



2013年度両生類研究施設研究活動及び研究成果報告書

平成26年8月1日

広島大学大学院理学研究科附属両生類研究施設

## 目次

I. 施設概要	3
II. 教育活動	6
III. 研究活動と研究内容現況	7
IV. 社会活動	19
V. 国際交流活動	22
VI. その他（特記事項）	24
VII. 各研究グループの研究内容と研究業績	26
発生研究グループ	26
遺伝情報・環境影響研究グループ	44
進化多様性・生命サイクル研究グループ	65
リーディングプログラムによる特任教員	111
生理生態学研究部門（客員部門）	
プロジェクト研究①	114
プロジェクト研究②	118
プロジェクト研究③	124
プロジェクト研究④	127

## 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。また，平成24年4月からNBRP再建のために，学長裁量経費により特任教授が採用された。また，今年度4月からリーディングプログラムによる特任准教授が配置された。

今年度から研究の活性化と構成員の流動化を目的に，従来の3部門制を廃して3グループ制へと改組した。また，これに伴い従来，発生遺伝学部門に属していた系統維持班は，施設長直属とすることとした。平成25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），特任教授1（柏木昭彦），准教授4（鈴木厚、古野伸明、三浦郁夫、高瀬稔），特任准教授1（高橋秀治），助教4（中島圭介、倉林敦、花田秀樹、田澤一郎），特任助教2（竹林公子、柏木啓子），客員教授2（Miguel Vences, Kelly Zamudio），研究員（Hasan Mahmudul）、契約一般職員（中島妙子）である。系統維持班は技術員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（島田歩稀）がいる。

系統維持班では，両生類200種500系統、約3万匹の野外系統及び突然変異系統等の特殊系統を保存している。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），絶滅危惧種系統，遺伝子組換え系

統, などがある。系統維持班では平成25年度には, 系統維持している8 系統 1, 427 個体を研究・教育材料として大学および高等学校, 中学校, 小学校に配布した。特に, 系統維持班とNBRPからは広島県教育バザールへ参加し, 生物教材としてネッタイツメガエル, アホロートルを62件183匹, およびフタホシコオロギ2, 000匹を提供した。また, 日本や世界各地から昭和51年より約30年あまりかけて野外収集した 9 科27属112種320集団12, 600匹及び実験的に作製された特殊系統100系統 4 千匹のカエルがマイナス80度に凍結保存されている。

平成 14 年度より文部科学省の第 1 期と第 2 期のナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) の中核的拠点整備プログラム「ネッタイツメガエル」の中核機関としての事業は, 一昨年度末で一旦終了した。昨年度 6 月から, 第 3 期 NBRP の新規採択課題として, あらたに「ネッタイツメガエル」の中核機関として「ネッタイツメガエルの近交化・標準系統の樹立・提供」を行っている。課題管理者として住田正幸, 課題協力者として柏木昭彦, 鈴木厚, 古野伸明, 倉林敦, 中島圭介, 花田秀樹, 田澤一朗, 柏木啓子, 竹林公子, 彦坂暁 (総合科学院) が参加している。また, 今年度からこのプロジェクトには 3 名の契約技術職員 (小林里美, 竹中純子, 玉城ゆうな<平成 25 年 5 月から>) が従事している。第 3 期 NBRP の運営委員会を 12 月 4 日に神戸商工会議所会館で開催した。この委員会には, 運営委員 6 名 (基礎生物学研究所・教授 上野直人: 委員長, 東京大学大学院理学系研究科・准教授 平良眞規, 東北大学大学院生命科学研究所・教授 田村宏治, 広島大学大学院理学研究科・教授, 木下勉 立教大学理学部・教授, 前野貢 新潟大学理学部・教授, 住田正幸: 代表機関課題管理者), オブザーバー 1 名 (情報・システム研究機構国立遺伝学研究所・准教授 山崎由紀子), NBRP 事務局 2 名 (事務局長 佐藤清, 事務局員 平田裕美), 課題協力者 3 名 (柏木昭彦, 鈴木厚, 花田秀樹) が参加し, 昨年度の事業概要説明を行なったあとで, 事業に対するコメントや助言をいただいた。また, 9 月 28 日には第 84 回日本動物学会で NBRP ネッタイツメガエル主催のシンポジウム「生物実験材料としてのネッタイツメガエルの長所と有用性」を開催 (参加者 150 名) した。さらに, 12 月 3 日~5 日には第 36 回日本分子生物学会で本リソースの実物つきパネル展示を行い, 2014 年 3 月 3 日~5 日には本施設で実験技術講習会を開催した。今年度の保存実績は 89 系統 7, 683 匹, 提供実績は 124 件 7, 056 匹, 論文実績は (当施設で把握している限りで) 10 編であった。

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—」(平成 26 年 3 月まで) が 5 年プロジェクトとして展開されてきた。今年度も, 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きた。今年が最終年であるため, 総括として国際シンポジウム ”Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing” を行なった。本シンポジウムには, 日本を含め 11 カ国から合計 93 名の参加者があり, 多様な国からの参加者に対し, 両生類研究施設の最新研究成果をアピールできた。

平成 23 年 10 月から資格審査によって助教以上 10 名の教員が学部教育担当になっており, 今年度は「教養ゼミ」「生物の世界」「自然科学概説 A」「動物の系統と進化」、教養教育科目「カエルから見た生命システム」、「実習」、学部生チューター、教務委員などを担当している。また, 今年度も STEP10 (国

立 10 大学大学院理学研究科等学生交流推進プログラム)として、10 大学学生のための集中講義「両生類を用いた先駆的研究」を開講した。

昨年度から総合博物館の理学研究科サテライト館のオープンスペースを玄関ロビーに開設し、一般公開を行なっている。今年度の施設見学者/施設訪問者は 52 件 985 人で、その中には、山内昌之先生 (東京大学名誉教授)、ジョン・グランジノ・ロダス先生 (サンパウロ大学長)、二宮正人先生 (サンパウロ大学教授) などもある。

一昨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。今年度は、学内から 16 名の研究員、学外海外から 33 名の客員研究員が推薦され、学内外および海外とも共同研究を展開している。共同研究相手先は、国内では東京大学、京都大学、九州大学、名古屋大学、北海道大学、東京工業大学、岡山大学、徳島大学、島根大学、新潟大学、鹿児島大学、琉球大学、自治医科大学、札幌医科大学、県立広島大学、福岡教育大学、長浜バイオ大学、奈良先端大学、沖縄科学技術大学院大学、兵庫県立大学、いわき明星大学、芝浦工業大学、北里大学、立教大学、帝京大学、玉川大学、基礎生物学研究所、遺伝学研究所、産業技術総合研究所、東京都医学総合研究所、JT 生命誌研究館、中外製薬、広島大学 (原医研、理学研究科、医歯薬保健学研究科)、海外ではヴァージニア大学 (米国)、UCLA バークレー (米国)、米国エネルギー省 DOE Joint Genome Institute (米国)、レンヌ 1 大学 (フランス)、キャンベラ大学 (豪州)、成都生物学研究所 (中国)、バングラデシュ農業大学 (バン格拉シュ)、ブラビジャヤ大学 (インドネシア)、ガードン研究所 (英国)、ポーツマス大学 (英国)、ウッズホール海洋生物学研究所 (米国)、ブラウンシュバイク工科大学 (ドイツ)、日米 *Xenopus laevis* genome consortium、米国カリフォルニア州立大学、スウェーデン Ludwig Institute for Cancer Research 等がある。

今年度は、8 月 2 日、10 月 16 日、12 月 17 日、1 月 23 日に両生類研究施設運営委員会を開催し、施設の活動実績と活動計画報告、今年度の活動方針及び平成 25 年度の客員教員と研究員/客員研究員の承認などを行った。

## 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・進化の授業やスロー生物学演習、社会実践生物学特論、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、後期1年に2名（そのうち1名は国費留学生）、2年に2名（そのうち1名は学振特別研究員DC2）で合計6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際学会発表は1件、国内学会発表は1件であり、博士課程後期学生の国際学会発表は3件、国内学会発表は2件である。原著論文発表は博士課程後期学生で3編である。大学院生によるRA 2件、TAは4件である。

学部教育科目として「教養ゼミ」「生物の世界」「生物科学概説A」「基礎生物科学B」「カエルから見た生命システム」「HUSA」「動物の系統と進化」を分担または担当し、さらに、生物科学基礎実験I、II、III、情報活用演習、学部生チューターや教務委員を担当している。

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。

柏木昭彦特任教授は、山陽女子短期大学臨床検査学科客員教授及び安田女子短期大学非常勤講師を務めている。三浦郁夫准教授は放送大学面接授業“生物と性の進化”(放送大学広島学習センター11月26-27日広島市)を行なった。住田正幸教授は、山口大学大学院理工学研究科講師(H25.4.1~H26.3.31)として環境共生生物科学特別講義(両生類進化遺伝学)(大学院生用1単位後期)を行なった。鈴木厚准教授は、名古屋大学医学部非常勤講師(発生学)(平成25年12月)として講義を、三重県立松阪高校のキャリア教育と理数科課題研究指導(平成25年7月)を、さらに第一学習社編集部で高等学校教科書(生物)に関する助言を行なった。高橋秀治特任准教授は放射線災害復興を推進するフェニックスリーダー育成プログラムを担当した。矢尾板教授は、平成25年8月10日(土)19時~19時44分NHK教育テレビ放送で放映された一地球ドラマチック「生きものはなぜ姿を変えるのか」-の監修をした。

### III. 研究活動と研究内容現況

発生研究グループ

構成員：矢尾板芳郎（教授），高瀬 稔（准教授），中島圭介（助教），田澤一朗（助教）

#### ○研究活動の概要

本研究グループは「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。研究内容は以下の通りである。

#### 1) 生殖細胞特異的なゲノム編集法の開発

本研究は両生類においてTALENを用いて生殖細胞特異的にゲノム編集を行う方法を開発するものである。目的の遺伝子変異が発生異常、致死もしくは不妊を誘導する場合、F0でそのような異常が生じ、それ以降の解析が不可能になる。しかし、この方法が確立すれば発生、成長、変態、性成熟、生殖等に関わる重要な遺伝子でも破壊されたホモ個体をF1で得ることができるようになり、遺伝子の機能解析が可能となる。

germ plasm を含む卵割球が将来生殖細胞に分化していくことがアフリカツメガエルで知られている。germ plasm で発現している遺伝子の mRNA の 3' UTR を、緑色蛍光蛋白質 mRNA に付加すると緑色蛍光蛋白質の mRNA が生殖細胞に限局し、緑色蛍光蛋白質そのものも生殖細胞に局在するようになる。この遺伝子の 3' UTR を付加した TALEN mRNA を受精卵に注入すれば TALEN mRNA は生殖細胞に限局し TALEN タンパク質も生殖細胞に局在すると考えられる。

ネッタイツメガエルのこの遺伝子の 3' UTR をクローニングする。メラニン色素の合成に関わるチロシナーゼを標的とする TALEN mRNA にこの遺伝子の 3' UTR を付加してネッタイツメガエルの受精卵に注入する。この時、体細胞でチロシナーゼの破壊が行われない程度まで注入する mRNA の量を減少させる。その個体を成熟後にアルビノネッタイツメガエルと交配させる。得られる F1 の染色体の一群はアルビノ由来なので、インジェクションを行った F0 の生殖細胞におけるチロシナーゼの破壊された割合が F1 のアルビノの割合と等しくなると考えられる。

#### 2) TALEN 法の効率を初期胚において向上させる方法の開発

母親由来ではない胚自身の遺伝子の発現が始まる mid-blastula transition (MBT) よりも早い発生段階で 100% の変異導入効率を得られる方法を開発する。100% 近く変異が導入された F0 で観察することで、標的遺伝子の変異による形質の予測が可能となる。その結果、性成熟を待ち、次の世代を得る必要がなくなり、研究のスピードが格段に上がることが期待できる。また、初期発生に重要な遺伝子でノックアウトが可能になる。

アフリカツメガエルの卵母細胞を取り出し、TALEN mRNA を注入する。プロゲステロンで成熟させ、他の雌の腹腔に戻して産卵させ、受精させる。この方法では TALEN を卵母細胞で発現させ数日間おくことができるので、TALEN の発現

量が高いときに受精させることが可能となり、高い変異導入効率を得ることが可能であると考えられる。

この方法により MBT 以前で 100%の効率で変異を導入することができた。しかし、卵母細胞での TALEN の発現量は低く、受精後にタンパク合成が盛んに行われることが新たに分かった。

### 3) 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。」という説は斬新なものであった。当時は私たちの研究室等は「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。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。*ouro* 1 遺伝子と *ouro* 2 遺伝子のどちらか一方のノックダウンで変態時の尾の退縮が抑制されると報告されている。*ouro* 1 遺伝子と *ouro* 2 遺伝子に対する TALEN を作成して、その mRNA をネッタイツメガエルの受精卵に注入しノックアウトカエルを作製し、変態時の尾の変化を観察する。

*ouro* 1 遺伝子と *ouro* 2 遺伝子が破壊されたカエルを作製した。今後、そのカエルの交配により多数の F1 を生じさせ、それらの *ouro* 遺伝子変異ガエルを解析して、各々に対応する表現型を観察する。

### 4) レチノイド処理による無尾両生類幼生の尾部切断部におけるホメオティック肢の誘導の再現

20 年程前、脊椎動物のホメオティック変異が報告された。インドの無尾両生類の幼生の尾部を切断しレチノイドで処理すると、尾ではなく、後肢の様な構造が生じた。この現象は、実験によく使われる種では再現されなかったため、分子レベルでは全く解析されてこなかった。我々はこの現象を研究するために、本邦で容易に入手可能な無尾両生類を用いてホメオティック肢形成の再現を試みた。

様々なカエルの幼生を用い、尾部を切断し、レチノイド溶液に移し、ホメオティック肢形成が起こるか否かを確かめた。また、ホメオティック肢におけるマーカーの遺伝子発現を RT-PCR でしらべた。

処理したニホンアカガエル、ヤマアカガエル、およびアマミアカガエルの一部で尾部切断部に過剰な肢芽が認められた。これらのホメオティック肢は尾部退縮中も成長し、皮膚と筋肉は成体型のマーカー遺伝子を発現していた。

本研究における遺伝子発現解析は、本来変態に伴い死滅する予定だった尾部の一部の細胞の運命が変化し、成体型器官として成長したことを示す。したがって、内因性レチノイドと変態後の細胞の運命制御との関係が示唆される。

### 5) 性転換機構の解析：ツチガエルおよびトノサマガエルの生殖腺に対する環境化学物質およびエストロゲンの影響

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。一方、内分泌かく乱作用を持つ環境化学物質が生殖腺や生殖細胞の分化に影響することが知られている。これまで、ツチガエル (*Rana rugosa*) を用いて環境

化学物質投与による生殖腺および生殖細胞への影響を組織学的に解析してきた。今回は、環境化学物質投与によるツチガエル精巣卵形成過程における遺伝子発現について解析した。また、トノサマガエル (*Pelophylax nigromaculata*) を用いたこれまでのエストロゲン曝露実験の結果、雌化が起こっている可能性が考えられた。今回、再現性を確認するためのエストロゲン曝露実験を行った。

6) 両生類生殖腺分化機構の解析：ネッタイツメガエルの全雄幼生集団作製の試みと予想される性決定機構

性転換機構や性分化機構を解析する場合、性に関して汎用性のある遺伝子マーカーが得られていない種においては、全て雄または全て雌からなる幼生集団が有用なツールになる。ネッタイツメガエル幼生にエストロゲンを投与すると、ほとんどが雌からなる集団が得られることから、雄から雌への性転換が誘導されることが考えられる。性決定機構が ZZ/ZW 型の場合、その雌（遺伝的雄の性転換個体）を用いた戻し交配により、全雄幼生集団が得られることが期待される。しかし、これまでの HU 系統を用いた戻し交配の結果、雄が有意に多い幼生集団は得られたが、ほぼ全てが雄からなる幼生集団は得られなかった。そこで今回、アイボリー系統を用いてエストロゲン投与および戻し交配を行った。

7) ネッタイツメガエルの肝臓と尾における甲状腺ホルモン受容体遺伝子発現

これまで、弱いエストロゲン作用を持つ環境化学物質ビスフェノール A (BPA) が甲状腺ホルモン T3 による尾の退縮および尾の甲状腺ホルモン受容体 (TR) 遺伝子発現に対して阻害作用を持つことが報告されている。また、尾以外の器官も TR 遺伝子を発現していることが報告されている。両生類のライフサイクルにおける環境化学物質影響を考えると、幼生と成体に共通して存在する TR 遺伝子発現器官に注目する必要があると考えた。そこで、幼生期および変態完了後の肝臓に着目し、甲状腺ホルモン作用に対する BPA およびエストロゲンの影響について調べた。

## 遺伝情報・環境影響研究グループ

構成員：柏木昭彦（特任教授）、古野伸明（准教授）、三浦郁夫（准教授）、花田秀樹（助教）、柏木啓子（特任助教）

### ○研究活動の概要

遺伝情報・環境影響研究グループは、卵の分化、生殖腺、体色を決定する機構、環境と内分泌攪乱など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25年度には本研究グループでは、原著論文5編、著書・総説2編、国際学会での一般講演9件、国内学会での招待講演1件、国内学会での一般講演15件、研究助成金の受入は3件である。研究内容は以下の通りである。

#### 1) 両生類におけるTALEN技術を用いた標的遺伝子の破壊

両生類は多くの独特な特徴を備えていることから、長期にわたって伝統的に重要な実験動物として用いられてきた。変態や再生といった現象の解明は生命科学にブレークスルーをもたらすことは明々白々である。無尾両生類の変態時における、尾部短縮を含む大掛かりな体の作り変えは、ほとんどの動物種では見られない。こうした興味深い出来事の分子機構を明らかにするための方策の一つとして、個体レベルでの遺伝子破壊技術を駆使して、関与する遺伝子の機能を調べることが大切である。学内共同研究を行い、TALENsを用いてツメガエルの標的遺伝子破壊を試みている。

#### 2) 両生類の対する内分泌かく乱化学物質の影響評価

内分泌かく乱化学物質が世間の耳目を集めたのは、1996年にシーア・コルボン等の自著『奪われし未来』が出版されてからである。EDCsとは内在性ホルモンの正常な作用をかく乱する物質のことであって、それらはヒトを含む動物種の個体レベルでの発生・成長や性分化、脳の発達、行動、恒常性等に悪影響を及ぼすばかりでなく、種の存続にも打撃を与えることも懸念されている。内分泌かく乱化学物質の多くは化学的に安定で脂溶性が高いため、曝露個体内における生物蓄積をもたらす。私達は今、生活関連物質や医薬品の生物影響についてツメガエルを用いて調べている。

#### 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

環境中の化学物質の生物に対する悪影響（例えば、内分泌かく乱作用）が危惧されている。両生類の変態は甲状腺ホルモン（TH）に支配されている。変態中のオタマジャクシからカエルへの体の作り変えは無尾両生類が最も顕著であるという点で、この動物は甲状腺ホルモンかく乱作用を持つ化学物質の生体影響の試験評価系として非常に優れている。私達は、甲状腺ホルモンアゴニストまたはアンタゴニストである化学物質を高感度に検出するためのトランスジェニックシステムを開発中である。その一例として、THにより活性化されるTRβ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て作出されたアフリカツメガエルのトランスジェニック（Tg）システムについて紹介する。この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指し、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を通して評価する方法を検討した。

4) NBRP ネットイツメガエルの研究目的のための提供と、このカエルを用いた研究提案

両生類は強い興味をそそられる特質を備えていることから、17 および 18 世紀のヨーロッパではすでに重要な実験動物としての地位を確立していた。20 世紀半ばからはサハラ砂漠以南に生息するアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) が医学・生物学研究の重要なモデル生物として世界中の研究機関で用いられてきた。ところがこのカエルの場合、複数種の雑種からの倍数体進化によって生じた異質 4 倍体であり、また生活環も 1.5~2 年と長いといった欠点を有するため、今日の生命科学、特に遺伝学の研究にはもはや用をなさないのだ。これに対して、最近では① 2 倍体でゲノムサイズが小さい、② 発生が速くて世代時間が短い (雄 6 ヶ月、雌 8 ヶ月)、③ ゲノム配列の解読が終了したなどの理由から、西アフリカ低地の熱帯雨林に生息するネッタイツメガエル (*Xenopus (Silurana) tropicalis*) がポストゲノム時代の有用な実験動物として注目を集めている。

両生類研究施設は、2012~2016 年にかけて、文部科学省の主催するナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) に参加、研究者や教育関係者にネッタイツメガエルを提供するわが国で唯一の中核機関に指名されている。ネッタイツメガエルを用いて、私達はすでに環境中化学物質の内分泌かく乱影響を調査、あるいは遺伝子機能の解析のための遺伝子改変ガエルを作製している。今後は、簡便で確実な配偶子凍結法の開発、雌性発生法による近交化の促進・遺伝子組成が斉一なホモ接合体の作出、ミュータジェネシスなどを計画中である。

5) ネッタイツメガエル Myt-1 遺伝子のクローニングと初期発生における機能解析

生物の細胞周期 ( $G1 \rightarrow S \rightarrow G2 \rightarrow M \rightarrow G1 \dots$ ) は CDK/サイクリン複合体により調節されている。CDK/サイクリン複合体が G1 期、G2 期で活性化されることにより細胞周期が S 期、M 期にそれぞれ進行する。ツメガエル卵母細胞は G2 期で停止しており、ホルモン刺激により CDK/サイクリン複合体が活性化され、M 期に進行し卵成熟を起こす。タンパク質リン酸化酵素である Myt1 は、ホルモン刺激を受けるまで CDK をリン酸化することで活性を抑制し、細胞周期 (卵成熟) を抑制すると考えられている。

Myt1 遺伝子は卵母細胞だけでなく初期胚でも発現しているが、初期発生での機能は知られていない。また近年利用が増大しているネッタイツメガエルの Myt1 遺伝子はまだクローニングされていない。そこで本研究では、ネッタイツメガエル Myt-1 遺伝子のクローニングと初期発生における機能解析を行った。

6) 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。

#### 7) 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。

#### 8) アフリカツメガエル初期胚に対する過重力の影響

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。両生類をモデル生物として過重力が発生にどのような影響を与えるかを調べ、その分子的な機構を調べる。

#### 9) XY 型と ZW 型生決定システムにおける生殖腺性差構築機構のちがい

ツチガエルには性決定機構が XX/XY 型と ZZ/ZW 型の地域集団が存在する。それゆえ、2つの性決定メカニズムの違いおよび、両者間における生殖腺性差構築機構の違いを調べる上で優れた研究材料である。本種の ZW 型集団では、その性染色体上に *SOX3* 遺伝子が存在する。この遺伝子は真獣類の精巣決定遺伝子 *SRY* の元祖遺伝子として知られているが、ツチガエルの幼生生殖腺では逆に ZW メスにおいて高い発現が観察されており、卵巣決定機能が示唆されている。そこで、*SOX3* 遺伝子の卵巣決定機能を検証するため、TALEN 法によるゲノム編集を用いて機能阻害実験を行った。その結果、mutation を確認した 7 個体に変態した。ZW 個体 4 個体のうち 1 個体は精巣を形成し、性分化関連遺伝子もオス特異的発現パターンを示した。一方、3 個体の ZZ はすべて正常な精巣を形成した。ただし、そのうち 2 個体は卵巣分化に関連する *Cyp19* と *Foxl2* 遺伝子の発現が正常雄よりも有意に高かった。以上の結果から、*SOX3* は ZW 型集団において卵巣決定の初期因子として機能することが示唆される。

一方、XY 型集団では、ZW 型と異なり、*SOX3* 遺伝子の発現は XY 雄幼生の生殖腺において高く、真獣類と同様のパターンを示した。TALEN 法による機能阻害実験を行ったところ、生殖腺の表現型に変化は見られなかった。さらに、機能誘導実験を行うため、*Y-SOX3* 遺伝子コンストラクトを作成し、2 個体の F0 個体を得た。今後、F1 を作成し、その機能を検証する。

#### 10) XY 型から ZW 型へ性決定機構の進化

ツチガエルの地域集団には XY 型と ZW 型の地域集団が存在している。これまでの研究成果をもとに、本種の XY 型から ZW 型へ性決定機構が進化した要因について考察した。それには、1) 東西に存在する 2 つの元祖型集団の遺伝的な違い、2) 両者の交雑による性比の偏り、3) 日本列島の地質学的歴史において生じた地理的変動による集団の融合や隔離、そして 4) 一つないし、少数遺伝子の発現量の微小なバランスによる性決定機能の変化、の 4 点が性決定機構の頻繁な変化を引き起こしたものと推測した。

### 1 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

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遷移 (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オンは 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。

### 1 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

培養カエル白血球細胞を用いて、本研究はビタミン E の抗酸化機能のかく乱のメカニズムを調べている。

活性酸素を誘発させることで、除草剤パラコートは培養細胞に染色体異常を誘発させることが知られている。そこで、培養カエル白血球細胞に対して、次の 4 種類の処理を行った、1)  $10^{-6}$  M パラコート処理のみ、2)  $10^{-7} \sim 10^{-5}$  M ビタミン E 処理のみ、3)  $10^{-6}$  M パラコート +  $10^{-7} \sim 10^{-5}$  M ビタミン E、4) 無処理。その結果、無処理およびビタミン E 処理細胞において染色体異常を持った細胞の発生率はいずれも 10% 未満であった。それに対して、パラコート処理のみの場合、染色体異常を持った細胞の発生率は 23% であった。さらに  $10^{-6}$  M パラコート +  $10^{-5}$  M ビタミン E 処理の場合、染色体異常を持つ異常な細胞の割合が 50% 近くまでに達した。これらの結果から、ビタミン E はパラコートの細胞遺伝毒性を抑制するのではなく、むしろ強めることがわかった。

### 1 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

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なく、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。

## 進化多様性・生命サイクル研究グループ

構成員：住田正幸（施設長，教授），鈴木 厚（准教授），倉林 敦（助教），竹林公子（特任助教），井川 武（特任助教），Islam Mohammed Mafizul（特任助教），Hasan Mahmudul（研究員）

### ○研究活動の概要

進化多様性・生命サイクル研究グループでは、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、人工繁殖と精子凍結保存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、光る透明ガエルの作製を進めている。また、両生類初期胚を用いた形態形成の研究も展開している。平成25年度には本研究部門では、原著論文9編、総説・解説など1編、国際会議での一般講演19件、国際会議での招待講演2件、国内学会での一般講演20件、研究助成金の受入は7件である。研究内容は以下の通りである。

#### 1) 絶滅危惧種アマミハナサキガエルとイボイモリの飼育下繁殖の試み

アマミハナサキガエル (*Odorrana amamiensis*) は、奄美大島と徳之島に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、環境省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、鹿児島県の天然記念物に指定されている。また、中央琉球に分布するイボイモリは、奄美大島や徳之島や沖縄島北部に分布しており、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 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、これらの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。

#### 2) 絶滅危惧種イボイモリにおける集団構造及び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。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、保全遺伝学分野で広く用いられているが、すでに我々は本種に有効なマイクロサテライト遺伝子座、10座の開発を昨年度に完了している (Sugawara et al., 2012)。そこで本研究ではこれらを利用して、本種の最も詳細な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、集団遺伝学的解析を行った。

#### 3) バングラデシュ産トラフガエル類における遺伝的多様性と繁殖隔離機構および飼育下繁殖

バングラデシュでは乱獲等によりトラフガエル *H. tigerinus* が野外で激減しており、本種の採集は法律で禁止されている。一方、最近、著者らはバングラデシュの南東沿岸域から近縁種ハマトラフガエル *H. litoralis* を新種として記載した (Hasan et al., 2011)。本研究では、バングラデシュ全域における本種群の遺伝的多様性を明らかにするとともに、これら2種間の交配後隔離機構を明らかにすることを目的に、野外から採集した個体を使って、ミトコンドリ

ア DNA の Cytb 遺伝子を解析するとともに、人工受精法によって交雑実験を行った。さらに、本種の域外保全を目的に、野外から採集した個体を使って飼育下繁殖を試みた。

#### 4) カエル亜目における SINE の探索 : SINE2-1XT ホモログおよびサブファミリーの系統的起源

カエル亜目 (Neobatrachia) は、現生両生類種の 95% を含む巨大な分類群である。本分類群のサブグループ (科～亜科レベル) の多くは、大陸移動に伴い分布拡大と系統分岐を生じたとされる一方で、従来の分子系統解析では解決できない系統額上の問題が数多く残っており、正確な生物地理学的な考察が困難な状況であった。そこで、本研究では、従来法にはない利点を持つ、転移因子 SINE の挿入に基づく系統解析によって、これらの問題を解決することを最終目的として研究を行った。ただし、これまでにカエル亜目からは SINE 配列が発見されていなかったため、SINE (Short Interspred Element) マーカーによる系統解析を実施するためには、まず、SINE を探索し、単離・同定を行う必要があった。SINE 探索に加え、本研究では以下の点を目的として研究を実施した。

(1) 両生類における SINE の起源と系統的分布の解明。(2) ゲノム内の SINE の存在比の解明と SINE 法実施可能性の検討。(3) カエルミトゲノムにおいて配置変化が生じやすい遺伝子の周辺に、SINE/LINE (Long Interspred Element) で共通してみられる LINE 逆転写酵素蛋白質の認識配列が存在するかの検討を行なった。

#### 5) 透明ガエル「スケルピオン」の遺伝様式と真皮色素細胞の組織学的観察

ニホンアカガエルには、灰色眼と黒色眼の 2 つの色彩突然変異があり、別々の遺伝子座の劣性ホモ接合体で発現することが分かっている。本研究の目的は、これらの色彩突然変異を用いて、皮膚が透明で内臓が透けて見える透明ガエルを効率的に作製し、その遺伝様式を明らかにすることである。透明ガエルの作製には、灰色眼、黒色眼、野生型 (ヘテロ) の雌雄を用いた。人工受精法により、灰色眼♀×黒色眼♂、野生型 (ヘテロ) 同士、灰色眼♀×野生型 (ヘテロ) ♂、透明ガエル同士の 4 組で交配を行った。また、透明ガエルの皮膚の微細構造を調べるため、野生型、黒色眼、灰色眼および透明ガエルの真皮色素細胞を電子顕微鏡で観察した。その結果、野生型では黄色、虹色、黒色の 3 種類の色素細胞が層状に観察された。灰色眼には黄色素胞と虹色素胞が存在し、虹色素胞には異常な丸い反射小板が観察された。黒色眼には黄色素胞と黒色素胞が存在し、黄色素胞には未熟なプテリノソームやカロテノイド小胞が観察されたが、虹色素胞は観察されなかった。透明ガエルでは色素細胞の数が少なく、未熟な黄色素胞様の細胞が見られ、その中にはメラノソーム様の構造も観察された。

#### 6) 絶滅危惧種における精子凍結保存法の確立

絶滅危惧種の域外保全を行う上で、精子凍結保存は有効な手法である。両生類では、ツメガエルで精子凍結保存法が一般化されており、また、陸上性ガエルでも、精子凍結保存後の受精率を観察した例がある。しかし、絶滅危惧両生類において、精子凍結保存を用いた域外保全法は確立されていない。本研究では、絶滅危惧両生類において精子凍結保存と人工授精を組み合わせた簡便な域外保全法を確立することを目的とした。ツメガエル類で確立されている精子凍結保存法は、液体窒素を使わず、 $-80^{\circ}\text{C}$  のディープフリーザーを用いる。また、

高価な試薬が不要という利点があり、きわめて低コストで実施が可能である。本研究では、この方法を絶滅危惧種のアマイシカワガエル、アマミアカガエル及びアマミハナサキガエルに適用した。凍結精子（24時間から1年、-80°Cで凍結）を解凍し、運動能を調べた結果、凍結した精子のかなりが、運動能を喪失していた。しかし、この精子を用いて人工授精を行った結果、イシカワガエルとアマミアカガエル及びアマミハナサキガエルのいずれにおいても、正常卵割する卵が観察でき、-80°C保存精子にも受精能が残っていることが明らかになった。受精率は保存期間や卵の状態によって変動した。

#### 7) バングラデシュのヒメアマガエルに2種の新種記載

ヒメアマガエルは519種からなり、ヒメアマガエルは基準属である。この属はいろいろな外部形態によって特徴つけられる。この属のカエルはアジア全域に広く分布しており、バングラデシュには3種(*Microhyla ornata*, *M. berdmorei* and *M. rubra*)が知られている。最近、私たちは Chittagong と Mymensingh-Sylhet からミトコンドリア DNA の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列情報に基づいて従来3種とは異なるハプログループを見つけた。分子データはこれらのハプログループが他のヒメアマガエル属とは明らかに遺伝的に分化していて、形態的にも従来のもとは異なることから、バングラデシュのヒメアマガエル属に2種の新種を記載した。

#### 8) 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

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。また、数学者 Thompson をはじめとする研究者によって、生物の多様な形態を、背腹軸と頭尾軸の調和機構の変化で説明しようとする試みがなされている。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。

#### 9) アフリカツメガエルのゲノム解析

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) は、医学生物学研究において長年使われており、膨大な研究成果を生んできた。近年のゲノム科学の進展に伴い、アフリカツメガエルのゲノムを解読して、これまでの研究成果を活用・展開させる機運が高まり、米国エネルギー省・カリフォルニア大学・テキサス大学、および東京大学・遺伝学研究所・広島大学などによる国際共同研究が開始されている。先にゲノムが解読されたネッタイツメガエル (*Xenopus (Silurana) tropicalis*) との比較解析を行い、ゲノム・遺伝子進化のメカニズムを明らか

にすることを目的としている。

#### 1 0) 国際ツメガエルリソース拠点ネットワークの構築

実験モデル動物として優れた特徴を持つネッタイツメガエルおよびアフリカツメガエルのバイオリソースを国際的な枠組みで保存・提供するために、英国・米国のツメガエルリソース拠点と両生類研究施設が連携を始めている。特に、ネッタイツメガエルについては、文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) の平成 24 年度新規採択課題としてサポートを受けている。両生類研究を推進するため、および両生類研究施設が国際的に貢献するために、積極的な取り組み・連携を行なうことを目的としている。

#### 1 1) アフリカツメガエル初期発生過程における神経誘導の保証機構にはたらく遺伝子ネットワークの解明

生物は遺伝的・環境的变化にうまく適応して生息圏を拡大している。両生類の胚は羊膜や卵殻を持たず様々な影響を受けやすいにも関わらず、正常に発生することができる。これは、両生類が遺伝的・環境的变化に適応する仕組み、すなわち発生生物学者 C. H. Waddington により提唱されたキャナリゼーションを発達させてきたことを示唆する。初期胚は様々な遺伝的・環境的变化にさらされながらも、発生過程で背腹と前後の軸が形成され、初めて胚の 3 次元座標が精確に決まり、基本的な体の設計図 (ボディープラン) が確立される。背腹軸は腹側化因子 BMP によって、前後軸は後方化因子 Wnt、FGF やレチノイン酸によって、それぞれ決定されている。従来から、背腹軸と頭尾軸は互いに調和しながら形成されると考えられているが、体軸形成の調和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、背腹軸と頭尾軸の調和機構は、ほとんど未解明である。これまでに、私達の研究グループで同定した FoxB1 転写因子が、腹側化因子 BMP のシグナルを抑制して神経を誘導 (背側化) し、後方化因子 Wnt・FGF のシグナルを活性化して胚を後方化することを明らかにしている (Takebayashi-Suzuki *et al.*, *Dev. Biol.* 2011)。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調和させてボディープランの成立に働く。最近、FoxB1 転写因子が背腹軸と頭尾軸の調和だけでなく、神経誘導の保証機構にも重要な働きを示すことが分かった。さらに FoxB1 転写因子と同様に Biz (BMP inhibitory zinc-finger) 遺伝子も、腹側化因子 BMP のシグナルを抑制して神経誘導を引き起こすこと、Wnt シグナルと協調して頭尾軸形成を調節し、体軸形成の調和機構に関わることがわかった。

## リーディングプログラムによる特任教員

構成員：高橋秀治（特任准教授）

### ○研究活動の概要

放射線災害復興を推進するフェニックスリーダー育成プログラムを担当している。平成25年度には、原著論文2編、国際会議での一般講演1件、国内学会での一般講演2件、研究助成金の受入は5件（内1件代表）である。研究内容は以下の通りである。

1) アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) ゲノム解読及びネッタイツメガエル (*Xenopus tropicalis*) を用いた初期発生に関する遺伝子の解析

*Xenopus laevis* は異質倍数体（4倍体）であるためゲノムが複雑であり、最も利用され多くの発見に寄与してきたにもかかわらず全ゲノムが解読されていない。これを解読して倍数化後におこる現象を明らかにすることと、ポストゲノムの研究においても研究に寄与できる環境を整えることを目的とし日米ゲノムコンソーシアムが組織され解読を行っている。このゲノムには次世代シーケンサでは解読不可能な領域が含まれておりこれらを明らかにすることも本研究の目的としている。また、初期発生は誘導、細胞分化、細胞の移動など多彩な現象が見られ、そこでおこる遺伝子発現ネットワークの解読は幹細胞を利用した再生医療研究に大きく寄与している。本研究では初期発生の詳細な遺伝子ネットワークを明らかにすることを目的にしている。

#### IV. 社会活動

##### ○見学研修等

中島圭介、中島妙子

- ・施設訪問者見学者に遺伝子破壊ネッタイツメガエルの概要説明（2013年4月～2014年4月）

柏木昭彦、柏木啓子

- ・施設訪問者見学者にネッタイツメガエルリソースの概要説明（2013年4月～2014年3月）
- ・個別指導の開催：ネッタイツメガエルの飼育方法等について大阪大学や愛知教育大学から教員、ポスドク研究員、大学院生等を指導

柏木昭彦、田澤一郎

- ・「第7回 NBRP データベース研究会」参加（2014年3月、国立遺伝学研究所、三島）

柏木昭彦、鈴木 厚、古野伸明、柏木啓子、花田秀樹、田澤一郎、倉林 敦、中島圭介、竹林公子、小林里美、竹中純子、住田正幸

- ・「新しい実験動物としてのネッタイツメガエル」第60回日本実験動物学会（2013年5月、つくば国際会議場、つくば）

柏木昭彦、柏木啓子、花田秀樹、田澤一郎、小林里美、竹中純子、鈴木 厚、竹林公子、古野伸明、倉林 敦、中島圭介、住田正幸

- ・「動物学ひろば：ツメガエルを知っていますか？」第84回日本動物学会（2013年9月、玉野市立玉野海洋博物館、玉野）

柏木 昭彦、柏木 啓子、花田 秀樹、鈴木賢一、鈴木 厚、竹林 公子、倉林 敦、中島 圭介、田澤 一郎、井川 武、小林 里美、竹中 純子、玉城 ゆうな、古野 伸明、山本 卓、住田 正幸

- ・「ネッタイツメガエルの近交化・標準系統の樹立・提供」第36回日本分子生物学会（2013年12月、神戸国際展示場 神戸）

住田正幸

- ・淡水魚水族館アクアトロギフ「イモリ」特別展 2014年3月～6月（イボイモリの繁殖個体展示）
- ・オープンキャンパス 2013年8月7日～8日 研究施設紹介（7日45名、8日34名）

鈴木厚、竹林公子

- ・施設訪問者見学者に NBRP オープンラボの概要説明（2013年4月～2014年3月）
- ・日本生物学オリンピック 2013 本選（広島大会）最先端研究室訪問・実験実習（平成25年8月）
- ・高校教員研修会「カエルの発生と中胚葉誘導・神経誘導」（講義・実験実習）の主催した（平成25年11月）。
- ・NBRP ネッタイツメガエル技術講習会開催した（平成26年3月）。

##### ○セミナー講演会講師等

高瀬 稔

- ・平成25年度 広島県科学オリンピック科学セミナー（生物分野）21人参加  
「カエルの解剖」広島大学理学部 2013年7月31日

三浦郁夫

- ・“科学と芸術のカエル三昧 -新種発見、そして遺伝子音楽- “ 広島大学大学院理学研究科サイエンスカフェ 6月15日（土）中国新聞ホール（中国新聞社7階）広島市
- ・“性決定機構の進化 ～XY型とZW型のバトルと相互変換～ 動植物に共通するアロ認証機構の解明 “ 第8回領域会議 2014年1月9日 名古屋市
- ・“カエルの性決定とその進化機構” 広島大学大学院生物圏科学研究科シンポジウム 生物学の基礎的研究から水・畜産業へのトランスレーション 2014年1月29日 東広島

古野伸明

- ・河合塾での生物担当講師への講演会の講師

住田正幸

- ・東広島市立河内西小学校「夢・感動推進事業」講師 2013年11月18日

鈴木厚

- ・「ゲノム・遺伝子から見た発生の仕組み～ゲノム学・発生学が支える私たちの健康～」広島市教育センター 高校教員研修会・講演会（2013年7月；招待・依頼講演）
- ・広島市安佐北中学・高等学校 広島市立高等学校公開研究授業・講演（平成25年10月）
- ・「カエルの発生と中胚葉誘導・神経誘導」高校教員研修会・実験実習（2013年11月23-24日、広島県東広島市；招待・依頼講演）
- ・インドネシア Brawijaya University にて招待講演と講義（平成25年10月）

鈴木厚、田澤一朗、花田秀樹、竹林公子、柏木啓子、宇都武司、難波ちよ、小林里美ほか

- ・広島県立教育センター主催の「第17回生物教材バザール」に参加、教材の提供を行う（2013年5月）

○各種役員、委員等（学外のみ）

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、学会誌編集委員
- ・Editorial Board of Asian Herpetological Research
- ・豪州キャンベラ大学非常勤准教授

花田秀樹

- ・日本動物学会中四国支部 会計監査役員

住田正幸

- ・生物遺伝資源委員会委員（国立遺伝学研究所）
- ・ナショナルバイオリソースプロジェクト運営委員会委員長会議委員
- ・日本動物学会支部代表委員・学会賞等選考委員会委員

- ・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
- 倉林敦
- ・ISRN Genomics 編集委員
- 井川武
- ・Journal of Tropical Life Science 編集委員
- 高橋秀治
- ・XCIJ 日本ツメガエル研究集会 (XCIJ-JXM) 運営委員
  - ・Xenopus ゲノムプロジェクト (XGP) 推進委員

## V. 国際交流活動

### ○国際共同研究

矢尾板芳郎

- ・ヴァージニア大学（米国）

研究テーマ：「ネッタイツメガエルの遺伝子変異作製について」

中島圭介

- ・ヴァージニア大学（米国）

研究テーマ：「Pax 6 遺伝子の解析」

古野伸明

- ・レンヌ I 大学（フランス） Prof. Claud Prigent

研究テーマ：「サイクリン B の紡錘体形成に対する関与」

三浦郁夫

- ・キャンベラ大学（豪州） Dr. Tariq Ezaz

研究テーマ：「両生類・爬虫類の性決定と性染色体の進化」

- ・成都生物研究所（中国） Dr. Xiaomao Zeng

研究テーマ：「ツチガエルの系統進化」

住田正幸

- ・バングラデシュ農業大学（学部間協定締結校） Mollah, M. F. A. 教授、Khan, M. M. R. 教授

研究テーマ：「バングラデシュのカエル類の種多様性と遺伝的多様性に関する研究」

鈴木厚

- ・米国エネルギー省ほか

研究テーマ：「アフリカツメガエルゲノムプロジェクト」

- ・英国ポーツマス大学および米国ウッズホール海洋生物研究所

研究テーマ：「国際ツメガエルリソースの国際拠点形成」

- ・英国ガードン研究所

研究テーマ：「ツメガエルリソースの系統解析」

倉林敦

- ・ビショップ博物館（米国）：

研究テーマ：「パプアニューギニア両生類インベントリー」

「ヘビからカエルへの遺伝子水平伝播」

- ・ブラウンシュバイク工科大学（ドイツ）

研究テーマ：「ヘビからカエルへの遺伝子水平伝播」

「SINE 法による両生類系統解析」

- ・中国科学院成都生物研究所（中国）

研究テーマ「無尾類のミトコンドリアゲノムの進化」

高橋秀治

- ・Xenopus laevis genome consortium（日米）

研究テーマ：「Xenopus laevis のゲノム解読」

- ・カリフォルニア州立大学（米国） Prof. Ken Cho

研究テーマ：「初期発生期の転写制御機構の網羅的解析」

- ・Ludwig Institute for Cancer Research（スウェーデン） Prof. Jan M. Stenman

研究テーマ：「新規 WNT シグナル制御因子の解析」

○研究員受入れ

住田正幸

- Alam Mohammad Shafiqul 2013 年 4 月 1 日～2013 年 4 月 31 日
- Hasan Mahmudul 2013 年 4 月 1 日～2014 年 3 月 31 日

○外国人留学生の受入れ

住田正幸

- 文部科学省国費留学生 (Sultana Nasrin, バングラデシュ) (D1)

## VI. その他（特記事項）

- ・両生類研究施設国際シンポジウム－Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing－開催（委員長：住田正幸教授、庶務幹事：倉林敦助教、実行委員：矢尾板芳郎教授、中島圭介助教、田澤一朗助教、井川武特任助教、Islam, M. M. 特任助教、島田歩希契約一般職員）平成 26 年 3 月 27～28 日、(1) 施設所属研究者 4 名プロジェクトの成果発表、(2) 関連分野のトップサイエンティストによる招待講演（アメリカ 1 名/イギリス 2 名/ドイツ 1 名/香港 1 名/日本 3 名）、および、(3) 国内外から両生類研究者のポスター発表 46 件を行った。本事業では、生物学分野の中でも発展著しく、かつ、社会的関心の高い、「絶滅危惧種の保全」と「ゲノム編集」研究の国内外のトップサイエンティストを招聘した。招待講演者の発表から、最先端研究の動向と解析技法など多くの新規知見を学ぶことができた。本シンポジウムには、日本を含め 11 カ国から合計 93 名の参加者があり、多様な国からの参加者に対し、両生類研究施設の最新研究成果をアピールすることができた。
- ・文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)「ネッタイツメガエルの近交化・保存・提供」第 3 期 2 年目は、以下の事業を行った。第 84 回日本動物学会シンポジウム「生物実験材料としてのネッタイツメガエルの長所と有用性」(2013 年 9 月、岡山大学、岡山) の開催。3 学会での展示説明(第 60 回日本実験動物学会 H25 年 5 月、第 84 回日本動物学会「動物学ひろば」H25 年 9 月、第 36 回日本分子生物学会 H25 年 12 月)。ネッタイツメガエル技術講習会開催(H25 年 3 月 3 日～5 日)。これらの事業は、前記 9 名の課題協力者による献身的な奉仕により達成された。NBRP ネッタイツメガエル事業の成果は両生類研究施設の紹介記事として、日本経済新聞『春秋』欄(H25 年 5 月 6 日)に取り上げられた。また、NBRP リソースニュース「世界でオンリーワンの両生類研究・リソースセンター」BioResource Now! vol. 9, No. 6, 1-2 (2013)にも紹介された。
- ・総合博物館サテライトとして玄関ロビーを一般公開した。展示には系統維持班の職員が日常の維持を行なっている。また、田澤一朗助教は展示に関わるウェブサイトの運営を行なっている。今年度の施設見学者は 52 件 985 名であった。
- ・国立大学協会(国大協広報誌 31 巻:2013 年 12 月)において両生類研究の研究活(系統維持や NBRP など)が紹介された。
- ・矢尾板芳郎教授は NHK 教育地球ドラマチック「生きものはなぜ姿を変えるのか」(2013 年 8 月 10 日放映)を監修した。
- ・柏木昭彦特任教授は、JT 生命誌研究館の表現スタッフ日記「採れる!撮れる!語り合う」(2014 年 4 月 5 日)及び「自然を知る新たな知を求めて」～映像で語る生命誌研究館の 20 年～(2013 年 DVD ディスク)で紹介された。
- ・三浦郁夫准教授が 2013 年度染色体学会賞を受賞した。
- ・三浦郁夫准教授は公開講演会「サドガエルが辿った進化と佐渡の自然」を開催した(2013 年 7 月 28 日佐渡市朱鷺交流センター)。
- ・住田正幸教授と井川武助教は、沖縄テレビ「OTV 報道スペシャル 地球の宝が棲む島ー沖縄・奄美の生き物たちー」(2013 年 9 月 1 日放送)で取材協力を行

- なった。
- ・鈴木厚准教授は平成 25 年度「日本学術振興会・科学研究費補助金審査委員表彰」（2013 年 11 月）を受けた。
  - ・倉林敦助教はBMC Evolutionary Biology誌、Mitochondrial DNA誌などの国際雑誌 7 誌 8 件のにおいて、論文レビューサービスを行った。
  - ・ HasanMahmudul 研究員の *Hoplobatrachus litoralis* 新種記載の記事がバンラデシュ新聞（2013 年 6 月 14 日）に紹介された。
  - ・ 小卷翔平君（学振特別研究員 D2）が Zoological Science Award 2013 及び Fujii 賞を受賞した。

## VII. 各研究グループの研究内容と研究業績

[発生研究グループ]

教授・矢尾板芳郎 (Yaoita Yoshio)

研究内容

### 1. 生殖細胞特異的なゲノム編集法の開発

The exploitation of germ-line-specific genome editing

[目的]

本研究は両生類においてTALENを用いて生殖細胞特異的にゲノム編集を行う方法を開発するものである。目的の遺伝子変異が発生異常、致死もしくは不妊を誘導する場合、F0でそのような異常が生じ、それ以降の解析が不可能になる。しかし、この方法が確立すれば発生、成長、変態、性成熟、生殖等に関わる重要な遺伝子でも破壊されたホモ個体をF1で得ることができるようになり、遺伝子の機能解析が可能となる。

[材料・方法]

germ plasm を含む卵割球が将来生殖細胞に分化していくことがアフリカツメガエルで知られている。germ plasm で発現している遺伝子の mRNA の 3' UTR を、緑色蛍光蛋白質 mRNA に付加すると緑色蛍光蛋白質の mRNA が生殖細胞に局限し、緑色蛍光蛋白質そのものも生殖細胞に局在するようになる。この遺伝子の 3' UTR を付加した TALEN mRNA を受精卵に注入すれば TALEN mRNA は生殖細胞に局限し TALEN タンパク質も生殖細胞に局在すると考えられる。

ネッタイツメガエルのこの遺伝子の 3' UTR をクローニングする。メラニン色素の合成に関わるチロシナーゼを標的とする TALEN mRNA にこの遺伝子の 3' UTR を付加してネッタイツメガエルの受精卵に注入する。この時、体細胞でチロシナーゼの破壊が行われない程度まで注入する mRNA の量を減少させる。その個体を成熟後にアルビノネッタイツメガエルと交配させる。得られる F1 の染色体の一組はアルビノ由来なので、インジェクションを行った F0 の生殖細胞におけるチロシナーゼの破壊された割合が F1 のアルビノの割合と等しくなると考えられる。

[成果]

本研究により外見はほとんど野生型の外見を持つ F0 とアルビノネッタイツメガエルとの交配から高い効率でアルビノの F1 を得ることができた。

[考察・将来の展望]

標的遺伝子の変異を高率に生殖細胞に導入する事が可能となった。今後、生殖細胞以外の組織における変異導入率を調べる必要があると考えられる。

(共同研究者：中島圭介)

### 2. TALEN 法の効率を初期胚において向上させる方法の開発

The development of the TALEN method to improve the efficiency of the target gene disruption

[目的]

母親由来ではない胚自身の遺伝子の発現が始まる mid-blastula transition (MBT) よりも早い発生段階で 100%の変異導入効率を得られる方法を開発する。100%近く変異が導入された F0 で観察することで、標的遺伝子の変異による形質の予測が可能となる。その結果、性成熟を待ち、次の世代を得る必要がなくなり、研究のスピードが格段に上がることが期待できる。また、初期発生に重要な遺伝子でノックアウトが可能になる。

[材料・方法]

アフリカツメガエルの卵母細胞を取り出し、TALEN mRNA を注入する。プロゲステロンで成熟させ、他の雌の腹腔に戻して産卵させ、受精させる。この方法では TALEN を卵母細胞で発現させ数日間おくことができるので、TALEN の発現量が高いときに受精させることが可能となり、高い変異導入効率を得ることが可能であると考えられる。

[成果]

この方法により MBT 以前で 100%の効率で変異を導入することができた。しかし、卵母細胞での TALEN の発現量は低く、受精後にタンパク合成が盛んに行われることが新たに分かった。

[考察]

卵母細胞で TALEN の発現量を上げれば、さらに早い段階や活性の弱い TALEN でも確実に 100%の変異導入効率を得られるようになると考えられる。このために polyA の付加等の工夫を行う。

[将来の展望]

この方法が確立すれば F0 での遺伝子機能の解析が可能となり、研究スピードが格段に早くなるものと思われる。

(共同研究者：中島圭介)

### 3. 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 *Xenopus* metamorphosis

[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。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。

#### [材料・方法]

*ouro 1* 遺伝子と *ouro 2* 遺伝子のどちらか一方のノックダウンで変態時の尾の退縮が抑制されると報告されている。*ouro 1* 遺伝子と *ouro 2* 遺伝子に対するTALENを作成して、そのmRNAをネッタイツメガエルの受精卵に注入しノックアウトカエルを作製し、変態時の尾の変化を観察する。

#### [成果・考察・将来の展望]

*ouro 1* 遺伝子と *ouro 2* 遺伝子が破壊されたカエルを作製した。今後、そのカエルの交配により多数のF1を生じさせ、それらの*ouro* 遺伝子変異ガエルを解析して、各々に対応する表現型を観察する。

#### 4. レチノイド処理による無尾両生類幼生の尾部切断部におけるホメオティック肢の誘導の再現

Reproduction of homeotic limb-induction on the amputated tails of anurans by retinoid treatment

#### [目的]

20年程前、脊椎動物のホメオティック変異が報告された。インドの無尾両生類の幼生の尾部を切断しレチノイドで処理すると、尾ではなく、後肢の様な構造が生じた。この現象は、実験によく使われる種では再現されなかったため、分子レベルでは全く解析されてこなかった。我々はこの現象を研究するために、本邦で容易に入手可能な無尾両生類を用いてホメオティック肢形成の再現を試みた。

#### [材料と方法]

様々なカエルの幼生を用い、尾部を切断し、レチノイド溶液に移し、ホメオティック肢形成が起こるか否かを確かめた。また、ホメオティック肢におけるマーカーの遺伝子発現をRT-PCRでしらべた。

#### [成果]

処理したニホンアカガエル、ヤマアカガエル、およびアマミアカガエルの一部で尾部切断部に過剰な肢芽が認められた。これらのホメオティック肢は尾部退縮中も成長し、皮膚と筋肉は成体型のマーカー遺伝子を発現していた。

#### [考察・将来の展望]

本研究における遺伝子発現解析は、本来変態に伴い死滅する予定だった尾部の一部の細胞の運命が変化し、成体型器官として成長したことを示す。したがって、内因性レチノイドと変態後の細胞の運命制御との関係が示唆される。

(共同研究者：田澤一朗)

## 研究業績

### ① 原著論文

1. K. Nakajima and Y. Yaoita (2013) Comparison of TALEN scaffolds in *Xenopus tropicalis*. *Biology Open*, 2: 1364-1370.
2. K. Nakajima, Y. Nakai, M. Okada and Y. Yaoita (2013) Targeted gene disruption in the *Xenopus tropicalis* genome using designed TALE nucleases *Zoological Science*, 30(6): 455-460. Most Read Articles (Previous Month) of *Zoological Science*.
3. Morihiro Okada, Ichiro Tazawa, Keisuke Nakajima and Yoshio Yaoita (2013)  
The expression of the *amelogenin* gene in the skin of *Xenopus tropicalis* *Zoological Science* **30**(3), 154-159.

### ② 総説・著書

該当なし

### ③ 学会発表

#### 国内学会

1. 中島 圭介、矢尾板 芳郎 「*Xenopus tropicalis* における各種 TALEN の比較」  
第 36 回日本分子生物学会年会 神戸市(2013, 12)
2. 中島 圭介、矢尾板 芳郎 「*Xenopus tropicalis* における各種 TALEN の比較」第 84 回日本動物学大会、岡山市(2013, 9)
3. 田澤一朗、矢尾板芳郎 「本邦産無尾両生類の尾部におけるレチノイドによるホメオティック肢形成」第 84 回日本動物学会大会、岡山市 (2013, 9)
4. 中島 圭介、矢尾板 芳郎 「*Xenopus tropicalis* における各種 TALEN の比較」XCIJ 研究集会、美祿市(2013, 9)
5. 高瀬 稔、田澤一朗、矢尾板芳郎、井口泰泉 「甲状腺ホルモンより誘導されるネッタイツメガエル甲状腺ホルモン受容体遺伝子発現に対する化学物質抑制作用の肝臓と尾における違い」 環境ホルモン学会、12/12-13、2013、東京.

#### 国際学会

1. Keisuke Nakajima and Yoshio Yaoita “The exploitation of genome editing in *Xenopus tropicalis*” International Symposium Frontiers in Amphibian

Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing” Hiroshima, Japan (2014, 3.27-28, 100)

2. Takuya Nakayama, Margaret B. Fish, Marilyn Fisher, Keisuke Nakajima, Yoshio Yaoita and Robert M. Grainger “*Xenopus tropicalis*, a model organism for the new genetics era: from forward to reverse genetics and now to gene targeting” International Symposium Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing, Hiroshima, Japan (2014, 3.27-28, 100) 招待講演

3. Ichiro Tazawa, Yoshio Yaoita “Induction of homeotic limbs by retinoid treatment on the amputated tails of Japanese anurans” International Symposium Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing, Hiroshima, Japan (2014, 3.27-28, 100)

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 11,740 千円 (担当 住田正幸、矢尾板芳郎)
2. 科学研究費助成事業 (基盤研究 C) ノックアウト効率の改善による初代完全  
ノックアウト動物の作製技術開発 (100 千円)

准教授・高瀬 稔 (Minoru Takase)

## 研究内容

1. 性転換機構の解析：ツチガエルおよびトノサマガエルの生殖腺に対する環境化学物質およびエストロゲンの影響

Analysis of mechanism of sex reversal in amphibians: Influences of environmental chemicals and estrogen on the gonads of the frogs, *Rana rugosa* and *Pelophylax nigromaculata*

### [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。一方、内分泌かく乱作用を持つ環境化学物質が生殖腺や生殖細胞の分化に影響することが知られている。これまで、ツチガエル (*Rana rugosa*) を用いて環境化学物質投与による生殖腺および生殖細胞への影響を組織学的に解析してきた。今回は、環境化学物質投与によるツチガエル精巣卵形成過程における遺伝子発現について解析した。また、トノサマガエル (*Pelophylax nigromaculata*) を用いたこれまでのエストロゲン曝露実験の結果、雌化が起こっている可能性が考えられた。今回、再現性を確認するためのエストロゲン曝露実験を行った。

### [材料・方法]

広島県ツチガエルの TK ステージ X の幼生の飼育水にノニルフェノール (NP) およびビスフェノール A (BPA)、エストラジオールベンゾエイト (EB) を添加した。曝露後の生殖腺から RNA を抽出し、ディファレンシャル・ディスプレイ法により得られた PCR 産物のシークエンス解析を行った。

また、富山県トノサマガエルの受精後 10 日目の幼生の飼育水にエチニルエストラジオール (EE2) を昨年度よりは低い終濃度も用いて添加し、TK ステージ XX 幼生の生殖腺を組織学的に解析した。

### [成果]

得られた PCR 産物を電気泳動し、対照群と BPA 曝露群との間で発現が異なる 25 個のバンドを回収して塩基配列を解析したところ、ビテロゲニン (*Vtg*) A1 遺伝子と高い相同性を持つ PCR 産物が含まれていることが確かめられた。

また、トノサマガエルに対して EE2 曝露を行ったところ、曝露した濃度に依存して雌化が誘導されることが再度確かめられた。

### [考察]

これまでのネッタイツメガエル (*Silurana tropicalis*) 肝臓を用いた研究から、エストロゲン応答遺伝子として *Vtg A* および *Vtg B* をコードする遺伝子を同定してきた。しかし、ネッタイツメガエル幼生へのエストロゲン曝露による肝臓での遺伝子発現を解析したところ、*Vtg B* とは異なり *Vtg A* はエストロゲン応答性が低いことを確かめている。また、これまでの曝露実験から、ツチ

ガエルのNKステージX幼生における精巣卵形成はBPA曝露では誘導されたが、エストロゲン曝露では誘導されなかったことを確かめている。従って、エストロゲンとは異なる作用経路によるBPAの精巣卵形成に *Vtg A1* 様遺伝子が関わっている可能性が考えられる。

また、富山県トノサマガエルでは、エストロゲンによる雌化が誘導されることが再確認された。トノサマガエルではアンドロゲンにより雌から雄への性転換が誘導されることが良く知られているため、ツチガエルと同様に性転換および性分化を解析するための有用な材料になることが期待される。

#### [将来の展望]

ツチガエル *Vtg A1* 遺伝子発現について、リアルタイムPCR法および *in situ* ハイブリダイゼーション法によりさらに詳しく解析する必要がある。また、トノサマガエルの雌化について、富山県とは異なり野外個体で精巣卵が見られなかった広島県トノサマガエルを用いた曝露実験は有意義であると考えられる。

## 2. 両生類生殖腺分化機構の解析：ネッタイツメガエルの全雄幼生集団作製の試みと予想される性決定機構

Analysis of mechanism of gonad differentiation in amphibians: Generation of male-tadpole population and possible sex-determining mechanism of *Silurana tropicalis*

#### [目的]

性転換機構や性分化機構を解析する場合、性に関して汎用性のある遺伝子マーカーが得られていない種においては、全て雄または全て雌からなる幼生集団が有用なツールになる。ネッタイツメガエル幼生にエストロゲンを投与すると、ほとんどが雌からなる集団が得られることから、雄から雌への性転換が誘導されることが考えられる。性決定機構がZZ/ZW型の場合、その雌（遺伝的雄の性転換個体）を用いた戻し交配により、全雄幼生集団が得られることが期待される。しかし、これまでのHU系統を用いた戻し交配の結果、雄が有意に多い幼生集団は得られたが、ほぼ全てが雄からなる幼生集団は得られなかった。そこで今回、アイボリー系統を用いてエストロゲン投与および戻し交配を行った。

#### [材料・方法]

ネッタイツメガエルのアイボリー系統NFステージ48-50の幼生に対して終濃度100 nMのエストラジオールベンゾエイト(EB)をNFステージ66(変態完了期)まで曝露し、さらに飼育を続けて成熟個体を得た。そのEB曝露成熟個体の雌を用いて戻し交配を行い、得られたF1の性比を調べた。

#### [成果]

EB曝露成熟個体の雌を用いて戻し交配を行ったところ、得られたF1は雄が33匹に対して雌が12匹であった。従って、雄の出現率は73.3%であった。一方、EB曝露に用いた対照群では、雄が19匹に対して雌が25匹であり、雄の出現率は43.2%であった。

#### [考察]

HU 系統と同様にアイボリー系統においても、エストロゲン処理により雌化は誘導され、戻し交配により雄の出現率が高い EB 処理個体が見られた。しかし、ほとんど雄からなる幼生集団は得られなかった。戻し交配に用いた個体が性転換雄（遺伝的雌）である確証はないが、ネッタイツメガエルのアイボリー系統の性決定機構に関しても HU 系統と同様に XX/XY 型である可能性も考えられた。

#### [将来の展望]

ネッタイツメガエルの性決定機構に関して、卵核二倍発生法によって発生させた幼生の性比を調べるなど、さらに詳しく解析する必要がある。また、遺伝的な雄または雌を同定するための遺伝子マーカーを開発し、性転換個体を識別する必要もある。

### 3. ネッタイツメガエルの肝臓と尾における甲状腺ホルモン受容体遺伝子発現に対する環境化学物質およびエストロゲンの影響

Effects of environmental chemicals and estrogen on thyroid hormone-inducible thyroid hormone receptor gene expression in the liver and tail of *Silurana tropicalis*

#### [目的]

これまで、弱いエストロゲン作用を持つ環境化学物質ビスフェノール A (BPA) が甲状腺ホルモン T3 による尾の退縮および尾の甲状腺ホルモン受容体 (TR) 遺伝子発現に対して阻害作用を持つことが報告されている。また、尾以外の器官も TR 遺伝子を発現していることが報告されている。両生類のライフサイクルにおける環境化学物質影響を考えると、幼生と成体に共通して存在する TR 遺伝子発現器官に注目する必要があると考えた。そこで、幼生期および変態完了後の肝臓に着目し、甲状腺ホルモン作用に対する BPA およびエストロゲンの影響について調べた。

#### [材料・方法]

様々な発生段階のネッタイツメガエル幼生および変態完了個体の肝臓と尾から RNA を調整した。また、NK ステージ 52-54 の幼生および変態完了個体を用いて、T3 および BPA、17 $\alpha$ -エチニルエストラジオール (EE2) の単独投与または共投与を 5 日間行い、処理後の肝臓または尾から RNA を調整した。調整した RNA を用いてリアルタイム PCR 法により TR $\beta$  遺伝子発現またはエストロゲン受容体 (ER) 遺伝子発現を解析した。

#### [成果]

ネッタイツメガエル幼生の変態過程の進行と共に肝臓と尾における TR $\beta$  遺伝子発現量は増加した。そこで、幼生に T3 を曝露したところ、濃度依存的に肝臓および尾における TR $\beta$  遺伝子発現量は増加した。一方、変態完了後の肝臓においても高い発現量が維持されていたが、T3 曝露による発現量の増加は認めら

れなかった。次に、T3 および BPA、EE2 を用いた曝露実験の結果、幼生の肝臓と尾における T3 誘導 *TRb* 遺伝子発現は BPA により有意に阻害された。しかし、EE2 は肝臓においてのみ有意に阻害した。変態完了個体の肝臓における *TRb* 遺伝子発現はいずれの曝露によっても有意な影響はなかった。さらに、*ER* 遺伝子発現量は、変態完了個体の肝臓では高かったが、幼生の尾および肝臓では共に低く、両器官の間に有意差はなかった。

#### [考察]

幼生の肝臓は尾に比べて環境化学物質に対する感受性が高いことが示唆され、変態後の肝臓では甲状腺ホルモンによる *TRb* 遺伝子発現誘導も見られなかった。従って、ライフサイクルを通じた環境評価を行う場合には、標的器官や発達段階を慎重に選ぶ必要があると考えられた。また、BPA の抑制作用はエストロゲンの作用経路とは異なる事が推察された。

#### [将来の展望]

今後さらに、*TRb* 遺伝子を発現している他の器官に対する化学物質影響を調べる必要がある。

#### 研究業績

##### ①原著論文

該当なし

##### ②総説・著書

該当なし

##### ③学会発表

###### 国内学会

1. 小林 亨、高瀬 稔、熊倉雅彦、山本 潤、長坂洋光、大西悠太、井口泰泉  
「トノサマガエルの生殖腺分化におけるエチニルエストラジオールの影響」  
環境ホルモン学会、12/12-13、2013、東京。

2. 高瀬 稔、田澤一朗、矢尾板芳郎、井口泰泉 「甲状腺ホルモンより誘導されるネッタイツメガエル甲状腺ホルモン受容体遺伝子発現に対する化学物質抑制作用の肝臓と尾における違い」 環境ホルモン学会、12/12-13、2013、東京。

###### 国際学会

1. Minoru Takase “Sex reversibility in amphibian and its applications: sex-hormone-inducible sex reversal in *Rana rugosa*, sex determination in *Silurana tropicalis*, and model amphibians as environmental indicator”  
International Symposium Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing. Hiroshima, Japan, 27-28<sup>th</sup> March.

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」代表者：高瀬 稔 1,000千円.

助教・中島圭介 (Keisuke Nakajima)

## 研究内容

### 1. 生殖細胞特異的なゲノム編集法の開発

The exploitation of germ-line-specific genome editing

#### [目的]

本研究は両生類においてTALENを用いて生殖細胞特異的にゲノム編集を行う方法を開発するものである。この方法が確立すれば発生、成長、変態、性成熟、生殖等に関わる“子孫を残すために重要な”遺伝子が破壊されたホモ個体をF1で得ることができるようになる。これまでF0が致死もしくは不妊のためにリバースジェネティクスを用いた解析が不可能であった遺伝子の機能解析がF1で可能となる。これらの新たな知見は様々な病因の解明につながるものであり、人類の健康の増進に大きく寄与する。

近年まで標的遺伝子を破壊するノックアウト法は胚性幹細胞が樹立されていたマウスやラットなどのごく一部のモデル動物でのみ可能であった。しかしここ数年の間にZFNやTALEN、CRIPR/Cas9といった標的遺伝子破壊を可能とする新しいツールが次々と開発されてきた。これらのツールはRNAを受精卵に注入するだけで標的遺伝子破壊が可能であり、胚性幹細胞が樹立されていない両生類や魚類、昆虫など極めて多くの実験動物で有効に機能することが示されてきた。

本研究室でもZFNを用いて色素を合成する遺伝子を破壊することにより、世界初のアルビノネツタイツメガエルを作出した。またTALEN法がネツタイツメガエルでも有効に機能することを示し、次々と開発されるTALENの新技术の中でどれが最も有効であるかを示してきた。

TALEN法はネツタイツメガエルにおいて極めて有効に機能するツールであり、ほぼ完全に標的遺伝子を破壊することも可能である。しかし、この方法では全身の細胞の遺伝子を破壊しているという保証はなく、遺伝子の機能を科学的に証明するためには全ての対立遺伝子が破壊された子孫であるF1のホモ個体を取らなければならない。もしも標的とする遺伝子が発生、成長、変態、性成熟、生殖等に関わる“子孫を残すために重要な”遺伝子であった場合、完全に標的遺伝子が破壊された個体は次の世代を残すことはできない。かといって活性を弱めて一部の細胞だけで標的遺伝子を破壊した場合にはF1で両方の対立遺伝子が破壊されたホモ個体を得ることは困難となる。この問題を解決するためには親の発生、成長、変態、性成熟を妨げずに生殖細胞の標的遺伝子のみを破壊しなければならない。そこで本研究では親の生殖細胞のみでTALENを働かせる方法の開発を行う。

#### [材料・方法]

TALENを生殖細胞のみで働かせるためにはいくつかの方法が考えられるが、これまでの知見や技術的な制限から二つの方法が有効であると考えられる。一つは生殖細胞でのみmRNAの転写が行われるようにする方法であり、二つ目は

生殖細胞のみでタンパク質の翻訳を行わせる方法である。一つ目の方法を行うためには生殖細胞のみで発現が行われる遺伝子のプロモーター領域を同定し、TALENの上流に組み込み、これをトランスジェニックの技術を用いてゲノムに組み込む。しかし、この方法では標的遺伝子ごとにトランスジェニック動物を作出する必要があり、多くの時間と労力を必要とする。二つ目の方法を実現するにあたり、ある遺伝子の3' UTRが役に立つと考えられる。この遺伝子は germ plasm と呼ばれる場所で発現しており、germ plasm を含む卵割球が将来生殖細胞に分化していくことがアフリカツメガエルで知られている。この遺伝子の発現部位を決めているのは mRNA の 3' UTR であり、緑色蛍光蛋白質の mRNA にこの遺伝子の 3' UTR を付加すると緑色蛍光蛋白質の mRNA が生殖細胞に局限し、緑色蛍光蛋白質そのものも生殖細胞に局在するようになる。この遺伝子の 3' UTR をコードする配列を TALEN 発現ベクターに付加すれば、TALEN の mRNA はこの遺伝子の 3' UTR を持つことになる。この mRNA を受精卵にインジェクションすれば TALEN mRNA は生殖細胞に局限し TALEN タンパク質も生殖細胞に局在すると考えられる。

この方法の有効性を確認するために、まずはネッタイツメガエルのこの遺伝子の 3' UTR をクローニング後、緑色蛍光蛋白質の mRNA に付加し、アフリカツメガエルと同様に生殖細胞に緑色蛍光蛋白質が局限することを確認する。次に色素の合成に関わるチロシナーゼを標的とする TALEN mRNA にこの遺伝子の 3' UTR を付加してネッタイツメガエルの受精卵にインジェクションを行う。この時、体細胞でチロシナーゼの破壊が行われない程度までインジェクションする mRNA の量を減少させ、その個体を成熟後にアルビノネッタイツメガエルと交配させる。得られる F1 の染色体の一组はアルビノ由来なので、インジェクションを行った F0 の生殖細胞におけるチロシナーゼの破壊された割合が F1 のアルビノの割合と等しくなる。このようにチロシナーゼを標的とすることで極めて容易にこの手法の有効性を確認することが可能となる。

#### [成果]

本研究により外見はほとんど野生型の外見を持つ F0 から高い効率でアルビノの F1 を得ることができた。

#### [考察]

本研究は標的遺伝子としてチロシナーゼを狙い、アルビノ個体と交配させることにより、簡便に生殖細胞への変異導入率を知ることができる。今後はさらに例数を増やし、実験結果を確実なものとするとともに生殖細胞以外の組織における変異導入率を調べる必要があると考えられる。

#### [将来の展望]

本研究は発生、成長、変態、性成熟、生殖等に関わる“子孫を残すために重要な”遺伝子を破壊した個体を得る為に生殖細胞のみに変異を導入する手法であり、今後このような遺伝子の機能を解析するにあたり様々な動物種で参考とされうる研究成果となることが期待される。

## 2. TALEN 法の効率を初期胚において向上させる方法の開発

The development of the TALEN method to improve the efficiency of the target gene disruption

### [目的]

母親由来ではない胚自身の遺伝子の発現が始まる mid-blastula transition (MBT) よりも早い発生段階で 100%の変異導入効率を得られる方法を開発する。この方法が開発されれば胚自身の遺伝子の働きを完全に抑えた場合の形質を F0 で観察することが可能となる。その結果、性成熟を待ち、次の世代を得る必要がなくなり、研究のスピードが格段に上がることが期待できる。

### [材料・方法]

アフリカツメガエルの卵母細胞を取り出し、濾胞細胞を除去する。この卵母細胞に TALEN をインジェクションした後、プロゲステロンで成熟させ、他の雌の腹腔に戻して産卵させ、受精させる。この方法では TALEN を卵母細胞で発現させ数日間おくことができるので、TALEN の発現量が高いときに受精させることが可能となり、高い変異導入効率を得ることが可能であると考えられる。

### [成果]

この方法により MBT 以前で 100%の効率で変異を導入することができた。しかし、卵母細胞での TALEN の発現量は低く、受精後にタンパク合成が盛んに行われることが新たに分かった。

### [考察]

卵母細胞で TALEN の発現量を上げれば、さらに早い段階や活性の弱い TALEN でも確実に 100%の変異導入効率を得られるようになると考えられる。このために polyA の付加等の工夫を行う。

### [将来の展望]

この方法が確立すれば F0 での遺伝子機能の解析が可能となり、研究スピードが格段に早くなるものと思われる。

## 3. 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。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。

#### [材料・方法]

*ouro 1* 遺伝子と *ouro 2* 遺伝子のどちらか一方のノックダウンで変態時の尾の退縮が抑制されると報告されている。*ouro 1* 遺伝子と *ouro 2* 遺伝子に対する TALEN を作成して、その mRNA をネッタイツメガエルの受精卵にノックアウトカエルを作製し、変態時の尾の変化を観察する。

#### [成果・考察・将来の展望]

*ouro 1* 遺伝子と *ouro 2* 遺伝子が破壊されたカエルを作製した。今後、そのカエルの交配により多数の F1 を生じさせ、それらの *ouro* 遺伝子を解析して、各々に対応する表現型を観察する。

#### 研究業績

##### ① 原著論文

1. K. Nakajima and Y. Yaoita (2013) Comparison of TALEN scaffolds in *Xenopus tropicalis*. *Biology Open*, 2: 1364-1370.
2. K. Nakajima, Y. Nakai, M. Okada and Y. Yaoita (2013) Targeted gene disruption in the *Xenopus tropicalis* genome using designed TALE nucleases *Zoological Science*, 30(6): 455-460. Most Read Articles (Previous Month) of *Zoological Science*.

##### ② 総説・著書

該当なし

##### ③ 学会発表

###### 国内学会

1. 中島 圭介、矢尾板 芳 「*Xenopus tropicalis* における各種 TALEN の比較」  
第 36 回日本分子生物学会年会 神戸市(2013, 12)
2. 中島 圭介、矢尾板 芳郎 「*Xenopus tropicalis* における各種 TALEN の比較」第 84 回日本動物学大会、岡山市(2013, 9)
3. 中島 圭介、矢尾板 芳郎 「*Xenopus tropicalis* における各種 TALEN の比較」XCIJ 研究集会、美祢市(2013, 9)
4. 柏木昭彦, 柏木啓子, 花田秀樹, 鈴木賢一, 鈴木 厚, 竹林公子, 倉林 敦, 中島圭介, 田澤一朗, 井川 武, 小林里美, 竹中純子, 玉城ゆうな, 古野伸明, 山本 卓, 住田 正幸 「ネッタイツメガエルの近交化・標準系統の樹立・提供」

第 36 回日本分子生物学会、神戸市(2013, 12)

5. 柏木昭彦, 柏木啓子, 花田秀樹, 田澤一朗, 小林里美, 竹中純子, 鈴木 厚, 竹林公子, 古野伸明, 倉林 敦, 中島圭介, 住田正幸 「ツメガエルを知っていますか？」第 84 回日本動物学会 動物学ひろば、玉野市(2013, 9)

6. 柏木昭彦, 鈴木 厚, 古野伸明, 柏木啓子, 花田秀樹, 田澤一朗, 倉林 敦, 中島圭介, 竹林公子, 小林里美, 竹中純子, 住田正幸 「新しい実験動物としてのネッタイツメガエル」第 60 回日本実験動物学会、つくば市(2013, 5)

#### 国際学会

1. Keisuke Nakajima and Yoshio Yaoita “The exploitation of genome editing in *Xenopus tropicalis*” International Symposium Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing” Hiroshima, Japan (2014, 3.27-28, 100)

2. Takuya Nakayama, Margaret B. Fish, Marilyn Fisher, Keisuke Nakajima, Yoshio Yaoita and Robert M. Grainger “*Xenopus tropicalis*, a model organism for the new genetics era: from forward to reverse genetics and now to gene targeting” International Symposium Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing, Hiroshima, Japan (2014, 3.27-28, 100) 招待講演

3. Akihiko Kashiwagi, Keiko Kashiwagi, Hideki Hanada, Atsushi Suzuki, Kimiko Takebayashi, Atsushi Kurabayashi, Kenichi Suzuki, Nubuaki Furuno, Ichirou Tazawa, Keisuke Nakajima, Takashi Yamamoto and Masayuki Sumida “National BioResource Project (NBRP) *Xenopus (Silurana) tropicalis*: Standard High Quality Inbred Strain for Biological Research” International Symposium Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing, Hiroshima, Japan (2014, 3.27-28, 100)

4. Akihiko Kashiwagi, Keiko Kashiwagi, Hideki Hanada, Kenichi Suzuki, Atsushi Suzuki, Kimiko Takebayashi, Keisuke Nakajima, Nubuaki Furuno, Ichirou Tazawa, Atsushi Kurabayashi, Takashi Yamamoto and Masayuki Sumida “National BioResource Project (NBRP) *Xenopus tropicalis* Mass Production of High Quality Standard Inbred Strains” The 5<sup>th</sup> ANRRC International Meeting, Hayama, Japan (2013, 10.30-11.1)

#### ④科研費等の受け入れ状況

科学研究費助成事業（基盤研究 C）平成 25～27 年度（1950、1300、2080 千円）課題番号 25430089 研究課題名：ノックアウト効率の改善による初代完全ノックアウト動物の作製技術開発 研究代表者氏名：中島圭介

助教・田澤一朗 (Ichiro Tazawa)

## 研究内容

レチノイド処理による無尾両生類幼生の尾部切断部におけるホメオティック肢の誘導の再現

Reproduction of homeotic limb-induction on the amputated tails of anurans by retinoid treatment

### [目的]

20年程前、脊椎動物としては世界初と言われるホメオティック変異が報告された。インドの無尾両生類の幼生の尾部を切断しレチノイドで処理すると、尾ではなく、後肢の様な構造が生じたのである。この現象は、脊椎動物のパターン形成機構を理解する鍵となると期待されたが、インドとヨーロッパの限られた無尾類でのみ再現され、アフリカツメガエルやウシガエルといった、世界中で実験によく使われる種では再現されなかった。この状況が、研究者（特に、インドとヨーロッパ以外の地域の研究者）がこの現象の研究をすることを甚だしく困難にしているものと思われる。そして、ホメオティック肢形成が分子レベルでは全く解析されてこなかったことの大きな理由の一つであろう。我々はこの現状を改善し、自らもこの現象を研究するために、本邦で容易に入手可能な無尾両生類を用いていろいろな条件でホメオティック肢形成の再現を試みた。

### [材料と方法]

アフリカツメガエル、ネッタイツメガエル、ニホンアカガエル、ヤマアカガエル、タゴガエル、エゾアカガエル、およびアマミアカガエルの幼生を用いた。尾部を切断し、レチノイド溶液に移し、最長2日間飼育した。尾部が退縮し始めるまでの経過を観察し、ホメオティック肢形成が起こるか否かを確認した。また、得られたホメオティック肢における変態関係マーカーの遺伝子発現をRT-PCR でしらべた。

### [成果]

処理したニホンアカガエル、ヤマアカガエル、およびアマミアカガエルの一部で尾部切断部に過剰な肢芽が認められ、ホメオティック肢形成を再現することに成功したことが判明した。アカガエル類としては過去の例より早い発生段階で尾切断を行うことが本現象を起こすのに重要だった。これらのホメオティック肢は尾部退縮中も成長し、皮膚と筋肉は成体型のマーカー遺伝子を発現していた。

### [考察]

本研究により、本邦では初めてホメオティック肢形成に成功した。このような明白なホメオティック変異は脊椎動物では現在まで世界に例がない。したがって、本研究グループは、脊椎動物の形態形成に関する新たな知見を得る1つの

ユニークな可能性を得たことになる。本研究における発現解析は、本来変態に伴い死滅する予定だった尾部の一部の細胞の運命が変化し、成体型器官として成長したことを示す結果だった。したがって、内因性レチノイドと変態後の細胞の運命制御との関係が示唆される。

#### [将来の展望]

レチノイドのシグナルがどのような過程で変態機構に影響を及ぼすか調べることで、両生類における幼生型のまま消滅する領域と成体型に変換される領域とを決定する機構の解明に繋がることが期待される。

#### 研究業績

##### ① 原著論文

Kurabayashi, A., R. Kakehashi, I. Tazawa, Y. Haramoto, T. Oshima, Y. Ito, M. Sumida (2014) Improved transport of the model amphibian, *Xenopus tropicalis*, and its viable temperature for transport. *Curr. Herpetol.*, 33:75-87.

##### ② 総説・著書

該当なし

##### ③ 学会発表

###### 国内学会

1. 田澤一朗 (発表者)、矢尾板芳郎「本邦産無尾両生類の尾部におけるレチノイドによるホメオティック肢形成」日本動物学会第84回大会、岡山市、2013年9月
2. 高瀬 稔、田澤一朗、矢尾板芳郎、井口泰泉 「甲状腺ホルモンより誘導されるネッタイツメガエル甲状腺ホルモン受容体遺伝子発現に対する化学物質抑制作用の肝臓と尾における違い」 環境ホルモン学会、12/12-13、2013、東京.

###### 国際学会

1. Kashiwagi A, Kashiwagi K, Hanada H, Suzuki A, Takebayashi K, Kurabayashi A, Suzuki K, Furuno N, Tazawa I, Nakajima K, Yamamoto T and Sumida M. National BioResource Project (NBRP) *Xenopus (Silurana) tropicalis*: Standard High Quality Inbred Strain for Biological Research. International Symposium, *Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing*. March 27-28, 2014. Higashihiroshima, Japan
2. Ichiro Tazawa, Yoshio Yaoita. Induction of homeotic limbs by retinoid treatment on the amputated tails of Japanese anurans. *International*

Symposium, Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species  
Conservation and Genome Editing. March 27-28, 2014. Higashihiroshima,  
Japan

- ④ 科研費等の受け入れ状況  
該当なし

## [遺伝情報・環境影響研究グループ]

特任教授・柏木昭彦(Akihiko Kashiwagi)

### 研究内容

1. NBRP ネットイツメガエルの研究目的のための提供と、このカエルを用いた研究提案

Supplying NBRP *Xenopus (Silurana) tropicalis* for research purposes and proposed research using such frogs

[目的] 両生類は強い興味をそそられる特質を備えていることから、17 および 18 世紀のヨーロッパではすでに重要な実験動物としての地位を確立していた。20 世紀半ばからはサハラ砂漠以南に生息するアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) が医学・生物学研究の重要なモデル生物として世界中の研究機関で用いられてきた。ところがこのカエルの場合、複数種の雑種からの倍数体進化によって生じた異質 4 倍体であり、また生活環も 1.5~2 年と長いといった欠点を有するため、今日の生命科学、特に遺伝学の研究にはもはや用をなさないのだ。これに対して、最近では① 2 倍体でゲノムサイズが小さい、② 発生が速くて世代時間が短い (雄 6 ヶ月、雌 8 ヶ月)、③ ゲノム配列の解読が終了したなどの理由から、西アフリカ低地の熱帯雨林に生息するネットイツメガエル (*Xenopus (Silurana) tropicalis*) がポストゲノム時代の有用な実験動物として注目を集めている。

両生類研究施設は、2012~2016 年にかけて、文部科学省の主催するナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) に参加、研究者や教育関係者にネットイツメガエルを提供するわが国で唯一の中核機関に指名されている。

[将来の展望] ネットイツメガエルを用いて、私達はすでに環境中化学物質の内分泌かく乱影響を調査、あるいは遺伝子機能の解析のための遺伝子改変カエルを作製している。今後は、簡便で確実な配偶子凍結法の開発、雌性発生法による近交化の促進・遺伝子組成が斉一なホモ接合体の作出、ミュータジェネシスなどを計画中である。

2. トランスジェニックスクリーニング法を用いた化学物質による甲状腺ホルモンかく乱作用の評価

Evaluating chemical related-thyroid hormone disruption using transgenic screening techniques

[目的] 環境中に存在する、天然もしくは人工の化学物質が正常な内分泌機能をかく乱することにより、ヒトや野生生物のホメオスタシスや発生、生殖、性分化、行動に悪影響を及ぼし、さらにはガンの発症をも惹起することが懸念されている。また、個体発生の初期段階における内分泌かく乱化学物質 (EDCs) への曝露影響は特に顕著で次世代にも伝わると考えられる。EDCs の作用メカニ

ズムには、ホルモンレセプターとの相互関係はもとより、ホルモンの合成・移動・代謝の阻害、レセプターのリン酸化などが含まれる。多くの EDCs は非常に安定で親脂性であるから、曝露個体内に生物濃縮される。無尾両生類の変態現象は甲状腺ホルモンに負うところが大きく、そのシステムはヒトへの EDCs 曝露リスクを推定するのに有用である。本研究では、甲状腺ホルモンアゴニストまたはアンタゴニストである化学物質を高感度に検出するためのトランスジェニック系統を開発する。

[方法] 甲状腺ホルモン応答レセプター依存性 EGFP 遺伝子を発現するトランスジェニックツメガエルの F1 幼生を用いて、甲状腺ホルモン[T3；対照群]および T3+生活関連物質・医薬品[実験群；(Pharmaceuticals and Personal Care Products；PPCPs)]に曝露した。

[結果と考察] 対照群に幼生の EGFP 活性は甲状腺ホルモン濃度に依存して増加した。これに対して、実験群では減少したため、被験物質は甲状腺アンタゴニストであることがわかった。これらの結果から、本研究で開発したこのトランスジェニックツメガエル系統を使うと化学物質と甲状腺ホルモン受容体との相互作用を簡単に迅速にしかも高感度で in vivo バイオアッセイできることがわかった。

[将来の展望] このトランスジェニック系統を用いて、各種多様な化学物質の単品はもとより混合物のかく乱作用を調べる。

### 3. TALENs を用いたノックアウトアフリカツメガエルの作製 The production of knockout *Xenopus laevis* using TALENs

[目的] 本研究の目的は、DNA 結合ドメインの Transcription activator-like effectors (TALEs) と切断ドメインの制限酵素 FokI を連結させた人工ヌクレアーゼ TALENs を用いた標的遺伝子破壊法がアフリカツメガエルで効率的に適用できるかどうかを調べることである。

[方法] メラニン合成に関わるチロシナーゼ遺伝子 (*try*)、および眼の形成に必要なマスター制御遺伝子 *pax6* を標的とする TALEN をアフリカツメガエル受精卵に導入した。

[結果と考察] DNA 2 本鎖の切断が生じたのち、非相同末端再結合による塩基の置換・欠失・挿入が起こり *try* および *pax6* 両遺伝子のノックアウトが誘起されたため、前者では白化現象、後者では無眼症・小眼症が高頻度で見られた。TALEN 標的遺伝子破壊法は遺伝子改変ツメガエルを作製するのに非常に優れた技術であることが証明された。

[将来の展望] TALEN 法や CRISPR/Cas9 法の開発によって両生類逆遺伝学は新たな段階に突入している。

## 研究業績

### ① 原著論文

1. Hanada, H., Kobuchi, H., Yamamoto, M., Kashiwagi, K., Katsu, K., Utsumi, T., Kashiwagi, A., Sasaki, J., Inoue, M. and Utsumi, K. (2013) Acetyl-L-carnitine suppresses thyroid hormone-induced and spontaneous anuran tadpole tail shortening. *Hereditas*, 150: 1-9.
2. Suzuki, K., Isoyama, Y., Kashiwagi, K., Sakuma, T., Ochiai, H., Sakamoto, N., Furuno, N., Kashiwagi, A. and Yamamoto, T. (2013) High efficiency TALENs enable F0 functional analysis by targeted gene disruption in *Xenopus laevis* embryos. *Biology Open* 2:448-452
3. Sakane, Y., Sakuma, T., Kashiwagi, K., Kashiwagi, A., Yamamoto, T. and Suzuki, K. (2014) Targeted mutagenesis of multiple and paralogous genes in *Xenopus laevis* using two pairs of transcription activator-like effector nucleases. *Dev. Growth Diff.*, 56:108-114.

### ② 総説・著書

1. Hanada, H., Kashiwagi, K., Suzuki, K., Yamamoto, T. and Kashiwagi, A. (2013) Suppression of anuran metamorphosis by synthetic chemicals. (in press) *Frogs: Genetic Diversity, Neural Development and Environmental Influences*. (NOVA, Sweden) pp.73-88

### ③学会発表

#### 国内学会

1. 柏木昭彦, 鈴木 厚, 古野伸明, 柏木啓子, 花田秀樹, 田澤一朗, 倉林 敦, 中島圭介, 竹林公子, 小林里美, 竹中純子, 住田正幸「新しい実験動物としてのネッタイツメガエル」第60回日本実験動物学会(2013年5月、つくば国際会議場、つくば)
2. 柏木昭彦, 柏木啓子, 花田秀樹, 田澤一朗, 小林里美, 竹中純子, 鈴木 厚, 竹林公子, 古野伸明, 倉林 敦, 中島圭介, 住田正幸「動物学ひろば：ツメガエルを知っていますか？」第84回日本動物学会(2013年9月、玉野市立玉野海洋博物館、玉野)
3. オーガナイザー：加藤尚志(早稲田大)、柏木昭彦(広島大)；講演者：山本卓(広島大)、加藤尚志(早稲田大)、田村宏治(東北大)、入江直樹(東京大)、鈴木賢一(広島大)「生物実験材料としてのネッタイツメガエルの長所と有用性」第84回日本動物学会シンポジウム(2013年9月、岡山大学、岡山)

4. 花田秀樹、小淵 浩嗣、柏木啓子、内海俊彦、井上正康、佐々木順三、勝賢二郎、佐藤英介、内海耕慥、柏木昭彦 「アセチル-L-カルニチンによる無尾両生類幼生尾部短縮の抑制」日本動物学会 第84回大会 (2013年9月 岡山大学、岡山)
5. 柏木啓子、鈴木賢一、佐能正剛、花田秀樹、山本 卓、新海 正、古野伸明、太田 茂、柏木昭彦 「両生類を用いた甲状腺ホルモン作用かく乱化学物質の評価」 第84回日本動物学会 (2013年9月、岡山大学、岡山)
6. 柏木 昭彦, 柏木啓子, 花田秀樹, 鈴木賢一, 鈴木 厚, 竹林公子, 倉林 敦, 中島圭 介, 田澤一朗, 井川 武, 小林里美, 竹中純子, 玉城ゆうな, 古野伸明, 山本 卓, 住田正幸 「ネットアイツメガエルの近交化・標準系統の樹立・提供」第36回日本分子生物学会 (2013年12月、神戸国際展示場 神戸)
7. 中出翔太、鈴木賢一、佐久間哲史、重田美津紀、柏木昭彦、柏木啓子、山本卓、小原政信「TALENを用いたツメガエル発生過程におけるサイトグロビンの機能解析」第36回日本分子生物学会 (2013年12月、神戸市)
8. 鈴木賢一、山本卓、柏木昭彦 WS (動物のメタモルフォーゼ：個体のライフスタイルの劇的変容を支える分子・細胞基盤に関する研究の最前線)「ツメガエル変態における甲状腺ホルモン受容体やその標的遺伝子の特徴」第36回日本分子生物学会 (2013年12月、神戸市)

#### 国際学会

1. Kashiwagi A., Kashiwagi K., Hanada H., Suzuki K., Suzuki A., Takebayashi K., Nakajima K., Furuno N., Tazawa I., Kurabayashi A., Yamamoto T. and Sumida M. 「National BioResource Project (NBRP) *Xenopus tropicalis* Mass Production of High Quality Standard Inbred Strains.」 The 5<sup>th</sup> ANRRC International Meeting (October 30–November 1, 2013 in Shonan Village Center, Hayama, Japan)
2. Isoyama, Y., Kashiwagi, K., Kashiwagi, A., Yamamoto, T. 「Gene knockout in *Xenopus* using TALENs.」 46th Annual Meeting of JSDB, 5<sup>th</sup> May, Matsue, Japan. (2013, 5<sup>th</sup> May, Matsue, Japan.)
3. Kashiwagi A., Kashiwagi K., Hanada H., Suzuki A., Takebayashi K., Kurabayashi A., Suzuki K., Furuno N., Tazawa I., Nakajima K., Yamamoto T. and Sumida M. 「National BioResource Project (NBRP) *Xenopus (Silurana) tropicalis*: Standard High Quality Inbred Strain for Biological Research」 International Symposium Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing (March

27-28, 2014 Institute for Amphibian Biology, Graduate School of Science, Hiroshima University, Higashihiroshima, Japan)

4. Watanabe A., Igawa T., Kashiwagi A., Suzuki A., Kurabayashi A., Fujii T. and Sumida M. 「Inbreeding coefficient and genetic relationship of seven strains of *Xenopus tropicalis* inferred from genome wide genotyping of 54 microsatellite loci」 International Symposium Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing (March 27-28, 2014 Institute for Amphibian Biology, Graduate School of Science, Hiroshima University, Higashihiroshima, Japan)
5. Suzuki, A., Kashiwagi A., Kashiwagi K., Hanada H., Takebayashi-Suzuki K., Tazawa I., Furuno N., Kurabayashi A., Kobayashi S., Takenaka J., Tamaki Y., Igawa T., Uto T., Nanba C., Watanabe A., Yoshida H., Shimada A. and Sumida M. 「International Xenopus Resource Network and Educational Activities at Institute for Amphibian Biology」 International Symposium Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing (March 27-28, 2014 Institute for Amphibian Biology, Graduate School of Science, Hiroshima University, Higashihiroshima, Japan)

④ 科研費等の受け入れ状況

1. 平成 24 年度 EXTEND2010 基盤的研究「ツメガエル変態アッセイを用いた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の開発」2000 千円 (代表)
2. 平成 25 年度 芝浦工業大学システム理工学部大学院重点研究 「アミオダロン暴露による水生両生類の甲状腺への影響」500 千円(分担)

准教授・古野伸明 (Nobuaki Furuno)

## 研究内容

### 1. ネットイツメガエル Myt-1 遺伝子のクローニングと初期発生における機能解析

Molecular cloning of the myt1 and the analysis of the myt1 function in early *Silura (Xenopus) tropicalis* embryo

生物の細胞周期 (G1→S→G2→M→G1…) は CDK/サイクリン複合体により調節されている。CDK/サイクリン複合体が G1 期、G2 期で活性化されることにより細胞周期が S 期、M 期にそれぞれ進行する。ツメガエル卵母細胞は G2 期で停止しており、ホルモン刺激により CDK/サイクリン複合体が活性化され、M 期に進行し卵成熟を起こす。タンパク質リン酸化酵素である Myt1 は、ホルモン刺激を受けるまで CDK をリン酸化することで活性を抑制し、細胞周期 (卵成熟) を抑制すると考えられている。

Myt1 遺伝子は卵母細胞だけでなく初期胚でも発現しているが、初期発生での機能は知られていない。また近年利用が増大しているネットイツメガエルの Myt1 遺伝子はまだクローニングされていない。そこで本研究では、ネットイツメガエル Myt-1 遺伝子のクローニングと初期発生における機能解析を行った。

#### [目的と結果]

作成したネットイツメガエル cDNA ライブラリーを鋳型として Myt1 遺伝子に対するプライマーを作製し PCR を行った。増幅された DNA をプラスミドにクローニングし塩基配列を決定したところ、Myt-1 遺伝子であることを確認した。次に Myt1 遺伝子の初期発生における機能解析のため、Myt 1 にさまざまなアミノ酸変異を導入し、活性化型、ドミナントネガティブ型および機能欠失型の変異体を作成した。野生型およびこれらの変異体から mRNA を合成し、ツメガエル初期胚へ顕微注射し初期卵割のパターンや初期発生に対する影響を調べた。その結果、野生型や機能欠失型の場合はほとんど影響が見られなかったが、活性化型、ドミナントネガティブ型の場合は初期卵割の遅れ (=細胞周期の抑制) が観察された。この結果は、卵成熟における Myt-1 遺伝子の機能と一致する。したがって Myt-1 遺伝子は、ツメガエルの卵成熟だけでなく初期発生の過程でも、細胞周期の抑制因子として機能していることが示唆された。

### 2. 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 10 kbp 上流まで）をクローニングし、GFP の上流に挿入した transgenic ガエル作製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いろ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。

### 3. 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。また、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り、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。最近、正常はサイクリン B2 が紡錘体の極を作る領域に局在する事、また、その局在がサイクリン B2 の NES を過剰発現させる事で乱され、これが CRS 過剰発現による 2 極紡錘体の形成異常を引き起こす原因であると推定された。さらに、2 極紡錘体形成に必要な Eg5

が関与していることを示唆する結果をえている。

#### 4. アフリカツメガエル初期胚に対する過重力の影響

Effects of hypergravity on gene expression and molecular analysis of head-defects in early *Xenopus* embryos

将来、人類が宇宙へ進出してい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。両生類をモデル生物として過重力が発生にどのような影響を与えるかを調べ、その分子的な機構を調べる。

#### [目的と成果]

両生類であるアフリカツメガエルをモデル生物として、初期発生や変態期に焦点を絞って過重力の影響を調べる。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異的な影響を与える事が明らかになった。また、RT-PCRを用いる事より、過重力は、少なくともWntのシグナルを弱めるように作用して、頭部形成に影響を及ぼしている事が明らかになった。また、変態は甲状腺ホルモンの支配によって起こるが、過重力環境下では甲状腺の成長が抑制され、微小重力環境下(地上においても、強磁場を用いると微小重力環境がえられる)においては、逆に甲状腺の成長が促進される事がわかった。このことから、ヒトも地球外環境下では甲状腺に影響が出る事が示唆される。

#### 研究業績

##### ① 原著論文

1. Suzuki, K., Isoyama, Y., Kashiwagi, K., Sakuma, T., Ochiai, H, Sakamoto, N., Furuno, N., Kashiwagi, A. and Yamamoto, T. High efficiency TALENS enable F0 functional analysis by targeted gene disruption in *Xenopus laevis*. *Biologiy Open* (2013) 448-452

2. Sekiguchi, T., Kamada, Y., Furuno, N., Funakoshi, M. and Kobayashi, H. Probing the amino acid residues required for Gtr1p-Gtr2p complex formation and its interactions with the Ego1p-Ego3p complex and TORC1 components in yeast. *Gene to Cell* (2014) in press

##### ② 総説・著書

サイクリン B2 の細胞内局在と紡錘体形成 吉留賢、古野伸明 生体の科学 (2013), 64, 360-365

##### ③ 学会発表

国内発表

1. 柏木昭彦, 鈴木 厚, 古野伸明, 柏木啓子, 花田秀樹, 田澤一朗, 倉林 敦, 中島圭介, 竹林公子, 小林里美, 竹中純子, 住田正幸「新しい実験動物としてのネッタイツメガエル」第60回日本実験動物学会 (2013年5月、つくば国際会議場、つくば市)
2. Yoshitame, S., Furuno, N., Prigent, C. and Hashimoto, E. “The subcellular localization of cyclin B2 is required for bipolar spindle formation during *Xenopus* oocyte maturation” The 46<sup>th</sup> annual meeting of the JSDB (2013,) May 27–31, Matue, Japan.
3. 柏木昭彦, 柏木啓子, 花田秀樹, 田澤一朗, 小林里美, 竹中純子, 鈴木 厚, 竹林公子, 古野伸明, 倉林 敦, 中島圭介, 住田正幸「ツメガエルを知っていますか？」第84回日本動物学会 動物学ひろば (2013年9月、玉野市立玉野海洋博物館、玉野市)
4. 柏木啓子、藤原好恒、古野伸明「重力と磁場によるニシツメガルの甲状腺への影響」第84回日本動物学会 2013年9月 岡山
5. 柏木啓子、鈴木賢一、佐能正剛、花田秀樹、山本卓、新海正、古野伸明、太田茂、柏木昭彦 「両生類を用いた甲状腺ホルモン攪乱化学物質の評価」第84回日本動物学会 2013年9月 岡山
6. 古野伸明、関口猛「ネッタイツメガエルの *wee1A*, *mos* のプロモーター領域のクローニングとその遺伝子構造」日本ツメガエル研究集会 2013年9月24日、山口
7. 柏木昭彦, 柏木啓子, 花田秀樹, 鈴木賢一, 鈴木 厚, 竹林公子, 倉林 敦, 中島圭介, 田澤一朗, 井川 武, 小林里美, 竹中純子, 玉城ゆうな, 古野伸明, 山本 卓, 住田 正幸「ネッタイツメガエルの近交化・標準系統の樹立・提供」第36回日本分子生物学会 (2013年12月、神戸国際展示場 神戸市)

#### 国際学会

1. Kashiwagi A., Kashiwagi K., Hanada H., Suzuki K., Suzuki A., Takebayashi K., Nakajima K., Furuno N., Tazawa I., Kurabayashi A., Yamamoto T. and Sumida M. “National BioResource Project (NBRP) *Xenopus tropicalis* Mass Production of High Quality Standard Inbred Strains” The 5<sup>th</sup> ANRRC International Meeting (October 30–November 1, 2013 in Shonan Village Center, Hayama, Japan)
2. Kashiwagi A., Kashiwagi K., Hanada H., Suzuki A., Takebayashi K., Kurabayashi A., Suzuki K., Furuno N., Tazawa I., Nakajima K., Yamamoto T. and Sumida M. “National BioResource Project (NBRP) *Xenopus (Silurana) tropicalis*: Standard High Quality Inbred Strain for Biological Research”

International Symposium Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing (March 27–28, 2014 Institute for Amphibian Biology, Graduate School of Science, Hiroshima University, Higashihiroshima, Japan)

3. Kurabayashi, A., Furuno, N., Sumida, M., Mizuho, H., Ohshima, K. and Vences, M. “Discovery and phylogenetic distribution of a short interspersed nuclear element (SINE) subgroup in neobatrachian frogs. International Symposium Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing” (March 27–28, 2014 Institute for Amphibian Biology, Graduate School of Science, Hiroshima University, Higashihiroshima, Japan)

4. Yoshitome, S., Prigent, C., Hashimoto, E. and Furuno, N. “Bipolar Spindle formation during meiosis I required the proper localization of cyclin B2 in *Xenopus* oocytes” International Symposium Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing. (March 27–28, 2014 Institute for Amphibian Biology, Graduate School of Science, Hiroshima University, Higashihiroshima, Japan)

5. Suzuki, A., Kashiwagi, A., Kashiwagi, K., Hanada, H., Takebayashi-Suzuki, K., Tazawa, I., Furuno, N., Kurabayashi, A., Kobayashi, S., Takenaka, J., Tamaki, Y., Igawa, T., Uto, T., Nanba, C, Watanabe, A., Yoshida, H., Shimada, A. and Sumida, M. “International *Xenopus* Resource Network and Educational Activities at Institute for Amphibian Biology” International Symposium Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing. (March 27–28, 2014 Institute for Amphibian Biology, Graduate School of Science, Hiroshima University, Higashihiroshima, Japan)

④科研費等の受け入れ状況

該当なし

准教授・三浦郁夫 (Ikuo Miura)

## 研究内容

### 1. XY 型と ZW 型生決定システムにおける生殖腺性差構築機構のちがい

The differences in the establishment mechanisms of gonadal sex-differences between XY and ZW sex-determining systems

ツチガエルには性決定機構が XX/XY 型と ZZ/ZW 型の地域集団が存在する。それゆえ、2つの性決定メカニズムの違いおよび、両者間における生殖腺性差構築機構の違いを調べる上で優れた研究材料である。本種の ZW 型集団では、その性染色体上に *SOX3* 遺伝子が存在する。この遺伝子は真獣類の精巣決定遺伝子 *SRY* の元祖遺伝子として知られているが、ツチガエルの幼生生殖腺では逆に ZW メスにおいて高い発現が観察されており、卵巣決定機能が示唆されている。そこで、*SOX3* 遺伝子の卵巣決定機能を検証するため、TALEN 法によるゲノム編集を用いて機能阻害実験を行った。その結果、mutation を確認した 7 個体が変態した。ZW 個体 4 個体のうち 1 個体は精巣を形成し、性分化関連遺伝子もオス特異的発現パターンを示した。一方、3 個体の ZZ はすべて正常な精巣を形成した。ただし、そのうち 2 個体は卵巣分化に関連する *Cyp19* と *Foxl2* 遺伝子の発現が正常雄よりも有意に高かった。以上の結果から、*SOX3* は ZW 型集団において卵巣決定の初期因子として機能することが示唆される。

一方、XY 型集団では、ZW 型と異なり、*SOX3* 遺伝子の発現は XY 雄幼生の生殖腺において高く、真獣類と同様のパターンを示した。TALEN 法による機能阻害実験を行ったところ、生殖腺の表現型に変化は見られなかった。さらに、機能誘導実験を行うため、*Y-SOX3* 遺伝子コンストラクトを作成し、2 個体の F0 個体を得た。今後、F1 を作成し、その機能を検証する。

### 2. XY 型から ZW 型へ性決定機構の進化

Evolutionary mechanism of sex determination from XY to ZW

ツチガエルの地域集団には XY 型と ZW 型の地域集団が存在している。これまでの研究成果をもとに、本種の XY 型から ZW 型へ性決定機構が進化した要因について考察した。それには、1) 東西に存在する 2 つの元祖型集団の遺伝的な違い、2) 両者の交雑による性比の偏り、3) 日本列島の地質学的歴史において生じた地理的変動による集団の融合や隔離、そして 4) 一つないし、少数遺伝子の発現量の微小なバランスによる性決定機能の変化、の 4 点が性決定機構の頻繁な変化を引き起こしたものと推測した。

## 研究業績

### ①原著論文

1. Miura I, Ogata M (2013) Change of heterogametic sex from male to female: Why so easy in the frog? *Chromosome Science* 16: 3-9.

②総説・著書  
該当なし

③学会発表  
国内学会

1. 三浦郁夫、尾形光昭 ツチガエルのヘテロな性はなぜ容易に変化するの  
か？  
日本遺伝学会第85回大会 9月19日 横浜
2. 尾形光昭、三浦郁夫 ツチガエルのXY型とZW型集団の接触地帯におけ  
る性決定機構の進化 日本進化学会第14回大会 8月21日 東京
3. 三浦郁夫、尾形光昭 ツチガエルの性決定機構はなぜ変化するのか？  
日本爬虫両生類学会第52回大会 11月2日 札幌
4. 尾形光昭、百崎孝男、三浦郁夫 ツチガエルのXY型とZW型集団の交雑  
日本爬虫両生類学会第52回大会 11月3日 札幌

国際学会

1. Miura I, Ogata M, Hasegawa Y, and Ohtani H 2014 Functional analysis of  
the sex-linked gene *SOX3* for female determination in the frog.  
International symposium Frontiers in Amphibian Biology: Endangered  
species conservation and genome editing. 27-28 March 2014,  
Higashi-Hiroshima, Japan
2. Miura I, Ogata M, Sekiya K, and Ohtani H 2014 Evolution of the Sado-frog,  
a newly described species, in the small Japanese island. International  
symposium Frontiers in Amphibian Biology: Endangered species  
conservation and genome editing. 27-28 March 2014, Higashi-Hiroshima,  
Japan

招待講演

1. 三浦郁夫 カエルの性決定と性染色体の進化 一般財団法人染色体学会第  
64回年会 (学会賞受賞記念講演) 11月9日、2013年 富山市
2. 三浦郁夫 サドガエル研究の14年 公開講演会 「サドガエルが辿った進  
化と佐渡の自然」 7月28日(日) 2013年 朱鷺交流センター 佐渡市
3. 三浦郁夫 性決定機構の進化 ～XY型とZW型のバトルと相互変換～  
動植物に共通するアロ認証機構の解明 第8回領域会議 1月9日、2014  
年 名古屋市
4. 三浦郁夫 カエルの性決定とその進化機 広島大学大学院生物圏科学研究

科シンポジウム 生物学の基礎的研究から水・畜産業へのトランスレーション  
1月29日 2014年 東広島市

④科研費等の受け入れ状況

1. 科学研究費新学術領域研究（公募、代表） 4,500千円 「XY型とZW型システムにおける生殖腺性差構築機構の違い」
2. 科学研究費挑戦的萌芽研究（代表） 1,200千円 「XY型からZW型へ性決定機構の進化」

助教・花田秀樹 (Hideki Hanada)

## 研究内容

### 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遷移 (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た。オタマジャクシの変態機構のさらなる解明を目的として、 $T_3$  誘導尾部短縮におけるサイクロスポリンの効果調べた。低濃度の  $T_3$  によってオタマジャクシ尾部は短縮し、それに伴う caspase-3 と-9 様酵素の活性増加、DNA 断片化およびラダー形成の増加が起こった。CsA はこれらの  $T_3$  の効果を抑制した。より高濃度の  $T_3$  とカルシウムイオンは成体のカエル肝臓から単離したミトコンドリアの膨潤の誘導とその膨潤に伴ったアポトーシス関連物質の放出を起こし、その放出された物質を含むフラクシオンは 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

培養カエル白血球細胞を用いて、本研究はビタミン E の抗酸化機能のかく乱のメカニズムを調べている。

活性酸素を誘発させることで、除草剤パラコートは培養細胞に染色体異常を誘発させることが知られている。そこで、培養カエル白血球細胞に対して、次の 4 種類の処理を行った、1)  $10^{-6}$  M パラコート処理のみ、2)  $10^{-7}$ ~ $10^{-5}$  M ビタミン E 処理のみ、3)  $10^{-6}$  M パラコート+ $10^{-7}$ ~ $10^{-5}$  M ビタミン E、4) 無処理。その結果、無処理およびビタミン E 処理細胞において染色体異常を持った細胞の発生率はいずれも 10% 未満であった。それに対して、パラコート処理のみの場合、染色体異常を持った細胞の発生率は 23% であった。さらに  $10^{-6}$  M パラコート+ $10^{-5}$  M ビタミン E 処理の場合、染色体異常を持つ異常な細胞の割合が 50% 近くまでに達した。これらの結果から、ビタミン E はパラコートの細胞遺伝毒性を抑制するのではなく、むしろ強めることがわかった。

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、それらの化学的变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

Hanada, H., Kobuchi, H., Yamamoto, M., Kashiwagi, K., Katsu, K., Utsumi, T., Kasahiwagi, A., Sasaki, J., Inoue, M., Utsumi, K. 2013.

Acetyl-L-carnitine suppresses thyroid hormone-induced and spontaneous anuran tadpole tail shortening. *Hereditas*, 150, 1-9.

##### ②総説・著書

Hanada, H. 2013. Herbicide paraquat genotoxicity-enhancement by the phenolic antioxidants dl- $\alpha$ -tocopherol and 2,6-di-tert-butyl-p-cresol: In Kobayashi D, Watanabe E (Eds), *Handbook on Herbicides: Biological Activity, Classification and Health & Environmental Implications*. Nova Science Publishers, Inc, New York, pp.191-211.

##### ③学会発表

###### 国内発表

1. 花田秀樹、小淵 浩嗣、柏木啓子、内海俊彦、井上正康、佐々木順三、勝賢二郎、佐藤英介、内海耕慥、柏木昭彦。アセチル-L-カルニチンによる無尾両生類幼生尾部短縮の抑制。日本動物学会 第84回大会 2013年9月26日 岡山大学、岡山。

2. 柏木昭彦、鈴木 厚、古野伸明、柏木啓子、花田秀樹、田澤一朗、倉林 敦、中島圭介、竹林公子、小林里美、竹中純子、住田正幸 「新しい実験動物としてのネッタイツメガエル」第60回日本実験動物学会(2013年5月、つくば国際会議場、つくば市)

3. 柏木昭彦, 柏木啓子, 花田秀樹, 田澤一朗, 小林里美, 竹中純子, 鈴木 厚, 竹林公子, 古野伸明, 倉林 敦, 中島圭介, 住田正幸 「ツメガエルを知っていますか？」第 84 回日本動物学会 動物学ひろば (2013 年 9 月、玉野市立玉野海洋博物館、玉野市)

4. 柏木昭彦, 柏木啓子, 花田秀樹, 鈴木賢一, 鈴木 厚, 竹林公子, 倉林 敦, 中島圭介, 田澤一朗, 井川 武, 小林里美, 竹中純子, 玉城ゆうな, 古野伸明, 山本 卓, 住田 正幸 「ネットイツメガエルの近交化・標準系統の樹立・提供」第 36 回日本分子生物学会 (2013 年 12 月、神戸国際展示場 神戸市)

### 国際学会

1. Kashiwagi A., Kashiwagi K., Hanada H., Suzuki K., Suzuki A., Takebayashi K., Nakajima K., Furuno N., Tazawa I., Kurabayashi A., Yamamoto T. and Sumida M. “National BioResource Project (NBRP) *Xenopus tropicalis* Mass Production of High Quality Standard Inbred Strains” The 5<sup>th</sup> ANRRC International Meeting (October 30–November 1, 2013 in Shonan Village Center, Hayama, Japan)

2. Kashiwagi A., Kashiwagi K., Hanada H., Suzuki A., Takebayashi K., Kurabayashi A., Suzuki K., Furuno N., Tazawa I., Nakajima K., Yamamoto T. and Sumida M. “National BioResource Project (NBRP) *Xenopus (Silurana) tropicalis*: Standard High Quality Inbred Strain for Biological Research” International Symposium Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing (March 27–28, 2014 Institute for Amphibian Biology, Graduate School of Science, Hiroshima University, Higashihiroshima, Japan)

### ④科研費等の受け入れ状況

1. 平成 25 年度 芝浦工業大学システム理工学部大学院重点研究 「両生類に対する過重力・磁場の影響」500 千円(分担)
2. 平成 25 年度 EXTEND2010 基盤的研究「ツメガエル変態アッセイを用いた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の開発」2000 千円(分担)

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]

両生類は多くの独特な特徴を備えていることから、長期にわたって伝統的に重要な実験動物として用いられてきた。変態や再生といった現象の解明は生命科学にブレークスルーをもたらすことは明々白々である。無尾両生類の変態時における、尾部短縮を含む大掛かりな体の作り変えは、ほとんどの動物種では見られない。こうした興味深い出来事の分子機構を明らかにするための方策の一つとして、個体レベルでの遺伝子破壊技術を駆使して、関与する遺伝子の機能を調べるのが大切である。数理分子生命理学専攻の山本 卓教授、鈴木賢一特任講師、佐久間哲史特任助教と共同研究を行い、TALENs を用いてツメガエルの標的遺伝子破壊を試みている。

#### [方法]

外来性遺伝子の破壊効果を調べるために、CMV:eGFP アフリカツメガエルトランスジェニック系統と野生型のカエルを交配させて得られた受精卵(F1)に eGFP TALEN mRNA を顕微注入した。さらに内在性遺伝子の破壊効果については、メラニン合成に関わるチロシナーゼ遺伝子 (*try*)、および眼の形成に必要なマスター制御遺伝子 *pax6* を標的とする TALENs をアフリカツメガエル受精卵に導入した。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]

外来性遺伝子の破壊効果を調べるために、CMV:eGFP アフリカツメガエルトランスジェニック系統と野生型のカエルを交配させて得られた受精卵(F1)に eGFP TALEN mRNA を顕微注入した。さらに内在性遺伝子の破壊効果については、メラニン合成に関わるチロシナーゼ遺伝子 (*try*)、および眼の形成に必要なマスター制御遺伝子 *pax6* を標的とする TALENs をアフリカツメガエル受精卵に導入した。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。さらに、EGFP 遺伝子とチロシナーゼ遺伝子を多重破壊したところ、両遺伝子の発現が著しく抑えられることもわかった。

TALEN 標的遺伝子破壊法は、外来性、外来性を問わず遺伝子の改変を行うのに非常に優れた技術であることがわかった。

#### [将来の展望]

今後、TALEN 技術を用いて変態等に重要な遺伝子の破壊を行い、遺伝子機能を解析していく予定である。

## 2. 両生類に対する内分泌かく乱化学物質の影響評価

Assessment of the effects of endocrine disrupting chemicals on amphibians

### [目的]

内分泌かく乱化学物質が世間の耳目を集めたのは、1996年にシーア・コルボーン等の自著『奪われし未来』が出版されてからである。EDCsとは内在性ホルモンの正常な作用をかく乱する物質のことであって、それらはヒトを含む動物種の個体レベルでの発生・成長や性分化、脳の発達、行動、恒常性等に悪影響を及ぼすばかりでなく、種の存続にも打撃を与えることも懸念されている。内分泌かく乱化学物質の多くは化学的に安定で脂溶性が高いため、曝露個体内における生物蓄積をもたらす。

私達は今、生活関連物質や医薬品の生物影響についてツメガエルを用いて調べている。

### [方法]

被検物質の各種濃度液にいろんな発生段階のツメガエル個体を曝露した。

### [成果と考察]

発生や成長、変態などへの影響が認められ、両生類は生活関連物質や医薬品に対する感受性が高く、有用な評価ツールになることが明らかになった。

### [将来の展望]

内分泌かく乱化学物質の特徴は、女性ホルモン作用の他に抗女性ホルモン、男性ホルモン、抗男性ホルモン、副腎皮質ホルモン作用を示すなど多岐にわたるといわれている。両生類への影響を通して、生活関連物質や医薬品の実体は何かを明らかにしていく。

## 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*

### [目的]

環境中の化学物質の生物に対する悪影響（例えば、内分泌かく乱作用）が危惧されている。両生類の変態は甲状腺ホルモン(TH)に支配されている。変態中のオタマジャクシからカエルへの体の作り変えは無尾両生類が最も顕著であるという点で、この動物は甲状腺ホルモンかく乱作用を持つ化学物質の生体影響の試験評価系として非常に優れている。私達は、甲状腺ホルモンアゴニストまたはアンタゴニストである化学物質を高感度に検出するためのトランスジェニックシステムを開発中である。その一例として、THにより活性化される *TRβ* 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て作出されたアフリカツメガエルのトランスジェニック (Tg) システムについて紹介する。この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指し、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を通して評価する方法を検討した。

#### [方法]

すでに樹立している TRpromoter/enhancer/Luciferase Tg  $\beta$  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も行った。

#### [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 曝露された Tg 幼生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 系統を用いて、TH 応答性をルシフェラーゼ活性に基づいて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ることが知られている。TH は成長や発生を調節し、代謝ホメオスタシスの維持に重要な役割を果たしている。現在使われている 10 万種類以上の化学物質のうちで、ヒトを含む生物への安全性が確認されているものは僅かである。安全性に関する情報を得るための優れた in vivo 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。内分泌かく乱物質の生物に及ぼす影響についてのメカニズムを解明していく。

#### 研究業績

##### ① 原著論文

1. Hanada, H., Kobuchi, H., Yamamoto, M., Kashiwagi, K., Katsu, K., Utsumi, T., Kashiwagi, A., Sasaki, J., Inoue, M. and Utsumi, K. (2013) Acetyl-L-carnitine suppresses thyroid hormone-induced and spontaneous anuran tadpole tail shortening. *Hereditas*, 150: 1-9.
2. Suzuki, K., Isoyama, Y., Kashiwagi, K., Sakuma, T., Ochiai, H., Sakamoto, N., Furuno, N., Kashiwagi, A. and Yamamoto, T. (2013) High efficiency TALENs enable F0 functional analysis by targeted gene disruption in *Xenopus laevis* embryos. *Biology Open*, 2:448-452.
3. Sakane, Y., Sakuma, T., Kashiwagi, K., Kashiwagi, A., Yamamoto, T. and

Suzuki, K. (2014) Targeted mutagenesis of multiple and paralogous genes in *Xenopus laevis* using two pairs of transcription activator-like effector nucleases. *Dev. Growth Diff.*, 56, 108-114.

② 総説・著書

1. Hanada, H., Kashiwagi, K., Suzuki, K., Yamamoto, T. and Kashiwagi, A. (2013) Suppression of anuran metamorphosis by synthetic chemicals. (in press) *Frogs: Genetic Diversity, Neural Development and Environmental Influences*. (NOVA, Sweden) pp.73-88

③学会発表

国内学会

1. 柏木昭彦, 鈴木 厚, 古野申明, 柏木啓子, 花田秀樹, 田澤一朗, 倉林 敦, 中島圭介, 竹林公子, 小林里美, 竹中純子, 住田正幸「新しい実験動物としてのネッタイツメガエル」第60回日本実験動物学会 (2013年5月、つくば国際会議場、つくば)

2. 柏木昭彦, 柏木啓子, 花田秀樹, 田澤一朗, 小林里美, 竹中純子, 鈴木 厚, 竹林公子, 古野申明, 倉林 敦, 中島圭介, 住田正幸 「動物学ひろば: ツメガエルを知っていますか?」 第84回日本動物学会 (2013年9月、玉野市立玉野海洋博物館、玉野)

3. 柏木啓子<sup>1</sup>、鈴木賢一<sup>1</sup>、佐能正剛<sup>2</sup>、花田秀樹<sup>1</sup>、山本 卓<sup>1</sup>、新海 正<sup>3</sup>、古野申明<sup>1</sup>、太田 茂<sup>2</sup>、柏木昭彦<sup>1</sup> 「両生類を用いた甲状腺ホルモン作用かく乱化学物質の評価」 第84回日本動物学会 (2013年9月、岡山大学、岡山)

4. 花田秀樹、小淵 浩嗣、柏木啓子、内海俊彦、井上正康、佐々木順三、勝賢二郎、佐藤英介、内海耕慥、柏木昭彦 「アセチル-L-カルニチンによる無尾両生類幼生尾部短縮の抑制」日本動物学会 第84回大会 (2013年9月 岡山大学、岡山)

5. 柏木 昭彦, 柏木 啓子, 花田 秀樹, 鈴木賢一, 鈴木 厚, 竹林 公子, 倉林 敦, 中島 圭介, 田澤 一朗, 井川 武, 小林 里美, 竹中 純子, 玉城 ゆうな, 古野 申明, 山本 卓, 住田 正幸 「ネッタイツメガエルの近交化・標準系統の樹立・提供」第36回日本分子生物学会 (2013年12月、神戸国際展示場 神戸)

6. 中出 翔太、鈴木 賢一、佐久間哲史、重田美津紀、柏木昭彦、柏木啓子、山本卓、小原政信「TALENを用いたツメガエル発生過程におけるサイトグロビンの機能解析」第36回日本分子生物学会 (2013年12月、神戸市)

国際学会

1. Kashiwagi A., Kashiwagi K., Hanada H., Suzuki K., Suzuki A., Takebayashi K., Nakajima K., Furuno N., Tazawa I., Kurabayashi A., Yamamoto T. and Sumida M. 「National BioResource Project (NBRP) *Xenopus tropicalis* Mass Production of High Quality Standard Inbred Strains.」 The 5<sup>th</sup> ANRRC International Meeting (October 30–November 1, 2013 in Shonan Village Center, Hayama, Japan)

2. Isoyama, Y., Kashiwagi, K., Kashiwagi, A., Yamamoto, T. 「Gene knockout in *Xenopus* using TALENs.」 46th Annual Meeting of JSDB, 5<sup>th</sup> May, Matsue, Japan. (2013, 5<sup>th</sup> May, Matsue, Japan.)

3. Kashiwagi A., Kashiwagi K., Hanada H., Suzuki A., Takebayashi K., Kurabayashi A., Suzuki K., Furuno N., Tazawa I., Nakajima K., Yamamoto T. and Sumida M. 「National BioResource Project (NBRP) *Xenopus* (*Silurana*) *tropicalis*: Standard High Quality Inbred Strain for Biological Research」 International Symposium Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing (March 27–28, 2014 Institute for Amphibian Biology, Graduate School of Science, Hiroshima University, Higashihiroshima, Japan)

4. Suzuki, A., Kashiwagi A., Kashiwagi K., Hanada H., Takebayashi–Suzuki K., Tazawa I., Furuno N., Kurabayashi A., Kobayashi S., Takenaka J., Tamaki Y., Igawa T., Uto T., Nanba C., Watanabe A., Yoshida H., Shimada A. and Sumida M. 「International *Xenopus* Resource Network and Educational Activities at Institute for Amphibian Biology」 International Symposium Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing (March 27–28, 2014 Institute for Amphibian Biology, Graduate School of Science, Hiroshima University, Higashihiroshima, Japan)

④ 科研費等の受け入れ状況

1. 平成 25 年度 EXTEND2010 基盤的研究「ツメガエル変態アッセイを用いた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の開発」2000 千円 (分担)
2. 平成 25 年度 芝浦工業大学システム理工学部大学院重点研究 「アミオダロン暴露による水生両生類の甲状腺への影響」500 千円 (分担)

[進化多様性・生命サイクル研究グループ]  
教授・住田正幸 (Masayuki Sumida)

#### 研究内容

1. 絶滅危惧種アマミハナサキガエルとイボイモリの飼育下繁殖の試み (継続)

Attempts at artificial breeding and natural reproduction for endangered amphibian species *Odorrana amamiensis* and *Echinotriton andersoni* from the Central Ryukyus

#### [目的]

アマミハナサキガエル(*Odorrana amamiensis*)は、奄美大島と徳之島に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、環境省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、鹿児島県の天然記念物に指定されている。また、中央琉球に分布するイボイモリは、奄美大島や徳之島や沖縄島北部に分布しており、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 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、これらの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]

アマミハナサキガエルは鹿児島県で天然記念物に指定されているため、採集には県の許可申請が必要であるが、著者らは、この種について、既に天然記念物現状変更許可申請を得ている。奄美大島産アマミハナサキガエル4個体(雄親2、雌親2)を用いて、人工受精法により、人工交配を行い、その後の発生過程における生活力を調べた。また、イボイモリについても、鹿児島県と沖縄県から、既に天然記念物現状変更許可申請を得ている。沖縄産と奄美大島産と徳之島産のイボイモリについて、それぞれ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、飼育下で自然繁殖を試みた。

#### [結果・考察]

奄美大島産アマミハナサキガエル2ペアから、およそ70個体の変態個体を得て飼育中である。生存率は、およそ25%であった。イボイモリでは、沖縄産と徳之島と奄美大島産のそれぞれについて、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1~3年齢150個体が順調に生育している。

#### [将来の展望]

アマミハナサキガエルは現在飼育中の人工繁殖および自然繁殖した子孫の

飼育を継続し、性成熟を待って飼育下で2世代を得ることにより、これらの絶滅危惧種の飼育法と繁殖法を確立させる予定である。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。

## 2. バングラデシュ産トラフガエル類における遺伝的多様性と繁殖隔離機構および飼育下繁殖（継続）

Genetic diversity, postmating isolation and artificial breeding of the Indian bullfrogs (*Hoplobatrachus tigerinus* and *Hoplobatrachus lateralis*) from Bangladesh

### [目的]

バングラデシュでは乱獲等によりトラフガエル *H. tigerinus* が野外で激減しており、本種の採集は法律で禁止されている。一方、最近、著者らはバングラデシュの南東沿岸域から近縁種ハマトラフガエル *H. lateralis* を新種として記載した (Hasan et al., 2011)。本研究では、バングラデシュ全域における本種群の遺伝的多様性を明らかにするとともに、これら2種間の交配後隔離機構を明らかにすることを目的に、野外から採集した個体を使って、ミトコンドリア DNA の Cytb 遺伝子を解析するとともに、人工受精法によって交雑実験を行った。さらに、本種の域外保全を目的に、野外から採集した個体を使って飼育下繁殖を試みた。

### [材料・方法]

バングラデシュのトラフガエルとハマトラフガエルについて、分布の全域を網羅した34集団から133個体を採集し、これらの個体の肢指から全ゲノムDNAを抽出精製して、Cytb 遺伝子全長の塩基配列を解析した。また、トラフガエル7個体（雌親3、雄親4）とハマトラフガエル5個体（雌親1、雄親4）を用いて、人工受精法によって交雑実験を行い、雑種とそのコントロールの生活力を観察した。また、トラフガエル3個体（雌親2、雄親1）を用いて、人工交配によって交雑実験を行い、その子孫の生活力を観察した。

### [成果・考察・展望]

Cytb 遺伝子の塩基配列から、バングラデシュでは、本種群は大きく2つのグループに分化していること、各グループについては、集団間の分化はきわめて小さいことがわかった。また、2種間の正逆雑種はコントロールとほぼ同様に正常に発育し、変態後も正常に発育している。変態率は65%または20%であった。これら2種は配偶子隔離や雑種致死による隔離はないことがわかった。今後、成熟した個体について、繁殖能力や精子形成などを観察して、雑種不妊や精子形成異常の有無を調べる必要がある。また、2個体の雌親から得られた合計10,332の卵を、1個体の雄の精子で受精させた。初期発生は、23°Cのインキュベーターで飼育しながら観察した。受精後80分で第一卵割、受精後48時間で尾芽胚、さらに受精後72時間後で孵化した。受精後5日目から幼

生にはゆでたホウレンソウを与えた。23℃のインキュベーターで2週間飼育した後、ガラス温室の中に設置されているコンクリート水槽で飼育した。変態は、受精後42日目ごろから始まった。全体の卵のうち、89%が正常に卵割し、70%が尾芽胚に到達し、56%が正常に孵化し、46%が正常な接餌幼生になった。しかし、わずか10%が正常に変態した。共食いが幼生の間で観察され、これは変態率の減少の要因となった。これに加えて、未確認の真菌感染と夏場を過ぎての低温も、変態率の減少の原因になった。*H. tigerinus*の繁殖力は全く正常だったが、*H. tigerinus*の子ガエルの大量生産には失敗した。将来、*H. tigerinus*の実験で大量生産と保護を確実にするために、変態までのすべての段階で水温の厳しいコントロールが必要であると考えられる。

### 3. 透明ガエル「スケルピオン」の遺伝様式と真皮色素細胞の組織学的観察 Inheritance and dermal chromatophore structure of see-through frogs

#### [目的]

ニホンアカガエルには、灰色眼と黒色眼の2つの色彩突然変異があり、別々の遺伝子座の劣性ホモ接合体で発現することが分かっている。本研究の目的は、これらの色彩突然変異を用いて、皮膚が透明で内臓が透けて見える透明ガエルを効率的に作製し、その遺伝様式を明らかにすることである。

#### [材料・方法]

透明ガエルの作製には、灰色眼、黒色眼、野生型（ヘテロ）の雌雄を用いた。人工受精法により、灰色眼♀×黒色眼♂、野生型（ヘテロ）同士、灰色眼♀×野生型（ヘテロ）♂、透明ガエル同士の4組で交配を行った。また、透明ガエルの皮膚の微細構造を調べるため、野生型、黒色眼、灰色眼および透明ガエルの真皮色素細胞を電子顕微鏡で観察した。

#### [成果・考察]

灰色眼♀×黒色眼♂では全てが野生型（ヘテロ）：野生型（ヘテロ）同士では野生型53.4%、灰色眼21.4%、黒色眼19.3%、透明ガエル5.9%：灰色眼♀×野生型（ヘテロ）♂では野生型40.6%、灰色眼38.7%、黒色眼11.2%、透明ガエル9.5%：透明ガエル同士では全て透明ガエルであったが、生存率は最も低かった。以上の結果から、透明ガエルの作製には灰色眼♀×野生型（ヘテロ）♂の交配が最も効率的であることが分かった。その結果、野生型では黄色、虹色、黒色の3種類の色素細胞が層状に観察された。灰色眼には黄色素胞と虹色素胞が存在し、虹色素胞には異常な丸い反射小板が観察された。黒色眼には黄色素胞と黒色素胞が存在し、黄色素胞には未熟なプテリノソームやカロテノイド小胞が観察されたが、虹色素胞は観察されなかった。透明ガエルでは色素細胞の数が少なく、未熟な黄色素胞様の細胞が見られ、その中にはメラノソーム様の構造も観察された。

#### [将来の展望]

「透明ガエル」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、改良を試みており、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。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となる。

## 研究業績

### ①原著論文

1. Kakehashi, R., A. Kurabayashi, S. Oumi, S. Katsuren, M. Hosono and M. Sumida (2013) Mitochondrial genomes of Japanese *Babina* frogs (Ranidae, Anura): unique gene arrangements and the phylogenetic position of genus *Babina*. *Genes Genet. Syst.*, 88: 59-67.
2. Kakehashi, R., T. Igawa, N. Iwai, E. Shoda-Kagaya, and M. Sumida (2013) Development and characterization of new microsatellite loci in the Otton frog (*Babina subaspera*) and cross-amplification in a congeneric species, Holst's frog (*B. holsti*). *Conser. Genet. Res.*, 5: 1071-1073.
3. Igawa, T., H. Sugawara, M. Tado, T. Nishitani, A. Kurabayashi, M. M. Islam, S. Oumi, S. Katsuren, T. Fujii and M. Sumida (2013) An attempt at captive breeding of an endangered newt, *Echinotriton andersoni*, from the Central Ryukyus in Japan. *Animals*, 3: 680-692.
4. Hasan, M., M. M. Islam, M. Kuramoto, A. Kurabayashi and M. Sumida (2014) Description of two new species of *Microhyla* (Anura: Microhylidae) from Bangladesh. *Zootaxa*, 3755: 401-418.
5. Kurabayashi, A. and M. Sumida (2013) Afrobatrachian mitochondrial genomes: genome reorganization, gene rearrangement mechanisms, and evolutionary trends of duplicated and rearranged genes. *BMC Genomics*, 14: 633.
6. Komaki, S., T. Igawa, M. Nozawa, S-M. Lin, S. Oumi and M. Sumida (2014) Development and characterization of 14 microsatellite markers for *Buergeria japonica* (Amphibia, Anura, Rhacophoridae). *Genes Genet. Syst.*, 89: 35-39.

7. Kurabayashi, A., R. Kakehashi, I. Tazawa, Y. Haramoto, T. Oshima, Y. Ito and M. Sumida (2014) Improved transport of the model amphibian, *Xenopus tropicalis*, and its viable temperature for transport. *Curr. Herpetol.*, 33:75–87.

8. Hasan, M., M. M. Islam, M. M. R. Khan, T. Igawa, M. S. Alam, T. H. Djong, N. Kurniawan, H. Joshy, H. S. Yong, Daicus, M. B., A. Kurabayashi, M. Kuramoto and M. Sumida (2014) Genetic divergences of South and Southeast Asian frogs: a case study of several taxa based on 16S ribosomal RNA gene data with notes on the generic name *Fejervarya*. *Turk. J. Zool.*, 38: in press.

②総説・著書・その他

住田正幸、柏木昭彦、鈴木 厚

「世界でオンリーワンの両生類研究・リソースセンター」

BioResource Now! 9巻6号1-2頁 (2013)

③学会発表

国内学会

1. 井川 武、小巻 翔平、Nasrin Sultana、長岡 麻衣、野澤 昌文、Islam Mohammed Mafizul、大海 昌平、住田 正幸「Ion PGM を利用した両生類 3 種におけるマイクロサテライトマーカー開発」次世代シーケンサ現場の会 第三回研究会 2013/9/3 - 9/5 神戸国際会議場

2. 住田正幸・井川武・Islam M. M.・倉林敦・Alam, M. S.・掛橋竜祐・田戸美雪・新谷望・菅原弘貴・西谷琢磨・大海昌平・勝連盛輝・藤井保「両生類絶滅危惧種の飼育下繁殖による保全の試み」日本遺伝学会第 85 回大会 平成 25 年 9 月 19 日、慶応大学、横浜

3. Hasan, M., M. M. Islam, M. Kuramoto, A. Kurabayashi and M. Sumida “Description of two new species of *Microhyla* (Anura: Microhylidae) from Bangladesh” 日本遺伝学会第 85 回大会 平成 25 年 9 月 20 日慶応大学、横浜

4. Islam, M. M., R. Kakehashi, H. Koide, A. Kurabayashi, S. Oumi, S. Katsuren, T. Fujii, and M. Sumida “Genetic divergence and postmating isolation between endangered Holst’s frog and Otton frog from the Ryukyu Archipelago, Japan, elucidated by allozyme and mitochondrial gene sequence analyses, crossing experiments and cytological observations” 日本遺伝学会第 85 回大会 平成 25 年 9 月 20 日、慶応大学、横浜

5. 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「アフリカツメガエルのゲノム倍数化過程に生じた染色体再配列と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」日本遺

伝学会第 85 回大会 平成 25 年 9 月 21 日、慶応大学、横浜

6. 住田正幸・井川武・菅原弘貴・田戸美雪・西谷琢磨・倉林敦・Islam M. M.・  
7. 大海昌平・勝連盛輝・藤井保「絶滅危惧種イボイモリの遺伝的多様性と飼育下繁殖」日本動物学会第 84 回大会 平成 25 年 9 月 26 日 岡山大学、岡山市

8. 小巻翔平・井川武・倉林敦・Mi-Sook Min・Si-Min Lin・住田正幸「東アジア産トノサマガエル種群の系統関係と遺伝子浸透」日本動物学会第 84 回大会 平成 25 年 9 月 26 日 岡山大学、岡山市

9. 住田正幸・M. M. Islam・井川 武・倉林 敦・古川友加里・佐野尚美・藤井 保・吉崎範夫「透明ガエルの遺伝様式と真皮色素細胞の組織学的観察」日本爬虫両棲類学会第 52 回大会 平成 26 年 11 月 2 日 東海大学、札幌

10. Islam, M. M., S. Oumi, H. Ida and M. Sumida “Genetic divergence and postmating isolation among several brown frog species from Honshu and Ryukyu of Japan, and Mongolia elucidated by mitochondrial gene sequence analyses, crossing experiments and subsequent cytological observations of their hybrids and controls” 日本爬虫両棲類学会第 52 回大会 平成 26 年 11 月 2 日 東海大学、札幌

11. 掛橋竜祐・井川武・住田正幸「絶滅危惧種ホルストガエルにおける遺伝的集団構造」日本爬虫両棲類学会第 52 回大会 平成 26 年 11 月 2 日 東海大学、札幌

12. 井川 武・長岡麻衣・野澤昌文・小巻翔平・藤井 保・住田正幸「Ion Torrent PGM を用いたハナサキガエルにおけるマイクロサテライト遺伝子座の単離と集団構造解析」日本爬虫両棲類学会第 52 回大会 平成 26 年 11 月 2 日 東海大学、札幌

13. 渡辺愛・井川武・鈴木厚・柏木昭彦・倉林敦・藤井 保・住田正幸「両生類モデル動物ネツタイツメガエル 6 系統における近交度及び遺伝的関係の解明」日本爬虫両棲類学会第 52 回大会 平成 26 年 11 月 2 日 東海大学、札幌

14. 倉林敦・古野伸明・住田正幸・水野英明・大島一彦・M. Vences 「カエル亜目における SINE(short interspersed nuclear elements)の発見と系統分布」日本爬虫両棲類学会第 52 回大会 平成 26 年 11 月 2-3 日 東海大学、札幌

15. Hasan, M., N. Kurniawan, A. Soewondo, M. M. Islam, T. Igawa, W. M. M. Nalley, M. Matsui and M. Sumida “Evolutionary relationships and postmating isolation among *Fejervarya* species from Lesser Sunda, Indonesia and other Asian countries revealed by mtDNA Cyt *b* gene sequences and crossing experiments” 日本爬虫両棲類学会第 52 回大会 平成 26 年 11

月 2-3 日 東海大学、札幌

国際学会

1. Sumida, M., T. Igawa, M. M. Islam, A. Kurabayashi, M. S. Alam, R. Kakehashi, M. Tado, N. Shintani, H. Sugawara, T. Nishitani, S. Oumi, S. Katsuren, and T. Fujii, “Captive breeding of endangered amphibian species: A case study of *ex situ* conservation” 50th Anniversary Meeting of the Australian Society of Herpetologists”, January 30, 2014, Greenhills Conference Centre, Canberra Australia
2. Hasan, M., M. M. Islam, M. Kuramoto, A. Kurabayashi and M. Sumida “Description of two new species of *Microhyla* (Anura: Microhylidae) from Bangladesh” 50th Anniversary Meeting of the Australian Society of Herpetologists”, January 31, 2014, Greenhills Conference Centre, Canberra Australia
3. Sumida, M., M. M. Islam, T. Igawa, A. Kurabayashi, N. Satou, K. Ukena, S. Oumi, S. Katsuren, and T. Fujii “A case study of fauna conservation in Japan: Current conservation measures of wild populations, captive breeding, genetic diversity, and potential resource materials in the endangered frog species *Odorrana ishikawae* and *O. splendida*” International Symposium “Frontiers in Amphibian Biology”, 28 March, 2014, Hiroshima University, Higashihiroshima
4. Islam, M. M., T. Igawa, A. Kurabayashi, R. Kakehashi, N. Satou, N. Shintani, M. Tado, H. Sugawara, T. Nishitani, M. Uchida, S. Oumi, S. Katsuren, T. Fujii, and M. Sumida “An *ex situ* conservation effort for several endangered and near-threatened amphibian species from the Ryukyu Archipelago, Japan: Captive breeding of nine anuran species and cryopreservation of sperm for two of them” International Symposium “Frontiers in Amphibian Biology”, 28 March, 2014, Hiroshima University, Higashihiroshima
5. Hasan, M., N. Kurniawan, A. Soewondo, M. M. Islam, T. Igawa, W. M. M. Nalley, M. Matsui and M. Sumida “Evolutionary relationships and postmating isolation among *Fejervarya* species from Lesser Sunda, Indonesia and other Asian countries revealed by mtDNA Cyt *b* gene sequences and crossing experiments” International Symposium “Frontiers in Amphibian Biology”, 27-28 March, 2014, Hiroshima University, Higashihiroshima
6. Alam M. S., M. M. R. Khan, M. M. Islam, M. Hasan and M. Sumida “Artificial Breeding of an Indian Bullfrog (*Hoplobatrachus tigerinus*): A Case Study

on Reproduction and Conservation” International Symposium “Frontiers in Amphibian Biology”, 27–28 March, 2014, Hiroshima University, Higashihiroshima

7. Sumida, M., M. M. Islam, T. Igawa, A. Kurabayashi, Y. Furukawa, N. Sano, T. Fujii and N. Yoshizaki “Translucent frogs created through crossbreeding, and their inheritance and dermal chromatophore structure” International Symposium “Frontiers in Amphibian Biology”, 27–28 March, 2014, Hiroshima University, Higashihiroshima

8. Kuramoto, M., N. Satou, S. Oumi, A. Kurabayashi, and M. Sumida “Inter- and intra-island divergence in *Odorrana ishikawae* (Anura, Ranidae) of the Ryukyu Archipelago of Japan, with description of a new species” International Symposium “Frontiers in Amphibian Biology”, 27–28 March, 2014, Hiroshima University, Higashihiroshima

9. Djong, H. T., M. Matsui, M. Kuramoto, M. Nishioka, and M. Sumida “A new species of the *Fejervarya limnocharis* complex from Japan (Anura, Dicroglossidae)” International Symposium “Frontiers in Amphibian Biology”, 27–28 March, 2014, Hiroshima University, Higashihiroshima

10. Sultana, N., T. Igawa, M. Nozawa, M. M. Islam, M. M. R. Khan, M. Hasan, M. S. Alam and M. Sumida “Development and characterization of 27 new microsatellite markers of Indian Bullfrog, *Hoplobatrachus tigerinus* (Daudin, 1802) and its congeneric species” International Symposium “Frontiers in Amphibian Biology”, 27–28 March, 2014, Hiroshima University, Higashihiroshima

11. Kakehashi, R., T. Igawa and M. Sumida “Genetic population structure of an endangered frog species, *Babina holsti*” International Symposium “Frontiers in Amphibian Biology”, 27–28 March, 2014, Hiroshima University, Higashihiroshima

12. Komaki, S., T. Igawa, K. Tojo, A. Kurabayashi, S.-M. Lin, M.-S. Min, and M. Sumida “New insights into evolutionary history among Asian pond frog species” International Symposium “Frontiers in Amphibian Biology”, 27–28 March, 2014, Hiroshima University, Higashihiroshima

13. Uno, Y., C. Nishida, C. Takagi, T. Igawa, N. Ueno, M. Sumida and Y. Matsuda “Molecular cytogenetic studies on the process of genomic and chromosomal evolution in *Xenopus laevis* after WGD and the origin and evolution of sex chromosomes in anuran species” International Symposium

“Frontiers in Amphibian Biology”, 27–28 March, 2014, Hiroshima University, Higashihiroshima

14. Kurabayashi, A., N. Furuno, M. Sumida, H. Mizuno, K. Ohshima, and M. Vences “Discovery and phylogenetic distribution of a short interspersed nuclear element (SINE) subgroup in neobatrachian frogs” International Symposium “Frontiers in Amphibian Biology”, 27–28 March, 2014, Hiroshima University, Higashihiroshima

15. Watanabe, A., T. Igawa, A. Kashiwagi, A. Suzuki, A. Kurabayashi, T. Fujii, and M. Sumida “Inbreeding coefficient and genetic relationship of seven strains of *Xenopus tropicalis* inferred from genome wide genotyping of 54 microsatellite loci” International Symposium “Frontiers in Amphibian Biology”, 27–28 March, 2014, Hiroshima University, Higashihiroshima

16. Kashiwagi, A., K. Kashiwagi, H. Hanada, A. Suzuki, K. Takebayashi, A. Kurabayashi, K. Suzuki, N. Furuno, I. Tazawa, K. Nakajima, T. Yamamoto and M. Sumida “National BioResource Project (NBRP) *Xenopus (Silurana) tropicalis*: Standard High Quality Inbred Strains for Biological Research” International Symposium “Frontiers in Amphibian Biology”, 27–28 March, 2014, Hiroshima University, Higashihiroshima

17. Suzuki, A., A. Kashiwagi, K. Kashiwagi, H. Hanada, K. Takebayashi-Suzuki, I. Tazawa, N. Furuno, A. Kurabayashi, S. Kobayashi, J. Takenaka, Y. Tamaki, T. Igawa, T. Uto, C. Nanba, A. Watanabe, H. Yoshida, A. Shimada, and M. Sumida “International *Xenopus* Resource Network and Educational Activities at Institute for Amphibian Biology” International Symposium “Frontiers in Amphibian Biology”, 27–28 March, 2014, Hiroshima University, Higashihiroshima

#### 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 11,740 千円 (担当 住田正幸、矢尾板芳郎)

2. 文部科学省第3期 NBRP 「ネッタイツメガエルの近交化・標準系統の樹立・提供」中核機関 (H25 年度) 11,410 千円 (課題代表者 住田正幸)

3. 科学研究費補助金 基盤研究(B) 「絶滅危惧両生類における遺伝的多様性評価と保全のための包括的研究」 3,510 千円 (研究代表者 住田正幸)

4. 科学研究費補助金 挑戦的萌芽研究「光る透明ガエルの作出：非モデル両生類への遺伝子導入法の確立と NGS による発現解析」2,340 千円（研究代表者 住田正幸）

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

(2) アフリカツメガエルのゲノム解析

*Xenopus laevis* genome project

(3) 国際ツメガエルリソース拠点ネットワークの構築

International *Xenopus* Resource Network

## [目的]

(1) 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。また、数学者 Thompson をはじめとする研究者によって、生物の多様な形態を、背腹軸と頭尾軸の調和機構の変化で説明しようとする試みがなされている。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。

(2) アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) は、医学生物学研究において長年使われており、膨大な研究成果を生んできた。近年のゲノム科学の進展に伴い、アフリカツメガエルのゲノムを解読して、これまでの研究成果を活用・展開させる機運が高まり、米国エネルギー省・カリフォルニア大学・テキサス大学、および東京大学・遺伝学研究所・広島大学などによる国際共同研究が開始されている。先にゲノムが解読されたネッタイツメガエル (*Xenopus (Silurana) tropicalis*) との比較解析を行い、ゲノム・遺伝子進化のメカニズムを明らかにすることを目的としている。

(3) 実験モデル動物として優れた特徴を持つネッタイツメガエルおよびアフリカツメガエルのバイオリソースを国際的な枠組みで保存・提供するために、英国・米国のツメガエルリソース拠点と両生類研究施設が連携を始めている。特に、ネッタイツメガエルについては、文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) の平成24年度新規採択課題としてサポートを受けている。両生類研究を推進するため、および両生類研究施設が国際的に貢献するために、

積極的な取り組み・連携を行なうことを目的としている。

#### [成果と考察]

(1) 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。すなわち、Biz の過剰発現を行うと頭部構造の形成が阻害され、胴尾部領域の神経マーカーの発現が誘導される。また、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うと、前後軸形成については、後方神経マーカーの1つである HoxB9 の発現が著しく低下した。また、背腹軸形成については、神経マーカー NCAM の発現が著しく低下することが分かっている。今年度は、Biz の生化学的な働きを調べるために、カエル胞胚の外胚葉組織片と培養細胞を用いた解析を中心におこなった。Biz をカエル卵の動物極側に過剰発現させると後方の神経が形成されるため、BMP シグナルの抑制、および Wnt シグナルの活性化が起きていることが予想された。BMP リガンドが受容体に結合して細胞内の BMP シグナルが活性化されると、シグナル伝達因子 Smad1/5/8 の C-末端にリン酸化が引き起こされる。そこで、BMP シグナルの活性化の指標としてリン酸化 Smad1/5/8 の状態を調べたところ、Biz を導入した外胚葉組織片の細胞では、リン酸化 Smad1/5/8 の量が減少しており、Biz が BMP シグナルを抑制していることが確認された。一方、Wnt シグナルについては、Wnt リガンドが受容体に結合してシグナルが活性化されると、細胞質および核内の beta-Catenin の分解が抑制されて、タンパク質量が増加することが知られている。Biz を導入した培養細胞では、予想どおり細胞質および核内に存在する beta-Catenin の量が増加し、Wnt シグナルが活性化していると考えられた。Biz の生化学的な働きと初期胚での表現型が一致したことから、Biz が BMP シグナルと Wnt シグナルの制御を介して背腹軸と頭尾軸の形成を調和させる重要な分子であることが明確になった。

(2) アフリカツメガエルのゲノム解読は、日米の各担当者が作業を分担・協力して解析を進めている。昨年度に引き続き国立遺伝学研究所で作製された BAC ライブラリー (約 135 万個の独立クローンからなるオリジナル) を両生類研究施設において凍結保存・管理することに加えて、今年度は、このライブラリーを基礎生物学研究所・大学連携バイオバックアッププロジェクト (IBBP) 機関へ輸送し、現地に赴いて共同研究者と協力して複製作業を行なった。IBBP における液体窒素保存用のほか、両生類研究施設から国内外に配布する複製品も作製し、オリジナルと複製品 2 セット (計 3 セット; 405 万クローン) を両生類研究施設へ輸送して凍結保存した。このうち 1 セットは、海外のツメガエル研究者への国際貢献として英国ツメガエルリソース拠点へ凍結状態で輸送・配布を行なった。また、米国エネルギー省・テキサス大学らのグループによって作成された遺伝子モデルの検定作業・修正提案を行ない、大幅な改善を行なうことが出来た。アフリカツメガエル遺伝子モデルの改善は、ネットアイツメガエル遺伝子モデルの改善に繋がることも示すことが出来たので、今回の改善作業は、ツメガエルゲノム科学の進展に大きな意味を持つと考えている。この他、ゲノム情報・発現情報を利用して、TGF-beta および FGF シグナル経路の

解析を共同研究で進めている。

(3) 両生類研究施設は、平成 24 年度から文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) に新規採択され、ネッタイツメガエルのリソース拠点として様々な研究支援を開始した。本プロジェクトでは、研究支援の一つとして、海外リソース拠点 (英国 European *Xenopus* Resource Centre (EXRC) と米国 National *Xenopus* Resource (NXR)) との国際連携促進を掲げている。拠点間における有用情報の共有だけでなく、ネッタイツメガエルサンプルの受渡しなど、有機的な連携を積極的に展開している。今年度は、日英米の 3 拠点による月例ビデオ会議を開催することに加えて米国 NXR で開催された国際ツメガエル研究室主宰者リソース会議へ出席し、NXR、EXRC と並んで NBRP に関する招待講演を行なった。海外の研究室主宰者、ツメガエルデータベース (Xenbase) 担当者、英米リソース拠点担当者との協議をおこない、2014 年版ツメガエル白書を参加者全員で協力して作成した。平成 24 年度から積極的に始めた国際連携活動から、両生類研究施設・NBRP が国際的に広く認知されるようになり、2014 年版ツメガエル白書にも掲載されることになった。両生類研究施設・NBRP へのホームページリンクも、EXRC、NXR、Xenbase 等の公式サイトに掲載されている。また、構築したリソース拠点ネットワークを活かして、英国ガードン研究所・ガードン教授および英国 EXRC・Guille 教授からネッタイツメガエルサンプルの提供を受けることができた。提供サンプルを用いた系統解析が両生類研究施設において進行しており、解析結果は国内外の研究者に対して公開・論文発表される予定である。

#### [将来の展望]

これまでに行なってきた FoxB1 転写因子の機能解析 (2011 年論文発表)、および Biz 転写因子の機能解析 (上記) から、背腹軸と頭尾軸の形成を調和させる機構が明らかになりつつある。この調和機構の実体は、BMP シグナルと Wnt シグナルを統合的に制御する FoxB1 や Biz タンパク質による転写活性やタンパク質分解の制御であると考えられる。今後、生化学的および分子生物学的手法を駆使して、FoxB1 や Biz に結合するタンパク質を同定・解析すれば、体軸形成や形態の多様性を生み出す分子基盤が明らかにできる可能性がある。また、BMP シグナルと Wnt シグナルは幹細胞の制御にも重要であることから、本研究での知見は、幹細胞制御・再生医療への応用も可能であると予想される。

アフリカツメガエルのゲノム解析は、急ピッチで進んでおり、遺伝子モデルの改善がさらに進む予定である。現段階でもニワトリなど他のモデル生物を上回る精度を持つことが分っており、論文発表時までには極めて高い完成度に到達するであろう。上述のように、ネッタイツメガエルのゲノム情報・遺伝子モデルも併せて向上する予定であり、本ゲノム解析は両生類研究の促進に大いに貢献すると考えられる。比較ゲノム解析の観点からも、2 倍体のネッタイツメガエルと擬似 4 倍体のアフリカツメガエルとの比較研究が可能となり、ツメガエル研究の重要性が増すと予想される。

平成 24 年度から積極的に展開した国際リソース拠点ネットワーク構築は、過去 3 回にわたる日英米リソース拠点会議、および月例ビデオ会議を経て、緊密な連携関係が構築されている。既に、400 種類以上の cDNA クローンおよび

135 万個の BAC ライブラリークローンの共有、系統解析用カエルサンプルの受渡しなどが行なわれており、3 大リソース拠点が協力して世界中の研究者に貢献している。両生類研究施設・NBRP の活動は、国内だけでなく海外主要研究室の主宰者に認められつつあり、今後、さらに幅広い研究者へ貢献していく予定である。米国で開催された国際ツメガエル研究室主宰者リソース会議では、次世代の人材育成の観点から、若手研究者や学部生・高校生に対する教育活動が非常に高く評価された。その後も引き続き、教育界からの要望に応じて高校教員研修会の開催やカエルを用いた授業方法の指導等を積極的に行なっており、長期的な視点で研究者・教育者の育成に繋がると期待している。

## 研究業績

### ①原著論文

該当なし

### ②総説・著書

住田正幸、柏木昭彦、鈴木 厚

「世界でオンリーワンの両生類研究・リソースセンター」

BioResource Now! vol. 9, No. 6, 1-2 (2013)

### ③学会発表等

#### 国内学会

1. Suzuki, A. and Takebayashi-Suzuki, K. “Establishment of vertebrate body plan via coordinated regulation of dorsal-ventral and anterior-posterior patterning and developmental canalization” 第 46 回日本発生生物学会，島根（2013 年 5 月 28 日-31 日、30 日；フラッシュトーク・ポスター発表）

2. 鈴木 厚「ナショナルバイオリソースプロジェクト・ネットイツメガエルの現況」第 46 回日本発生生物学会・日本ツメガエル研究会総会，島根（2013 年 5 月；招待・依頼講演）

3. 鈴木 厚「ゲノム・遺伝子から見た発生の仕組み～ゲノム学・発生学が支える私たちの健康～」広島市教育センター 高校教員研修会・講演会（2013 年 7 月；招待・依頼講演）

4. 鈴木 厚、竹林公子「背腹軸と頭尾軸の統合的制御によるボディープラン形成と形態多様化のメカニズム」第 7 回日本ツメガエル研究集会（2013 年 9 月 24 日、山口県美祢市；口頭発表）

5. 鈴木 厚「ナショナルバイオリソースプロジェクト・ネットイツメガエルの現況と *Xenopus* PI meeting の報告」第 7 回 日本ツメガエル研究集会（2013 年 9 月、山口県美祢市；招待・依頼講演）

6. 鈴木 厚「カエルの発生と中胚葉誘導・神経誘導」高校教員研修会・実験実習（2013年11月23-24日、広島県東広島市；招待・依頼講演）

7. 吉田和史，近藤剛士，五十嵐一衛，竹林公子，鈴木 厚，塩川光一郎「アフリカツメガエル尾芽胚の組織形成に対するスペルミンの影響」日本ポリアミン学会第5回年会、千葉県銚子市，（2014年1月23、24日、発表日：2014年1月23日）

#### 国際学会

1. Akihiko Kashiwagi, Atsushi Suzuki\*, Nobuaki Furuno, Keiko Kashiwagi, Hideki Hanada, Ichiro Tazawa, Atsushi Kurabayashi, Kimiko Takebayashi-Suzuki, Keisuke Nakajima, Satomi Kobayashi, Junko Takenaka, Yuuna Tamaki and Masayuki Sumida “National BioResource Project (NBRP) for *Xenopus*: Asian hub for the international *Xenopus* research community” *Xenopus* PI meeting, 米国 Woods Hole Marine Biological Laboratory (2013年8月；招待・依頼講演), \* Speaker

2. Atsushi Suzuki “Molecular mechanisms of frog embryogenesis and its applications to understanding human diseases and advancement of regenerative medicine” International Interdisciplinary Studies Seminar (IISS IV), Brawijaya University, インドネシア (2013年10月；招待・依頼講演)

3. Atsushi Suzuki, Akihiko Kashiwagi, Keiko Kashiwagi, Hideki Hanada, Kimiko Takebayashi-Suzuki, Ichiro Tazawa, Nobuaki Furuno, Atsushi Kurabayashi, Satomi Kobayashi, Junko Takenaka, Yuuna Tamaki, Takeshi Igawa, Takeshi Uto, Chiyo Nanba, Ai Watanabe, Hitoshi Yoshida, Aki Shimada, and Masayuki Sumida “International *Xenopus* Resource Network and Educational Activities at Institute for Amphibian Biology” International symposium “Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing”, 東広島 (2014年3月27日-28日、27日；ポスター発表)

4. Kimiko Takebayashi-Suzuki, Hidenori Konishi and Atsushi Suzuki “Establishment of vertebrate body plan via coordinated regulation of dorsal-ventral and anterior-posterior patterning during early *Xenopus* embryogenesis” International symposium “Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing”, 東広島 (2014年3月27日-28日、27日；ポスター発表)

#### ④科研費等の受け入れ状況

科学研究費補助金 基盤研究 (C) (分担)

助教・倉林 敦 (Atsushi Kurabayashi)

## 研究内容

カエル亜目における SINE の探索: SINE2-1XT ホモログおよびサブファミリーの系統的起源

Survey of SINE retrotransposons in neobatrachian frogs: Phylogenetic origins of SINE2-1XT homologue and its subfamilies.

## [目的]

カエル亜目 (Neobatrachia) は、現生両生類種の 95% を含む巨大な分類群である。本分類群のサブグループ (科～亜科レベル) の多くは、大陸移動に伴い分布拡大と系統分岐を生じたとされる一方で、従来の分子系統解析では解決できない系統額上の問題が数多く残っており、正確な生物地理学的な考察が困難な状況であった。そこで、本研究では、従来法にはない利点を持つ、転移因子 SINE の挿入に基づく系統解析によって、これらの問題を解決することを最終目的として研究を行った。ただし、これまでにカエル亜目からは SINE 配列が発見されていなかったため、SINE (Short INterspred Element) マーカーによる系統解析を実施するためには、まず、SINE を探索し、単離・同定を行う必要があった。SINE 探索に加え、本研究では以下の点を目的として研究を実施した。

(1) 両生類における SINE の起源と系統的分布の解明。(2) ゲノム内の SINE の存在比の解明と SINE 法実施可能性の検討。(3) カエルミトゲノムにおいて配置変化が生じやすい遺伝子の周辺に、SINE/LINE (Long INterspred Element) で共通してみられる LINE 逆転写酵素蛋白質の認識配列が存在するかの検討。

## [材料・方法]

本研究では、世界各地から 50 種以上のアカガエル類やその他の両生類分類群の組織サンプルを研究材料として収集し、分子生物学的実験に用いた。また、以下に主たる研究方法を示す。

- ・ ドットプロットハイブリダイゼーション (サザンハイブリダイゼーション) による、ゲノム内 SINE (および LINE) 配列の確認。
- ・ 454 次世代シーケンサーによるランダムシーケンス。
- ・ RepeatMasker および RepeatModeler プログラムによる NGS データからの SINE/LINE 配列の探索。(その他、Blast、Perl などのプログラムを使ったバイオインフォマティクス解析)
- ・ PCR 法による、SINE/LINE の増幅・サブクローニングと DNA 塩基配列決定。

## [結果・考察・成果]

### (1) カエル亜目における SINE2-1XT ホモログの発見

両生類では、これまでムカシガエル亜目に属するピパ科のツメガエル属 (*Xenopus*) のみで SINE の存在が知られており、カエル亜目では SINE の存在は知られていなかった。そこで、カエル亜目に属する、3 科 3 種のカエル - ニホンアカガエル (*Rana japonica*: アカガエル科)、セアカアデガエル (*Boophis*

*goudotii*: マダガスカルガエル科)、アメフクラガエル (*Breviceps adspersus*: フクラガエル科) - のゲノムを、454 次世代シーケンサーを用いて、をランダムシーケンスした。

ここで得られた配列情報 (それぞれ 48、59、68 メガベース) から、既知の SINE 配列を探索した。その結果、新規 SINE は発見できなかった。一方で、これら 3 種のゲノムには、ネツタイツメガエルで発見されていた 6 種の SINE のうち、SINE2-1XT と相同な SINE が存在することが明らかとなった。さらに、SINE2-1XT ホモログの配列がゲノムに占める割合 (存在率) は分類群間で大きく異なっていた。具体的には、ニホンアカガエル・フクラガエルでの SINE2-1XT の存在率は、 $0.13 \cdot 0.20\%$  と低いが、*B. goudotii* では、全ゲノム配列 (3.9Gbp) の 1.84% が SINE2-1XT ホモログであると推定された。(なお、全ゲノム情報が公開されているネツタイツメガエルゲノムにおける SINE2-1XT の存在率は、0.04% である)。この結果から、カエル亜目内でも SINE 法による系統解析が実施可能であることが初めて明らかとなった。一方で、SINE 法による系統解析の成功率は、SINE の増幅率と増幅時期が大きく影響する。このため、今回の結果は、SINE 法を適用しやすい分類群と適用が難しいグループがあることを示唆するものであった。

さらに、本研究によって、*B. goudotii* とニホンアカガエルとゲノムには、それぞれ典型的な SINE2-1XT とは異なる SINE 2-1 サブタイプが存在することが分かった。具体的には、*B. goudotii* には LINE 逆転写酵素認識部位を含むおよそ 70bp の領域が 2-5 コピー重複している SINE2-1 が存在し、さらに、ニホンアカガエルには、同認識部位が大きく変化した SINE2-1 が存在していた。

## (2) SINE2-1XT ホモログとそのサブファミリーの系統的分布と起源系統

SINE2-1XT ホモログおよび、これらの SINE2-1 サブタイプが生じた起源系統を明らかにするため、36 種類の両生類についてドットプロットハイブリダイゼーションを行った。その結果、今回検査した全ての両生類種 (有尾類・無足類を含む) において、SINE2-1XT ホモログは陽性であった。この結果は、同 SINE は全ての現生両生類の共通祖先系統に由来することを示している。また、ニホンアカガエルで見つかった SINE2-1 サブタイプは、アカガエルかの中でも *Rana* 属の種にのみ存在することが示され、本サブタイプは本属の共通祖先 (または *Rana* 一部系統の祖先) に由来すると考えられた。また、*Boophis* ゲノムに存在するリピートを持った SINE サブタイプ (*Boophis* サブタイプ) は、一部の *Natatanura* (広義アカガエル科) 系統でのみ存在が確認された。さらに、*Boophis* サブタイプは、単系統 *Natatanura* の中で多系統的に存在していることが示された。このことは、以下 2 点の可能性を示唆している。1) *Boophis* サブタイプ SINE は、一部の *Natatanura* 系統の共通祖先で生じたが、その後、いくつかの系統ではゲノムから消失した。2) 現在の *Natatanura* 内の系統仮説は正しくない (= *Boophis* サブタイプ SINE をもったグループが単系統である可能性)。どちらの仮説が正しいのかについては、更なる研究が必要であるが、2) の仮説が正しい場合は、現行の *Natatanura* の系統仮説については、大きな変更が必要となる。

(3) カエル亜目ミトゲノムの遺伝子配置変化とレトロポゾン様転移機構  
一般的に、ミトコンドリアゲノム上で遺伝子が並んでいる順序（遺伝子配置）は、多細胞動物では保守的で、あまり変化しない。しかし、カエル亜目のミトゲノムでは、特定の遺伝子部位（tRNA-His 遺伝子や nad5 遺伝子）の配置変化が多系統的に頻繁に生じることが分かっており、この配置変化は SINE/LINE などのレトロポゾン様の転移メカニズムが作用していることが示唆されていた。このため、本研究で発見した SINE2-1XT ホモログの逆転写酵素認識配列が、上記のミトゲノム遺伝子近傍に存在するかを検索した。その結果、この SINE の逆転写酵素認識部位類似配列は存在せず、カエル亜目のミトゲノム高頻度配置変化は、レトロポゾン様の遺伝子転移機構とは無関係か、SINE2-1XT ホモログとは全く別のレトロポゾンがミトゲノムの構造変化に関与していることが示唆された。  
なお、現在、上記（1-3）の成果をまとめた欧文論文を準備中である。

#### [今後の展望]

##### SINE 法による未解決系統関係へのアプローチ

上記の研究により、カエル亜目の中でも、SINE 法による系統解析の実施が容易な分類群と、同法の適用が難しい分類群が存在することが示唆された。そこで、SINE 法の適用が容易と考えられるマダガスカルガエル科において、従来法では解決できない系統学上の問題点（1）マダガスカルガエル 3 亜科の類縁関係、（2）*Tsingymantis* 属の亜科帰属問題、（3）マダガスカルガエル亜科内の *Spinomantis* 属の系統的位置の解決を企図した。現在までに、マダガスカルガエル科の全 3 亜科全属についてのサンプルの収集に成功し、さらに、上記 *Boophis* に加え、*Laliostoma*, *Mantella*, *Mantidactylus*, *Guibemantis*, *Spinomantis*, *Tsingymantis* 属の代表各 1 種について、部分ゲノムシーケンズを行い、多数の SINE 座位を単離した。現在、これらの SINE 座位を増幅するプライマーを作製している。今後は、PCR 法によって、系統学的に情報のある座位を選別し、最終的に SINE 座位の挿入の有無を形質とした最節約法による系統解析を行い、上述の系統関係問題を解決する予定である。

#### 研究業績

##### ① 原著論文

1. Kakehashi, R., A. Kurabayashi, S. Oumi, S. Katsuren, M. Hoso, M. Sumida. Mitochondrial genomes of Japanese Babina frogs (Ranidae, Anura): unique gene arrangements and the phylogenetic position of genus *Babina*. *Genes Genet Syst.* 88:59-67 (2013).

2. Igawa, T, H. Sugawara , M. Tado , T. Nishitani, A. Kurabayashi, M. M. Islam, S. Oumi, S. Katsuren, T. Fujii, & M. Sumida. An Attempt at Captive Breeding of the Endangered Newt *Echinotriton andersoni*, from the Central Ryukyus in Japan. *Animals* 3: 680-692 (2013).

3. Kurabayashi, A & M Sumida. Afrobatrachian mitochondrial genomes: genome

reorganization, gene rearrangement mechanisms, and evolutionary trends of duplicated and rearranged genes. *BMC Genomics* 14: 633 (2013).

4. Hasan, M., M. M. Islam, M. M. R. Khan, T. Igawa, M. S. Alam, T. H. Djong, N. Kurniawan, H. Joshy, H. S. Yong, Daicus, M. B., A. Kurabayashi, M. Kuramoto & M. Sumida. Genetic divergences of South and Southeast Asian frogs: A case study of several taxa based on 16S ribosomal RNA gene data with notes on the generic name *Fejervarya*. *Turk. J. Zool.* 38:1-23 (2014).

5. Hasan, M. K., M. M. Islam, M. Kuramoto, A. Kurabayashi, and M. Sumida. Description of two new species of *Microhyla* (Anura: Microhylidae) from Bangladesh. *Zootaxa* 3755: 401-408 (2014).

6. Kurabayashi, A., R. Kakehashi, I. Tazawa, Y. Haramoto, T. Oshima, Y. Ito & M. Sumida. Improved transport of the model amphibian, *Xenopus tropicalis*, and its viable temperature for transport. *Current Herpetology* 33: 75-87 (2014).

② 総説・著書  
該当なし

③ 学会発表  
国内学会

1. 倉林 敦・住田正幸・水野英明・大島一彦・Miguel Vences 「カエル亜目におけるSINE (short interspersed nuclear element) の発見と系統的分布」日本爬虫両棲類学会 第52回大会 (2012年11月、東海大学札幌キャンパス、北海道)

2. 住田正幸・井川武・Islam M. M.・倉林敦・Alam, M. S.・掛橋竜祐・田戸美雪・新谷望・菅原弘貴・西谷琢磨・大海昌平・勝連盛輝・藤井保「両生類絶滅危惧種の飼育下繁殖による保全の試み」日本遺伝学会第85回大会 平成25年9月19日、慶応大学、横浜

3. Hasan, M., M. M. Islam, M. Kuramoto, A. Kurabayashi and M. Sumida “Description of two new species of *Microhyla* (Anura: Microhylidae) from Bangladesh” 日本遺伝学会第85回大会 平成25年9月20日慶応大学、横浜

4. Islam, M. M., R. Kakehashi, H. Koide, A. Kurabayashi, S. Oumi, S. Katsuren, T. Fujii, and M. Sumida “Genetic divergence and postmating isolation between endangered Holst’s frog and Otton frog from the Ryukyu Archipelago, Japan, elucidated by allozyme and mitochondrial gene sequence analyses, crossing experiments and cytological observations” 日本遺伝学会第85回大会 平成25年9月20日、慶応大学、横浜

5. 住田正幸・井川武・菅原弘貴・田戸美雪・西谷琢磨・倉林敦・Islam M. M.・大海昌平・勝連盛輝・藤井保「絶滅危惧種イボイモリの遺伝的多様性と飼育下繁殖」日本動物学会第84回大会 平成25年9月26日 岡山大学、岡山市

6. 小巻翔平・井川武・倉林敦・Mi-Sook Min・Si-Min Lin・住田正幸「東アジア産トノサマガエル種群の系統関係と遺伝子浸透」日本動物学会第84回大会 平成25年9月26日 岡山大学、岡山市

7. 住田正幸・M. M. Islam・井川武・倉林敦・古川友加里・佐野尚美・藤井保・吉崎範夫「透明ガエルの遺伝様式と真皮色素細胞の組織学的観察」日本爬虫両棲類学会第52回大会 平成26年11月2日 東海大学、札幌

8. 渡辺愛・井川武・鈴木厚・柏木昭彦・倉林敦・藤井保・住田正幸「両生類モデル動物ネッタイツメガエル6系統における近交度及び遺伝的關係の解明」日本爬虫両棲類学会第52回大会 平成26年11月2日 東海大学、札幌

#### 国際学会

1. Kuramoto, M., N. Satou, S. Oumi, A. Kurabayashi & M. Sumida. Inter- and intra-island divergence in *Odorrana ishikawae* (Anura, Ranidae) of the Ryukyu Archipelago of Japan, with description of a new species. (IABHU International Symposium, Hiroshima University, March 2014).

2. Komaki, S., T. Igawa, K. Tojo, A. Kurabayashi, S.-M. Lin, M.-S. Min, & M. Sumida. New insights into evolutionary history among Asian pond frog species. (IABHU International Symposium, Hiroshima University, March 2014).

3. Kurabayashi, A., N. Furuno, M. Sumida, H. Mizuno, K. Ohshima, & Miguel Vences. Discovery and phylogenetic distribution of a short interspersed nuclear element (SINE) subgroup in neobatrachian frogs. (IABHU International Symposium, Hiroshima University, March 2014).

4. Watanabe, A., T. Igawa, A. Kashiwagi, A. Suzuki, A. Kurabayashi, T. Fujii & M. Sumida. Inbreeding coefficient and genetic relationship of seven strains of *Xenopus tropicalis* inferred from genome wide genotyping of 54 microsatellite loci. (IABHU International Symposium, Hiroshima University, March 2014).

5. Suzuki, A., A. Kashiwagi, K. Kashiwagi, H. Hanada, K. Takebayashi-Suzuki, I. Tazawa, N. Furuno, A. Kurabayashi, S. Kobayashi, J. Takenaka, Y. Tamaki, T. Igawa, T. Uto, C. Nanba, A. Watanabe, H. Yoshida, A. Shimada & M. Sumida. International *Xenopus* Resource Network and Educational Activities

at Institute for Amphibian Biology. (IABHU International Symposium, Hiroshima University, March 2014).

6. Kashiwagi, A., K. Kashiwagi, H. Hanada, A. Suzuki, K. Takebayashi, A. Kurabayashi, K. Suzuki, N. Furuno, I. Tazawa, K. Nakajuma, T. Yamamoto & M. Sumida. National BioResource Project (NBRP) *Xenopus (Silurana) tropicalis*: Standard High Quality Inbred Strains for Biological Research

7. Sumida, M., M. M. Islam, T. Igawa, A. Kurabayashi, Y. Furukawa, N. Sano, T. Fujii, N. Yoshizaki, & M. Nishioka. Translucent frogs created through crossbreeding, and their inheritance and dermal chromatophore structure. (IABHU International Symposium, Hiroshima University, March 2014).

8. Islam, M.M., T. Igawa, A. Kurabayashi, R. Kakehashi, N. Satou, N. Shintani, M. Tado, H. Sugawara, T. Nishitani, M. Uchida, S. Oumi, S. Katsuren, T. Fujii & M. Sumida. An ex situ conservation effort for several endangered and near-threatened amphibian species from the Ryukyu Archipelago, Japan: Captive breeding of nine anuran species and cryopreservation of sperm for two of them.

9. Sumida, M., M.M. Islam, T. Igawa, A. Kurabayashi, N. Satou, K. Ukena, S. Oumi, S. Katsuren & T. Fujii. A case study of fauna conservation in Japan: Current conservation measures of wild populations, captive breeding, genetic diversity, and potential resource materials in the endangered frog species *Odorrana ishikawae* and *O. splendida*.

10. Sumida, M., T. Igawa, M. M. Islam, A. Kurabayashi, M. S. Alam, R. Kakehashi, M. Tado, N. Shintani, H. Sugawara, T. Nishitani, S. Oumi, S. Katsuren, and T. Fujii, "Captive breeding of endangered amphibian species: A case study of *ex situ* conservation" 50th Anniversary Meeting of the Australian Society of Herpetologists", January 30, 2014, Greenhills Conference Centre, Canberra Australia

11. Hasan, M., M. M. Islam, M. Kuramoto, A. Kurabayashi and M. Sumida "Description of two new species of *Microhyla* (Anura: Microhylidae) from Bangladesh" 50th Anniversary Meeting of the Australian Society of Herpetologists", January 31, 2014, Greenhills Conference Centre, Canberra Australia

④ 科研費等の受け入れ状況

- |                   |                     |
|-------------------|---------------------|
| ・科学研究費補助金・若手研究 B  | 2013 年 50 万円 (研究代表) |
| ・科学研究費補助金・基盤研究 B  | 2013 年 20 万円 (分担)   |
| ・科学研究費補助金・挑戦的萌芽研究 | 2013 年 10 万円 (分担)   |

特任助教・竹林公子 (Kimiko Takebayashi-Suzuki)

## 研究内容

アフリカツメガエル初期発生過程における神経誘導の保証機構にはたらく遺伝子ネットワークの解明

Establishment of vertebrate body plan via coordinated regulation of dorsal-ventral and anterior-posterior patterning during early *Xenopus* embryogenesis

### [目的]

生物は遺伝的・環境的变化にうまく適応して生息圏を拡大している。両生類の胚は羊膜や卵殻を持たず様々な影響を受けやすいにも関わらず、正常に発生することができる。これは、両生類が遺伝的・環境的变化に適応する仕組み、すなわち発生生物学者 C.H. Waddington により提唱されたキャナリゼーションを発達させてきたことを示唆する。初期胚は様々な遺伝的・環境的变化にさらされながらも、発生過程で背腹と前後の軸が形成され、初めて胚の3次元座標が精確に決まり、基本的な体の設計図(ボディープラン)が確立される。背腹軸は腹側化因子 BMP によって、前後軸は後方化因子 Wnt、FGF やレチノイン酸によって、それぞれ決定されている。従来から、背腹軸と頭尾軸は互いに調和しながら形成されると考えられているが、体軸形成の調和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、背腹軸と頭尾軸の調和機構は、ほとんど未解明である。これまでに、私達の研究グループで同定した FoxB1 転写因子が、腹側化因子 BMP のシグナルを抑制して神経を誘導(背側化)し、後方化因子 Wnt・FGF のシグナルを活性化して胚を後方化することを明らかにしている(Takebayashi-Suzuki *et al.*, Dev. Biol. 2011)。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調和させてボディープランの成立に働く。最近、FoxB1 転写因子が背腹軸と頭尾軸の調和だけでなく、神経誘導の保証機構にも重要な働きを示すことが分かった。さらに FoxB1 転写因子と同様に Biz (BMP inhibitory zinc-finger) 遺伝子も、腹側化因子 BMP のシグナルを抑制して神経誘導を引き起こすこと、Wnt シグナルと協調して頭尾軸形成を調節し、体軸形成の調和機構に関わることがわかった(詳細については本研究部門・鈴木准教授の項目も参照のこと)。

本研究では、FoxB1 転写因子と Biz 転写因子を中心に、背腹軸と頭尾軸の調和機構、および神経誘導の保証機構に関する分子メカニズムを解析することを目的とする。

### [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。すなわち、Biz の

過剰発現を行うと頭部構造の形成が阻害されて胴尾部領域の神経マーカーの発現が誘導され、Biz の機能阻害実験を行うと、神経マーカーNCAM と後方神経マーカーHoxB9 の発現が著しく低下することが分かった。今年度はさらに解析するマーカー遺伝子の種類と数を増やして、体軸形成における Biz の機能を調べた。Biz MO 注入胚では、神経マーカーNCAM に加えて、より後期の神経分化マーカーである N-tubulin の発現も著しく低下することが分かった。さらに興味深いことに、背側と頭部の両方に発現する Pax6 の Biz MO 注入胚における発現は、背側で著しく減少する一方で、頭部では逆に拡大していた。したがって、Biz が初期の神経誘導の方向付けよりも、むしろ後期の神経分化段階、および頭部抑制に必要であることが確かめられた。

次に、体軸形成の調和機構に関わる FoxB1 と Biz 転写因子が協調するかを調べるために、Biz の単独機能欠損胚で表現型が見られた時よりも MO 量を減らし、FoxB1 と Biz の両方を同時に機能欠損させる実験をおこなった。その結果、それぞれ単独で機能阻害した場合に比べて、神経マーカーNCAM と N-tubulin の両方の発現が、より激しく低下することがわかった。また、Pax6 の背側の発現も著しく減少し、頭部の発現領域は一層強く拡大することがわかった。したがって、FoxB1 と、Biz を同時に機能欠損させると、背腹軸と前後軸パターン形成の両方が影響を受け、互いに協調していることがわかった。昨年度までに、Oct-25 転写因子が腹側化因子 BMP のシグナルを抑制して神経形成を促進すること、および Oct-25 下流遺伝子として同定した FoxB1 転写因子と Oct-25 は外胚葉中で feed-forward loop ネットワークを形成して、Oct-25 の働きが低下しても FoxB1 が神経誘導の保証機構として働くことがわかっている。したがって、Biz 転写因子も FoxB1 と同様、背腹軸と頭尾軸の調和に働くだけでなく、様々な遺伝的・環境的变化に初期胚がさらされても神経が誘導されるように保証する機構として、正常な発生を促している可能性を考えている。

さらに、私たちが既にマイクロアレイ解析によって同定した新規 Oct-25 下流因子群が、発生過程において神経誘導が確立される時期に発現するかを調べるため、アフリカツメガエル胚のホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション法をおこなった。その結果、Oct-25 によって発現が上昇する遺伝子の一つは予定神経領域に発現することがわかった。したがって、新規 Oct-25 下流因子群は、実際の神経誘導期に発現しており、Oct-25/FoxB1 feed-forward loop ネットワークとの協調作用（神経誘導保証機構）に働く可能性が考えられた。

#### [将来の展望]

今年度は、解析するマーカーの種類を増やして Biz 過剰発現と機能阻害の表現型を調べたことによって、頭尾軸と背腹軸の調和機構における Biz の重要性がさらに強まったうえ、FoxB1 転写因子との協調作用についても明らかになりつつある。現在、Biz の機能解析に加えて、FoxB1 と Biz、および、新規 Oct-25 下流因子群と Oct-25/FoxB1 feed-forward loop ネットワークとの協調作用（外胚葉内の神経誘導保証機構）を詳細に調べている。また、昨年度確立したネットイツメガエル胚のホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション法を活用し、アフリカツメガエル胚に加えて、ネットイツメガエル胚における Oct-25 転写因子下流遺伝子の発現についても、さらに詳細な解析をおこなう。これら

の研究から、神経誘導の保証機構、および頭尾軸と背腹軸の調和機構の体系的な遺伝子ネットワークの理解が可能になると考えている。

研究業績

①原著論文

該当なし

②総説・著書

該当なし

③学会発表

国内学会

1. Kimiko Takebayashi-Suzuki, Hidenori Konishi and Atsushi Suzuki “Establishment of vertebrate body plan via coordinated regulation of dorsal-ventral and anterior-posterior patterning during early *Xenopus* embryogenesis” International symposium “Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing”, 東広島 (2014年3月27日-28日、27日ポスター発表)

2. 吉田和史, 近藤剛士, 五十嵐一衛, 竹林公子, 鈴木厚, 塩川光一郎 「アフリカツメガエル尾芽胚の組織形成に対するスペルミンの影響」 日本ポリアミン学会第5回年会、千葉県銚子市, (2014年1月23、24日、発表日:2014年1月23日)

3. 鈴木 厚、竹林公子 「背腹軸と頭尾軸の統合的制御によるボディープラン形成と形態多様化のメカニズム」 第7回日本ツメガエル研究集会 (2013年9月24日、山口県美祢市、口頭発表)

4. Suzuki, A. and Takebayashi-Suzuki, K. “Establishment of vertebrate body plan via coordinated regulation of dorsal-ventral and anterior-posterior patterning and developmental canalization” 第46回日本発生生物学会, 島根 (2013年5月28日-31日、30日フラッシュトーク・ポスター発表)

国際学会

該当なし

④科研費等の受け入れ状況

科学研究費補助金 基盤研究 (C) 「神経誘導の保証機構にはたらく遺伝子ネットワークの解明」 代表者: 竹林公子 800 千円.

特任助教・井川 武 (Takeshi Igawa)

## 研究内容

絶滅危惧種イボイモリにおける集団構造及び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が、すでに我々は本種に有効なマイクロサテライト遺伝子座、10座の開発を昨年度に完了している (Sugawara et al., 2012)。そこで本研究ではこれらを利用して、本種の最も詳細な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、集団遺伝学的解析を行った。

## [材料・方法]

### ① 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

我々が採集した奄美大島産 12 個体、徳之島産 36 個体、沖縄島産 30 個体に加えて、Honda et al. (2012) においてミトコンドリア DNA の解析に用いられた個体の提供を受け、それらからゲノム DNA を抽出し、Sugawara et al. (2012) 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・成果]

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、奄美大島内にそれぞれ遺伝的に異なる三つの集団が確認された。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。特に、沖縄島内北部個体群においては、異なる集団が入れ子状に分布する二重構造が見られた。また、各集団の移動分散の頻度を Migrate (Beerli & Palczewski, 2010) により求めたところ、沖縄島内においては、方向性のある移動分散が見られ、特に二重構造の形成には、氷期等の陸域拡大時期に存在した陸橋を通じて、分布拡大及び移動分散があったと考えられた。本研究の成果は、当該分野の国際的雑誌に投稿準備中である。

## 研究業績

1. Shohei Komaki, Takeshi Igawa\*, Masafumi Nozawa, Si-Min Lin, Shohei Oumi,

and Masayuki Sumida. Development and characterization of 14 microsatellite markers for *Buergeria japonica* (Amphibia, Anura, Rhacophoridae). *Genes & Genetic Systems*. 89: 35-39, 2014.

2. Mahmudul Hasan, Mohammed Mafizul Islam, Mukhlesur Rahman Khan, and Takeshi Igawa, Mohammad Shafiqul Alam, HonTjong Djong, Nia Kurniawan, Hareesh Joshy, Yong Hoi Sen, Daicus M. Belabut, Atsushi Kurabayashi, Mitsuru Kuramoto, Masayuki Sumida. Genetic divergences of South and Southeast Asian frogs : a case study of several taxa based on 16S ribosomal RNA gene data with notes on the generic name *Fejervarya*. *Turkish Journal of Zoology*, 38:1-22, 2014
3. Takeshi Igawa, Shohei Oumi, Sseiki Katsuren, and Masayuki Sumida. Population structure and landscape genetics of two endangered frog species of genus *Odorrana*: different scenarios on two islands. *Heredity*, 110:46-56, September 2013.
4. Takeshi Igawa, Hirotaka Sugawara, Miyuki Tado, Takuma Nishitani, Atsushi Kurabayashi, Mohammed Islam, Shohei Oumi, Seiki Katsuren, Tamotsu Fujii, and Masayuki Sumida. An Attempt at Captive Breeding of the Endangered Newt *Echinotriton andersoni*, from the Central Ryukyus in Japan. *Animals*, 3:680-692, July 2013.
5. Ryosuke Kakehashi, Takeshi Igawa, Noriko Iwai, Etsuko Shoda-Kagaya, and Masayuki Sumida. Development and characterization of new microsatellite loci in the Otton frog (*Babina subaspera*) and cross-amplification in a congeneric species, Holst's frog (*B. holsti*). *Conservation Genetics Resources*, 5(4):1071-1073, June 2013.
6. Kinuya Yasui, Takeshi Igawa, Takao Kaji, and Yasuhisa Henmi. Stable aquaculture of the Japanese lancelet *Branchiostoma japonicum* for 7 years. *Journal of experimental zoology. Part B, Molecular and developmental evolution*, 320B:538-547, September 2013.

② 総説・著書

該当なし

③ 学会発表

国内学会

1. 井川武・小巻翔平・Nasrin Sultana・長岡麻衣・野澤昌文・Islam Mohammed

Mafizul・大海昌平・住田正幸「Ion PGM を利用した両生類 3 種におけるマイクロサテライトマーカー開発」NGS 現場の会第三回研究会（2013 年 9 月 4 日、神戸）

2. 住田正幸・井川武・イスラム マフィズル・倉林敦・アラム シャフィクル・掛橋竜祐・田戸美雪・新谷望・菅原弘貴・西谷琢磨・大海昌平・勝連盛輝・藤井保「両生類絶滅危惧種の飼育下繁殖による保全の試み」日本遺伝学会第 85 回大会（2013 年 9 月 19 日、横浜）（口頭発表）
3. 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「アフリカツメガエルのゲノム倍数化過程に生じた染色体再配列と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」日本遺伝学会第 85 回大会（2013 年 9 月 21 日、横浜）（口頭発表）
4. 住田正幸・井川武・菅原弘貴・田戸美雪・西谷琢磨・倉林敦・Mafizul Islam・大海昌平・勝連盛輝・藤井保「絶滅危惧種イボイモリの遺伝的多様性と飼育下繁殖」日本動物学会第 84 回大会（2013 年 9 月 26 日、岡山）（口頭発表）
5. 小巻翔平・井川武・倉林敦・Min-Sook Min・Si-Min Lin・住田正幸「東アジア産トノサマガエル種群の系統関係と遺伝子浸透」日本動物学会第 84 回大会（2013 年 9 月 26 日、岡山）（口頭発表）
6. 住田正幸・Islam M. Mafizul・井川武・倉林敦・古川友加里・佐野尚美・藤井保・吉崎範夫「透明ガエルの遺伝様式と皮膚色素細胞の組織学的観察」日本爬虫両生類学会第 52 回大会（2013 年 11 月 2 日、札幌）（口頭発表）
7. 掛橋竜祐・井川武・住田正幸「絶滅危惧種ホルストガエルにおける遺伝的集団構造」日本爬虫両生類学会第 52 回大会（2013 年 11 月 2 日、札幌）（口頭発表）
8. 井川武・長岡麻衣・野澤昌文・小巻翔平・藤井保・住田正幸「Ion Torrent PGM を用いたハナサキガエルにおけるマイクロサテライト遺伝子座の単離と集団構造解析」日本爬虫両生類学会第 52 回大会（2013 年 11 月 2 日、札幌）（口頭発表）
9. 渡辺愛・井川武・鈴木厚・柏木昭彦・倉林敦・藤井保・住田正幸「両生類モデル動物ネツタイツメガエル 6 系統における近交度及び遺伝的關係の解明」日本爬虫両生類学会第 52 回大会（2013 年 11 月 2 日、札幌）（口頭発表）
10. M Hasan・N Kurniawan・A Sowendo・MM Islam・T Igawa・WMM Nalley・M Matsui・M Sumida「Evolutionary relationships and postmating isolation among *Fejervarya* species from Lesser Sunda, Indonesia and other Asian countries revealed by mtDNA Cyt b gene sequences and crossing

experiments」日本爬虫両生類学会第52回大会（2013年11月2日、札幌）  
（ポスター発表）

#### 国際学会

1. Uno, Y., Nishida, C., Takagi, C., Igawa, T., Ueno, N., Sumida, M., and Matsuda, Y. “Molecular cytogenetic studies on the process of genomic and chromosomal evolution in *Xenopus laevis* after whole-genome duplication and the origin and evolution of sex chromosomes in anuran species.” 19th International Chromosome Conference (4th September, 2013. Italia)
2. Igawa, T. “Conservation genetics of endangered amphibians in Ryukyu Archipelago towards sustainable conservation of the biodiversity hotspot of amphibians” International Symposium, “Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing” (28th March, 2014, Higashi-Hiroshima, Japan) (Oral presentation)
3. Hasan, M., Kurniawan, N., Soewondo, A., Islam, MM., Igawa, T., Nalley, WMM., Matsui, M., and Sumida, M. “Evolutionary relationships and postmating isolation among *Fejervarya* species from Lesser Sunda, Indonesia and other Asian countries revealed by mtDNA Cyt b gene sequences and crossing experiments” International Symposium, “Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing” (27–28th March, 2014, Higashi-Hiroshima, Japan)
4. Sultana, N., Igawa, T., Nozawa, M., Islam MM., Khan, MR., Hasan, M., Alam, MS., and Sumida, M. “Development and characterization of 27 new microsatellite markers of Indian Bullfrog, *Hoplobatrachus tigerinus* (Daudin, 1802) and its congeneric species” International Symposium, “Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing” (27–28th March, 2014, Higashi-Hiroshima, Japan)
5. Komaki, S., Igawa, T., Tojo, K., Kurabayashi, A., Lin, S., Min, M., and Sumida, M., “New insights into evolutionary history among Asian pond frog species” International Symposium, “Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing” (27–28th March, 2014, Higashi-Hiroshima, Japan)
6. Kakehashi, R., Igawa, T., and Sumida, M. “Genetic population structure of an endangered frog species, *Babina holsti*” International Symposium, “Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing” (27–28th March, 2014, Higashi-Hiroshima, Japan)
7. Matsunami, M., Kishida, O., Kitano, J., Nozawa, M., Igawa, T., Michimae,

H., Miura, T., and Nishimura, K. "Eco-evo-devo study of phenotypic plasticity in the Hokkaido salamander (*Hynobius retardatus*)" International Symposium, "Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing" (27-28th March, 2014, Higashi-Hiroshima, Japan)

8. Uno, Y., Nishida, C., Takagi, C., Igawa, T., Ueno, N., Sumida, M., and Matsuda, Y. "Molecular cytogenetic studies on the process of genomic and chromosomal evolution in *X. laevis* after WGD and the origin and evolution of sex chromosomes in anuran species" International Symposium, "Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing" (27-28th March, 2014, Higashi-Hiroshima, Japan)

9. Watanabe, A., Igawa, T., Kashiwagi, A., Suzuki, A., Kurabayashi, A., Fujii, T., and Sumida, M. "Inbreeding coefficient and genetic relationship of seven strains of *Xenopus tropicalis* inferred from genome wide genotyping of 54 microsatellite loci" International Symposium, "Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing" (27-28th March, 2014, Higashi-Hiroshima, Japan)

10. Suzuki, A., Kashiwagi, A., Kashiwagi, K., Hanada, H., Takebayashi-Suzuki, K., Tazawa, I., Furuno, N., Kurabayashi, A., Kobayashi, S., Takenaka, J., Tamaki, Y., Igawa, T., Uto, T., Nanba, C., Watanabe, A., Yoshida, H., Shimada, A., and Sumida, M. "International *Xenopus* Resource Network and Educational Activities at Institute for Amphibian Biology" International Symposium, "Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing" (27-28th March, 2014, Higashi-Hiroshima, Japan)

11. Sumida, M., Islam, MM., Igawa, T., Kurabayashi, A., Furukawa, Y., Sano, N., Fujii, T., Yoshizaki, N., and Nishioka, M. "Translucent frogs created through crossbreeding, and their inheritance and dermal chromatophore structure" International Symposium, "Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing" (27-28th March, 2014, Higashi-Hiroshima, Japan)

12. Islam, MM., Igawa, T., Kurabayashi, A., Kakehashi, R., Satou, N., Shintani, N., Tado, M., Sugawara, H., Nishitani, T., Uchida, M., Oumi, S., Katsuren, S., Fujii, T., and Sumida, M. "An ex situ conservation effort for several endangered and near-threatened amphibian species from the Ryukyu Archipelago, Japan: Captive breeding of nine anuran species and cryopreservation of sperm for two of them" International Symposium, "Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and

Genome Editing” (27-28th March, 2014, Higashi-Hiroshima, Japan)

13. Sumida, M., Islam, MM., Igawa, T., Kurabayashi, A., Satou, N., Ukena, K., Oumi, S., Katsuren, S., and Fujii, T. “A case study of fauna conservation in Japan: Current conservation measures of wild populations, captive breeding, genetic diversity, and potential resource materials in the endangered frog species *Odorrana ishikawae* and *O. splendida*” International Symposium, “Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing” (27-28th March, 2014, Higashi-Hiroshima, Japan)

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」 研究課題番号：23710282 代表者：井川武 1,300 千円

Assistant Professor • Islam Mohammed Mafizul

1. Development of low-cost cryopreservation technique with sperm of the endangered Amami Ishikawa Frog (*Odorrana splendida*).

Summary: In order to achieve the goal for conservation of endangered anuran species, I have developed the sperm cryopreservation technique for the endemic Amami Ishikawa frog (*Odorrana splendida*) from Amami Island, which is natural monument in Kagoshima prefecture and protected by law. Cryopreservation technique is a famous tool for ex-situ conservation in other animals but there is limited work with frog in Japan especially with endangered species. To find out a sustainable and suitable cryopreservation technique, I considered a low-cost and convenient technique; thus I developed a method avoiding use of liquid nitrogen and expensive capillary rather I preserve the sperm in  $-80^{\circ}\text{C}$  freezer and preserve them in 0.5ml tube which is common in most biology laboratory. I have used cryoprotectant which mixed with certain volume of sperm suspension obtain by mincing the testes and preserved in  $-80^{\circ}\text{C}$  freezer. To understand the activeness of the frozen sperm I checked the sperm motility under microscope as a convenient method but most importantly I have confirm the degree of activeness of the sperm by fertilizing the eggs with frozen sperm of different frozen period and compare the fertilization rate with that of fresh sperm. I have found a maximum of 35% fertilization rate with 24 h frozen sperm and sperm frozen for maximum 1 year in the freezer, found active to fertilize the egg to some extent.

Methods: I have used both male and female individuals from the field, as well as frogs that bred and reared in the laboratory. Prior to the sperm collection I prepared the cryoprotectant solution to be used as the preservative medium of sperm. The cryoprotectant solution was prepared after mixing 40ml of Cryoprotectant A (consisting of Sucrose, Sodium Bicarbonate and Pentoxylline) and 10 ml of Cryoprotectant B (consisting of same volume of fresh Egg yolk and Distilled water) and after centrifuge only the supernatant has been used. The male was anaesthetized before dissecting the testes and 1/3 of the testes were bring out and transferred in the Eppendorf tube containing L-15 medium, calf serum and L- glutamine . The testes were minced with a tissue homogenizer and same volume of Cryoprotectant solution was mixed. Then the solution separated in 10 thin walled 500 $\mu\text{l}$  tubes and immediately transferred in a Styrofoam box covered by fuel-paper and transferred in  $-80^{\circ}\text{C}$  deep freeze. A small part of the remaining sperm suspension was used for counting the sperm density and confirm the sperm motility with the help of a cell counter under a

microscope.

I have injected the female frog with bullfrog pituitary and after the confirming ovulation I have prepared the frozen sperm to fertilize as well fertilize them with fresh sperm. The tube containing frozen sperm suspension along with the cryoprotectant was thawing with finger for less than 30 seconds and same volume of DDW was added and fertilized the eggs immediately as the frozen sperm lose their motility quickly after thawing. The fertilization was taken place on glass slides and they were moved in the petridish and submerged in the water and kept in a controlled temperature of 18°C. They were counted in every stage such as 1<sup>st</sup> cleavage, tail-bud, hatched and feeding tadpoles. The tadpoles were reared in an incubator and fed with boiled spinach.

Findings: I have noticed a maximum of 24% fertilization rate with the cryopreserved sperm and they go for normal cleavage and subsequent embryonic development. The rate is good enough as reported with other amphibians. Although I have noticed the efficiency of sperm reduced with the course of time freezing but I was able to fertilize the eggs even with sperm frozen one year before. I have the frozen sperm from several male individual which I can use following years. With the development cryopreservation technique along with of artificial breeding and captive breeding technique much progress has been carried out for this most beautiful frog of Japan.

## 2. Cryopreservation of sperm for the near threatened species *Rana ulma* from Amamioshima island and observation of early development *R. ulma* with cryopreserved sperm

Summary: I have conducted cryopreservation experiments to preserve the sperm of the Amami Brown frog (*R. ulma*) using the low cost cryopreservation technique. I have used a low-cost method as describe earlier by preserving the sperm in -80°C freezer thus avoiding any use of liquid nitrogen. I have got a maximum of around 86% fertilization rate which is rare with cryopreserved sperms. I have got success with the sperm preserve for maximum 40 days by confirming fertilization and successive embryos. The embryos got by using the frozen sperm went through normal development and metamorphosed within the similar time compared to the control. Now they have been reared in the frog room to study the male-female ration whether to confirm the effect of sex ration for the frogs produced from the frozen sperm.

Methods: I have selected a series of male and female individuals for this

cryopreservation experiments. At first several males were dissected and testes were brought out to an Eppendorf tube containing L-15 medium and calf serum and L-Glutamine to get the sperm suspension and they were immediately mixed with ice clod Cryoprotectant and the equally distributed in several thin walled 500 $\mu$ l tube. The tubes were then transferred in the Styrofoam box and immediately moved to a -80°C deep freeze for further use.

During the breeding, I injected several female with Bullfrog pituitary and the ovulated eggs were fertilized with the frozen sperm as well as fresh sperm on the glass-slide. The degree of development were count at each stage namely fertilized eggs, tail-buds, hatchlings, feeding tadpoles, 30-days- old tadpoles and metamorphosed frogs. The water temperature was maintained 18°C and the tadpoles were feed with boiled spinach where the metamorphosed frogs were fed with small cricket.

Findings: I have found a maximum of 65% fertilization rate using the frozen sperm and I could fertilize the eggs with the sperm frozen for 24 hours to 40-days during the breeding season. I have checked the motility and physical shape of the sperm after thawing and noticed they are motile and many of the sperm are intact shape. Most importantly to confirm the performance of the cryopreserved sperm I observed the development of eggs fertilized with frozen sperm and compare them with the control. I have noticed that they develop without any abnormalities and took almost similar time compare to the control one. Even the metamorphosed frogs that come from the cryopreserved sperm go normal feeding and grown up in similar pattern.

### 3. Cryopreservation of the sperm of endemic Amami Tip-nosed frog (*Odorrana amamiensis*) from Amamioshima Island

Summary: I have also developed sperm cryopreservation technique for Amami tip-nosed frog, *Odorrana amamiensis* another endangered frog species distributed only in Amamioshima and Tokunoshima Islands of Ryukyu Archipelago. In Amami Island the species is commonly found in mountain streams and occasionally in mountain paths in night, but is rare in lowland. Last year I have developed the artificial breeding technique for this frog in the laboratory condition as a consequence of the conservation work with this frog I worked on the cryopreservation of its sperm. Compare to *O. splendida* it has a prolong breeding season which allow more time for research thus we have conducted several breeding trial from March to late May and succeeded to get the fertilized eggs with the frozen sperm even with the sperm that was preserved in last year.

Methods: Sperm was collected from the of mature male from after dissecting

the frog and bringing out the one-third testes and minced the testes with a tissue homogenizer to obtain a suitable concentration of sperm. The sperm suspension was mixed with same volume of cryoprotectant as mentioned earlier, mixed and transferred in several thin walled 500 $\mu$ l tubes. Then the tubes were kept in a Styrofoam box and transferred immediately into the  $-80^{\circ}\text{C}$  deep freezer within. I froze different series of sperm from the same testes to be used as 24hrs frozen sperm and followed by 7 days, 30 days and 1 year frozen sperm. For thawing of the frozen sperm, it was done by hand for 30 seconds and mixed with 0.1 MBS solution and with distilled water then immediately used to fertilize the eggs. At same time, motility of sperms was checked and sperm concentrations were counted. After that fertilized eggs were kept in incubator in controlled temperature and their developmental capacity were observed and compared with the eggs that were fertilized with fresh sperm

Findings: Frozen sperm was found to capable to fertilize eggs by this cryopreservation technique in case of *O. amamiensis* with a maximum rate of less than 10% also control was around 60%. Although many efforts have been made I cannot get very high rate of fertilization and it was possibly due to lack of good female i.e., good eggs . it was possible to get the fertilize eggs with the frozen sperm preserved for 24 hrs, 1 week, 10 days, 40 days as well as 1 year .

4. Conservation of a near threatened species (*Odorrana supranarina*) from Iriomote Island by artificial breeding and subsequent rearing in the laboratory.

Summary: Greater tip-nosed frog, *Odorrana supranarina* is one of the near-threatened frog species distributed only in Iriomote and Ishigaki Islands of Okinawa prefecture in the Ryukyu Archipelago. Although the scientist and local government is concern about the status of this frog due to environmental degradation and other man made causes decline of population is common in this frog. Thus it was essential to develop some suitable technique of artificial breeding in the laboratory to conserve the species. Although they were found to be bred in prolong breeding season, from January to May, it was difficult to find ready to breed female and male and we conducted this artificial breeding experiment in the end of February. For this species, a lower temperature of  $18^{\circ}\text{C}$  was found preferable for their early development and for tadpoles. Among total eggs, more than 80% cleaved normally, more than 50% hatched normally, and more than 30% metamorphosed normally Finally, it was possible get many offspring which finally metamorphosed and now many of them kept and reared in our facility.

Methods: It was possible to breed the frogs in the laboratory by using typical artificial breeding technique developed in our laboratory. The female frog was injected with *Lithobates catesbeianus* PG. they were found to ovulated around 70 hours after injection. As the eggs were very big in size special care was taken during fertilization. The first cleavage appear almost 7 hours after fertilization and further development took longer time even compared with the Ishikawa frog. The eggs were counted at every stage that is during first cleavage, tail-buds embryos, hatched tadpoles, feeding tadpoles and finally metamorphosed frogs. The tadpoles were fed with boiled spinach and the metamorphosed one fed with cricket.

Findings: A better fertilization rate (80%) was noticed and more than 50% eggs hatched normally, and more than 30% undergo metamorphosed. Throughout this artificial breeding technique we have found a number of offspring which can be used to produce next generation in near future and most importantly we can do some study with this frog without go back to field and without disturbing their natural habitat.

Future research plan:

Research is going on for sustainable in vitro conservation technique for several endangered frog species from the Ryukyu Archipelago. We have already able to conduct artificial and captive breeding for several endangered species such as *O. ishikawai*, *O. splendida*, *O. amaiensis*, *O. supranarina*, *B. holsti*, *B. subaspera*, *Echinotriton andersoni* and near threatened species *Rana ulma* and *R. kobai* and many of their off-springs are now maintained in the laboratory. I am planning developed suitable technique for their sperm cryopreservation and I succeed for some species and research is going on with other species. I am rearing many mature males and females of these species.

Research Achievements

① Original paper

1. Igawa, T., H. Sugawara, M. Tado, T. Nishitani, A. Kurabayashi, M. M. Islam, S. Oumi, S. Katsuren, T. Fujii and M. Sumida (2013) An attempt at captive breeding of an endangered newt, *Echinotriton andersoni*, from the Central Ryukyus in Japan. *Animals*, 3: 680–692.

2. Hasan, M., M. M. Islam, M. Kuramoto, A. Kurabayashi and M. Sumida (2014) Description of two new species of *Microhyla* (Anura: Microhylidae) from Bangladesh. *Zootaxa*, 3755: 401–418.

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

N. Kurniawan, H. Joshy, H. S. Yong, Daicus, M. B., A. Kurabayashi, M. Kuramoto and M. Sumida (2014) Genetic divergences of South and Southeast Asian frogs: a case study of several taxa based on 16S ribosomal RNA gene data with notes on the generic name *Fejervarya*. Turk. J. Zool., 38: in press

② Review paper or Book  
None

③ Presentation in conferences

National conference:

1. Islam M. M., Kakehashi R., Koide H., Kurabayashi A., Oumi S., Katsuren S., Fuji T. and Sumida M. Genetic divergence and postmating isolation between endangered Holst's frog and Otton frog from the Ryukyu Archipelago, Japan, elucidated by allozyme and mitochondrial gene sequence analyses, crossing experiments and cytological observations. 82<sup>nd</sup> Annual meeting of the Genetics Society of Japan, Yokohama, Japan.

2. Islam M. M., Oumi S., Katsuren S., Ida H. and Sumida M. Genetic divergence and postmating isolation among several brown frog species from Honshu and Ryukyu of Japan, and Mongolia elucidated by mitochondrial gene sequence analyses, crossing experiments and subsequent cytological observations of their hybrids and controls. 52<sup>nd</sup> Annual meeting of the Herpetological Society of Japan, Hokkaido, Japan.

3. Hasan M., Islam M. M. Kuramoto M, Kurabayashi A. and Sumida M. Description of two new species of *Microhyla* (Anura: Microhylidae) from Bangladesh 82<sup>nd</sup> Annual meeting of the Genetics Society of Japan, Yokohama, Japan.

4. 住田 正幸、井川 武、イスラム マフィズル、倉林 敦、アラム シャフィクル、掛橋 竜祐、田戸 美雪、新谷 望、菅原 弘貴、西谷 琢磨、大海 昌平、勝連 盛輝、藤井 保 「両生類絶滅危惧種の飼育下繁殖による 保全の試み」 日本遺伝学会第84回大会 (2012年9月26日、九州大学、福岡)

5. Sumida M. Islam M. M., Igawa T. Kurabayashi A., Furukawa Y, Sano N., Fujii T., and Yoshizaki N. Inheritance and dermal chromatophore structure of see-through frogs. 52<sup>nd</sup> Annual meeting of the Herpetological Society of Japan, Hokkaido, Japan.

International conference

1. Islam M. M., Igawa T., Kurabayashi A., Kakehashi R., Satou N., Shintani N., Tado M., Sugawara H., Nishitani T., Uchida M., Oumi S., Katsuren S.,

Fujii T., and Sumida M. An *ex situ* conservation effort for several endangered and near-threatened amphibian species from the Ryukyu Archipelago, Japan: Captive breeding of nine anuran species and cryopreservation of sperm for two of them. International Symposium- Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing, Hiroshima, Japan.

2. Sumida M., Islam M. M., Igawa T., Kurabayashi A., Satou N., Ukena K., Oumi S., Katsuren S., and Fujii T. A case study of fauna conservation in Japan: Current conservation measures of wild populations, captive breeding, genetic diversity, and potential resources materials in the endangered frog species *Odorrana ishikawae* and *O. splendida*. International Symposium- Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing, Hiroshima, Japan

3. Sumida M., Igawa T., Islam M.M., Kurabayashi A., Kakehashi R., Satou N., Shintani N., Tado M., Sugawara H., Nishitani T., Uchida M., Oumi S., Katsuren S., Fujii T. Captive breeding of endangered species: a case study of *ex situ* conservation. 50<sup>th</sup> Annual Meeting of the Herpetological Society of Australia, Canberra, Australia.

4. Hasan M., Islam M. M. Kuramoto M, Kurabayashi A. and Sumida M. Description of two new species of *Microhyla* (Anura: Microhylidae) from Bangladesh. 50<sup>th</sup> Annual meeting of the Herpetological Society of Australia, Canberra, Australia

5. Alam M. S. Khan M. M. R. Islam M.M., Hasan M. and Sumida M. Artificial Breeding of the Bullfrog (*Hoplobatrachus tigerinus*): A case study on reproduction and conservation. International Symposium- Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing, Hiroshima, Japan

6. Hasan M., Kuniawan N., Soewondo A., Islam M. M. Igawa T., Nalley W. M. Matsui M. and Sumida M. Evolutionary relationships and postmating isolation among *Fejervarya* species from Lesser Sunda, Indonesia and other Asian countries revealed by mtDNA gene sequence and crossing experiments. International Symposium- Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing, Hiroshima, Japan.

7. Sultana N., Igawa T., Nozawa M., Islam M. M., Khan M. M. R. Hasan M., Alam M. S. and Sumida M., Development and characterization of 27 new microsatellite markers of Indian Bullfrog, *Hoplobatrachus tigerinus* (Daudin, 1802) and its congeneric species. International Symposium-

Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing, Hiroshima, Japan.

8. Sumida M., Islam M. M., Igawa T., Kurabayashi A., Furukawa Y., Sano N., Fujii T., Yoshizaki N., and Nishioka M. Translucent frogs created through crossbreeding, and their inheritance and dermal chromatophore structure. International Symposium- Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing, Hiroshima, Japan

④ Grants

1. Grants-in-Aid for Scientific Research (B) (No.24310173) (Partaker) .
2. Grants-in-Aid for Challenging Research (No. 25640050) (Partaker).

Researcher. Mahmudul Hasan

1. Genetic divergences of South and Southeast Asian frogs: a case study of several taxa based on 16S ribosomal RNA gene data with notes on the generic name *Fejervarya*.

#### Introduction:

A species is a fundamental unit of biology. Contemporary concepts of species differ between researchers and also between objective taxa; thus, the concept of what constitutes a species continues to be a vexing problem. Although it is not sufficient to define a biological species on the basis of molecular data alone, the utility of molecular data in taxonomic studies, especially in searching for cryptic species (i.e., 2 or more species sharing similar external morphology) has been demonstrated. One such procedure is called the “candidate species approach”. In the present study, the term “candidate species” is used to denote lineages which are generally distinct, for instance on the basis of molecular data (generally mitochondrial [mt]DNA genes), but for which corroborating evidence, such as morphology, ecological characteristics, and/or nuclear gene data, is required. In this study, we revealed the diversity of Asian frogs using candidate species approach and also argues the generic allocation of *Fejervarya-Minervarya-Zakerana* complexes on the basis of sequence divergence and our resultant phylogenetic tree.

#### Materials and Methods:

A total of 159 specimens from 81 populations were collected from 22 localities across 6 Asian countries. Total genomic DNA was extracted from the clipped toe of each frog specimen using a DNA extraction kit (DNeasy Tissue Kit, Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer’s instructions. The obtained new sequences that were found in this study were deposited in the DNA Data Bank of Japan (DDBJ) database under the accessions numbers AB530548 to AB530656. The 16S ribosomal RNS gene (16S) sequences from the 159 specimens and *X. laevis* were aligned using the ClustalW program. After deletion of indel and ambiguous sites, several haplotypes had identical sequences, and the initial 109 haplotypes were reduced to 88 haplotypes, which were used for a phylogenetic tree reconstruction. The sequence divergences (uncorrected *p* values) were calculated for the 88 haplotypes and then, we constructed maximum likelihood (ML), maximum parsimony (MP), neighbour joining (NJ), and Bayesian inference (BI) trees using the alignment data of the 88 haplotypes of our specimens. Further phylogenetic analyses of families Rhacophoridae, Ranidae, Microhylidae, and Bufonidae were performed by ML and BI.

### Results and Discussion:

The resultant phylogenetic trees showed that the haplotypes of each species formed one clade. The average sequence divergence at the individual, population, species, genus, and family taxonomic levels was 0.23%, 2.2%, 7.23%, 11.22%, and 17.35%, respectively. In general, the low *16S* diversity in each species clade of dicroglossid frogs indicates the absence of candidate species in the examined dicroglossid specimens. In contrast, the average (and range) of *16S* fragment analysed within each species is as follows: 2.1% (0.1–3.1%) in *Pseudophilautus wynaadensis*, 3.6% (2.5–4.5%) in *Polypedates leucomystax*, 4.0% (0.7–5.8%) in *Hylarana erythraea*, 7.1% in *Microhyla okinavensis*, 8.9% (0.4–15.7%) in *M. ornata*, and 5.3% (0.3–7.2%) in *Duttaphrynus melanostictus*. Excluding *Ps. wynaadensis*, all examined taxa showed > 3% *16S* divergence. Especially, *16S* divergence is higher in *P. leucomystax* (between the Okinawa, Univ. Malaya Campus, and Chantaburi populations), *H. erythraea* (between the Langkawi Island/Univ. Malaya Campus and Chantaburi populations), *M. okinavensis* (between the Okinawa and Ishigaki populations), *M. ornata* (between the Bajipe, Mudigere, and Talapu populations), and *D. melanostictus* (between the Maelipet Siberut, Padil, Bajipe, Univ. Malaya Campus, and Ranong Province populations). These high *16S* divergence values suggest the presence of many candidate species in our specimens. In total, 109 haplotypes were found, and the concept of a 3% difference in *16S* sequence corresponding to species threshold was applied to define candidate amphibian species, for which corroborating evidence, such as morphology, ecological characteristics, and/or nuclear gene data, is required. Finally, we showed that at least 6 candidate and 6 possible candidate species from our specimens.

### Findings:

*Polypedates leucomystax*, *Hylarana chalconota*, and *Hylarana* sp. from Chantaburi, Maelipet Siberut, and Langkawi Island, respectively, correspond to 3 candidate species and *H. erythraea* from Malaysia/Thailand represents a possible candidate species. *Hylarana* cf. *nicobariensis* from Muara Siberut, *Amolops larutensis* from Gombak, and *Microhyla okinavensis* from Ishigaki Island showed divergences from the topotypic specimen, all suggesting a relevant candidate species. *Microhyla heymonsi* from Malaysia and *M. ornata* from two regions (Mudigere and Talapu) India did not fit any congeneric species based on available *16S* data, suggesting 3 possible candidate species in total. Two lineages of *Duttaphrynus melanostictus* from Malaysia denote 2 possible candidate species. Consequently, this study indicates the occurrence of 6 candidate and 6 possible candidate species, and argues that the generic allocation of the

*Fejervarya-Minervarya-Zakerana* complex needs to be studied in detail.

## 2. Description of two new species of *Microhyla* (Anura: Microhylidae) from Bangladesh

### Introduction:

Microhylidae is a large anuran family comprising 8% of all frogs (519 species), with *Microhyla* being its type genus. This genus is characterized by various morphological characteristics (e.g., smooth or warty skin, absence of vomerine teeth, a narrow and elliptical tongue, hidden tympanum, free fingers, free or webbed toes, united outer metatarsals, dilated finger and toe tips, absent omosternum, and T-shaped terminal phalanges. Members of this genus show a wide distribution across Asia and in Bangladesh, only three nominal *Microhyla* species (*Microhyla ornata*, *M. berdmorei* and *M. rubra*) are known. Recently, we found Chittagong and Mymensingh-Sylhet haplogroups of *M. cf. ornata* distinct from these three species based on mitochondrial 16S ribosomal RNA gene (*16S*) data. Molecular analysis shows clear genetic divergence of these haplogroups from the other *Microhyla* taxa, and the morphological characteristics of these groups is inconsistent with the descriptions of *M. fissipes* and other known microhylid species. Thus, here we describe two new *Microhyla* species from Bangladesh.

### Materials and methods:

Specimens of genus *Microhyla* were collected from five localities of Bangladesh from 2003 to 2012. Vouchers were deposited at the Institute for Amphibian Biology, Hiroshima University (IABHU), Japan. Total DNA samples for Cytochrome *b* gene (*cytb*) analysis of the *Microhyla* specimens were extracted from the clipped toe of each individual. The obtained *cytb* sequences were deposited in the DNA Data Bank of Japan (DDBJ) database (accession numbers: AB819011–AB819033). The resulting *cytb* sequences were aligned using the ClustalW program. The sequence divergence of *cytb* (uncorrected *p* values) was calculated using MEGA Ver. 4.0. Phylogenetic analysis was performed by the maximum likelihood (ML), maximum parsimony (MP), and Bayesian inference (BI) methods. Based on the ML and Bayesian tree topology, the divergence times of the *Microhyla* taxa, focusing especially on the new *Microhyla* taxa of interest (Chittagong and Mymensingh-Sylhet haplogroups) from Bangladesh and *M. fissipes*, were estimated by the Bayesian relaxed-clock method. For morphological comparison, 28 measurements were taken using digital calipers to the nearest 0.1 mm. Two sexually mature individuals from the Mymensingh-Sylhet haplogroup (from Mymensingh; IABHU 4005–4006) were used for karyological

studies.

#### Results and Discussion:

Based on phylogenetic analyses, it showed that all individuals of the Chittagong haplotype (*M. sp. C*  $\approx$  Chittagong haplogroup) formed a sister clade with the topotypic *M. fissipes*. In addition, all of the individuals from Mymensingh, Netrokona, Sylhet and Sunamganj (*M. sp. M*  $\approx$  Mymensingh–Sylhet haplogroup) formed another single clade which showed the sister relationships with the *M. sp. C* + *M. fissipes*. *Microhyla sp. C* and *M* are greatly diverged from *M. fissipes* 8.9 and 10.2% for *cytb* and 3.6 and 4.2% for *16S*, respectively. The common ancestor of these taxa seems to have evolved somewhere in East or Southeast Asia before the formation of the Bangladesh landmass; and *M. sp. M* and *M. sp. C* may have independently colonized Bangladesh from these areas at different times (10.5 Mya and 3.4 Mya, respectively) following land formation. Morphologically, *M. sp. C* and *M.* are distinguished from all of other congeners based on different morphological and morphometric characteristics.

#### Systematics:

*Microhyla mukhlesuri* sp. nov.

*Microhyla ornata* (Bangladesh): Kabir et al. (2009), p. 25 (part).

*Microhyla* cf. *ornata* (Chittagong, Bangladesh): Hasan et al. (2012), p. 168.

*Microhyla sp. C*: above discussion

Holotype. IABHU 3956, adult female (SVL: 17.9 mm; if not otherwise specified, the following body parts are measured in mm) collected from Raozan, Chittagong (22° 35' N, 91° 55' E, > 9 m asl.), Bangladesh on 14 November 2009 by M. M. Islam.

Paratypes. IABHU 3878, adult female (SVL: 17.3); IABHU 3879, adult male (SVL: 21.0); IABHU 3880, adult male (SVL: 19.3); IABHU 3881, adult female (SVL: 17.5); IABHU 3882, adult male (SVL: 16.5); IABHU 3957, adult female (SVL: 18.4); IABHU 3958, adult female (SVL: 17.3); IABHU 3959, adult male (SVL: 16.5); and IABHU 3960, adult male (SVL: 16.6) collected from Raozan, Chittagong, Bangladesh on 14 November 2009 by M. M. Islam.

Etymology. We dedicate the species name “mukhlesuri” to the late Dr. Md. Mukhlesur Rahman Khan, Professor of the Department of Fisheries Biology & Genetics, Bangladesh Agricultural University (BAU).

Diagnosis. The new species is small frog with SVL of 16.5–21.0 mm in males and 17.3–18.4 mm in females. Head length subequal head width, finger formula  $1 < 4 < 2 < 3$ , toe formula  $1 < 2 < 5 < 3 < 4$ , fingers free and slender, tips of fingers and toes not widened, rudimentary web between toes and subarticular tubercles relatively prominent. TIL/SVL ratio was  $0.54 \pm 0.03$ , whereas this value was  $0.57 \pm 0.04$  in *M. mymensinghensis*, and  $0.50 \pm 0.02$  in *M. fissipes* from Taiwan. Tibiotarsal articulation reaches between the eyes to tip of snout, whereas it reaches near the eye in *M. fissipes*. Phylogenetically, it appears to closer to “*M. ornata*” from Myanmar plus “*M. fissipes*” from Laos and Thailand and to be sister respectively with Taiwanese topotypic *M. fiissipes* with significant genetic divergences.

Distribution. The known occurrence of *M. mukhlesuri* is Raozan, Chittagong District, southeastern corner of Bangladesh.

*Microhyla mymensinghensis* sp. nov.

*Microhyla ornata* (Bangladesh): Kabir et al. (2009), p. 25 (part).

*Microhyla* cf. *ornata* (Mymensingh, Bangladesh): Hasan et al. (2012), p.

168. *Microhyla* cf. *ornata* (Sylhet, Bangladesh): Hasan et al. (2012), p. 168.

*Microhyla* sp. M: above discussion

Holotype. IABHU 4116, adult female (SVL: 21.3 mm, if not otherwise specified, the following body parts are measured in mm) collected from Bangladesh Agricultural University Campus (24° 44' 50" N, 90° 24' 24" E, > 18 m asl.), Mymensingh, Bangladesh on June 25, 2012 by M. Hasan.

Paratypes. IABHU 4004, adult male (SVL: 14.8); IABHU 4117, adult female (SVL: 20.2); and IABHU 4120, adult female (SVL: 20.5) collected from Bangladesh Agricultural University Campus, Mymensingh, Bangladesh on 9 June 2011 and 25 June 2012 by M. Hasan. IABHU 3947, adult male (SVL: 17.6); IABHU 3948, adult male (SVL: 17.3); and IABHU 3899, adult female (SVL: 16.7) collected from Golapganj, Sylhet on 6 June 2011 by M. M. R. Khan.

Etymology. The specific name refers to Mymensingh, the type locality of this species.

Diagnosis. In conclusion, this new species is small frog with SVL of 14.2–17.6 mm in males and 15.2–21.3 mm in females. Head length subequal head width, finger formula  $1 < 4 < 2 < 3$ , toe formula  $1 < 5 < 2 < 3 < 4$ , fingers free and slender, tips of fingers and toes not widened, rudimentary web between toes and subarticular tubercles distinct. TIL/SVL ratio was

0.57 ± 0.04, whereas this value was 0.54 ± 0.03 in *M. mukhlesuri*, and 0.50 ± 0.02 in *M. fissipes* from Taiwan. Tibiotarsal articulation extends from between the eyes to the tip of the snout, while it reaches near the eye in *M. fissipes* and in front of the shoulders in *M. ornata*. Phylogenetically, it shows sister relationship with *M. mukhlesuri* plus *M. fissipes* with high genetic divergences.

Distribution. The known occurrence of *M. mymensinghensis* includes the Mymensingh, Netrokona, Sylhet and Sunamganj districts in the northern and northeastern regions of Bangladesh.

#### Findings:

The DNA sequences of the mitochondrial *cytb* gene from these new species are substantially diverged from *M. fissipes* (8.9 and 10.2% [3.6 and 4.2% for 16S] uncorrected pairwise divergence, respectively), and the estimated phylogenetic splits from their closest relative is in the Pliocene (3.4 Mya) and middle Miocene (10.5 Mya). The first new species (*Microhyla mukhlesuri* sp. nov.) can be diagnosed from its nearest congener (*M. fissipes*) by the following characteristics: SVL: 16.5–21.0 mm, finger length 1 < 4 < 2 < 3, tips of finger and toes not swollen, subarticular tubercles distinct, an inverse U-shaped mark on the anus, and a distinct X-shaped marking on the dorsum. Although the second new species (*M. mymensinghensis* sp. nov.) shares some morphological characteristics with the first new species, it can be readily diagnosed from its close congeners by its longer hindlimbs (HLL/SVL), tibia (TIL/SVL) and forearm width (FAW/SVL), in addition to a combination of the following characteristics: SVL: 14.2–21.3 mm, snout truncate, a crescent-shaped marking on the anus, and an X-shaped marking on the dorsum. The tibio-tarsal articulation extends to the eye in *M. fissipes* but ranges from the eye to the tip of the snout in the two new species.

#### Future Research Plan:

At present, I am working on the evolutionary relationships and postmating isolation among *Fejervarya* species from lesser Sunda, Indonesia and other Asian countries revealed by mtDNA *cytb* gene sequences, crossing experiment, histology and spermatogenesis. Further, I am working on to describe *Hylarana* sp., *Microhyla* sp., *Fejervarya* sp. and *Euphlyctis* sp. from Bangladesh using multiple datasets i.e. morphology, acoustic and molecular data.

#### Research Achievements:

##### ① Original paper

1. Igawa, T., H. Sugawara, M. Tado, T. Nishitani, A. Kurabayashi, M. M.

Islam, S. Oumi, S. Katsuren, T. Fujii and M. Sumida (2013) An attempt at captive breeding of an endangered newt, *Echinotriton andersoni*, from the Central Ryukyus in Japan. *Animals*, 3: 680–692.

2. Hasan, M., M. M. Islam, M. Kuramoto, A. Kurabayashi and M. Sumida (2014) Description of two new species of *Microhyla* (Anura: Microhylidae) from Bangladesh. *Zootaxa*, 3755: 401–418.

3. Hasan, M., M. M. Islam, M. M. R. Khan, T. Igawa, M. S. Alam, T. H. Djong, N. Kurniawan, H. Joshy, H. S. Yong, Daicus, M. B., A. Kurabayashi, M. Kuramoto and M. Sumida (2014) Genetic divergences of South and Southeast Asian frogs: a case study of several taxa based on 16S ribosomal RNA gene data with notes on the generic name *Fejervarya*. *Turk. J. Zool.*, 38: in press

② Review paper or Book

None

③ Presentations in Conferences:

National Conference

1. M. Hasan, M. M. Islam, M. Kuramoto, A. Kurabayashi and M. Sumida. Description of two new species of *Microhyla* (Anura: Microhylidae) from Bangladesh. 85<sup>th</sup> Annual Meeting of the Genetic Society of Japan, Keio University, Yokohama, Kanagawa Prefecture, September 18 – September 20, 2013.

International Conference

M. Hasan, M. M. Islam, M. Kuramoto, A. Kurabayashi and M. Sumida. Description of two new species of *Microhyla* (Anura: Microhylidae) from Bangladesh. Australian Herpetological Society, Greenhills Conference Centre, Canberra, ACT, January 29 – February 01, 2014.

2. Alam M. S. Khan M. M. R. Islam M. M., Hasan M. and Sumida M. Artificial Breeding of the Bullfrog (*Hoplobatrachus tigerinus*): A case study on reproduction and conservation. International Symposium– Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing, Hiroshima, Japan

3. Hasan M., Kuniawan N., Soewondo A., Islam M. M. Igawa T., Nalley W. M. Matsui M. and Sumida M. Evolutionary relationships and postmating isolation among *Fejervarya* species from Lesser Sunda, Indonesia and other Asian countries revealed by mtDNA gene sequence and crossing experiments.

International Symposium- Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing, Hiroshima, Japan.

4. Sultana N., Igawa T., Nozawa M., Islam M. M., Khan M. M. R. Hasan M., Alam M. S. and Sumida M., Development and characterization of 27 new microsatellite markers of Indian Bullfrog, *Hoplobatrachus tigerinus* (Daudin, 1802) and its congeneric species. International Symposium- Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing, Hiroshima, Japan.

④ Grants

None

[リーディングプログラムによる特任教員]  
特任准教授・高橋秀治(Shuji Takahashi)

#### 研究内容

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) ゲノム解読及びネッタイツメガエル (*Xenopus tropicalis*) を用いた初期発生に関与する遺伝子の解析

Analysis of *Xenopus laevis* whole genome and genes involving early development in *Xenopus tropicalis*

#### [目的]

(1) *Xenopus laevis* は異質倍数体 (4 倍体) であるためゲノムが複雑であり、最も利用され多くの発見に寄与してきたにもかかわらず全ゲノムが解読されていない。これを解読して倍数化後におこる現象を明らかにすることと、ポストゲノムの研究においても研究に寄与できる環境を整えることを目的とし日米ゲノムコンソーシアムが組織され解読を行っている。このゲノムには次世代シーケンサでは解読不可能な領域が含まれておりこれらを明らかにすることも本研究の目的としている。(2) また、初期発生は誘導、細胞分化、細胞の移動など多彩な現象が見られ、そこでおこる遺伝子発現ネットワークの解読は幹細胞を利用した再生医療研究に大きく寄与している。本研究では初期発生の詳細な遺伝子ネットワークを明らかにすることを目的にしている。

#### [材料・方法]

本研究の (1) では、ゲノム解読に利用している *Xenopus laevis* J 系統 (近交系) の直接の子孫を研究室で維持・継代し使用している。(2) では *Xenopus tropicalis* のゲノムを読まれた系統 (Nigerian 系統) を研究室で維持・継代し使用している。

##### (1) *Xenopus laevis* ゲノム解析

- ゲノムシーケンス、RNA-seq、FISH 用サンプル提供。
- Fosmid library 作製。
- シークエンスおよび FISH 解析。
- ClustalW や Blast を用いた詳細な Gene model の validation。
- PCR 法による重要領域の増幅・クローニングと DNA 塩基配列決定。
- メス及びオス特異的ゲノム領域探索のための W 及び WW 個体作製
- 次世代シーケンサでは解読できない難関領域の Fosmid スクリーニング。

##### (2) 初期発生に関与する遺伝子の解析

- DNA アレイ、Whole-mount *in situ* hybridization 解析を用いた発現パターン等から候補とした *Xenopus tropicalis* の遺伝子のクローニング。

#### [結果・考察・成果・今後の展望]

##### (1) *Xenopus laevis* ゲノム解析

両生類では、これまで2倍体の *Xenopus tropicalis* のゲノムが解読されている。*Xenopus laevis* は異質倍数化して時間がさほどたっていないことからゲノム上の2つの遺伝子は94%程度の相同性を持ち解読自体が難しい。日米のコンソーシアムでは次世代シーケンサで100b paired endからの情報をもとにアセンブルを行い、Scaffoldを構築した。さらにBacやFosmidライブラリーを構築しこれらのエンドシーケンスデータ及びこれらを用いたFISHデータからScaffoldの検証を行ってきた(当研究室分担)。さらにGene modelの作成及び同祖遺伝子の網羅的発現レベル解析を行うため各発生ステージや各組織からRNAを抽出し、次世代シーケンサを用いてRNA-seq(100b paired end)を進めてきた(当研究室担当)。これらのゲノム・遺伝子発現解析には日本で開発され、当研究室で維持されている *Xenopus laevis* 純系J系統を使用している。その他にもGene modelの検証、3番染色体2セットの検証、W及びWW個体の作製も担当した。ホモロジーの非常に高い遺伝子のリピート構造で構成された次世代シーケンサでは解読が不可能である nodal 遺伝子領域 (*Xenopus tropicalis* でも解読されていない) についても担当し、Fosmid library を作製してスクリーニングを行い、サンガー法で解析している。今年度、nodal3領域については全貌が解明した。nodal5領域に関してはタンデムリピート構造の両端の配列を明らかにした。現在、日米コンソーシアムの努力により、全ゲノムとGene model構築がほぼ完成している。今後は生物学的解析を行い倍数化ゲノムの進化などの理解にもつなげたい。また担当している、難関領域である nodal クラスターも構造を明らかにその生物学的意味を明らかにすることを計画している。

## (2) 初期発生に関与する遺伝子の解析

両生類初期胚は初期発生を理解する上で、他の動物胚に無い利点を持っている。卵のサイズが大きく操作が行いやすいことや大量の胚を集めることが可能であること等である。この特徴を生かし、初期発生に関与する遺伝子の解析を行っている。本年度はDNAアレイ、Whole-mount *in situ* hybridization解析を用いた発現パターン等から候補とした *Xenopus tropicalis* の遺伝子のHigh-fidelity KOD Polymeraseを用いてRT-PCRを行い、クローニングを行った。約15個の遺伝子の過剰発現用のベクターにクローニングを完了した。これらの遺伝子はツメガエル胞胚の表面に存在する細胞の分化に関与していると考えられるものである。特に胞胚内胚葉領域の表層に存在する細胞は原腸陥入後、原腸の表面をおもに構成する細胞である。原腸表面の細胞は消化管形成に貢献するだけでなく消化管から出芽する内胚葉性器官すべての元となる細胞であり、これらの解析を行うことで内胚葉分化の正確な理解が得られると考えられる。米国との共同研究でChIP-seqのためのサンプル大量調整の条件検討を行い良好な結果を得ている。今後は過剰発現により遺伝子を選択し、検討した条件を用いて次世代シーケンサを用いた大規模解析を行う予定である。また共同研究でChIP-seq、RNA-seqを用いた頭部形成に関わる遺伝子の解析を行った。この研究により頭部形成の初期遺伝子発現メカニズムが明らかになった。

## 研究業績

### ① 原著論文

1. Morita M, Yamashita S, Matsukawa S, Haramoto Y, Takahashi S, Asashima M, Michiue T. Xnr3 affects brain patterning via cell migration in the neural-epidermal tissue boundary during early *Xenopus* embryogenesis. *Int J Dev Biol.* 2013;57(9-10):779-86. doi: 10.1387/ijdb.130161tm
2. Nejigane S, Takahashi S, Haramoto Y, Michiue T, Asashima M. Hippo signaling components, Mst1 and Mst2, act as a switch between self-renewal and differentiation in *Xenopus* hematopoietic and endothelial progenitors. *Int J Dev Biol.* 2013;57(5):407-14. doi: 10.1387/ijdb.130010st.

② 総説・著書

該当なし

③ 学会発表

国際学会

1. Yoshikazu Haramoto, Shuji Takahashi, Yasuko Onuma, Yuzuru Ito, Makoto Asashima. Functional analyses of a novel Insulin-like factor. (IABHU International Symposium, Hiroshima University, March 2014).

国内学会

1. 原本悦和、高橋秀治、小沼泰子、伊藤弓弦、浅島誠 「新規インスリン様因子の機能解析」 第7回ツメガエル研究集会 (2013年9月25日、秋吉台国際芸術村、山口県)
2. 本田裕樹、桐ヶ谷嘉章、安岡有理、鈴木 穰、高橋 秀治、浅島 誠、菅野 純夫、平良 眞規 「転写因子Siamois のChIP-Seq 解析による頭部オーガナイザー形成機構の解明」 第36回分子生物学会 (2013年12月3～5日)

④ 科研費等の受け入れ状況

- |                    |        |        |        |
|--------------------|--------|--------|--------|
| 1. 科学研究費補助金・基盤研究 C | 2013 年 | 100 万円 | (研究代表) |
| 2. 科学研究費補助金・基盤研究 B | 2013 年 | 100 万円 | (分担)   |
| 3. 科学研究費補助金・基盤研究 C | 2013 年 | 15 万円  | (分担)   |
| 4. 科学研究費補助金・基盤研究 C | 2013 年 | 15 万円  | (分担)   |
| 5. 国立大学改革強化推進補助金   | 2013 年 | 175 万円 | (分担)   |

## プロジェクト研究①

### I. ネットイツメガエルを用いた研究提案

Proposed research using *Xenopus (Silurana) tropicalis*

柏木啓子 (広島大学)、山本 卓 (広島大学)、鈴木賢一 (広島大学)、成瀬清 (基礎生物学研究所)、笹土隆雄 (基礎生物学研究所)、花田秀樹 (広島大学)、柏木昭彦 (広島大学)

ネットイツメガエルを用いて、私達は現在、化学物質の内分泌かく乱作用を調査、あるいは TALENs による遺伝子改変動物を作製中である。近い将来、簡便で確実な精子凍結法の開発、雌性発生法による近交系作出の促進、さらにはミュータジェネシスなどを計画している。

### II. トランスジェニックスクリーニング法を用いた化学物質による甲状腺ホルモンかく乱作用の評価

Evaluating chemical related-thyroid hormone disruption using transgenic screening techniques

柏木昭彦 (広島大学)、鈴木賢一 (広島大学)、花田秀樹 (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)

世界規模でしかも地球生命史上前例のない速度で両生類個体群が減少していると報じられている。その原因として、生息場所の消失、紫外線量の増加、気候変動の他に残留性の高い化学物質による環境汚染が挙げられる。両生類は、透過性の高い皮膚を有していること、水陸双方に生息すること、発生過程で草食性オタマジャクシから肉食性カエルへと食物網が変化することなどから、いろいろな経路を通して環境汚染物質に曝露される可能性が高い。両生類にとって有害な要因がヒトにも健康被害を及ぼすことは多くの研究者の一致するところである。

工業製品の原材料や PPCPs など多数の化学物質が世界の環境中から見つまっている。その中には、脂質との親和性が顕著で、生物蓄積し、甲状腺機能障害を含めいくつかの悪影響を及ぼすものもある。無尾両生類の変態現象は甲状腺ホルモンに負うところが大きく、そのシステムは正常な甲状腺ホルモン作用に対する化学物質の曝露リスクを推定するのに有用である。本研究では、甲状腺ホルモンアゴニストまたはアンタゴニストである化学物質を高感度に検出するためのトランスジェニック系統を開発し、環境中化学物質の内分泌かく乱作用の判定に役立てたいと考えている。

### III. ミトコンドリア膜透過遷移と無尾両生類における尾部アポトーシスのメカニズム

Mitochondrial membrane permeability transition and the mechanism for tail apoptosis in anurans

柏木昭彦（広島大学）、花田秀樹（広島大学）、柏木啓子（広島大学）、内海俊彦（山口大学）、井上正康（宮城大学）、佐々木順三（岡山大学）、勝賢二郎（熊本大学）、佐藤英介（鈴鹿医療科学大学）、内海耕慥（高知大学）

無尾両生類の変態時に見られるオタマジャクシの尾部消失にミトコンドリア膜透過遷移(MPT)が重要な役割を果たしている。L-カルニチンが $\beta$ 酸化およびエネルギー生成のために遊離脂肪酸(FFAs)をサイトゾルからミトコンドリアマトリックスに移動させることはよく知られている。以前に私達が行った研究からL-カルニチン処理はFFAsレベルは減少させてT3およびFFAによって誘導されたMPTを抑制することがわかった。昨年度の研究では、L-カルニチンと同じく脂肪酸酸化に関与するアセチル-L-カルニチン(ALC)に焦点を当てて、ツチガエルオタマジャクシのT3誘導による尾部短縮、およびアフリカツメガエルオタマジャクシの自然状態での尾部短縮の影響を調べた。

T3処理されたオタマジャクシの尾部アポトーシスの指標であるDNAラダー像の形成およびカスパーゼ-3、カスパーゼ-9活性の増加がALCを添加することによって抑えられることがわかった。また、ALCはアフリカツメガエルオタマジャクシの内在性甲状腺ホルモンによって制御される自然変態を抑制し、同時にカスパーゼやフォスホリパーゼA2活性、DNAラダー像の形成を減少させることも明らかになった。

以上の結果は、FFAs活性の増加がMPT開始を促し、無尾両生類の変態時におけるオタマジャクシ尾部のアポトーシスによる細胞死を制御するシグナル伝達を活性化するという、私達がこれまでに得てきた結論を支持するものである。

今後も引き続き、両生類の変態におけるオタマジャクシ尾部アポトーシスの分子機構を調べていく予定である。

## 研究業績

### ① 原著論文

1. Hanada, H., Kobuchi, H., Yamamoto, M., Kashiwagi, K., Katsu, K., Utsumi, T., Kashiwagi, A., Sasaki, J., Inoue, M. and Utsumi, K. (2013) Acetyl-L-carnitine suppresses thyroid hormone-induced and spontaneous anuran tadpole tail shortening. *Hereditas*, 150: 1-9.
2. Suzuki, K., Isoyama, Y., Kashiwagi, K., Sakuma, T., Ochiai, H., Sakamoto, N., Furuno, N., Kashiwagi, A. and Yamamoto, T. (2013) High efficiency TALENs enable F0 functional analysis by targeted gene disruption in *Xenopus laevis* embryos. *Biology Open*, 2:448-452
3. Sakane, Y., Sakuma, T., Kashiwagi, K., Kashiwagi, A., Yamamoto, T. and Suzuki, K. (2014) Targeted mutagenesis of multiple and paralogous genes in *Xenopus laevis* using two pairs of transcription activator-like effector nucleases. *Dev. Growth Diff.*, 56: 108-114.

### ② 総説・著書

1. Hanada, H., Kashiwagi, K., Suzuki, K., Yamamoto, T. and Kashiwagi, A. (2013) Suppression of anuran metamorphosis by synthetic chemical

compounds. *Frogs: Genetic Diversity, Neural Development and Environmental Influences*. (NOVA, Sweden) pp. 73-88

② 学会発表

国内学会

1. 柏木昭彦, 鈴木 厚, 古野伸明, 柏木啓子, 花田秀樹, 田澤一朗, 倉林 敦, 中島圭介, 竹林公子, 小林里美, 竹中純子, 住田正幸「新しい実験動物としてのネッタイツメガエル」第60回日本実験動物学会(2013年5月、つくば国際会議場、つくば)
2. 柏木昭彦, 柏木啓子, 花田秀樹, 田澤一朗, 小林里美, 竹中純子, 鈴木 厚, 竹林公子, 古野伸明, 倉林 敦, 中島圭介, 住田正幸「動物学ひろば: ツメガエルを知っていますか?」第84回日本動物学会(2013年9月、玉野市立玉野海洋博物館、玉野)
3. オーガナイザー: 加藤尚志(早稲田大)、柏木昭彦(広島大); 講演者: 山本 卓(広島大)、加藤尚志(早稲田大)、田村宏治(東北大)、入江直樹(東京大)、鈴木賢一(広島大)「生物実験材料としてのネッタイツメガエルの長所と有用性」第84回日本動物学会シンポジウム(2013年9月、岡山大学、岡山)
4. 花田秀樹、小淵 浩嗣、柏木啓子、内海俊彦、井上正康、佐々木順三、勝賢二郎、佐藤英介、内海耕慥、柏木昭彦「アセチル-L-カルニチンによる無尾両生類幼生尾部短縮の抑制」日本動物学会 第84回大会(2013年9月 岡山大学、岡山)
5. 柏木啓子<sup>1</sup>、鈴木賢一<sup>1</sup>、佐能正剛<sup>2</sup>、花田秀樹<sup>1</sup>、山本 卓<sup>1</sup>、新海 正<sup>3</sup>、古野伸明<sup>1</sup>、太田 茂<sup>2</sup>、柏木昭彦<sup>1</sup>「両生類を用いた甲状腺ホルモン作用かく乱化学物質の評価」第84回日本動物学会(2013年9月、岡山大学、岡山)
6. 柏木 昭彦, 柏木 啓子, 花田 秀樹, 鈴木賢一, 鈴木 厚, 竹林 公子, 倉林 敦, 中島 圭介, 田澤 一朗, 井川 武, 小林 里美, 竹中 純子, 玉城 ゆうな, 古野 伸明, 山本 卓, 住田 正幸「ネッタイツメガエルの近交化・標準系統の樹立・提供」第36回日本分子生物学会(2013年12月、神戸国際展示場 神戸)
7. 中出 翔太、鈴木 賢一、佐久間哲史、重田美津紀、柏木昭彦、柏木啓子、山本卓、小原政信「TALENを用いたツメガエル発生過程におけるサイトグロビンの機能解析」第36回日本分子生物学会(2013年12月、神戸市)
8. 鈴木賢一、山本卓、柏木昭彦 WS(動物のメタモルフォーゼ: 個体のライフスタイルの劇的変容を支える分子・細胞基盤に関する研究の最前線)「ツメガエル変態における甲状腺ホルモン受容体やその標的遺伝子の特徴」第36回日本分子生物学会(2013年12月、神戸市)

## 国際学会

1. Kashiwagi A., Kashiwagi K., Hanada H., Suzuki K., Suzuki A., Takebayashi K., Nakajima K., Furuno N., Tazawa I., Kurabayashi A., Yamamoto T. and Sumida M. 「National BioResource Project (NBRP) *Xenopus tropicalis* Mass Production of High Quality Standard Inbred Strains.」 The 5<sup>th</sup> ANRRC International Meeting (October 30–November 1, 2013 in Shonan Village Center, Hayama, Japan)
2. Isoyama, Y., Kashiwagi, K., Kashiwagi, A., Yamamoto, T. 「Gene knockout in *Xenopus* using TALENs.」 46th Annual Meeting of JSDB, 5<sup>th</sup> May, Matsue, Japan. (2013, 5<sup>th</sup> May, Matsue, Japan.)
3. Kashiwagi A., Kashiwagi K., Hanada H., Suzuki A., Takebayashi K., Kurabayashi A., Suzuki K., Furuno N., Tazawa I., Nakajima K., Yamamoto T. and Sumida M. 「National BioResource Project (NBRP) *Xenopus (Silurana) tropicalis*: Standard High Quality Inbred Strain for Biological Research」 International Symposium Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing (March 27–28, 2014 Institute for Amphibian Biology, Graduate School of Science, Hiroshima University, Higashihiroshima, Japan)
4. Watanabe A., Igawa T., Kashiwagi A., Suzuki A., Kurabayashi A., Fujii T. and Sumida M. 「Inbreeding coefficient and genetic relationship of seven strains of *Xenopus tropicalis* inferred from genome wide genotyping of 54 microsatellite loci」 International Symposium Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing (March 27–28, 2014 Institute for Amphibian Biology, Graduate School of Science, Hiroshima University, Higashihiroshima, Japan)
5. Suzuki, A., Kashiwagi A., Kashiwagi K., Hanada H., Takebayashi–Suzuki K., Tazawa I., Furuno N., Kurabayashi A., Kobayashi S., Takenaka J., Tamaki Y., Igawa T., Uto T., Nanba C., Watanabe A., Yoshida H., Shimada A. and Sumida M. 「International *Xenopus* Resource Network and Educational Activities at Institute for Amphibian Biology」 International Symposium Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing (March 27–28, 2014 Institute for Amphibian Biology, Graduate School of Science, Hiroshima University, Higashihiroshima, Japan)

## 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（広島大学）、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（広島大学）、植木龍也（広島大学）、関口猛（九州大学）、小林英紀（岡山大学）、小原政信（広島大学）

### 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った。さらに甲状腺を詳しく調べると、甲状腺の成長が抑制されている事もわかった。このことから、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。また、甲状腺の成長も促進されていた。この事は、磁場が、内分泌系に影響を与える事を示唆する。

## [ 3 ] TALEN によるアフリカツメガエルの F0 における遺伝子破壊 Targeted mutagenesis of genes by TALEN in *Xenopus* embryos

ノックアウトによる特定の遺伝子破壊は、その遺伝子の機能を探る上で非常に有効な手段である。この技術は、マウスでは ES 細胞を用いて確立されてポピュラーにつかわれるようになっているが、それ以外の動物では ES 細胞が確立されていない事で不可能である。しかしながら、最近、ZNF (Zinc finger nuclease), さらに TALEN (Transcription activator-like effector 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

昨年、カエルで ZNF が応用可能かどうか実験を行い、良い結果をえていたが、ZNF は作成が複雑である。その点、TALEN は (難しいとはいえ) ZNF よりは操作が容易である。また、破壊の効率が高く、次世代を待たずに、目標となる遺伝子を破壊し F0 でその効果を見れる可能性が出て来た。今回、いろいろ TALEN を改良して、*Xenopus* を使って、F0 で有効かどうかを調べた。使った遺伝子は、既に遺伝子の機能が報告されている tyrosinase と pax6 を用いた。祖の結果、TALEN を使ってそれぞれの遺伝子を破壊した結果、高効率で今まで報告されている表現形が観察され、TALEN が F0 でも有効である事が示された。

## 研究内容

### [ 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して研究を行っている。その結果、サイクリン B2 が何処に局在するか、また、どういうモータータンパク質と共同して 2 極の紡錘体を形成しているかが明らかになっている。

### [ 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。

[ 7 ] サイトグロビンやアンドログロビンの初期胚における機能解析  
Functional analysis of the cytoglobin and androglobin in *Xenopus* embryos

サイトグロビンはミオグロビンやヘモグロビンの仲間、グロビタンパク質の一種であり、酸素の運搬に関わっているタンパク質であるが初期胚における機能はわかっていない。また、アンドログロビンは最近のゲノム解析の結果から見つかったタンパク質で、最近、オスの精巣で特異的に発現している事が分って来たが、その機能は不明である。

[目的と成果]

サイトグロビンの初期発生における機能を調べるため、この遺伝子を過剰発現させて、どのような表現系がでるか調べる。また、アンドログロビンの発生における機能をアフリカツメガエルやニシツメガエルを用いて調べる。

研究業績

① 原著論文

1. Suzuki, K., Isoyama, Y., Kashiwagi, K., Sakuma, T., Ochiai, H, Sakamoto, N., Furuno, N., Kashiwagi, A. and Yamamoto, T. High efficiency TALENS enable F0 functional analysis by targeted gene disruption in *Xenopus laevis*. *Biologiy Open* (2013)2: 448-452

2. Sekiguchi, T., Kamada, Y., Furuno, N., Funakoshi, M. and Kobayashi, H. Probing the amino acid residues required for Gtr1p-Gtr2p complex formation and its interactions with the Ego1p-Ego3p complex and TORC1 components in yeast. *Gene to Cell* (2014) in press

② 総説・著書

サイクリン B2 の細胞内局在と紡錘体形成 吉留賢、古野伸明 生体の科学 (2013), 64, 360-365

③学会発表

国内発表

1. 柏木昭彦, 鈴木 厚, 古野伸明, 柏木啓子, 花田秀樹, 田澤一朗, 倉林 敦, 中島圭介, 竹林公子, 小林里美, 竹中純子, 住田正幸「新しい実験動物としてのネッタイツメガエル」第60回日本実験動物学会 (2013年5月、つくば国際会議場、つくば市)

2. Yoshitame, S., Furuno, N., Prigent, C. and Hashimoto, E. “The subcellular localization of cyclin B2 is required for bipolar spindle formation during *Xenopus* oocyte maturation” The 46<sup>th</sup> annual meeting of the JSDB (2013,) May 27-31, Matue, Japan.

3. 柏木昭彦, 柏木啓子, 花田秀樹, 田澤一朗, 小林里美, 竹中純子, 鈴木 厚, 竹林公子, 古野申明, 倉林 敦, 中島圭介, 住田正幸「ツメガエルを知っていますか？」第 84 回日本動物学会 動物学ひろば (2013 年 9 月、玉野市立玉野海洋博物館、玉野市)
4. 柏木啓子、藤原好恒、古野申明「重力と磁場によるニシツメガルの甲状腺への影響」第 84 回日本動物学会 2013 年 9 月 岡山
5. 柏木啓子、鈴木賢一、佐能正剛、花田秀樹、山本卓、新海正、古野申明、太田茂、柏木昭彦 「両生類を用いた甲状腺ホルモン攪乱化学物質の評価」第 84 回日本動物学会 2013 年 9 月 岡山
6. 古野申明、関口猛「ネッタイツメガエルの *wee1A*, *mos* のプロモーター領域のクローニングとその遺伝子構造」日本ツメガエル研究集会 2013 年 9 月 2 4 日、山口
7. 柏木昭彦, 柏木啓子, 花田秀樹, 鈴木賢一, 鈴木 厚, 竹林公子, 倉林 敦, 中島圭介, 田澤一朗, 井川 武, 小林里美, 竹中純子, 玉城ゆうな, 古野申明, 山本 卓, 住田 正幸「ネッタイツメガエルの近交化・標準系統の樹立・提供」第 36 回日本分子生物学会 (2013 年 12 月、神戸国際展示場 神戸市)

#### 国際学会

1. Kashiwagi A., Kashiwagi K., Hanada H., Suzuki K., Suzuki A., Takebayashi K., Nakajima K., Furuno N., Tazawa I., Kurabayashi A., Yamamoto T. and Sumida M. “National BioResource Project (NBRP) *Xenopus tropicalis* Mass Production of High Quality Standard Inbred Strains” The 5<sup>th</sup> ANRRC International Meeting (October 30–November 1, 2013 in Shonan Village Center, Hayama, Japan)
2. Kashiwagi A., Kashiwagi K., Hanada H., Suzuki A., Takebayashi K., Kurabayashi A., Suzuki K., Furuno N., Tazawa I., Nakajima K., Yamamoto T. and Sumida M. “National BioResource Project (NBRP) *Xenopus (Silurana) tropicalis*: Standard High Quality Inbred Strain for Biological Research” International Symposium Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing (March 27–28, 2014 Institute for Amphibian Biology, Graduate School of Science, Hiroshima University, Higashihiroshima, Japan)
3. Kurabayashi, A., Furuno, N., Sumida, M., Mizuho, H., Ohshima, K. and Vences, M. “Discovery and phylogenetic distribution of a short interspersed nuclear element (SINE) subgroup in neobatrachian frogs. International Symposium Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing” (March 27–28, 2014 Institute for Amphibian Biology,

Graduate School of Science, Hiroshima University, Higashihiroshima, Japan)

4. Yoshitome, S., Prigent, C., Hashimoto, E. and Furuno, N. “Bipolar Spindle formation during meiosis I required the proper localization of cyclin B2 in *Xenopus* oocytes” International Symposium Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing. (March 27–28, 2014 Institute for Amphibian Biology, Graduate School of Science, Hiroshima University, Higashihiroshima, Japan)

5. Suzuki, A., Kashiwagi, A., Kashiwagi, K., Hanada, H., Takebayashi-Suzuki, K., Tazawa, I., Furuno, N., Kurabayashi, A., Kobayashi, S., Takenaka, J., Tamaki, Y., Igawa, T., Uto, T., Nanba, C., Watanabe, A., Yoshida, H., Shimada, A. and Sumida, M. “International *Xenopus* Resource Network and Educational Activities at Institute for Amphibian Biology” International Symposium Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing. (March 27–28, 2014 Institute for Amphibian Biology, Graduate School of Science, Hiroshima University, Higashihiroshima, Japan)

④科研費等の受け入れ状況  
該当なし

### プロジェクト研究③

[1] アセチル-L-カルニチンは甲状腺ホルモン誘導および変態期のオタマジャクシ尾部短縮を抑制する

Acetyl-L-carnitine suppresses thyroid hormone-induced and spontaneous tadpole tail shortening

花田秀樹（広島大学）、柏木昭彦（広島大学）、柏木啓子（広島大学）、内海俊彦（山口大学）、井上正康（宮城大学）、佐々木順三（岡山大学）、勝賢二郎（熊本大学）、佐藤英介（鈴鹿医療科学大学）、内海耕隄（高知大学）

無尾両生類の変態時に見られるオタマジャクシの尾部消失にミトコンドリア膜透過遷移(MPT)が重要な役割を果たしている。L-カルニチンが $\beta$ 酸化およびエネルギー生成のために遊離脂肪酸(FFAs)をサイトゾルからミトコンドリアマトリックスに移動させることはよく知られている。以前に私達が行った研究から、L-カルニチン処理はFFAsレベルを減少させ、 $T_3$ およびFFAによって誘導されたMPTを抑制することがわかった。昨年度の研究では、L-カルニチンと同じく脂肪酸酸化に関与するアセチル-L-カルニチン(ALC)に焦点を当てて、ツチガエルオタマジャクシの $T_3$ 誘導による尾部短縮、およびアフリカツメガエルオタマジャクシの自然状態での尾部短縮の影響を調べた。

$T_3$ 処理されたオタマジャクシの尾部アポトーシスの指標であるDNAラダー像の形成およびカスパーゼ-3、カスパーゼ-9活性の増加がALCを添加することによって抑えられることがわかった。また、ALCはアフリカツメガエルオタマジャクシの内在性甲状腺ホルモンによって制御される自然変態を抑制し、同時にカスパーゼやフォスホリパーゼ $A_2$ 活性、DNAラダー像の形成を減少させることも明らかになった。

以上の結果は、FFAs活性の増加がMPT開始を促し、無尾両生類の変態時におけるオタマジャクシ尾部のアポトーシスによる細胞死を制御するシグナル伝達を活性化するという、私達がこれまでに得てきた結論を支持するものである。

今後も引き続いて、両生類の変態におけるオタマジャクシ尾部アポトーシスの分子機構を調べていく予定である。

[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

花田秀樹（広島大）、柏木昭彦（広島大、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）、

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

### ① 原著論文

1. Hanada, H., Kobuchi, H., Yamamoto, M., Kashiwagi, K., Katsu, K., Utsumi, T., Kasahiwagi, A., Sasaki, J., Inoue, M., Utsumi, K. 2013. Acetyl-L-carnitine suppresses thyroid hormone-induced and spontaneous anuran tadpole tail shortening. *Hereditas*, 150, 1-9.

### ② 総説・著書

Hanada, H. 2013. Herbicide paraquat genotoxicity-enhancement by the phenolic antioxidants dl- $\alpha$ -tocopherol and 2, 6-di-tert-butyl-p-cresol: In Kobayashi D, Watanabe E (Eds), *Handbook on Herbicides: Biological Activity, Classification and Health & Environmental Implications*. Nova Science Publishers, Inc, New York, pp.191-211.

### ③ 学会発表

#### 国内発表

1. 花田秀樹、小渕 浩嗣、柏木啓子、内海俊彦、井上正康、佐々木順三、勝賢二郎、佐藤英介、内海耕慥、柏木昭彦。アセチル-L-カルニチンによる無尾両生類幼生尾部短縮の抑制。日本動物学会 第84回大会 2013年9月26日 岡山大学、岡山。
2. 柏木昭彦, 鈴木 厚, 古野伸明, 柏木啓子, 花田秀樹, 田澤一朗, 倉林 敦, 中島圭介, 竹林公子, 小林里美, 竹中純子, 住田正幸 「新しい実験動物としてのネッタイツメガエル」第60回日本実験動物学会 (2013年5月、つくば国際会議場、つくば市)
3. 柏木昭彦, 柏木啓子, 花田秀樹, 田澤一朗, 小林里美, 竹中純子, 鈴木 厚, 竹林公子, 古野伸明, 倉林 敦, 中島圭介, 住田正幸 「ツメガエルを知っていますか？」第84回日本動物学会 動物学ひろば (2013年9月、玉野市立玉野海洋博物館、玉野市)
4. 柏木昭彦, 柏木啓子, 花田秀樹, 鈴木賢一, 鈴木 厚, 竹林公子, 倉林 敦, 中島圭介, 田澤一朗, 井川 武, 小林里美, 竹中純子, 玉城ゆうな, 古野伸明, 山本 卓, 住田 正幸 「ネッタイツメガエルの近交化・標準系統の樹立・提供」第36回日本分子生物学会 (2013年12月、神戸国際展示場 神戸市)

## 国際学会

1. Kashiwagi A., Kashiwagi K., Hanada H., Suzuki K., Suzuki A., Takebayashi K., Nakajima K., Furuno N., Tazawa I., Kurabayashi A., Yamamoto T. and Sumida M. “National BioResource Project (NBRP) *Xenopus tropicalis* Mass Production of High Quality Standard Inbred Strains” The 5<sup>th</sup> ANRRC International Meeting (October 30–November 1, 2013 in Shonan Village Center, Hayama, Japan)

2. Kashiwagi A., Kashiwagi K., Hanada H., Suzuki A., Takebayashi K., Kurabayashi A., Suzuki K., Furuno N., Tazawa I., Nakajima K., Yamamoto T. and Sumida M. “National BioResource Project (NBRP) *Xenopus (Silurana) tropicalis*: Standard High Quality Inbred Strain for Biological Research” International Symposium Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing (March 27–28, 2014 Institute for Amphibian Biology, Graduate School of Science, Hiroshima University, Higashihiroshima, Japan)

### ④科研費等の受け入れ状況

該当なし

## プロジェクト研究④

先駆的両生類研究の展開 –両生類絶滅危惧種の遺伝的多様性の解明と保全、および新規有用アプリケーションの開発–

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

<sup>1)</sup> 広島大学大学院理学研究科附属両生類研究施設

<sup>2)</sup> 宗像市ひかりが丘 3-6-15

<sup>3)</sup> 奄美市農林課

<sup>4)</sup> 沖縄県環境衛生研究所

<sup>5)</sup> 広島大学大学院生物圏科学研究科

<sup>6)</sup> 広島大学大学院総合科学研究科

<sup>7)</sup> 広島県立大学人間文化学部

<sup>8)</sup> 京都大学大学院農学研究科

### 研究内容

[ 1 ] 絶滅危惧種アマミイシカワガエルの飼育下における温度条件と遺伝的要因が個体生存率に与える影響 (継続)

Influence of temperature condition and genetic factors on survival rates of captive breeding populations of *Odorrana splendida*

### [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。特に、日本産両生類における最美麗種といわれることも多い、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 (Kuramoto et al., 2011)。また、これらの種については、すでに人工交配と継代飼育に成功しており (Sumida et al., 2011)、島内における遺伝的多様性についても、マイクロサテライト遺伝子座を利用して、遺伝的多様性と微細集団構造が解明されている (Igawa et al., 2013)。

遺伝的多様性と表現型との相関関係は、生物の保全を考える上で非常に重要であり、これらの正の相関は様々な分類群で報告されている。特に絶滅危惧種においては、個体数の減少と合わせて絶滅への負の連鎖を引き起こすことが知られている。本研究では、飼育条件及び遺伝的要因が与える影響を検証するとともに、各世代の遺伝的指標の変化を予測し、遺伝的多様性を維持した効率的な継代飼育の方策を検討することを目的として、(1) 定量的な条件下での個体生存率の調査、(2) シミュレーターによる継代後の遺伝的多様性変化の検証を

行った。

[材料・方法]

(1)については、一腹卵を3分割し、血縁度の異なる3個体のオスの精子と受精させ、それぞれ18°C、20°C、22°Cの温度条件で飼育し、変態段階まで正常生存率を観察した。(2)については、各世代の作出に任意のペアを用いるランダムモデル、アリル共有率が最も低いペアを用いる Minimal Kinship (MK) モデルをC言語により実装し、シミュレーションを行った。各世代の親数は2~16個体とし、10世代まで試行した。

[結果・考察]

(1)については、温度条件における生存率は18°Cが最も高く、20°Cでは劣り、22°Cでは、孵化段階でほぼ全個体が死亡した。遺伝的影響については、18°Cでは近親交配となる交配が最も生存率が低く、マイクロサテライト遺伝子座における子孫の予測ヘテロ接合度との間に正の相関がみられた。(2)については、親数が一定数以下の場合、MK交配を行うことにより、ヘテロ接合度の減少が軽減されることが分かった。以上の結果から、本種の正常発生には温度条件が大きく影響し、近親交配一世代目においても近交弱勢の影響が示唆された。また、遺伝的影響の指標には、子孫の予測ヘテロ接合度が有効であり、本種の継代維持にはMK交配法が望ましいと考えられた。

[ 2 ] 絶滅危惧種オットンガエルとホルストガエルの人工繁殖の試みと繁殖隔離機構の解明 (継続)

Artificial breeding and postmating isolation in endangered frog species *Babina subaspera* and *B. holsti* from Southwestern Islands

[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、飼育下繁殖を目指した研究を継続している。また、同胞種としての交配後隔離機構についての研究も継続している。

[材料・方法]

以前に交配を行った、オットンガエル6個体(雌親3、雄親3)、ホルストガエル4個体(雌親2、雄親2)の人工交配によって生じた子孫(コントロールと正逆雑種)については、繁殖能力を調べるため、成熟期まで飼育を継続してい

る。

[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3年齢の子孫(コントロールと正逆雑種)(およそ320個体と110個体)を飼育中である。コントロールも正逆雑種も正常に発育しており、生存率は、いずれも変態数のうちおよそ20%で、雑種致死による隔離はみられなかった。なお、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、孵化まではいわず、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ている。

[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。また、両種の正逆雑種については、成熟させて、繁殖能力や精子形成について調べて、雑種不妊による隔離があるかどうかを明らかにする予定である。これによって、両種の間での交配後の繁殖隔離機構を解明できる。

[ 3 ] 絶滅危惧種イボイモリにおける飼育下繁殖と繁殖行動および行動の季節変化の観察(継続)

Captive breeding, 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、集団の飼育下繁殖を試みるとともに、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]

① イボイモリにおける飼育下繁殖

昨年につき、徳之島・三京産の野外個体について、繁殖装置での飼育下繁殖の試みを継続した。

② 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、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。

#### [結果・考察]

①今年度も昨年が続いて、徳之島のもので、飼育下繁殖に成功した。変態率は 83%、2 ヶ月幼体で 61%であった。環流式の幼生飼育システムを確立して、共食いをさけて安定して幼生を飼育することが可能になった。

②求愛行動については、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。

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、生息地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。

#### [ 4 ] 絶滅危惧種アマミハナサキガエルの飼育下繁殖の試み (継続)

Artificial breeding for endangered frog species *Odorrana amamiensis* from Amami Island

#### [目的]

アマミハナサキガエル(*Odorrana amamiensis*)は、奄美大島と徳之島に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、鹿児島県の天然記念物に指定されている。この種を絶滅から防ぐ一つの方法として、人工受精法による飼育下繁殖の確立を目指している。

[材料・方法]

奄美大島産アマミハナサキガエル 4 個体（雄親 2、雌親 2）を用いて、人工受精法により、人工交配を行い、その後の生活力を調べた。

[結果・考察]

アマミハナサキガエルの 2 ペアから得た子孫（およそ 70 個体）を飼育中である。生存率は、およそ 25%であった。

[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、絶滅危惧種であるアマミハナサキガエルの飼育法と繁殖法を確立させる予定である。

[ 5 ] バングラデシュ産トラフガエル類における遺伝的多様性と繁殖隔離機構

(継続)

Genetic diversity and postmating isolation of the Indian bullfrog (*Hoplobatrachus tigerinus* and *Hoplobatrachus lateralis*) from Bangladesh

[目的]

バングラデシュでは乱獲等によりトラフガエル *H. tigerinus* が野外で激減しており、本種の採集は法律で禁止されている。一方最近、バングラデシュの南東沿岸域から近縁種ハマトラフガエル *H. litoralis* が新種として記載された (Hasan et al., 2011)。本研究では、バングラデシュ全域における本種群の遺伝的多様性を明らかにするとともに、これら 2 種間の交配後隔離機構を明らかにすることを目的に、野外から採集した個体を使って、ミトコンドリア DNA の Cytb 遺伝子を解析するとともに、人工受精法によって交雑実験を行った。

[材料・方法]

バングラデシュのトラフガエルとハマトラフガエルについて、分布の全域を網羅した 34 集団から 133 個体を採集し、これらの個体の肢指から全ゲノム DNA を抽出精製して、Cytb 遺伝子全長の塩基配列を解析した。また、トラフガエル 7 個体（雌親 3、雄親 4）とハマトラフガエル 5 個体（雌親 1、雄親 4）を用いて、人工受精法によって交雑実験を行い、雑種とそのコントロールの生活力を観察した。

[成果・考察]

Cytb 遺伝子の塩基配列から、バングラデシュでは、本種群は大きく 2 つのグループに分化していること、各グループについては、集団間の分化はきわめて小さいことがわかった。また、2 種間の正逆雑種はコントロールとほぼ同様に正常に発育し、変態後も正常に発育している。変態率は 65% または 20% であった。これら 2 種は配偶子隔離や雑種致死による隔離はないことがわかった。今

後、成熟したもので、繁殖能力や精子形成などを観察することが必要である。

#### [ 6 ] 絶滅危惧種における精子凍結保存法の確立 (継続)

Establishment of the sperm cryopreservation method in the endangered species

##### [目的]

絶滅危惧種の域外保全を行う上で、精子凍結保存は有効な手法である。両生類では、ツメガエルで精子凍結保存法が一般化されており、また、陸上性ガエルでも、精子凍結保存後の受精率を観察した例がある。しかし、絶滅危惧両生類において、精子凍結保存を用いた域外保全法は確立されていない。本研究では、絶滅危惧両生類において精子凍結保存と人工授精を組み合わせた簡便な域外保全法を確立することを目的とした

##### [材料・方法]

ツメガエル類で確立されている精子凍結保存法は、液体窒素を使わず、 $-80^{\circ}\text{C}$ のディープフリーザーを用いる。また、高価な試薬が不要という利点があり、きわめて低コストで実施が可能である。本研究では、この方法を絶滅危惧種のイシカワガエルと、普通種のニホンアカガエル（ただし、広島県では絶滅危惧種）に適用した。

##### [成果・考察]

凍結精子 (27 時間から 1 ヶ月、 $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結) を解凍し、運動能を調べた結果、凍結した精子のほとんどは、運動能を喪失していた。しかし、この精子を用いて人工授精を行った結果、イシカワガエルとニホンアカガエルのどちらにおいても、正常卵割する卵が観察でき、 $-80^{\circ}\text{C}$  保存精子にも受精能が残っていることが明らかになった。受精率は保存期間や卵の状態によって変動し、27 時間保存では受精率は 5.0~36.8% であり、1 週間保存では、2.3~9.0%、1 ヶ月保存では 1.7%~4.6% であった。また、イシカワガエル・ニホンアカガエルの双方で、尾芽胚期以降の発生は見られなかったが、これは凍結していない通常の精子を用いた人工授精コントロール胚でも同様であった。このため、本年度用いた卵の状態が悪く、発生が進行しなかったと考えられる。

#### [ 7 ] 絶滅危惧種イシカワガエルの皮膚に存在する抗菌ペプチドの解析 (継続)

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

##### [目的]

日本で最も美しいといわれるイシカワガエル (*Odorrana ishikawae*) は、奄美大島と沖縄本島の固有種である。近年個体数が減少しており、環境省レッドリストでは絶滅危惧 I B 類に分類されており、沖縄県と鹿児島県では天然記念物に指定されている。一方、本種は人工繁殖に成功しており、飼育室では感染症に

対する抵抗性を示すことが分かっている。このことから絶滅危惧に瀕している原因の一つに、野生環境下での自然免疫システムの低下の可能性が考えられる。水辺という微生物の攻撃を受けやすい環境にいるカエルにとって、皮膚から分泌される抗菌ペプチドは重要な生体防御因子であり、自然免疫システムの要となっている。先行研究により、イシカワガエルの皮膚から生化学的手法により10種類の抗菌ペプチドが単離・同定されている。さらに、分子生物学的手法により12種類の分泌ペプチドが推定され、これらの中には既存の抗菌ペプチドファミリーとは全く異なる構造を持つ新奇なペプチドが含まれている。本研究では、これら22種類のペプチドのグラム陰性菌・グラム陽性菌・真菌に対する最小発育阻止濃度 (Minimal inhibitory concentration ; MIC) を測定し、有効菌種のレパートリーを示す抗菌スペクトルを評価することを目的とした。

#### [材料・方法]

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

#### [結果と考察]

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

#### [ 8 ] 光る透明ガエル「スケルピオン」の作製 (継続) (Production of illuminating see-through frogs)

#### [目的]

これまでに、2種の色素細胞を欠き、皮膚が透けて見えるニホンアカガエル「透明ガエル」(通称・スケルピオン)の作出と継代維持に成功している。透明ガ

エルは、実験的に生み出された内臓透視可能な唯一の四足動物であり、実験動物としてのポテンシャルは高い。一方で、アカガエルは非モデル動物であるため、透明ガエルを研究界に導入するためには、実験手法の確立・基礎データの収集・実験の成功例の明示というステップが必須である。本研究では、透明ガエルの有用実験動物化の第一ステップとして、ニホンアカガエルへの遺伝子導入方法を構築し、「光る透明ガエル」の作出を目的として研究を開始した。

#### [材料・方法]

ニホンアカガエル野生型を実験に用いた。顕微注入の前段階として、受精卵のゼリーを除去する方法を検討した。また、顕微注入の条件検討を行うために、mCherry mRNA をマーカーとして用いた。さらに、ツメガエルのプロモーターがニホンアカガエルでも機能するかを検討するために、アフリカツメガエルカルディアククチンプロモーター連結 EGFP ベクターをニホンアカガエル幼生尾部の体節に顕微注入し、EGFP の発現を蛍光顕微鏡で確認した。

#### [結果と考察]

ニホンアカガエル受精卵ゼリー層の除去を、ツメガエルで行われている方法で行った所、卵が変形し、死亡した。このため、多数の試薬条件を検討した結果、チオグリコール酸ナトリウム 5%・pH9 の条件で、卵を生かしたまま脱ゼリーが可能であることが分かった。

アフリカツメガエルカルディアククチンプロモーター連結 EGFP ベクターを、ニホンアカガエル幼生尾部に顕微注入した。その後、注入部位を蛍光顕微鏡で観察した所、EGFP の発光が見られた。この結果から、アフリカツメガエルカルディアククチンプロモーターがニホンアカガエルの筋組織でも機能することが確認された。

ゼリー除去アカガエル受精卵に、mCherry mRNA を顕微注入し、3日後に蛍光顕微鏡下で mCherry の発現を観察した。その結果、mCherry 溶液(107ng/ul)を 20・200nl 注入した胚で、mCherry の発現が見られた。これら mCherry 発現胚は、胞胚以降の発生が進まなかったが、ゼリーを除去せず顕微注入も行っていないコントロール胚も同じステージ以降の発生が進まなかった。このため、胚の発生停止は、ゼリー除去や顕微注入が原因ではなく、本年度に準備できた受精卵の状態が悪かった（実験開始時期が、通常の繁殖シーズンより3ヶ月程遅かった）と考えられた。

本年度の研究により、卵ゼリーを取り除く溶液、インジェクション時の針の太さ、インジェクション時のガス圧、注入 DNA、I-SceI（あるいは蛍光色素タンパク質 mRNA）の濃度と容量、インジェクション時とその後の受精卵維持水の水質と至適温度など、顕微注入実験に必要な条件を大幅に絞り込むことができた。今後は、繁殖シーズンに状態の良い受精卵を用いてあわせて、実験を行う必要がある。

#### 研究業績

##### ①原著論文

1. Kakehashi, R., A. Kurabayashi, S. Oumi, S. Katsuren, M. Hosono and M. Sumida (2013) Mitochondrial genomes of Japanese *Babina* frogs (Ranidae, Anura): unique gene arrangements and the phylogenetic position of genus *Babina*. *Genes Genet. Syst.*, 88: 59–67.
  
2. Kakehashi, R., T. Igawa, N. Iwai, E. Shoda-Kagaya, and M. Sumida (2013) Development and characterization of new microsatellite loci in the Otton frog (*Babina subaspera*) and cross-amplification in a congeneric species, Holst's frog (*B. holsti*). *Conser. Genet. Res.*, 5: 1071–1073.
  
3. Igawa, T., H. Sugawara, M. Tado, T. Nishitani, A. Kurabayashi, M. M. Islam, S. Oumi, S. Katsuren, T. Fujii and M. Sumida (2013) An attempt at captive breeding of an endangered newt, *Echinotriton andersoni*, from the Central Ryukyus in Japan. *Animals*, 3: 680–692.
  
4. Hasan, M., M. M. Islam, M. Kuramoto, A. Kurabayashi and M. Sumida (2014) Description of two new species of *Microhyla* (Anura: Microhylidae) from Bangladesh. *Zootaxa*, 3755: 401–418.
  
5. Kurabayashi, A. and M. Sumida (2013) Afrobatrachian mitochondrial genomes: genome reorganization, gene rearrangement mechanisms, and evolutionary trends of duplicated and rearranged genes. *BMC Genomics*, 14: 633.
  
6. Komaki, S., T. Igawa, M. Nozawa, S-M. Lin, S. Oumi and M. Sumida (2014) Development and characterization of 14 microsatellite markers for *Buergeria japonica* (Amphibia, Anura, Rhacophoridae). *Genes Genet. Syst.*, 89: 35–39.
  
7. Kurabayashi, A., R. Kakehashi, I. Tazawa, Y. Haramoto, T. Oshima, Y. Ito and M. Sumida (2014) Improved transport of the model amphibian, *Xenopus tropicalis*, and its viable temperature for transport. *Curr. Herpetol.*, 33:75–87.
  
8. Hasan, M., M. M. Islam, M. M. R. Khan, T. Igawa, M. S. Alam, T. H. Djong, N. Kurniawan, H. Joshy, H. S. Yong, Daicus, M. B., A. Kurabayashi, M. Kuramoto and M. Sumida (2014) Genetic divergences of South and Southeast Asian frogs: a case study of several taxa based on 16S ribosomal RNA gene data with notes on the generic name *Fejervarya*. *Turk. J. Zool.*, 38: in press.

②総説・著書・その他

住田正幸、柏木昭彦、鈴木 厚  
「世界でオンリーワンの両生類研究・リソースセンター」  
BioResource Now! 9巻6号1-2頁 (2013)

③学会発表

国際学会

1. Sumida, M., T. Igawa, M. M. Islam, A. Kurabayashi, M. S. Alam, R. Kakehashi, M. Tado, N. Shintani, H. Sugawara, T. Nishitani, S. Oumi, S. Katsuren, and T. Fujii, “Captive breeding of endangered amphibian species: A case study of *ex situ* conservation” 50th Anniversary Meeting of the Australian Society of Herpetologists”, January 30, 2014, Greenhills Conference Centre, Canberra Australia

2. Hasan, M., M. M. Islam, M. Kuramoto, A. Kurabayashi and M. Sumida “Description of two new species of *Microhyla* (Anura: Microhylidae) from Bangladesh” 50th Anniversary Meeting of the Australian Society of Herpetologists”, January 31, 2014, Greenhills Conference Centre, Canberra Australia

3. Sumida, M., M. M. Islam, T. Igawa, A. Kurabayashi, N. Satou, K. Ukena, S. Oumi, S. Katsuren, and T. Fujii “A case study of fauna conservation in Japan: Current conservation measures of wild populations, captive breeding, genetic diversity, and potential resource materials in the endangered frog species *Odorrana ishikawae* and *O. splendida*” International Symposium “Frontiers in Amphibian Biology”, 28 March, 2014, Hiroshima University, Higashihiroshima

4. Islam, M. M., T. Igawa, A. Kurabayashi, R. Kakehashi, N. Satou, N. Shintani, M. Tado, H. Sugawara, T. Nishitani, M. Uchida, S. Oumi, S. Katsuren, T. Fujii, and M. Sumida “An *ex situ* conservation effort for several endangered and near-threaten amphibian species from the Ryukyu Archipelago, Japan: Captive breeding of nine anuran species and cryopreservation of sperm for two of them” International Symposium “Frontiers in Amphibian Biology”, 28 March, 2014, Hiroshima University, Higashihiroshima

5. Hasan, M., N. Kurniawan, A. Soewondo, M. M. Islam, T. Igawa, W. M. M. Nalley, M. Matsui and M. Sumida “Evolutionary relationships and postmating isolation among *Fejervarya* species from Lesser Sunda, Indonesia and other Asian countries revealed by mtDNA Cyt *b* gene sequences and crossing experiments” International Symposium “Frontiers in Amphibian Biology”, 27-28 March, 2014, Hiroshima University, Higashihiroshima

6. Alam M. S., M. M. R. Khan, M. M. Islam, M. Hasan and M. Sumida “Artificial Breeding of an Indian Bullfrog (*Hoplobatrachus tigerinus*): A Case Study on Reproduction and Conservation” International Symposium “Frontiers in Amphibian Biology”, 27–28 March, 2014, Hiroshima University, Higashihiroshima
7. Sumida, M., M. M. Islam, T. Igawa, A. Kurabayashi, Y. Furukawa, N. Sano, T. Fujii and N. Yoshizaki “Translucent frogs created through crossbreeding, and their inheritance and dermal chromatophore structure” International Symposium “Frontiers in Amphibian Biology”, 27–28 March, 2014, Hiroshima University, Higashihiroshima
8. Kuramoto, M., N. Satou, S. Oumi, A. Kurabayashi, and M. Sumida “Inter- and intra-island divergence in *Odorrana ishikawae* (Anura, Ranidae) of the Ryukyu Archipelago of Japan, with description of a new species” International Symposium “Frontiers in Amphibian Biology”, 27–28 March, 2014, Hiroshima University, Higashihiroshima
9. Djong, H. T., M. Matsui, M. Kuramoto, M. Nishioka, and M. Sumida “A new species of the *Fejervarya limnocharis* complex from Japan (Anura, Dicroglossidae)” International Symposium “Frontiers in Amphibian Biology”, 27–28 March, 2014, Hiroshima University, Higashihiroshima
10. Sultana, N., T. Igawa, M. Nozawa, M. M. Islam, M. M. R. Khan, M. Hasan, M. S. Alam and M. Sumida “Development and characterization of 27 new microsatellite markers of Indian Bullfrog, *Hoplobatrachus tigerinus* (Daudin, 1802) and its congeneric species” International Symposium “Frontiers in Amphibian Biology”, 27–28 March, 2014, Hiroshima University, Higashihiroshima
11. Kakehashi, R., T. Igawa and M. Sumida “Genetic population structure of an endangered frog species, *Babina holsti*” International Symposium “Frontiers in Amphibian Biology”, 27–28 March, 2014, Hiroshima University, Higashihiroshima
12. Komaki, S., T. Igawa, K. Tojo, A. Kurabayashi, S.-M. Lin, M.-S. Min, and M. Sumida “New insights into evolutionary history among Asian pond frog species” International Symposium “Frontiers in Amphibian Biology”, 27–28 March, 2014, Hiroshima University, Higashihiroshima
13. Uno, Y., C. Nishida, C. Takagi, T. Igawa, N. Ueno, M. Sumida and Y. Matsuda “Molecular cytogenetic studies on the process of genomic and chromosomal evolution in *Xenopus laevis* after WGD and the origin and

evolution of sex chromosomes in anuran species” International Symposium “Frontiers in Amphibian Biology”, 27–28 March, 2014, Hiroshima University, Higashihiroshima

14. Kurabayashi, A., N. Furuno, M. Sumida, H. Mizuno, K. Ohshima, and M. Vences “Discovery and phylogenetic distribution of a short interspersed nuclear element (SINE) subgroup in neobatrachian frogs” International Symposium “Frontiers in Amphibian Biology”, 27–28 March, 2014, Hiroshima University, Higashihiroshima

15. Watanabe, A., T. Igawa, A. Kashiwagi, A. Suzuki, A. Kurabayashi, T. Fujii, and M. Sumida “Inbreeding coefficient and genetic relationship of seven strains of *Xenopus tropicalis* inferred from genome wide genotyping of 54 microsatellite loci” International Symposium “Frontiers in Amphibian Biology” , 27–28 March, 2014, Hiroshima University, Higashihiroshima

16. Kashiwagi, A., K. Kashiwagi, H. Hanada, A. Suzuki, K. Takebayashi, A. Kurabayashi, K. Suzuki, N. Furuno, I. Tazawa, K. Nakajima, T. Yamamoto and M. Sumida “National BioResource Project (NBRP) *Xenopus (Silurana) tropicalis*: Standard High Quality Inbred Strains for Biological Research” International Symposium “Frontiers in Amphibian Biology” , 27–28 March, 2014, Hiroshima University, Higashihiroshima

17. Suzuki, A., A. Kashiwagi, K. Kashiwagi, H. Hanada, K. Takebayashi–Suzuki, I. Tazawa, N. Furuno, A. Kurabayashi, S. Kobayashi, J. Takenaka, Y. Tamaki, T. Igawa, T. Uto, C. Nanba, A. Watanabe, H. Yoshida, A. Shimada, and M. Sumida “International *Xenopus* Resource Network and Educational Activities at Institute for Amphibian Biology” International Symposium “Frontiers in Amphibian Biology” , 27–28 March, 2014, Hiroshima University, Higashihiroshima

#### 国内学会

1. 井川 武、小巻 翔平、Nasrin Sultana、長岡 麻衣、野澤 昌文、Islam Mohammed Mafizul、大海 昌平、住田 正幸「Ion PGM を利用した両生類 3 種におけるマイクロサテライトマーカー開発」次世代シーケンサ現場の会 第三回研究会 2013/9/3 – 9/5 神戸国際会議場

2. 住田正幸・井川武・Islam M. M.・倉林敦・Alam, M. S.・掛橋竜祐・田戸美雪・新谷望・菅原弘貴・西谷琢磨・大海昌平・勝連盛輝・藤井保「両生類絶滅危惧種の飼育下繁殖による保全の試み」日本遺伝学会第 85 回大会 平成 25 年 9 月 19 日、慶応大学、横浜

3. Hasan, M., M. M. Islam, M. Kuramoto, A. Kurabayashi and M. Sumida “Description of two new species of *Microhyla* (Anura: Microhylidae) from Bangladesh” 日本遺伝学会第 85 回大会 平成 25 年 9 月 20 日慶応大学、横浜
4. Islam, M. M., R. Kakehashi, H. Koide, A. Kurabayashi, S. Oumi, S. Katsuren, T. Fujii, and M. Sumida “Genetic divergence and postmating isolation between endangered Holst’s frog and Otton frog from the Ryukyu Archipelago, Japan, elucidated by allozyme and mitochondrial gene sequence analyses, crossing experiments and cytological observations” 日本遺伝学会第 85 回大会 平成 25 年 9 月 20 日、慶応大学、横浜
5. 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「アフリカツメガエルのゲノム倍数化過程に生じた染色体再配列と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」日本遺伝学会第 85 回大会 平成 25 年 9 月 21 日、慶応大学、横浜
6. 住田正幸・井川武・菅原弘貴・田戸美雪・西谷琢磨・倉林敦・Islam M. M.・大海昌平・勝連盛輝・藤井保「絶滅危惧種イボイモリの遺伝的多様性と飼育下繁殖」日本動物学会第 84 回大会 平成 25 年 9 月 26 日 岡山大学、岡山市
7. 小巻翔平・井川武・倉林敦・Mi-Sook Min・Si-Min Lin・住田正幸「東アジア産トノサマガエル種群の系統関係と遺伝子浸透」日本動物学会第 84 回大会 平成 25 年 9 月 26 日 岡山大学、岡山市
8. 住田正幸・M. M. Islam・井川 武・倉林 敦・古川友加里・佐野尚美・藤井 保・吉崎範夫「透明ガエルの遺伝様式と真皮色素細胞の組織学的観察」日本爬虫両棲類学会第 52 回大会 平成 26 年 11 月 2 日 東海大学、札幌
9. Islam, M. M., S. Oumi, H. Ida and M. Sumida “Genetic divergence and postmating isolation among several brown frog species from Honshu and Ryukyu of Japan, and Mongolia elucidated by mitochondrial gene sequence analyses, crossing experiments and subsequent cytological observations of their hybrids and controls” 日本爬虫両棲類学会第 52 回大会 平成 26 年 11 月 2 日 東海大学、札幌
10. 掛橋竜祐・井川武・住田正幸「絶滅危惧種ホルストガエルにおける遺伝的集団構造」日本爬虫両棲類学会第 52 回大会 平成 26 年 11 月 2 日 東海大学、札幌
11. 井川 武・長岡麻衣・野澤昌文・小巻翔平・藤井 保・住田正幸「Ion Torrent PGM を用いたハナサキガエルにおけるマイクロサテライト遺伝子座の単離と集団構造解析」日本爬虫両棲類学会第 52 回大会 平成 26 年 11 月 2 日 東海大学、札幌

12. 渡辺愛・井川武・鈴木厚・柏木昭彦・倉林敦・藤井 保・住田正幸「両生類モデル動物ネツタイツメガエル 6 系統における近交度及び遺伝的関係の解明」日本爬虫両棲類学会第 52 回大会 平成 26 年 11 月 2 日 東海大学、札幌

13. 倉林敦・古野伸明・住田正幸・水野英明・大島一彦・M. Vences「カエル亜目における SINE(short interspersed nuclear elements)の発見と系統分布」日本爬虫両棲類学会第 52 回大会 平成 26 年 11 月 2-3 日 東海大学、札幌

14.

Hasan, M., N. Kurniawan, A. Soewondo, M. M. Islam, T. Igawa, W. M. M. Nalley, M. Matsui and M. Sumida “Evolutionary relationships and postmating isolation among *Fejervarya* species from Lesser Sunda, Indonesia and other Asian countries revealed by mtDNA Cyt *b* gene sequences and crossing experiments” 日本爬虫両棲類学会第 52 回大会 平成 26 年 11 月 2-3 日 東海大学、札幌

#### 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 11,740 千円 (担当 住田正幸、矢尾板芳郎)

2. 文部科学省第 3 期 NBRP「ネツタイツメガエルの近交化・標準系統の樹立・提供」中核機関 (H25 年度) 11,410 千円 (課題代表者 住田正幸)

3. 科学研究費補助金 基盤研究(B)「絶滅危惧両生類における遺伝的多様性評価と保全のための包括的研究」3,510 千円 (研究代表者 住田正幸)

4. 科学研究費補助金 挑戦的萌芽研究「光る透明ガエルの作出：非モデル両生類への遺伝子導入法の確立と NGS による発現解析」2,340 千円 (研究代表者 住田正幸)