and two blood proteins were analyzed by the method of horizontal starch-gel electrophoresis. The details of the electrophoretic method have been reported previously by Nishioka et al. (1980). A total of nine individuals were used for mitochondrial *Cytb*, 12S and 16S rRNA gene analysis.

Results:

Results revealed gametic isolation among three genera (*Hoplobatrachus*, *Euphlyctis* and *Fejervarya*), although the intergeneric hybrids between female *E. cyanophlyctis* and male *H. chinensis* were inviable at the tadpole stage, while the hybrids between female *E. cyanophlyctis* and male *H. tigerinus* were inviable at the hatching stage. These results showed complete hybrid inviability between the two genera. Almost all interspecific hybrids between female *H. tigerinus* and male *H. chinensis* died of underdevelopment at the tadpole stage, whereas several hybrids developed normally, and survived to

maturity. Chromosomal observations and mtDNA and allozyme analyses confirmed that these mature hybrids were allotriploid consisting of two maternal genomes and one paternal genome. The present results suggest that the allotriploids were produced spontaneously, and histological observations confirmed their sex as sterile males. Furthermore, we also investigated the molecular relationships between *H. tigerinus*, *H. chinensis* and the interspecific allotriploids by mitochondrial *Cytb*, 12S and 16S rRNA gene analysis. The maternal inheritance mode of mitochondrial genomes was retained in the hybrids. Finally, the present results advocate that the degree of postmating isolation reflects the phylogenetic relationship. In addition, we speculate that allotriploids may be produced via hybridization among cryptic species.

Conclusion:

We found sterile allotriploids between female *H. tigerinus* and male *H. chinensis* by artificial crossing; whereas it has been reported that diploid and tetraploid populations were found in African *H. occipitalis* (*Dicroglossus occipitalis*) populations in nature (Bogart and Tandy, 1976). However, Mable et al. (2011) explained in detail genome duplication in amphibians and fish, and they suggested that the polyploids could be formed in nature during times of climatic instability. We also found duplication events in the mt genome of *Hoplobatrachus* and *Euphlyctis* genera in our previous paper (Alam et al., 2010). At present, we would like to avoid further discussion about the possibility of a past evolutionary route of tetraploid formation via the triploid stage in nature. In future studies, cryptic species of *Hoplobatrachus*, *Euphlyctis*, and *Fejervarya* genera need to be studied more closely to understand the polyploidization that might occur during the formation of species using multiple genetic markers.

Future research plan:

In the present study, we focused the genus *Hoplobatrachus* and related genera and in the next stage of this research we have plan to survey the chromosomal polyploidization among all the amphibian fauna from South Asian country and try to find out their evolutionary histories that could happen in the past. At present, we are rearing the crosses of Bangladesh *Euphlyctis cyanophlyctis* with Indian *E. cyanophlyctis* and we will perform chromosomal, histological, allozyme and molecular analysis in near future.

Research Achievements:

Original Paper:

1. Alam MS, Islam MM, Khan MMR, Hasan M, Wanichanon, R. and Sumida M. (2012)

Postmating isolation in six species of three genera (*Hoplobatrachus*, *Euphlyctis* and *Fejervarya*) from family Dicroglossidae (Anura), with special reference to spontaneous production of allotriploids. Zool. Sci., 29: in Press.

2. Hasan M, Kuramoto M, Islam MM, Alam MS, Khan MMR and Sumida M (2012) A new species of genus *Hoplobatrachus* (Anura, Dicroglossidae) from the coastal belt of Bangladesh. Zootaxa, 3312: 45-58.

3. Hasan M, Islam MM, Khan MMR, Alam MS, Kurabayashi A, Igawa T, Kuramoto M, and Sumida M (2012) Cryptic anuran biodiversity in Bangladesh revealed by mitochondrial 16S rRNA gene sequences. Zool. Sci., 29: 162-172.

Presentation in Conferences:

(International Conference)

1. Alam MS, Islam MM, Khan MMR, Hasan M, and Sumida M (2011) Reproductive isolating mechanisms and genetic divergences in the genus *Hoplobatrachus* (Anura, Dicroglossidae) based on crossing experiments, chromosomal and histological observations, allozyme and mitochondrial analyses. Joint Meeting of Ichthyologists and Herpetologists 2011 (July 9, 2011, Minneapolis, Minnesota, USA)

2. プロジェクト研究①

内海耕慥（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。

研究業績

原著論文

1. 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. (2012) Hypergravity specifically effects head formation in the *Xenopus* embryos raseid under hypergravity condition. *Space Utili. Res.* in press.

2. Fujiwara, Y., Kashiwagi, K., Nakagawa, M., Shinkai, T., Yanagisawa, M., Furuno, N., Hanada, H., Suzuki, K., Katsu, K., Yamashita, M., Yamamoto, T., Tanimoto, Y. and Kashiwagi, A. (2012) Effects of magnetically controllled microgravity and hypergravity environment on amphibian behavior. *Space Utili. Res.* in press.

3. Yanagisawa, M., Kashiwagi, K., Hanada, H., Shinkai, T., Yoshitome, S., Kubo, H., Sakai, M., Fujii, H., Yamashi, M., Kashiwagi, A. Furuno, N. *, Watanabe, M*. (2012) Analysys of the head-defects caused by hypergravity in early *Xenopus* embyos. *Biol. Sci. Space* 26, 1-6.

学会発表

1. 藤原好恒、柏木啓子、中川真依、新海正、柳澤誠、古野伸明、花田秀樹、鈴木賢一、勝賢二郎、山下雅道、山本卓、谷本能文、柏木昭彦 両生類の行動に対する強磁場制御による微小および過重力の影響 第28回宇宙利用シンポジウム 2012年1月23日 日本学術会議 東京。

2. 柳澤誠、古野伸明、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、山下雅道、柏木昭彦、渡部稔、鈴木賢一 過重力はフリカツメガエルの頭部形成(特に眼と脳)に特異的に影響を与える 第28回宇宙利用シンポジウム 2012年1月23日 日本学術会議 東京。

3. 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 過重力はツメガエルの頭部形成に特異的に影響を与える。 日本動物学会第82回大会 2011年 9月22日 旭川市大雪クリスタルホール 旭川。

プロジェクト研究②

古野伸明（広島大学）、吉留賢（鳥取大学）、渡部稔（徳島大学）、柏木啓子（広島大学）、花田秀樹（広島大学）、新海正（芝浦工業大学）、久保英夫（東京都医学総合研究所）、坂井雅夫（鹿児島大学）、藤井博匡（札幌医科大学）、山下雅道（JAXA）、柏木昭彦（山陽女子短期大学）、谷本能文（大阪大谷大学）、藤原好恒（広島大学）、山本卓（広島大学）、鈴木賢一（愛媛大学）、植木龍也（広島大学）、道端薺（広島大学）、関口猛（九州大学）、小林英紀（岡山大学）

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。WISH を用いた実験から過重力は頭部形成に特に影響を与える事が明らかになった。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。また、オタマジャクシを強磁場に曝露すると、行動に異常が生じる事もわかった。現在、その行動異常の原因を探っている。

[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。

[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 の遺伝子に変異を導入する事ができた。さらに、mos 遺伝子にも変異を導入できた。これ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。しかしながら、最近、TALEN という ZNF より簡便で有効な遺伝子破壊の方法が報告され、継続するかが課題である。

[4] 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。さらに、この領域がNES (Nuclear export signal)として働くことや、そのNESの機能と2極の紡錘体の形成能が関係していることが明らかになった。

[5] 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。

[6] 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. Ueki, T., Furuno, N., Michibata, H. (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.
2. 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 analysis of the head-defects in the *Xenopus* embryos raised under hypergravity condition. *II Space Util. Res.* 27: 198-200. (* Corresponding author)
3. Yanagisawa, M., Kashiwagi, K., Hanada, H., Shinkai, T., Yoshitome, S., Kubo, H., Sakai, M., Fujii, H., Yamashi, M., Kashiwagi, A. Furuno, N. *, Watanabe, M*. (2012) Analysis of the head-defects caused by hypergravity in early *Xenopus* embryos. *Biol. Sci. Space*, 26: 1-6. (* Corresponding author)
4. Yoshitome, S., Furuno, N., Prigent, C. and Hashimoto, E. (2012) The subcellular localization of cyclin B2 is required for bipolar spindle formation during *Xenopus* oocyte maturation. *Biochemical and Biophysical Research communication*, 422: 770-775.
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. Hypergravity specifically affects head formation in the *Xenopus* embryos raised under hypergravity condition. *Space Util. Res.* 2012, in press. (* Corresponding author)
6. Fujiwara, Y., Kashiwagi, K., Nakagawa, M., Shinkai, T., Yanagisawa, M., Furuno, N., Hanada, H., Suzuki, K., Katsu, K., Yamashita, M., Yamamoto, T., Tanimoto, Y. and Kashiwagi, A. Effects of magnetically controlled microgravity and hypergravity environment on amphibian behavior. *Space Util. Res.* 2012, in press.

学会発表

1. 関口 猛、鎌田 芳彰、古野 伸明、小林 英紀 ヘテロ 2 量体 G タンパク質の Gtr1、Gtr2 と Tor 複合体 1 との相互作用 日本遺伝学会第 83 回大会 2011 年 9 月

20日 京都

2. 藤原好恒、柏木啓子、中川真依、新海正、柳澤誠、古野伸明、花田秀樹、鈴木賢一、勝賢二郎、山下雅道、山本卓、谷本能文、柏木昭彦 両生類の行動に対する強磁場制御による微小および過重力の影響 第28回宇宙利用シンポジウム 2012年1月23日 日本学術会議 東京

3. 柳澤誠、古野伸明、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、山下雅道、柏木昭彦、渡部稔、鈴木賢一 過重力はフリカツメガエルの頭部形成（特に眼と脳）に特異的に影響を与える 第28回宇宙利用シンポジウム 2012年1月23日 日本学術会議 東京

4. Suzuki, K., Kashiwagi, K., Ochiai, H., Sakuma, T., Sakamoto, N., Kashiwagi, A., Yamamoto, T. and Furuno, N. Targeted mutagenesis of throid hormone receptor beta gene by engineered zinc finger nuclease in amphibian embryo. 第44回日本発生生物学会年会 2011年5月20日 沖縄コンベンションセンター 宜野湾市

5. 鈴木賢一、落合博、柏木啓子、古野伸明、山本卓、柏木昭彦「両生類の変態・再生研究における遺伝子改変動物の必要性」遺伝子機能解析の最前線-ZFN 及びTALENを用いた遺伝子改変の実際- 2011年7月11日 基礎生物学研究所 岡崎

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 過重力はツメガエルの頭部形成に特異的に影響を与える。日本動物学会第82回大会 2011年9月22日 旭川市大雪クリスタルホール 旭川

科研費等の受け入れ状況

1. 宇宙環境利用科学委員会研究班ワーキンググループ（2011）両生類の生活環に対する過重力の影響 150千円

プロジェクト研究③

三浦郁夫（広島大学）、古賀章彦（京都大学霊長類研究所）

[1] 脊椎動物の色彩変異体における活性型 DNA トランスポゾンの探索
Survey of body color mutants fro active DNA transposons in vertebrates

DNA 型トランスポズンは動物に広く存在し、活性型を維持していることが知られている。これまでメダカの色彩変異体から活性型トランスポズンが発見されていることから、色彩変異体に注目し、18種類の脊椎動物色彩変異体におけるトランスポゾンの探索を行った。その結果、魚類1種とツチガエルにおいてトランスポゾンの挿入を発見した。

研究業績

学会発表

1. 原とおる、山本博章、三浦郁夫、古賀章彦. 脊椎動物の体色変異体を用いた活性型トランスポゾンの探索 日本遺伝学会 2011年9月21日 京都市

プロジェクト研究④

[1] 両生類における TALEN 技術を用いた標的遺伝子の破壊

Targeted gene disruption by TALENs in amphibians

山本 卓 (広島大学)、鈴木賢一 (広島大学)、柏木啓子 (広島大学)、佐久間哲史 (広島大学)、磯山由樹子 (広島大学)、落合 博 (広島大学)、柏木昭彦 (広島大学、山陽女子短期大学)

最近、TAL effector DNA 結合ドメインを DNA 切断ドメインと融合させた TALENs により標的遺伝子の破壊が可能であることが ES 細胞や iPS 細胞を含む培養細胞や、線虫、ラット、ゼブラフィッシュ等で報告されている。

私達は、EGFP TALENs mRNA を注入した受精卵から発生したトランスジェニック胚で、EGFP 蛍光の顕著な減少を確認した。さらに、TALEN 標的領域を Cel-1 アッセイやシーケンスにより解析したところ、高頻度で挿入や欠失による変異が生じていることも確認した。

今後は、TALEN 技術を用いて変態や再生現象に重要な遺伝子の破壊を行っていく予定である。

[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

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

柏木啓子 (広島大学)、古野伸明 (広島大学)、藤原好恒 (広島大学)、新海 正 (芝浦工業大学)、花田秀樹 (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)、鈴木賢一 (広島大学)、山本 卓 (広島大学)、柏木昭彦 (広島大学、山陽女子短期大学)

無重力状態における宇宙飛行士の体には老化に似た症状が現れることが知られている。惑星での長期間滞在は寿命にどのような影響を及ぼすであろうか。子孫の発生や成長は大丈夫なのか、などといった疑問が山積している。残念ながら、わからないことが多いのが現状である。だが、重力や磁場変化に関する地上研究を通してある程度の予測は可能である。

私達の宇宙環境利用委員会研究チームのテーマ「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」は、平成 16 年以降今年度に至るまで連続して JAXA で採択されている。実験材料には、主にアフリカツメガエルを用いて研究を続けてきたが、今後はネッタイツメガエルも対象実験動物として加える。過重力・強磁場を印加された受精卵から発生した胚やオタマジャクシに著しい発生阻害、形態異常、頭部マーカー・セメントマーカー遺伝子の発現低下等が認められた。性分化への影

響についても調べる。

[3] トランスジェニックガエルを用いた甲状腺ホルモンかく乱物質スクリーニングシステムの開発

Development of a screening system for thyroid hormone disrupting chemicals using transgenic *Xenopus laevis*

柏木昭彦 (広島大学、山陽女子短期大学)、鈴木賢一 (広島大学)、柏木啓子 (広島大学)、山本 卓 (広島大学)、太田 茂 (広島大学)

環境省によると、子どものアトピーやぜんそく、先天異常 (尿道下裂、ダウン症など) の発症率が増えているという。環境中にある化学物質の関与が懸念されている。人工の化学物質は食料品はもとより医薬品や日用品などあらゆるもので使われており現代生活に不可欠なものとなっている。しかし一方では、化学物質による内分泌かく乱作用が危惧されている。無尾両生類は甲状腺ホルモン (TH) の働きによりオタマジャクシが変態してカエルになることから、甲状腺ホルモンかく乱作用を持つ化学物質の生体影響を試験評価するための格好の実験動物である。私達は、TH により活性化される TRbeta 遺伝子のプロモーター/エンハンサーとホタルルシフェラーゼ遺伝子を連結させてつくったレポーター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 (Tg) 系統を既に確立している。この Tg 系統を利用した TH かく乱物質を評価する試験系の確立を目的として、F1 世代の TH 反応性や化学物質の影響をルシフェラーゼ活性により評価する方法を検討した。

in vivo ルシフェラーゼイメージング解析の結果、TH に高い反応性を示すことが知られている幼生の脳や四肢において、強いルシフェラーゼ活性の誘導を確認できた。また、TH 暴露した Tg オタマジャクシのホモジェネートを用いてルシフェラーゼ活性を測定した結果、濃度依存的なレポーター活性の増大も確認された。以上の結果により、この Tg 系統は、個体レベルでの TH 応答性をルシフェラーゼ活性によりモニターすることが可能であることが証明された。

環境中に放出された人工化学物質の中には正常な TH 作用をかく乱するものが含まれ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は少なく、その開発が喫緊の課題である。本研究課題で開発したルシフェラーゼ遺伝子を導入したアフリカツメガエル Tg 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・高感度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スクリーニングしていく予定である。

研究業績

原著論文

1. 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 analyses of the head-defects in the *Xenopus* embryos raised under hypergravity conditions. II Space Utili. Res. 27: 198-200.

2. Yanagisawa, M., Kashiwagi, K., Hanada, H., Shinkai, T., Yoshitome, S., Kubo, H., Sakai, M., Fujii, H., Yamashi, M., Kashiwagi, A., Furuno, N. and Watanabe, M. (2012) Analyses of head-defects caused by hyper - gravity in early *Xenopus* embryos. Biol. Sci. Space, 26: 1-6.

総説・著書

1. 「板櫃川で発見された後肢欠損ガエルの発生原因について」2011年11月発行 北九州市環境局

学会発表（国内）

1. Suzuki, K., Kashiwagi, K., Ochiai, H., Sakuma, T., Sakamoto, N., Kashiwagi, A., Yamamoto, T. and Furuno, N. Targeted mutagenesis of thyroid hormone receptor beta gene by engineered zinc finger nuclease in amphibian embryo. 第44回日本発生生物学会年会 2011年5月20日 沖縄コンベンションセンター 宜野湾市

2. 鈴木賢一、落合 博、柏木啓子、古野伸明、山本 卓、柏木昭彦. 遺伝子機能解析の最前線-ZFN 及び TALEN を用いた遺伝子改変の実際—両生類の変態・再生研究における遺伝子改変動物の必要性 ZFN 研究会 2011年7月11日 基礎生物学研究所 岡崎市

3. Yanagisawa Makoto, Furuno Nobuaki ,Watanabe Minoru, Kashiwagi Keiko, Hanada Hideki, Shinkai Tadashi, Yoshitome Satoshi, Kubo Hideo, Sakai Masao, Fujii Hirohada, Suzuki Ken-ichi, Yamashita Masamichi, Kashiwagi Akihiko. Molecular analysis of the head-defects in the *Xenopus* embryos raised under hypergravity conditions. II 第82回日本動物学会 2011年9月22日 旭川

4. 藤原好恒、柏木啓子、中川真依、新海 正、柳澤 誠、古野伸明、花田秀樹、鈴木賢一、勝賢二郎、山下雅道、山本 卓、谷本能文、柏木昭彦. Effects of magnetically controlled microgravity and hypergravity environments on amphibian behavior. 第28回宇宙利用シンポジウム 2012年1月23日 日本学術会議 東京

5. 柳澤 誠、古野伸明、柏木啓子、花田秀樹、新海 正、久保英夫、坂井雅夫、藤

井博、山下雅道、柏木昭彦、渡部稔、鈴木賢一. 過重力はアフリカツメガエルの頭部形成（特に眼と脳）に影響を与える. 第 28 回宇宙利用シンポジウム 2012 年 1 月 23 日 日本学術会議 東京

6. Seigo Sanoh, Keiko Kashiwagi, Hideki Hanada, Kana Matsubara, Kohei Kawabata, Tadashi Shinkai, Takashi Yamamoto, Ken-ichi Suzuki, Nariaki Fujimoto, Kazumi Sugihara, Shigeyuki Kitamura, Akihiko Kashiwagi, Shigeru Ohta. Effects of exposure to thyroid hormone disrupting chemicals on amphibian metamorphosis. 環境ホルモン学会 2011年12月2日 東京大学 山上会館 東京

7. 鈴木賢一、柏木啓子、佐久間哲史、落合 博、礒山由樹子、柏木昭彦、山本 卓. 両生類における ZFN/TALEN を用いた遺伝子破壊の実施例. 第一回ゲノム編集研究会 2012 年 2 月 28 日 広島大学

科研費等の受け入れ状況

1. 平成 23 年度化学物質の内分泌かく乱作用に関するフェージビリティスタディ研究「脳神経発達へ影響を及ぼす甲状腺ホルモンかく乱化学物質のスクリーニングシステム開発（分担）」3,000 千円

2. 宇宙環境利用科学 WG「両生類の生活環に対する重力影響」（分担）300 千円

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「板櫃川で発見された後肢欠損ガエルの発生原因について」（2011 年 11 月 19 日 北九州市市役所）

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

研究内容

[1] 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、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、12 のマイクロサテライト遺伝子座 (Igawa et al., 2011) を利用し、オキナワイシカワガエル・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]

現存する生息域を網羅したオキナワイシカワガエル 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、集団遺伝学的解析を行った。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]

STRUCTURE (Pritchard et al., 2000)を用いた集団構造解析の結果、オキナワ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、ところ、アマミイシカワガエルの集団は地理的に近い集団が単系統となった。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。

[2] イシカワガエル青色突然変異体の組織学・遺伝学的研究（継続）

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」が発見された。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。組織学的要因については昨年明らかにしたので、今年度は、遺伝形質か否かについての検証を継続した。

[材料・方法]

昨年、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島産の野生型雌それぞれ1個体と交配し、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。今年度は、その子孫の飼育を継続した。

[結果]

奄美大島産および沖縄島産の野生型雌とのF1 個体を、それぞれ20匹以上を現在飼育中であり、性成熟に備えている。

[考察]

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が、現在のところ飼育下個体において、青色を呈する個体は出現していない。また、現時点では性成熟には到達していないと考えられる。

[将来の展望]

F1 個体の性成熟を待ち、人工交配を実施し、F2 を得る必要がある。ここで、3 :

1 の割合で青色個体が出現した場合は、青色の表現形は 1 遺伝子座似によって支配される劣勢突然変異であるといえる。

[3] 絶滅危惧種イボイモリのミトコンドリアゲノムの分子進化と分岐年代推定に基づく系統地理学的考察

Mitochondrial genomes and divergence times of crocodile newts: Inter-islands distribution of *Echinotriton andersoni* and the origin of a unique repetitive sequence found in *Tylototriton* mt genomes

[目的]

現在、イボイモリ類(有尾目イモリ科)としては、*Echinotriton* 属の *E. andersoni* と *E. chinhaiensis* および 8 種の *Tylototriton* の 2 属 10 種が記載されている。これらのイモリは、原始的な体制を残していることから生きた化石と呼ばれ、また、その多くが絶滅危惧種に指定されている。本研究では、ミトコンドリアゲノムの中でも、イボイモリの集団解析に適した進化速度の速い遺伝子や領域を明らかにし、将来的に絶滅危惧種の保全研究に資することを目的として研究を行った。

[材料・方法]

沖縄島産および奄美大島産イボイモリ (*E. andersoni*) と *Tylototriton verrucosus* を材料に用いた。LA-PCR 法によるミトゲノム増幅と、プライマーウォーキング法によるシーケンシングによって両者のミトコンドリアゲノム全塩基配列を決定した。

[結果・考察]

今回決定した 2 種のイボイモリ類のミトゲノムと、既に報告されていた 3 種のイボイモリのミトゲノムを比較し、イボイモリ類の中で、最も進化速度の速いミトゲノム領域を検索した。その結果、イボイモリ類では、*nad1*, *nad2*, *atp6*, *nad4*, *nad3* などのタンパク質遺伝子の進化速度が速いことが分かり、これらの遺伝子が種内や近縁種間の遺伝的解析や系統解析に有用であることが示唆された。一方で、多くの脊椎動物のミトゲノムに置いて最も進化速度が速いとされているコントロール領域 (D-loop 領域) は、イボイモリ類では非常に進化速度が遅いことが分かった (*12SrRNA* に次いで 2 番目に遅い)。これらの結果をまとめ、Genes & Genetic Systems 誌に公表した。

[今後の展望]

本研究によって、イボイモリ種内や近縁種間の解析に有用なミトゲノムマーカーが特定されたことにより、今後、これら絶滅危惧種の集団解析を実施する上でより解像度の高い結果が得られるようになるかと推測される。また、本研究から、イボイモリ類にはこれまでに知られていない更なる種多様性があること、系統解析のマーカーとなりうるミトゲノム構造マーカーが発見された。これらの新知見は、イボイモリ類の分類研究を促進する上での一助となりうると思われる。

[4] 絶滅危惧種イボイモリにおけるマイクロサテライトマーカーの開発と遺伝的多様性の解明

Isolation and development of microsatellite markers and detection of genetic diversity for Crocodile Newt, *Echinotriton andersoni*

[目的]

イボイモリ *Echinotriton andersoni* は、奄美大島、請島、徳之島、沖縄島、瀬底島、渡嘉敷島の6島に生息する西南諸島固有種である。しかしながら、他の絶滅危惧種と同様に、生息地の消失や、環境改変、ジャワマンダースによる食害により個体数が激減しており、本種はIUCNレッドリストにおける絶滅危惧IB類に指定されている。本種の包括的かつ、効率的な保全には種内の遺伝的多様性に関する知見が不可欠である。マイクロサテライト遺伝子座は共優性であり、さらに多型性の高い分子マーカーであり、保全遺伝学の分野で広く用いられている。そこで本研究では種内の遺伝的構造と、集団内の遺伝的多様性を評価することを目的として、イボイモリにおけるマイクロサテライトマーカーの開発及び、それらマーカーに基づく集団遺伝学的解析を行った。

[材料・方法]

(i) マイクロサテライトマーカーの開発

マイクロサテライト遺伝子座の単離および、マーカー開発は、三つの方法：磁気ビーズ法 (Glenn and Schable, 2005)、二重抑制PCR法 (Lian and Hogetsu, 2002)、複合型二重抑制PCR法 (Lian et al., 2006) に従って行った。また、徳之島産および沖縄産イボイモリの各1個体の尾の先端からゲノムDNAを抽出し、遺伝子座の単離に用いた。

(ii) マイクロサテライトマーカーを用いた集団遺伝学的解析

奄美大島産12個体、徳之島産36個体、沖縄島産30個体からゲノムDNAを抽出し、(i)において開発したマイクロサテライトマーカーの遺伝子型を決定した。その後、これらの各集団のデータに基づいて集団遺伝学的解析を行った。

[結果・考察]

マイクロサテライト遺伝子座の単離および、マーカー開発を試みた結果、磁気ビーズ法によって4遺伝子座、二重抑制PCR法によって2遺伝子座、複合型二重抑制PCR法によって4遺伝子座が単離された。また、これらの遺伝子座について奄美大島、徳之島、沖縄島の各集団で遺伝子型を決定したところ、十分な多型性が確認できた。これらの遺伝子座については、集団遺伝学的解析および、個体識別に有用なマイクロサテライトマーカーとして *Conservation Genetics Resources* 誌に掲載予定である。

次に、今回決定した遺伝子型に基づいて集団間の遺伝的距離を算出したところ、3つの島で遺伝的に大きく異なり、さらに沖縄島内の3集団においてもある程度分化が見られた。Structure (Pritchard et al., 2000) による解析でも同様の結果が見られ、島内でも遺伝的に異なる集団が存在することが示唆された。

[5] 絶滅危惧種イボイモリにおける繁殖行動および、行動の季節変化の観察

Observation of reproductive behaviors and seasonal behavioral changes of Crocodile Newt, *Echinotriton andersoni*

[目的]

生物種の保全において、最も優先すべきは野外集団の保護、およびその周辺環境の維持である。しかしながら、多くの絶滅危惧種においては種生態学的知見が不足しており、具体的にどの時期に、どのような環境を利用しているのか不明確な場合が多い。特に、イボイモリは側溝などの人工構造物などによって行動範囲が制限されるなど、移動能力に乏しいと考えられ、生息域における環境利用の実態の解明が求められている。

したがって、本研究では、集団の存続に最も重要な繁殖行動、特に有尾両生類に特徴的な求愛・産卵行動および、行動の季節変化を観察することを目的として研究を行った。

[材料・方法]

(i) 求愛行動と行動の季節変化の観察

徳之島・三京産 9 個体を飼育しているケージに、赤外線ネットワークカメラおよび、赤外線 LED ライトを設置し、2011 年 2 月から同年 11 月まで、継続して録画を行った。求愛行動については、可能性の高い時間帯と時期を考慮し、5 分ごとに区切られた 55000 個のビデオ映像を目視により精査し、観察した。また、行動の季節変化については、毎日の 2 時、8 時、14 時、20 時の 5 分間の映像を確認し、飼育ケージ内のシェルターから出てきた個体数をカウントした。

(ii) 産卵行動の観察

2011 年 1 月に徳之島において個体を捕獲し滞在先に持ち帰った際、メス個体 1 匹が産卵を始めたため、二台のビデオカメラを用いてその行動を観察した。できるだけ採集場所の状況に近づけるため、テーブルに濡れたタオルを用意し、電燈等は点けずに赤外光による撮影を試みた。

[結果・考察]

求愛行動については、2011 年 2 月および 7 月の 2 回、近縁種であるチンハイイボイモリで観察された行動パターン (Sparreboom et al., 2001) とよく似た行動を観察できた。具体的な行動は、まず、オスがメスに接近して体側面にアプローチし、メスが逃げるのをオスが追いかけることから始まる。その後、オスが再度メスに接触し、今度は雌雄が同円周状に回転するというパターンであった。一周が 5 分から 10 分と非常にゆっくりとしたペースであり、この回転の途中でオスが総排出腔付近を震わせる姿が確認できた。また、雌雄が回転している場所はケージ内の水辺に近い湿度のある地面でのみ行われていた。また、行動が活発化していた時期も、2 月下旬から 3 月上旬、5 月上旬と 7 月上旬で、シェルターから出ている個体が増えており、求愛行動が観察された時期と一致していた。

産卵行動については、メスが障害物の下に潜り込み、円周状に動きながら卵を産み落とす行動が観察できた。イボイモリの卵は、野外において落ち葉の下に見つかること、卵は塊状にまとまって確認されることが知られており (又吉ら 1978)、観察された行動は野外においても同様の行動パターンであると考えられる。この産卵

行動の様子については、その詳細を報文として爬虫両生類学会報に報告した(菅原ら 2011)。

本研究によりイボイモリの繁殖行動が初めて明らかになった。特に、イボイモリの繁殖行動には地表面の湿度および、適当な遮蔽物が必要であることが示唆された。したがって、イボイモリは普段は比較的乾燥した場所に生息するが、繁殖行動を行う上では、生息地周辺に適度な大きさの水辺が必要であり、生息域の景観の維持が個体群の存続に重要であると考えられた。

[6] 長野県トノサマガエル種群接触帯における過去 30 年間の分布域変化と交雑様式

Distributional change and epidemic introgression in overlapping areas of Japanese pond frog species over 30 years

[目的]

日本には、トノサマガエル種群に分類される 2 種 2 亜種のカエルトノサマガエル・トウキョウダルマガエル・ダルマガエル (ナゴヤダルマガエル) が分布する。これらのカエル類は、長野県の松本盆地と伊奈盆地の隣り合う二つの盆地において分布域が接近しており、松本盆地においてはトノサマガエルとトウキョウダルマガエルが、伊奈盆地においては、トノサマガエルとダルマガエルが、それぞれ交雑帯を形成していることが知られていた。本研究では、これら 2 つの盆地のトノサマガエル種群について以下の点を明らかにすることを目的として研究を行った。(1) 詳細な分布域と交雑帯を明確にする。(2) ミトコンドリアと核それぞれの遺伝マーカーを用いて、交雑の頻度・様式を明らかにする。(3) 30 年前のデータと比較し、個々 30 年間で各種の分布域、および交雑帯がどのように変化したかを明らかにする。(4) (ナゴヤ) ダルマガエルは長野県において絶滅危惧種に指定されているが、何が原因で分布域や個体数の減少が生じているのかを検討する。

[材料・方法]

松本・伊奈盆地から、トノサマガエル種群のサンプル 233 個体を採集した。これらについて、(1) 外部形態に基づく種同定と分布域の決定、(2) ミトコンドリア (cytb 遺伝子) ・アロザイム (4 座位: α -GDH、IDH-B、LDH-B、MDH-B) を指標としたより詳細な種および雑種判定と交雑様式と頻度の検討を行った。

[結果・考察]

外部形態による種判定と分布域の調査から、松本盆地では過去のトウキョウダルマガエルの生息域が、現在は非常に狭くなり、また分断化していることが分かった。これに対し、トノサマガエルの分布域は大きく拡大していた。また、遺伝学的解析から、両種の交雑帯は、過去に比べてトウキョウダルマガエルが分布していた北側に移動していることが分かった。さらに、遺伝学的解析の結果、雑種一代目の個体が多いことから、現時点でも交雑が高頻度で生じていることが示された。特に興味深いのは、両種の雑種の多くは、トウキョウダルマガエル雌由来の個体が多いことであった。このことは、トウキョウダルマガエルとトノサマガエルの交雑では、トウキョウダルマガエルの雌をトノサマガエルの雄が奪いやすいという「方向性のある

交雑]が生じていることを意味する。また、一般的に方向性のある交雑が生じると、雌を奪われる側の種が不利益を被ると言われている。従って、ここ 30 年のトウキョウダルマガエルの分布域減少と交雑帯の移動も、方向性のある交雑によって、トノサマガエルがトウキョウダルマガエル集団を浸食していった結果であると考えられた。

一方、伊奈盆地では、ナゴヤダルマガエルとトノサマガエルの分布域は 30 年前と比べてほとんど変化していなかった。しかし、遺伝的解析からは、形態的にナゴヤダルマガエルと思われる個体の多くが、トノサマガエルに固有の遺伝子座やミトコンドリアはプロタイプを持っていることが非常に多かった。これは、ナゴヤダルマガエルと見られる個体のほとんどが、実際は過去に雑種由来の親を経てきたことを意味しており、実際に遺伝学的に“純粋な”ナゴヤダルマガエル個体は今回調査した中でわずか 8 個体のみであった。また、松本盆地とは対照的に、伊奈盆地ではトノサマガエルとダルマガエルの F1 雑種個体が少なく、交雑はそれほど頻繁には怒っていないことが示唆された。伊奈盆地においては過去 30 年間でダルマガエルの分布域の変化が見られないことや、雑種由来の戻し交雑個体が多いことは、低頻度の交雑が長年積み重なった結果生じたと考えられた。

[今後の展望]

本研究で、松本・伊奈どちらの盆地でも、トノサマガエルとの交雑によりダルマガエルが絶滅の危機に瀕していることが明らかになった。しかし、トウキョウダルマガエルとナゴヤダルマガエルの性質の違いから、トノサマガエルとの交雑の様式は異なっており、両盆地でのダルマガエルの絶滅要因は全く異なるものであった。いずれにせよ、伊奈盆地におけるナゴヤダルマガエル集団へのトノサマガエルの遺伝子浸透は著しく、同地域では早急にナゴヤダルマガエルを保全する必要があると考えられるが、自然に生じる異種間交雑が絶滅要因であるためその対策には困難が予想される。

[7] 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 (継続)

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。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た研究を昨年から継続している。

[材料・方法]

昨年度交配を行った、オットンガエル 6 個体 (♂3、♀3)、ホルストガエル 4 個

体（♂2、♀2）の人工交配子孫の飼育を継続した。また、同属に分類されることもあるヤエヤマハラブチガエルの雄を用いて、両種の雌から得た卵に人工授精を行い、交配後隔離を観察した。

[結果・考察]

オットンガエルとホルストガエルのペアから得た子孫（およそ 500 個体と 200 個体）を飼育中である。生存率は、オットンガエルでおよそ 40%、ホルストガエルでおよそ 30%であった。

ヤエヤマハラブチガエル（雄）との交雑では、どちらの種も卵も卵割は見られるものの、孵化まではいたらず、ヤエヤマハラブチガエルとオットン・ホルストガエル（狭義の *Babina* 属）の間には、完全な交配後隔離が発達していることが示された。

[将来の展望]

現在飼育中の人工交配子孫の飼育を継続し、性成熟を待って飼育下 2 世代目を得ることにより、絶滅危惧種であるオットンガエルとホルストガエルの飼育法と繁殖法を確立させる予定である。

[8] 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(継続)

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

[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昨年度決定した。また昨年未完成であったオットンガエルのコントロール領域（CR）の全長も決定した。

本年度は、上記 2 種に加え、代表的なアカガエル類でありながら未だ全ミトゲノム情報がないウシガエル (*Lithobates catesbeianus*) と、オットン・ホルストガエルと同属とされることもあるヤエヤマハラブチガエル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、

ミトゲノム構造を指標に、未だ明確になっていないオットン・ホルストガエルの最近縁属について検討することも目的とした。

[材料・方法]

ウシガエルとヤエヤマハラブチガエル各 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、シークエンスを行った。また昨年度は、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 産物から直接シークエ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クエンスを完了した。

[結果]

ウシガエルとヤエヤマハラブチ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 18524 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った。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]

ミトゲノムにコードされる 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った。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。

ウシガエルのミトゲノムは、アカガエル (ネオバトラキア) 一般型であったが、そこ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。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った。また、ヤエヤマハラブチガエル (ここでは *Nidirana* 属とする) の遺伝子配置は、アカガエル一般型とよく似ていたが、オットンガエルとホルストガエルにおいて tRNA-His 遺伝子の偽遺伝子が見られる CR 下流に、tRNA-His の偽遺伝子が見られた。この偽遺伝子の存在は、*Nidirana* と *Babina* 両者の共有派生形質である可能性が高く、狭義 *Babina* 属の最近縁属は、*Nidirana* 属である可能性が高まった。オットンガエルとホルストガエルの集団解析に利用しやすいミトゲノム遺伝子を特定した。また、これまでにコンセンサスが得られていない、狭義 *Babina* 属の最近縁属を絞り込むことができた。

[9] 特定外来生物ウシガエルの遺伝的多様性および導入圧に関する研究

Study on genetic variation and propagule pressure of the invasive alien

amphibian species, *Lithobates catesbeianus*

[目的]

ウシガエル *Lithobates catesbeianus* は本来、アメリカ合衆国東部、カナダ南東部、メキシコ北東部に自然に分布している種であるが、現在では世界各地への移入が確認されている。大型かつ貪欲であるため、在来の生物を捕食し本来の生態系のバランスを崩す可能性が懸念されており、世界の侵略的外来種ワースト 100 に指定されている。日本では 2006 年に外来生物法により、特定外来生物に指定されている。

侵入成功のプロセスを説明する仮説は種によって異なり、一般化することは難しいが、散布体の導入圧（導入された個体数あるいは、導入回数）は、数少ない全体的に合意を得られている要因の一つである。具体的には、遺伝的・人口学的背景によって、より多くの個体、あるいは、より多く回数の導入イベントを経験した個体群が、より定着し易いという考え方である。

現在、野生化しているウシガエルの大部分の由来は、1918 年にアメリカ合衆国ルイジアナ州ニューオーリンズから輸入されたオス 12 匹とメス 5 匹に遡る可能性が高い。河野 (1913) によれば、これら 17 匹の子孫は茨城県および、滋賀県水産試験場において大量繁殖に用いられ、1930 年までに 52 万匹が全国に配布されたとされる。しかし、その後、各地の養蛙場において、何度も独自に輸入したらしく (長谷川 1999、岩澤 1968)、本邦における導入個体群の由来、および有効集団サイズ、現在の個体群における遺伝的多様性の実態は不明である。したがって、本研究では、遺伝的指標を用いて、導入個体の由来ウシガエルの侵入成功プロセスにおける導入圧を検証することを目的とした。

[材料・方法]

日本、および韓国から 13 地点、177 個体の組織（指趾）を採集し、ゲノム DNA を抽出した。なお、採集にあたっては、外来生物法に従い、運搬による他地点への移入は一切行っていない。まず、Austin et al., (2004) の方法にしたがって、13 地点 78 個体について、ミトコンドリアゲノムにコードされている *Cyt b* 遺伝子の部分塩基配列を決定した。これらのデータと Austin et al., (2004) のデータを合わせて分子系統解析およびネットワーク解析を行い、移入個体群の産地を推定した。さらに、Austin et al., (2003) で用いられたマイクロサテライト遺伝子座 7 つのうち、アレル多様度の高い 6 つの遺伝子座について全個体の遺伝子型を決定し、北米大陸の在来集団との遺伝的多様性の比較を行った。

[結果・考察]

Cyt b 遺伝子の 401 塩基を決定したところ、3 つのハプロタイプが存在し、そのうちの 2 つは Austin et al., (2004) における H3 と H7 と同じハプロタイプであり、1 つはこれまでに確認されていない新規ハプロタイプ (H43) であった。さらに Austin et al., (2004) のデータと合わせて分子系統解析および、ネットワーク解析を行ったところ、北米大陸の集団は、東側と西側の大きく二つのクラスターを形成し、Austin et al., (2004) の結果と一致した。このうち、今回、確認できた 3

つのハプロタイプは西側のクラスターに属し、特に、H3 と H7 はニューオリンズと地理的に近い南部の地点で頻度が高いことから、導入個体群はニューオリンズ近郊で捕獲されたものと推測され、文献記録とも矛盾しなかった。また、韓国の集団は、H3 と H43 のハプロタイプであったことから、韓国の移入個体は日本の集団に由来することが考えられた。

また、マイクロサテライト遺伝子座における期待ヘテロ接合度を算出したところ、13 地点の平均値は 0.591 であった。これは、Austin et al., (2003)における北米大陸・オンタリオ湖周辺の在来集団における平均値、0.216 の約 2.5 倍に相当する。また、最大値は茨城県・霞ヶ浦の 0.690 であった。以上のことから、ウシガエルの日本における現存集団の遺伝的多様性は北米の在来集団に比べても非常に高く、侵入成功における導入圧も十分であったことが考えられた。

研究業績

① 原著論文

1. Nishizawa, T., A. Kurabayashi, T. Kunihara, N. Sano, T. Fujii and M. Sumida (2011) Mitochondrial DNA diversification, molecular phylogeny, and biogeography of the primitive rhacophorid genus *Buergeria* in East Asia. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 59: 139-147.
2. Igawa, T., M. Okuda, S. Oumi, S. Katsuren, A. Kurabayashi, T. Umino and M. Sumida (2011) Isolation and characterization of twelve microsatellite loci of endangered Ishikawa's frog (*Odorrana ishikawae*). *Conservation Genet. Resour.*, 3: 421-424.
3. Sumida, M., N. Satou, N. Yoshikawa, A. Kurabayashi, M. M. Islam, T. Igawa, S. Oumi, S. Katsuren, H. Ota, N. Shintani, H. Fukuniwa, N. Sano and T. Fujii (2011) Artificial production and natural breeding of the endangered frog species *Odorrana ishikawae*, with special reference to fauna conservation in the laboratory. *Zool. Sci.*, 28: 834-839.
4. Djong, H. T., M. Matsui, M. Kuramoto, M. Nishioka and M. Sumida (2011) A new species of the *Fejervarya limnocharis* complex from Japan (Anura, Dicroglossidae). *Zool. Sci.*, 28 : 292-299.
5. Kurabayashi, A., M. Matsui, Daicus, M. B., H. S. Yong, N. Ahmad, A. Sudin, M. Kuramoto, A. Hamidy and M. Sumida (2011) From Antarctica or Asia? New colonization scenario for Australian-New Guinean narrow mouth toads suggested from the findings on a mysterious genus *Gastrophrynoides*. *BMC Evol. Biol.*, 11: 175.
6. Iwakoshi-Ukena, E., M. Soga, G. Okada, T. Fujii, M. Sumida and K. Ukena

(2011) Characterization of novel antimicrobial peptides from the skin of the endangered frog *Odorrana ishikawae* by shotgun cDNA cloning. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 412 : 673–677.

7. Iwakoshi-Ukena, E., G. Okada, A. Okimoto, T. Fujii, M. Sumida and K. Ukena (2011) Identification and structure–activity relationship of an antimicrobial peptide of the palustrin-2 family isolated from the skin of the endangered frog *Odorrana*. *Peptides*, 32: 2052–2057.

8. Hasan, M., M. M. Islam, M. M. R. Khan, M. S. Alam, A. Kurabayashi, T. Igawa, M. Kuramoto and M. Sumida (2012) Cryptic anuran biodiversity in Bangladesh revealed by mitochondrial 16S rRNA gene sequences. *Zool. Sci.*, 29: 162–172.

9. Sugawara, H., T. Igawa, M. Yokogawa, M. Okuda, S. Oumi, S. Katsuren, S. Kaneko, T. Umino, Y. Isagi and M. Sumida (2012) Isolation and characterization of ten microsatellite loci of endangered Anderson’s crocodile newt, *Echinotriton andersoni*. *Conservation Genet. Resour.*, 4: 595–598.

10. Kurabayashi, A., T. Nishitani, S. Katsuren, S. Oumi and M. Sumida (2012) Mitochondrial genomes and divergence times of crocodile newts: Inter-islands distribution of *Echinotriton andersoni* and the origin of a unique repetitive sequence found in *Tylototriton* mt genomes. *Genes Genet. Syst.*, 87: 39–51.

② 総説・著書・その他

1. 菅原弘貴・井川武・岩井紀子・山室一樹・大海昌平・住田正幸「徳之島産イボイモリ (*Echinotriton andersoni*) の産卵行動の記録」*爬虫両棲類学会報* 2011 (2) : 115–118

③ 学会発表

国際学会

1. Alam, M. S., M. M. Islam, M. M. R. Khan and M. Sumida “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” 2011 Joint Meeting of Ichthyologists and Herpetologists (July 9, 2011, Minneapolis, USA)

2. Islam, M. M., M. M. R. Khan, M. Kuramoto, T. H. Djong and M. Sumida “Genetic divergence and reproductive isolation among the frogs of the genus *Fejervarya* from several Asian countries” (July 11, 2011, Minneapolis, USA)

3. Sumida, M., N. Satou, S. Oumi, A. Kurabayashi and M. Kuramoto “Inter- and intra-island divergence in *Odorrana ishikawae* (Anura, Ranidae) of the Ryukyu Archipelago of Japan, with description of a new species” 2011 Joint Meeting of Ichthyologists and Herpetologists (July 10, 2011, Minneapolis, USA)

4. Igawa, T., Oumi, S., Katsuren, S., Sumida, M. “Population structures and its causal landscapes of two endangered frog species of genus *Odorrana* – Different scenarios in two islands” Annual Conference of Society for Molecular Biology and Evolution (SMBE) 2011 (July, 27, 2011, Kyoto, Japan)

5. Igawa, T., Oumi, S., Katsuren, S., Sumida, M. “A case study of conservation genetics for endangered species in Japan: Population structures and its causal landscapes of two endangered frog species of genus *Odorrana*” Basic Science International Conference 2012 (February, 2012, Malang, Indonesia)

国内学会

1. 岩越-浮穴栄子・浮穴和義・沖本愛子・曾我美幸・岡田玄也・佐野尚美・藤井保・菅原芳明・住田正幸「絶滅危惧両生類イシカワガエルの皮膚から単離した9種類の抗菌ペプチド」日本動物学会第63回中国・四国支部大会（2011年5月14日、高松）

2. 住田正幸・佐藤直樹・倉林敦・大海昌平・倉本満「奄美大島のイシカワガエルは沖縄とは別種 — 新種『アマミイシカワガエル』誕生」日本遺伝学会第83回大会（2011年9月22日、京都）

3. Djong, T. H.・M. Matsui・M. Kuramoto・M. Nishioka・M. Sumida “A new species of the *Fejervarya limnocharis* complex from Japan (Anura, Dicroglossidae)” 日本爬虫両棲類学会第50回記念大会（2011年10月8-10日、京都）

4. 菅原弘貴・井川武・大海昌平・勝連盛輝・横川昌史・井鷲裕司・住田正幸 「絶滅危惧種イボイモリのマイクロサテライト DNA を用いた集団構造解析と飼育下繁殖の試み」日本爬虫両棲類学会第50回記念大会（2011年10月9日、京都）

5. 井川武・大海昌平・勝連盛輝・住田正幸 「絶滅危惧種イシカワガエルにおける集団構造とその景観要因」日本爬虫両棲類学会第50回記念大会（2011年10月10日、京都）

6. 倉林敦・松井正文・Amir Hamidy・Daicus M. Belabat・倉本満・住田正幸「オセアニアヒメアマガエル亜科はどこからきたのか？：亜科所属不明属

Gastrophrynoideaの系統的位罫に基づく推定」日本爬虫両棲類学会第50回記念大会
(2011年10月8～10日、京都)

7. 掛橋竜祐・倉林敦・大海昌平・勝連盛輝・細将貴・住田正幸「ミトコンドリア
ゲノム情報に基づく Babina 属の系統的位罫」日本爬虫両棲類学会第 50 回記念大会
(2011 年 10 月 10 日、京都)

8. 新谷望・嶋村正樹・勝連盛輝・倉林敦・住田正幸「イシカワガエル青色変異個
体の皮膚色素胞単位の観察」日本爬虫両棲類学会第50回記念大会 (2011年10月10
日、京都)

9. 宇野好宣・西田千鶴子・高木知世・井川武・上野直人・住田正幸・松田洋一
「無尾両生類における性染色体の起源とその進化に関する分子細胞遺伝学的研究」
日本染色体学会第 62 回年会 (2011 年 11 月 12 日、平塚)

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 13,410 千円 (担当 住田正
幸、矢尾板芳郎)

2. 科学研究費補助金 若手研究(B) 「西南諸島に産する両生類絶滅危惧種の遺伝
的多様性の解明と飼育繁殖における遺伝的管理」1,500 千円 (代表 井川武)