



2014年度両生類研究施設研究活動及び成果報告書

平成27年8月19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	5
III. 社会活動	6
IV. 国際交流活動とその他	9
V. 各研究グループの研究内容と研究業績	11
A) 「発生」研究グループ	11
B) 「進化多様性・生命サイクル」研究グループ	18
C) 「遺伝情報・環境影響」研究グループ	30
D) リーディングプログラムによる特任教員	43

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。

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った。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。また、平成24年度4月からNBRP事業支援として、学長裁量経費により特任教授が採用された。平成26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）、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）、助教4（中島圭介、倉林敦、花田秀樹、田澤一朗）、客員教授2（ドイツ、ブラウンシュバイク工科大学Miguel Vences教授、米国、ヴァージニア大学Robert Grainger教授）、特別研究員（Hasan Mahmudul）、研究員3（竹林公子、柏木啓子、Islam Mohammed Mafizul）、契約一般職員（中島妙子）である。系統維持班の人員の構成は花田秀樹助教（兼任）、技術員1（宇都武司）、契約技能員2（難波ちよ、玉城淳子）、契約用務員2（水戸妙子、渡辺八重子）、である。事務室には契約一般職員1（島田歩希：平成26年12月31日を以て退職）がいる。

系統維持班では、両生類39種（有尾類11種、無尾類28種）180系統（有尾類31系統、無尾類149系統）の野外系統及び突然変異系統等の特殊系統を保存している。これまでに確立されている系統には、野外種育成系統（146系統）、自然・人為色彩突然変異系統、四肢形成異常系統、癌多発系統、遺伝子組換え系統、遺伝子連鎖群解析系統、人工新種系統、核細胞質雑種系統および人為倍数体系統などがある。現在維持している変異系統は34系統にのぼる。

系統維持班では平成26年度には、系統維持している変態完了個体から成体まで約4,292匹の飼育に加えて、交配系統数：9系統、飼育幼生数：2,173匹、新しい系統数：17系統、新しい系統の飼育幼生数：3,084匹の系統維持活動を行い、19系統512匹を研究・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、生物教材としてアホートルを21件281匹、およびフタホシコオロギ2,000匹を提供した。また、昭和51年より現在までに、日本や世界各地から収集されたおよそ10科110種のカエルと、実験的に作製された100系統のカエル、合計1万匹以上がマイナス80度に凍結保存されている。

平成14年に文部科学省は、生命科学を発展させるために研究者に動植物や微生物、その

他のバイオリソースを提供するナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)を開始した。各期が5年で、現在、本プロジェクトは第3期に入り、全国で29の研究機関が中核を形成している。両生類研究施設は「ネッタイツメガエルの近交化・標準系統の樹立・提供」というスローガンの下、NBRPに参画、ネッタイツメガエルの提供を行うわが国唯一の中核機関である。西アフリカの低地熱帯雨林に生息するネッタイツメガエル*Xenopus tropicalis*は、1) 小型の2倍性ゲノムをもち、発生が速く、生活環も短いなどの諸特徴を備え、遺伝学研究が容易に行える、またトランスジェニック・ノックアウト系統の安定的な作出が可能、2) 2010年に完了したゲノム配列解読の結果から哺乳類のものとの間に高い相関性を有する、といった理由から、ネッタイツメガエルはポストゲノム時代の重要なモデル動物の一つと考えられている。NBRP-ネッタイツメガエルの課題管理者は住田正幸(11月から柏木昭彦に交代)、課題協力者には柏木昭彦(10月まで)、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)がいる。また契約技術職員として、小林里美、竹中純子、杉原麻美の3名がいる。平成26年には以下の行事を開催した。①9月22日～10月1日にかけてNBRP「メダカ」と協力し、基礎生物学研究所(岡崎市)で合同国際トレーニングコース「The 8th NIBB and The 3rd NIBB-TLL-DBS/NUS International Workshop “Experimental Techniques Using Medaka and *Xenopus*—The Merits of Using Both”」。7カ国から16人の若手研究者が参加、②NBRP運営委員会(11月、パシフィコ横浜、横浜市)、③第85回日本動物学会でNBRP事務局との共催でシンポジウム「ツメガエルを用いた機能ゲノム科学研究」(9月、東北大学、仙台市)、④第61回日本実験動物学会総会(5月、札幌コンベンションセンター、札幌市)、第85回日本動物学会「動物学ひろば」(9月、東北大学、仙台市)、第37回日本分子生物学会年会(11月、パシフィコ横浜、横浜市)でネッタイツメガエルを展示。さらに、ネッタイツメガエル技術講習会を両生類研究施設で開催した(平成27年3月)。

平成24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ており、今年度の施設見学者/施設訪問者は24件661人であった。

平成23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19名の研究員、学外海外から42名(うち10名が海外から)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、北海道大学、名古屋大学、岡山大学、総合研究大学院大学、山形大学、山口大学、鳥取大学、徳島大学、鹿児島大学、防衛大学、札幌医科大学、大阪市立大学、川崎医科大学、京都産業大学、県立広島大学、福岡教育大学、北里大学、麻生大学、長浜バイオ大学、いわき明星大学、大阪大谷大学、カズサDNA研究所、芝浦工業大学、基礎生物学研究所、海外ではNIH(米国)、コネチカット大学(米国)、ブラウンシュバイク工科大学(ドイツ)、キャンベラ大学(豪州)、ラ トローブ大学(豪州)、ローザンヌ大学(スイス)、ノースウェスト大学(南アフリカ)、成都生物学研究所(中国)、バングラデシュ農業大学(バングラデシュ)等がある。

今年度は、10月8日、10月20日、2月3日に両生類研究施設運営委員会を開催した。

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4名、2年に1名、後期1年に1名、2年に2名、3年に2名で合計10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6件であり、博士課程後期学生の国際学会発表は1件、国内学会発表は6件である。原著論文発表は博士課程後期学生で4編である。

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」、「カエルから見た生命システム」、「基礎生物科学B」、「動物の系統と進化」、「細胞生物学A」、「先端生物学」、「内分泌学・免疫学」、「情報活用演習」、「生物科学基礎実験」、学部生チューター、教務委員などを担当している。

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。

鈴木准教授は名古屋大学医学部において非常勤講師を担当している。百名程度の医学部生を対象に発生学の講義を行い、臨床医学における基礎研究の重要性などについて解説し、基礎生物学および先端医療への理解を促している。

柏木特任教授は山陽女子短期大学臨床検査学科客員教授として、前期「生物学」・後期「遺伝子・染色体検査学」を、安田女子短期大学非常勤講師として、前期「人間と環境」を担当している。

III. 社会活動

○ 見学・研修等

・ 住田正幸, 柏木昭彦, 鈴木 厚, 花田秀樹, 倉林 敦, 中島圭介, 竹林公子, 柏木啓子, 中島妙子, Mohammed Mafizul Islam難波ちよ、宇都武司, 矢尾板芳郎

施設訪問者見学者：24件, 661名

- ・ 柏木昭彦, 柏木啓子, 花田秀樹, 鈴木賢一, 鈴木 厚, 古野伸明, 田澤一朗, 倉林 敦, 中島圭介, 竹林公子, 小林里美, 竹中純子, 杉原麻美, 山本 卓, 住田正幸
動物学ひろば「重要な実験動物—ツメガエル」第85回日本動物学会仙台大会におけるナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)ポスター展示 (2014年9月, 東北大学, 仙台市)
- ・ 柏木昭彦, 柏木啓子, 花田秀樹, 鈴木賢一, 鈴木 厚, 竹林公子, 古野伸明, 田澤一朗, 倉林 敦, 中島圭介, 小林里美, 竹中純子, 杉原麻美, 山本 卓, 住田正幸
「近交系ネットイツメガエルを用いた生命科学」第37回日本分子生物学会(2014年11月, パシフィコ横浜, 横浜市)
- ・ 鈴木 厚, 竹林公子, 難波ちよ、宇都武司
広島県立教育センター主催の「第18回生物教材バザール」に参加、教材の提供および解説を行う(2014年5月 東広島)

○ セミナー・講義・講演会講師等

- ・ 鈴木 厚, 柏木昭彦, 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, 杉原麻美, 竹中純子, 宇都武司, 難波ちよ, [外部講師：荻野 肇・越智陽城]

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実験技術講習会 開催
(2015年3月)

- ・ 柏木昭彦, 花田秀樹, 柏木啓子

NBRP-メダカ・NBRP-ネットイツメガエルによる合同国際トレーニングコース

「Experimental techniques using medaka and Xenopus—The merits of using both」
(2014年9月, 10月, 基礎生物学研究所, 岡崎市)

- ・ 柏木昭彦

第13回未病臨床セミナー「化学物質が及ぼす内分泌かく乱作用」(2014年12月, 国民宿舎みやじま社の宿, 廿日市市)

NBRP-メダカ・NBRP-ネットイツメガエルによる合同国際トレーニングコース

「Experimental techniques using medaka and Xenopus—The merits of using both」
(2014年9月, 10月, 基礎生物学研究所, 岡崎市) 講師

山陽女子短期大学臨床検査学科客員教授 前期「生物学」・後期「遺伝子・染色体検査学」を担当

安田女子短期大学非常勤講師 前期「人間と環境」を担当

- ・ 三浦郁夫

カエルの遺伝学 先導科学考究 総合研究大学院大学 11月18日(火) 神奈川県三浦郡葉山町 修士および博士課程後期学生対象

遺伝と進化学のエッセンス 放送大学面接授業 放送大学福山学習センター11月11-12

日 福山市 放送大学学生対象

The Amphibian Genetics Lecture to 3 year conservation ecology students on
'Genetic Variation and Genetic Markers' 2nd March 2015, University of Canberra,
Canberra, Australia キャンベラ大学学部3年生対象

・ 鈴木 厚

近畿大学工学部 学部生に対するツメガエル受精実験と講義の指導 (2014年5~8月)

「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~
兵庫県赤穂市立有年中学校「理科おもしろ実験教室」における講演, およびツメガエル
卵受精実験等の生物実験教室開催 (2014年7月 赤穂)

「両生類を用いた中胚葉誘導・神経誘導の研究と再生医学への応用」名古屋大学医学部
における講義 (2014年12月 名古屋)

・ 花田秀樹

東広島サムエル保育園 (東広島市高屋) にて保育園児らを対象にしたカエルに関する講
演を行った。2014年7月8日

・ 倉林 敦

「両生類系統学研究2題: パプアヒメアマガエル類の分布拡大ルートについての新仮説・
ヘビからカエルへの遺伝子水平伝播」名古屋市立大学

第106回 システム自然科学研究科セミナー および 第33回 生物多様性研究センター
セミナー (2014年7月 名古屋市立大学 名古屋)

○各種役員, 委員

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
- ・ 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」課題管
理者(10月まで)
- ・ 国際両生爬虫類学会 (World Congress of Herpetology)・執行委員

柏木昭彦

- ・ 生物遺伝資源委員会委員 (国立遺伝学研究所)
- ・ 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」
課題管理者(11月から)
- ・ 山陽女子短期大学臨床検査学科客員教授
- ・ 安田女子短期大学非常勤講師
- ・ 広島大学総合博物館客員研究員

三浦郁夫

- ・ (財) 染色体学会・理事
- ・ (財) 染色体学会・学会賞選考常任委員
- ・ Editorial Board of Asian Herpetological Research (編集委員)
- ・ Editorial Board of Sexual Development (編集委員)
- ・ Editorial Board of Chromosome Science (編集委員)
- ・ Editorial Board of Dataset Papers in Biology (編集委員)

- ・キャンベラ大学（豪州）非常勤准教授

鈴木 厚

- ・日本ツメガエル研究集会 組織委員
- ・国際ツメガエルデータベース (Xenbase) ツメガエル遺伝子命名委員会 (*Xenopus* Gene Nomenclature Committee) 委員
- ・英国ツメガエルリソース拠点 (EXRC) 運営会議 (Strategic Board Meeting) 委員

花田秀樹

- ・日本動物学会中四国支部 会計監査

IV. 国際交流活動とその他

○国際共同研究

矢尾板芳郎・中島圭介

・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」

住田正幸

・バングラデシュ農業大学（学部間協定締結校）

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」

・国立台湾師範大学台湾

研究テーマ：「アジアの両生類の多様性」

三浦郁夫

・キャンベラ大学（豪州） Dr. Tariq Ezaz 性決定と性染色体の進化に関する研究

・成都生物研究所（中国） Dr. Xiaomao Zeng ツチガエルの進化に関する研究

・Leibniz-Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries - IGB Germany Dr. Matthias Stöck カエルの系統進化に関する研究

鈴木 厚

・米国エネルギー省、カリフォルニア大学、テキサス大学ほか

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、英国ガードン研究所および米国ウッズホール海洋生物学研究所

研究テーマ：「ネッタイツメガエルリソースの系統解析」

・英国ポーツマス大学および米国ウッズホール海洋生物学研究所

研究テーマ：「国際ツメガエルリソースの国際拠点形成」

倉林 敦

・ブラウンシュバイク工科大学（ドイツ）・ビショップ博物館（アメリカ）・南オーストラリア博物館（オーストラリア）

研究テーマ：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）・コネチカット大学（アメリカ）・ノースウェスト大学（南アフリカ）

研究テーマ：フクラガエルが生殖行為に用いる糊状物質の解明

・ブラウンシュバイク工科大学（ドイツ）

研究テーマ：両生類皮膚粘液に存在する細菌類の進化と分布の解明

・ビショップ博物館

研究テーマ：パプアヒメアマガエルの種インベントリー

・中国科学院成都生物研究所

研究テーマ：無尾類のミトコンドリアゲノムの進化

竹林公子

・英国ポーツマス大学および米国ウッズホール海洋生物学研究所

研究テーマ：「国際ツメガエルリソースの国際拠点形成」

高橋秀治

・日米アフリカツメガエルゲノムコンソーシアム

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

・米国カリフォルニア州立大学 アーバイン校 (Ken Cho)

○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) (研究生, 平成24年10月4日から)

その他 (特記事項)

・ 理学部・大学院理学研究科公開 (平成 26 年 11 月 1 日) において研究施設を公開し, およそ 300 名が見学した。

矢尾板芳郎, Islam Mohammed Mafizul、倉林 敦

バングラデシュ政府と Bangladesh Institute for Nuclear Agriculture からホセイン氏 (Division Chief, Agriculture, Water Resource & Rural Institution Division, Planning Commission, Ministry of Planning) ら 5 名を招待して、両生類研究施設を中心として、理学部生物学科鈴木研究室、遺伝子実験施設、生物生産学部を案内し、バングラデシュの科学振興に貢献した。浅原学長や谷口理学研究科長に表敬訪問を行なっている (2015年3月17日—20日)。

矢尾板芳郎, 中島圭介

・ 原著論文 「Highly efficient gene knockout by injection of TALEN mRNAs into oocytes and host transfer in *Xenopus laevis*. *Biology Open*, 4(2): 180-185.」が *Xenopus* 生物学の国際総合情報ホームページ (Xenbase) の表紙に採用された

倉林 敦

・ TV番組写真提供・取材協力: 2件 (テレビ朝日『怒り新党』, テレビ東京『テレビ東京ありえへん∞世界』)

V. 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, 「遺伝情報・環境影響」研究グループ, 「進化多様性・生命サイクル」研究グループ, リーディングプログラムに分けて記載する。

A) 「発生」研究グループ

平成26年度構成員：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。それから半世紀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*DEADSouth*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。

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*DEADSouth*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通常より少量注入する。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の量を減少させるためである。実際に行なった結果、生殖細胞の標的遺伝子が高率（85-100%）に変異を起こしたが、体細胞では低率にしか、変異が起きていなかった。論文としてまとめ、投稿した。

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 (host transfer法)。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。

この方法では卵母細胞でのTALENの発現量は非常に低いという問題があった。しかし、TALEN mRNAにこの*DEADSouth*遺伝子の3' UTRを付加することにより、mRNAを注入した卵母細胞でTALEN蛋白質の高レベルの発現が観察された。この*DEADSouth*遺伝子の3' UTRを付加する方法とhost transfer法を組み合わせる事により受精初期からTALEN蛋白質の高発現が可能になり、初期胚での高率な標的遺伝子破壊が可能となった。論文としてまとめ、投稿した。

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応答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。

*Ouro1*遺伝子と*ouro2*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。*ouro1*遺伝子と*ouro2*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、それらを交配して多くのF1を得た。遺伝子解析によって、両アレルの*ouro*遺伝子が破壊されている幼生を同定して、変態時の尾の変化を観察したが、何らかの遅延も見つらなかつた。TALEN法で*Foxn1*遺伝子が破壊された先天性胸腺欠損症の幼生も作製したが、尾の退縮の異常は見出せなかつた。

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形成過程の解析

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 (ホメオティック肢) 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つたので、その解析はあまり進んでいなかった。しかし我々は、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に成功し、現在この現象を研究することが可能である。

ホメオティック肢形成過程は殆ど観察されていない。そこで我々は先ずその詳細を明らかにすることにした。ホメオティック肢は尾部切断端から形成される再生体の上側、下側、あるいはその両方に生じる細胞塊から発達することがわかつた。また、尾の上側よりも下側からの発生頻度が高かつた。これら両事象間には正の相関が認められ、過剰肢発生メカニズムが尾部の上下で完全には独立していないことが示唆された。

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、環境化学物質であるビスフェノールA (BPA) 曝露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ところ、ビテロゲン (*Vtg*) *Al*遺伝子と一部に高い相同性を持つ遺伝子の発現を確認した。

また、トノサマガエル (*Pelophylax nigromaculata*) 幼生へのエストロゲン曝露による雄から雌への性転換について再現性を確認した。

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 (*Silurana tropicalis*) 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ところ同様の結果が得られた。従って、ネッタイツメガエルの性決定機構はXX/XY型である可能性が考えられた。今後、ネッタイツメガエル性決定機構をさらに詳しく解析するために、卵核二倍発生法によって得られる幼生の性比の解析、および性転換個体を識別するための遺伝子マーカーの開発などが必要である。

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に対する環境化学物質およびエストロゲンの影響

これまで、弱いエストロゲン作用を持つ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および人工エストロゲンであるエチニルエストラジオール (EE2) の影響について調べた。最初に、尾と同様に幼生期の肝臓の *TRβ* 遺伝子発現はT3によって誘導されることを確かめた。次に、BPAまたはEE2によりその誘導が阻害され、尾に比べて顕著であることを確かめた。しかし、変態完了後の肝臓ではT3による *TRβ* 遺伝子発現の誘導作用が認められなかったことから、*TR* 遺伝子発現が見られる他の器官についてさらに解析する必要がある。

○発表論文

1. 原著論文

- ◎K. Nakajima and Y. Yaoita (3/2015) Development of a new approach for targeted gene editing in primordial germ cells using TALENs in *Xenopus*. *Biology Open*, 4(3): 259-266.
- ◎K. Nakajima and Y. Yaoita (2/2015) Highly efficient gene knockout by injection of TALEN mRNAs into oocytes and host transfer in *Xenopus laevis*. *Biology Open*, 4(2): 180-185.
- H. Hanada, K. Kashiwagi, K. Suzuki, I. Tazawa, T. Yamamoto, A. Kashiwagi. Suppression of anuran metamorphosis by synthetic chemical compounds. *Frogs: Genetic Diversity, Neural Development and Environmental Influences*. Nova Science Publishers, Hauppauge, New York (6/2014)

2. 総説・解説

該当なし

○著書

該当なし

○取得特許

該当なし

○講演

1. 国際会議での招待講演

- ◎Keisuke Nakajima and Yoshio Yaoita “The role of the thyroid hormone receptor during *Xenopus* metamorphosis” 8th International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology, Okazaki, Japan (2014, 11.7-9)

2. 国際会議での一般講演

- ◎Keisuke Nakajima and Yoshio Yaoita “The development of TALEN methods to enhance the mutation efficiency and to perform genome editing preferentially in germ cells using *Xenopus*.” 15th International *Xenopus* Conference, Pacific Grove, CA, USA (2014, 8.24-28, 300)

Minoru Takase “A study on the sex-determination system in the frog *Silurana tropicalis*.” 8th International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurology (ISAREN), Okazaki, Japan, 7-9, Nov. 2014

3. 国内学会での招待講演

該当なし

4. 国内学会での一般講演

- ◎中島圭介・矢尾板芳郎 「致死遺伝子のノックアウト問題の解決を目指して：TALENによる生殖細胞優先的標的遺伝子破壊法の開発」 第9回 XCIJ-MA・第8回ツメガエル

研究会ジョイント研究集会、相模原市(2014年11月)

- ◎中島圭介・矢尾板芳郎 「TALENを用いたネツタイツメガエル生殖細胞優先的ゲノム編集技術 第37回日本分子生物学会, 横浜市(2014年11月)
- ◎中島圭介・矢尾板芳郎 「TALENによる生殖細胞特異的ゲノム編集法の開発」 第85回日本動物学会, 仙台市(2014年9月)
- ◎中井裕也・中島圭介・矢尾板芳郎 「ツメガエルにおける *ouro* 遺伝子ノックアウト」 第85回日本動物学会, 仙台市(2014年9月)
- ◎田澤一朗・矢尾板芳郎 「ヤマアカガエルにおけるホメオティック肢形成過程」日本動物学会第85回大会, 仙台市(2014年9月11日)
- 柏木昭彦・柏木啓子・花田秀樹・鈴木賢一・鈴木厚・古野伸明・田澤一朗・倉林敦・中島圭介・竹林公子・小林里美・竹中純子・杉原麻美・山本卓・住田正幸 「高品質な近交系ネツタイツメガエルを用いた生物学の研究」第61回日本実験動物学会総会, 第48回日本実験動物学会技術者協会総会 日本動物科学技術さっぽろ2014, 札幌コンベンションセンター, 札幌市(2014年5月)
- 柏木昭彦・柏木啓子・花田秀樹・鈴木賢一・鈴木厚・古野伸明・田澤一朗・倉林敦・中島圭介・竹林公子・小林里美・竹中純子・杉原麻美・山本卓・住田正幸 「重要な実験動物——ツメガエル」第85回日本動物学会, 東北大学, 仙台市(2014年9月)
- 柏木昭彦・柏木啓子・花田秀樹・鈴木賢一・鈴木厚・竹林公子・古野伸明・田澤一朗・倉林敦・中島圭介・小林里美・竹中純子・杉原麻美・山本卓・住田正幸 「近交系ネツタイツメガエルを用いた生命科学」第37回日本分子生物学会, パシフィコ横浜, 横浜市(2014年11月)

○各種研究員と外国人留学生の受入状況

1. 外国人留学生

該当なし

2. 外国人客員研究員

該当なし

3. 研究員

該当なし

○研究助成金の受入状況

1. 科学研究費補助金

矢尾板芳郎

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(研究分担者)

基盤研究(C)「TALENによる両生類変態の分子機構の解明 ～ほ乳類の出生は変態か～」
2,080千円(研究代表者)

中島圭介

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」1,900千円（研究代表者）

基盤研究(C)「TALENによる両生類変態の分子機構の解明～ほ乳類の出生は変態か～」

200千円（研究分担者）

田澤一朗

基盤研究(C)「TALENによる両生類変態の分子機構の解明～ほ乳類の出生は変態か～」

200千円（研究分担者）

2. 共同研究

該当なし

3. その他

該当なし

○学界ならびに社会での活動

1. 学協会役員・委員

中島圭介

・文部科学省第3期NBRP「ネッタイツメガエル」課題管理協力者

高瀬 稔

・公益法人日本動物学会中国四国支部会計委員

2. セミナー・講演会開催実績

該当なし

3. 産学官連携実績

該当なし

4. セミナー・講義・講演会講師等

高瀬 稔

平成26年度 国際生物科学オリンピックチューター教育（生物分野）1人参加（国際生物科学オリンピック代表選抜者）「両生類の解剖」広島大学理学研究科附属両生類研究施設，2014年5月24日

5. その他

該当なし

○国際共同研究

矢尾板芳郎・中島圭介

・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」

○特記事項

矢尾板芳郎・中島圭介

- ・原著論文「Highly efficient gene knockout by injection of TALEN mRNAs into oocytes and host transfer in *Xenopus laevis*. *Biology Open*, 4(2): 180-185.」がXenopus 生物学の国際総合情報ホームページ(Xenbase)の表紙に採用された

○大学院教育

1. 大学院生の国内学会発表実績

◎中井裕也・中島圭介・矢尾板芳郎 「ツメガエルにおける *ouro* 遺伝子ノックアウト」
第 85 回日本動物学会, 仙台市(2014 年 9 月)

2. 大学院生の国際学会発表実績

該当なし

3. 修士論文発表実績

該当なし

4. 博士学位

該当なし

5. TAの実績

中井裕也：生物科学基礎実験，生物学実験A

6. 大学院教育の国際化 ← 国際化への対応等

矢尾板芳郎・中島圭介・田澤一朗

発生遺伝学演習を英語化

B) 「進化多様性・生命サイクル」研究グループ

平成26年度構成員：住田正幸（教授，施設長[10月まで]），鈴木 厚（准教授），
倉林 敦（助教），Islam Mohammed Mafizul（特任助教），
竹林公子（研究員），
Hasan Mahmudul（研究員[4月のみ]）
特任助教[グローバルキャリアデザインセンター所属：5月より]

○研究活動の概要

本研究グループでは，分子生物学的手法や交雑実験を用い，両生類における種の多様性やゲノムの分子進化プロセスの究明を目的とした研究を推進している。さらに，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，新たなモデル両生類となりうる透明ガエルの実験的アプリケーションの開発を進めている。また，両生類初期胚を用いた誘導因子による形態形成機構，誘導因子に対する細胞応答制御機構と幹細胞からの細胞分化機構，およびツメガエルの比較ゲノム解析に関する研究を展開している。さらに，英米ツメガエルリソース拠点との共同研究，国際ツメガエルデータベース拠点との連携を行い，国際的なリソース拠点ネットワークの形成を推進している。国際連携活動は，文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトの一環として行なっており，この他にcDNAと全ゲノムBACライブラリーを含む遺伝子リソース整備，実験技術講習会などの研究サポート・教育サービスも展開している。平成26年度の研究内容は以下の通りである。

1. 沖縄・鹿児島県産絶滅危惧種両生類の累代飼育

絶滅危惧両生類の域外保全を目的とし，これまでに人工繁殖・飼育下繁殖に成功した，沖縄・鹿児島県産絶滅危惧種両生類について累代飼育を継続している。これまでに，アマミシカワガエルについては，F2が得られているが，それ以外の種については，F1子孫までの樹立に留まっている。今後もF2以降の子孫獲得と長期維持を目的に飼育を継続する予定である。姉妹種であるオットンガエル・ホルストガエルの交配後隔離の程度を明らかにするために，精子形成および減数分裂の観察を行い，その結果両者間雑種子孫の精子形成と減数分裂像には異常が見られず，交配後隔離はほとんど発達していないことが示唆された。

2. 絶滅危惧種トラフガエルにおける集団構造の解明

バングラデシュでは乱獲等によりトラフガエルが野外で激減している。本種の保全を最終的な目標とし，バングラデシュ全域における本種群の遺伝的多様性と遺伝構造を明らかにすることを目的とした研究を実施し，本年度は集団解析用のマイクロサテライトマーカーを開発した。

3. バングラデシュ産トラフガエル類の交配後隔離

トラフガエルと最近本グループが記載したその近縁種（ハマトラフガエル）間の交配後隔離（精子形成および減数分裂）を調査するため，繁殖子孫を維持し，性成熟を待った。今年度は性成熟まで至らなかった為，来年度以降に組織・核型解析を実施する。

4. 絶滅危惧種における精子凍結保存法

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。昨年度から絶滅危惧種における精子凍結保存に関する研究を実施しているが、本年度もこれを継続した。

5. 両生類皮膚粘液における細菌叢の解明

両生類の皮膚粘液には多様な細菌が存在し、様々な役割を果たしていると考えられるが、その細菌は生息場所や地域に依存するのか、あるいは種や系統に特異的なのかについてはほとんど知見がない。また、カエル・サンショウウオツボカビなどに耐性をもたらず細菌の存在が報告され、絶滅危惧保全の観点からも両生類皮膚粘液細菌叢の理解は重要である。両生類皮膚細菌叢国際プロジェクトに参加し、絶滅危惧種や外来種を中心に両生類皮膚粘液を採取し、上記の課題を明らかにする研究の実施を開始した。今後は環境DNA解析手法を用いて、日本産絶滅危惧両生類の皮膚に存在する細菌を明らかにして行く予定である。

6. 透明ガエル「スケルピオン」の回復

ニホンアカガエルの黒（グレーアイ）・虹色（ブラックアイ）色素細胞欠損二重突然変異体である、透明ガエル「スケルピオン」の表現型をもつ個体が秋頃に絶えた。この回復を図るため、グレーアイとブラックアイ劣性因子をもつ個体を用いて人工繁殖を行った。ブラックアイ・グレーアイの表現型を示す幼生が複数個体得られたが、そのほとんどが発生中に死亡した。これは、グレーアイとブラックアイ表現型個体を維持する為に連続した近親交配を行ってきたことが原因の可能性があり、スケルピオン回復の為に、繁殖時における野生個体の導入の必要性が示唆された。

7. フクラガエル糊粘液成分の解明

主にアフリカの乾燥地帯に分布するフクラガエルは、雌が大きく雄が小さいという性的二型を示し、また地中生活への適応から、前肢がとても短い。その結果、フクラガエルは雄が雌を腕で抱くという通常の抱接が難しい為、皮膚から糊を出し、その糊で接着することで抱接を行うという奇妙な繁殖生態を示す。この現象は60年前に知られていたが、これまでに糊物質が何であるかと言う点は不明であった。本研究では、糊物質とその対応遺伝子を明らかにすることを目的として研究を開始した。SDS PAGEの結果、糊粘液には多数の蛋白質が含まれ、還元・非還元状態で現れる蛋白質バンドの分子量が変化することが分かり、これらが糊物質候補と考えられた。現在、SDS PAGEで現れた蛋白質バンドを質量分析し、また、次世代シーケンサーにより、皮膚のRNA-Seqを行い、糊物質とその遺伝子の絞り込みを行っている。

8. ヘビからカエルへの遺伝子水平伝播の系統地理学的起源の推定

捕食者であるヘビから被捕食者であるカエル類に水平伝播している奇妙な遺伝子（転移因子）を発見した。複数の大陸に分布する複数系統のカエル類について、この遺伝子の存在をサザンハイブリダイゼーションおよびPCR法で確認した所、この水平伝播は世界の多数の地域で、複数回独立に生じたことが示唆された。現在、世界多地域からヘビ・カエルサンプルを収集し、NGSを用いた アンプリコン解析によって、どの地域で、どのヘビ系統か

らどのカエル系統へ、何時頃水平伝播を生じたのか、という点についての解析を進めている。また、研究の過程で、ヘビからカエルだけでなく、ヘビからヘビへの水平伝播が生じた可能性も示唆された。

9. 神経誘導の保証機構に働くネットワークの解明

ヒト胎児先天異常の原因には大きく分けて環境要因と遺伝的要因がある。同じ環境要因にさらされても重症化する場合、逆に症状が出ない場合などがあり、これは個々の遺伝的要因が大きく関与することを示す。中枢神経系が環境要因・遺伝的要因の変化に関わらず発生過程で確実に形成されるためには神経形成の保証機構が必要だと考えられ、保証機構の破綻が先天異常の発症につながる可能性が高い。竹林・鈴木は、FoxB1転写因子が関与する神経誘導の保証機構に着目し、FoxB1と他の制御因子の協調作用を解析することで保証機構に重要な遺伝子ネットワークを明らかにすることを目的としている。これまでに、FoxB1転写因子と同様にBMPシグナルを抑制して神経を誘導するBiz転写因子が、複数の神経マーカーの発現においてFoxB1転写因子と協調作用を示すことがわかった。さらにFoxB1転写因子とは異なり、Biz転写因子とBMPシグナル伝達因子Smad1/5/8との結合が認められないため、両転写因子のBMPシグナルに対する作用点異なる可能性が高いことが示唆された。現在、Biz転写因子の単独過剰発現によるBMPシグナル伝達因子Smad1/5/8各因子の発現レベル変化、タンパク質間の結合変化などについて培養細胞を用いて生化学的に解析をおこなっている。

10. 誘導因子の働きにより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、様々な誘導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・Activin/Nodal）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、当研究グループの鈴木・竹林の発見を含めて、体軸形成の調和機構に関する知見が得られつつある（Funtealba 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した。

11. 誘導因子に対する細胞応答の制御と尾部オーガナイザー形成

受精卵を構成する個々の細胞は、受容した誘導因子に応答して、その分化運命を決定していく。つまり、発生初期には幹細胞として様々な細胞に分化する能力を持ち、誘導因子に対する応答能力も高いが、発生が進行するにつれて応答能力が制限される。しかしながら、多能性の幹細胞状態から細胞応答が次第に制限されていく機構は明確ではない。鈴木・竹林は、この点に着目して中胚葉や神経誘導の制御に働くTGF-betaシグナル伝達経路を抑

制する遺伝子群をスクリーニングし、Oct-25転写因子を単離することに成功している (Takebayashi-Suzuki et al. *Mechanisms of Development* 124, 840-855, 2007)。その後の解析から、Oct-25はBMPシグナルを抑制して神経を誘導するだけでなく、Activin/NodalやFGFのシグナルも調節することが可能で、より広域なシグナルに対する細胞応答を制御することが示されている。今年度は、誘導因子に対する細胞応答をOct-25が制御する機構を明らかにすることを目的として、Oct-25が発現を制御する遺伝子の機能解析を行なった。マイクロアレイを用いた解析からFoxB1を既に単離しているので (Takebayashi-Suzuki et al. *Developmental Biology* 360, 11-29, 2011)、未解析の遺伝子に着目して機能解析を進めた結果、初期胚で過剰発現すると2次尾部構造を誘導する遺伝子を同定することができた。誘導された2次尾部構造におけるマーカー遺伝子発現を調べると、体節（筋肉）持たない尾部構造が形成されており、同定した新規の尾部誘導因子は、尾部オーガナイザー形成に関与する一方で、尾部オーガナイザー領域における細胞応答を部分的に抑制している可能性が示唆された。尾部オーガナイザー領域は、幹細胞様の性質を長期に渡って維持することで新しい細胞を生み出し、尾部を伸長させることが知られている。したがって、今回同定した新規尾部誘導因子は、幹細胞の維持、および誘導因子に対する細胞応答能力を調節・制限する上で重要な役割を果たしていると考え、解析を進めている。

1 2. アフリカツメガエルのゲノム解析、および異質倍数体のゲノム進化

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。アフリカツメガエルは異質4倍体であり、本研究により初めて動物の異質倍数体ゲノムが解読されることになる。既にゲノムが解読された2倍体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が明らかになりつつある。両生類研究施設では、当研究グループの鈴木がプロジェクト開始当時からアフリカツメガエルゲノムBACクローンの複製作業・凍結保存・管理を行なっている。昨年度は、オリジナルプレート（350枚）からの複製・凍結保存作業（計1400枚；基礎生物学研究所IBBPセンターにおける共同作業）と海外リソース拠点への分譲作業（350枚）を行なった。今年度は、全ゲノムのカバー率を上げるために更に追加分150枚のオリジナルプレートからの複製・凍結保存作業（計450枚）を行なった。また、国際共同プロジェクトの推進において、国際スカイプビデオ会議のオーガナイズおよびゲノム解析に必須な遺伝子モデル改善作業等において中核的な役割を果たしている。

1 3. TGF-betaシグナル伝達経路の比較ゲノム解析とその進化

TGF-betaシグナル伝達経路は、Activin/Nodal/TGF-beta経路とBMP経路の2つに大別され、胚発生初期の中胚葉誘導、内胚葉形成、神経誘導や様々な組織・器官の形成に働く重要なシグナル伝達経路である。細胞内外において数多くの調節因子・シグナル伝達因子が同定されており、異質倍数体化を起こして4倍体となったアフリカツメガエルと祖先型の2倍体ゲノムを持つネッタイツメガエルとの比較ゲノム解析を行なうことで、ゲノム倍加に伴うシグナル伝達経路の変化や進化、環境適応など両生類固有の生存戦略の発達などにおいて

重要な知見が得られると考えられる。当研究グループの鈴木は、TGF-betaシグナル伝達経路の構成因子を幅広く調べ、Nodal3遺伝子クラスター、Vgl遺伝子クラスター、ChordinなどのBMPアンタゴニスト遺伝子、Activin受容体遺伝子、Smadシグナル伝達因子に非常に興味深い変化を見出している。比較対象として、FGFシグナル伝達経路の構成因子についても解析を進めており、TGF-betaシグナル伝達経路にユニークな変化が起きていることが、より明確になりつつある。

14. 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、および両生類研究施設が国際的に貢献するために、当研究グループの鈴木が中心となり、両生類研究施設と英国・米国のツメガエルリソース拠点の国際連携を行なっている。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おり、鈴木・竹林は、国際ネットワークを活かした遺伝子リソースの整備・ネッタイツメガエル実験技術講習会の主催などのサービスを充実させている。昨年度は、米国ウッズホールで開催された研究室主宰者会議において、英米のリソース拠点とともに両生類研究施設NBRP事業の招待講演を行い、広島大学の貢献と拠点ネットワークの連携状況を説明した。今年度はさらに発展させて、全世界のツメガエル研究者が一同に集う国際ツメガエル会議(米国カリフォルニア州アシロマで開催)において招待講演を行なった。特に、NBRP事業に止まらず、現在中核的な貢献を果たしているツメガエルゲノム解析におけるBACライブブラリーの国際共有・提供体制等についても紹介した。また、国際ツメガエル会議中に行なわれた、国際ツメガエルゲノムプロジェクト推進会議、国際ツメガエルゲノムプロジェクト/国際ツメガエルデータベース(Xenbase)連携会議、Xenbaseユーザー会議の3つのサブ会議に出席し積極的な意見やデータを提供して議論を行なった。日英米月例ビデオ会議(両生類研(鈴木)―英国リソース拠点(Guille博士)―米国リソース拠点(Horb博士))も継続し、日英米リソース拠点間の連携をさらに強化した。特に、今年度は日英米リソース拠点に国際ツメガエルデータベース拠点(Xenbase)を加えた4拠点国際ビデオ会議も開催して連携を加速させた。拠点間では、プラスミドDNAの共有化・共同解析ならびにカエル系統の共同解析も進行している。これらの活動が評価され、今年度から鈴木が国際ツメガエルデータベース(Xenbase)ツメガエル遺伝子命名委員会(Xenopus Gene Nomenclature Committee)委員および英国ツメガエルリソース拠点(EXRC)運営会議(Strategic Board Meeting)委員に招聘されている。

○発表論文

1. 原著論文

- Uno Y., C. Nishida, C. Takagi, T. Igawa, N. Ueno, M. Sumida, and Y. Matsuda (2015) Extraordinary diversity in the origins of sex chromosomes in anurans inferred from comparative gene mapping. *Cytogenet. Genome Res.*, (in press)
- Igawa T., S. Komaki, T. Takahara, and M. Sumida (2015) Development and Validation of PCR-RFLP Assay to Identify Three Japanese Brown Frogs of The True Frog Genus *Rana*. *Curr. Herpetol.*, 34: 89-94.

- Igawa T., M. Nozawa, M. Nagaoka, S. Komaki, S Oumi, T Fujii, and M. Sumida (2015) Microsatellite Marker Development by Multiplex Ion Torrent PGM Sequencing: A Case Study of the Endangered *Odorrana narina* Complex of Frogs. *J. Hered.*, 106: 131-137.
- Kurniawan, N., T. H. Djong, T. Maideliza, A. Hamidy, M. Hasan, T. Igawa and M. Sumida (2014) Genetic divergence and geographic distribution of frogs in genus *Fejervarya* from Indonesia from mitochondrial 16S rRNA gene analysis. *Treubia*, 41: 1-16.
- Nasrin S., T. Igawa, M. Nozawa, M. M. Islam, M. Hasan, M. S. Alam, M. M. R. Khan, and M. Sumida (2014) Development and characterization of 27 new microsatellite markers of Indian Bullfrog, *Hoplobatrachus tigerinus* and its congeneric species. *Genes Genet. Syst.*, 89: 137-141.
- Shan, X., Y. Xia, R. Kakehashi, A. Kurabayashi, F.-D. Zou, X.-M. Zeng (2014) Complete mitochondrial genome of *Amolops mantzorum* (Anura: Ranidae). *Mitochondrial DNA*: 1-3.
- Haramoto, Y., T. Oshima, S. Takahashi, M. Asashima, Y. Ito, A. Kurabayashi (2015) Complete mitochondrial genome of “*Xenopus tropicalis*” Asashima line (Anura: Pipidae), a possible undescribed species. *Mitochondrial DNA* 25: 1-3.

2. 総説・解説

該当なし

○著書

該当なし

○取得特許

該当なし

○講演

1. 国際会議での招待講演

- ◎Atsushi Suzuki, Akihiko Kashiwagi and Masayuki Sumida “National BioResource Project for *Xenopus*” 15th International *Xenopus* Conference 2014年8月24-28日 Asilomar Conference Center in Pacific Grove, California.

2. 国際会議での一般講演

Kimiko Takebayashi-Suzuki, Hidenori Konishi, Hitoshi Yoshida, Maya Okada, Atsushi Suzuki “Establishment of vertebrate body plan via coordinated regulation of dorsal-ventral and anterior-posterior patterning during early *Xenopus* embryogenesis” 15th International *Xenopus* Conference 2014年8月24-28日 Asilomar Conference Center in Pacific Grove, California.

3. 国内学会での招待講演

鈴木 厚「ナショナルバイオリソースプロジェクト・ネッタイツメガエル」

第47回日本発生生物学会・日本ツメガエル研究会総会（2014年5月 名古屋）

鈴木 厚「ナショナルバイオリソースプロジェクト・ネッタイツメガエル」

第9回XCIJ-MA・第8回日本ツメガエル研究会ジョイント研究集会（2014年11月 相模原）

倉林 敦「非モデル両生類の利用可能性：透明ガエルを中心に」日本実験動物技術者協会平成26年度関西支部秋季広島大会（2014年11月 サテライトキャンパスひろしま 広島）

4. 国内学会での一般講演

- ◎Mahmudul Hasan, June-Shiang Lai, Masayuki Sumida 「Morphological and molecular comparisons of two-striped grass frogs (Anura: Ranidae) from Bangladesh and Taiwan.」日本爬虫両棲類学会 第53回大会 2014年11月8-9日 神戸山手大学 神戸
- ◎Nasrin Sultana, Takeshi Igawa, Masafumi Nozawa, Mohammed Mafizul Islam, Mahmudul Hasan, Mohammad Shafiqul Alam, Md. Mukhlesur Rahman Khan, Masayuki Sumida 「Fine scale genetic divergence among *Hoplobatrachus tigernus* from Bangladesh and neighboring countries elucidated by mitochondrial genes and microsatellite markers.」日本爬虫両棲類学会 第53回大会 2014年11月8-9日 神戸山手大学 神戸
- ◎渡辺 愛・井川 武・柏木昭彦・鈴木 厚・倉林 敦・藤井 保・住田正幸
「次世代モデルリソース・ネッタイツメガエル7系統における近交度及び遺伝的關係」
日本爬虫両棲類学会 第53回大会 2014年11月8-9日 神戸山手大学 神戸
- ◎Mohammed Mafizul Islam, Ryosuke Kakehashi, Shohei Oumi, Seiki Katsuren, Atsushi Kurabayashi, Masayuki Sumida 「Cryopreservation of sperm using endangered and near-threatened frogs from the Ryukyu Archipelago: an ex situ conservation effort.」日本爬虫両棲類学会 第53回大会 2014年11月8-9日 神戸山手大学 神戸
- 小巻翔平・井川 武・林思民・東城幸治・Min Mi-Sook・住田正幸「東アジア産トノサマガエル種群の遺伝子浸透」日本爬虫両棲類学会 第53回大会 2014年11月8-9日 神戸山手大学 神戸
- ◎倉林 敦・住田正幸・大島一彦・Miguel Vences 「ヘビからカエルへの遺伝子水平伝播：発見の経緯と発生頻度の地理的相違」日本爬虫両棲類学会 第53回大会 2014年11月8-9日 神戸山手大学 神戸
- Atsushi Suzuki and Kimiko Takebayashi-Suzuki “Establishment of vertebrate body plan via coordinated regulation of dorsal-ventral and anterior-posterior patterning during early *Xenopus* embryogenesis” 第47回日本発生生物学会 2014年5月27-30日 愛知県名古屋市
- 吉田和史・岡田麻耶・竹林公子・上野直人・鈴木 厚「神経形成に関わるXOct-25転写因子の下流因子の解析」第38回日本分子生物学会年会 2014年11月25-27日 神奈川県横浜市
- 竹林公子・小西秀典・吉田和史・岡田麻耶・鈴木 厚「胚発生初期に背腹と頭尾のパターン形成が調和するしくみ」日本動物学会中国四国支部・県例会 2015年3月3日 広島県東広島市
- 吉田和史・岡田麻耶・竹林公子・上野直人・鈴木 厚「モルフォゲンシグナルの統合に

働く新しい尾部オーガナイザー因子の同定と解析」日本動物学会中国四国支部・県例会 2015年3月3日 広島県東広島市

○鈴木 厚・宇野好宣・豊田 敦・福井彰雅・以下省略(東京大学・名古屋大学・北海道大学・基礎生物学研究所・遺伝学研究所・米国エネルギー省・カリフォルニア大学・テキサス大学を含む他30名)「アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)のゲノム解析と異質倍数体におけるゲノム進化」新学術領域「ゲノム支援」拡大班会議 2014年8月20-21日 神戸市

○各種研究員と外国人留学生の受入状況

1. 外国人留学生

博士後期課程 文部科学省国費留学生 (Sultana Nasrin, バングラデシュ)

2. 外国人客員研究員

該当なし

3. 研究員

該当なし

○研究助成金の受入状況

1. 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)

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」1,040千円 (研究代表者 住田正幸)

基盤研究(B)「ヘビからカエルへの遺伝子水平伝播：起源系統と発生地域の解明および媒介生物の特定」5,070千円 (研究代表者 倉林 敦)

挑戦的萌芽研究「フクラガエルが生殖行為に用いる「糊状物質」の特性と成分の解明および人工繁殖の試み」1,430千円 (研究代表者 倉林 敦)

基盤研究(C)「神経誘導の保証機構に働くネットワークの解明」1,040千円
(研究代表者 竹林公子, 研究分担者 鈴木 厚)

2. 共同研究

鈴木 厚 平成26年度基礎生物学研究所 共同利用研究 個別共同利用研究

「*Xenopus laevis* ゲノムプロジェクト完成に向けたFISH解析およびBACライブラリーの効率的な利用に向けた検討」

3. その他

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(H26年度)11,410千円 (課題代表者 住田正幸 11月以降 柏木昭彦)

○学界ならびに社会での活動

1. 学協会役員・委員

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
- ・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」
課題管理者(10月まで)
- ・国際両生爬虫類学会（World Congress of Herpetology） 執行委員

鈴木 厚

- ・文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクト 課題管理協力者
- ・日本ツメガエル研究集会 組織委員
- ・国際ツメガエルデータベース（Xenbase） ツメガエル遺伝子命名委員会（*Xenopus* Gene Nomenclature Committee） 委員
- ・英国ツメガエルリソース拠点（EXRC） 運営会議（Strategic Board Meeting） 委員
- ・国際誌論文レビューサービス：5誌7件（Developmental Biology, PLOS ONE, International Journal of Developmental Biology, Zoological Science, Proceedings of the Japan Academy, Series B）

倉林 敦

- ・文部科学省第3期NBRP「ネッタイツメガエル」 課題管理協力者
- ・国際誌論文レビューサービス：2誌2件（BMC Research Notes, Amphibia-Reptilia）

竹林公子

- ・文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクト 課題管理協力者

2. セミナー・講演会開催実績

住田正幸・倉林 敦 細胞のかたちと機能プロジェクト研究センター2014年度第1回セミナーの開催 講演者：Miguel Vences 教授（ブラウンシュバイク工科大学・ドイツ）
2014年4月10日

鈴木 厚・竹林公子 細胞のかたちと機能プロジェクト研究センター2014年度第4回セミナーの開催 講演者：三川 隆 教授（University of California, San Francisco）
2014年10月6日

鈴木 厚 細胞のかたちと機能プロジェクト研究センター2014年度第8回セミナーの開催
講演者：田崎 啓 博士（Center for Regenerative Therapies Dresden, Technische Universität Dresden, Germany） 2014年12月22日

倉林 敦 細胞のかたちと機能プロジェクト研究センター2014年度第9回セミナーの開催
講演者：Miguel Vences 教授（ブラウンシュバイク工科大学・ドイツ） 2015年3月6日

3. 産学官連携実績

第61回日本実験動物学会総会，第48回日本実験動物学会技術者協会総会 日本動物科学技術さっぽろ2014におけるナショナルバイオリソースプロジェクト（NBRP）ポスター展示
「高品質な近交系ネッタイツメガエルを用いた生物学の研究」柏木昭彦・柏木啓子・花田秀樹・鈴木賢一・鈴木 厚・古野伸明・田澤一朗・倉林 敦・中島圭介・竹林公子・小林里美・竹中純子・杉原麻美・山本 卓・住田正幸（2014年5月，札幌コンベン

ションセンター，札幌市)

第85回日本動物学会仙台大会におけるナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)ポスター展示 動物学ひろば「重要な実験動物—ツメガエル」柏木昭彦・柏木啓子・花田秀樹・鈴木賢一・鈴木 厚・古野伸明・田澤一朗・倉林 敦・中島圭介・竹林公子・小林里美・竹中純子・杉原麻美・山本 卓・住田正幸 (2014年9月，東北大学，仙台市)

第37回日本分子生物学会におけるナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)ポスター展示 「近交系ネッタイツメガエルを用いた生命科学」柏木昭彦・柏木啓子・花田秀樹・鈴木賢一・鈴木 厚・竹林公子・古野伸明・田澤一朗・倉林 敦・中島圭介・小林里美・竹中純子・杉原麻美・山本 卓・住田正幸 (2014年11月，パシフィコ横浜，横浜市)

4. セミナー・講義・講演会講師等

鈴木 厚

- ・施設訪問者見学者対象 NBRPオープンラボの概要説明 16件
- ・広島県立教育センター主催「第18回生物教材バザール」教材の提供および解説 (2014年5月 東広島)
- ・「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～兵庫県赤穂市立有年中学校「理科おもしろ実験教室」における講演，およびツメガエル卵受精実験等の生物実験教室開催(2014年7月 赤穂)
- ・「両生類を用いた中胚葉誘導・神経誘導の研究と再生医学への応用」名古屋大学医学部における講義 (2014年12月 名古屋)

倉林 敦

- ・「両生類系統学研究2題：パプアヒメアマガエル類の分布拡大ルートについての新仮説・ヘビからカエルへの遺伝子水平伝播」名古屋市立大学
- ・第106回 システム自然科学研究科セミナー および 第33回 生物多様性研究センターセミナー (2014年7月 名古屋市立大学 名古屋)

竹林公子

- ・施設訪問者見学者対象 NBRPオープンラボの概要説明 16件
- ・広島県立教育センター主催「第18回生物教材バザール」教材の提供および解説 (2014年5月 東広島)

5. その他

○国際共同研究

住田正幸

- ・バングラデシュ農業大学 (学部間協定締結校)
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」
- ・国立台湾師範大学台湾
研究テーマ：「アジアの両生類の多様性」

鈴木 厚

- ・米国エネルギー省、カリフォルニア大学、テキサス大学ほか
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, 英国ガードン研究所および米国ウッズホール海洋生物学研究所
研究テーマ:「ネットイツメガエルリソースの系統解析」
- ・英国ポーツマス大学および米国ウッズホール海洋生物学研究所
研究テーマ:「国際ツメガエルリソースの国際拠点形成」

倉林 敦

- ・ブラウンシュバイク工科大学 (ドイツ)・ビショップ博物館 (アメリカ)・南オーストラリア博物館 (オーストラリア)
研究テーマ: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)・コネチカット大学 (アメリカ)・ノースウェスト大学 (南アフリカ)
研究テーマ:フクラガエルが生殖行為に用いる糊状物質の解明
- ・ブラウンシュバイク工科大学 (ドイツ)
研究テーマ:両生類皮膚粘液に存在する細菌類の進化と分布の解明
- ・ビショップ博物館
研究テーマ:パプアヒメアマガエルの種インベントリー
- ・中国科学院成都生物研究所
研究テーマ:無尾類のミトコンドリアゲノムの進化

竹林公子

- ・英国ポーツマス大学および米国ウッズホール海洋生物学研究所
研究テーマ:「国際ツメガエルリソースの国際拠点形成」

○特記事項

鈴木 厚

- ・名古屋大学医学部 非常勤講師 (発生学)

鈴木 厚・竹林公子

- ・近畿大学工学部 学部生に対するツメガエル受精実験と講義の指導 (2014年5~8月)

鈴木 厚・柏木昭彦・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・杉原麻美・竹中純子・宇都武司・難波ちよ・[外部講師:荻野 肇・越智陽城]

- ・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実験技術講習会 開催 (2015年3月)

倉林 敦

- ・TV番組写真提供・取材協力:2件 (テレビ朝日『怒り新党』, テレビ東京『テレビ東京ありえへん∞世界』)

○大学院教育

1. 大学院生の国内学会発表実績:5件

◎Nasrin Sultana, Takeshi Igawa, Masafumi Nozawa, Mohammed Mafizul Islam, Mahmudul Hasan, Mohammad Shafiqul Alam, Md. Mukhlesur Rahman Khan, Masayuki Sumida
「Fine scale genetic divergence among *Hoplobatrachus tigernus* from Bangladesh and neighboring countries elucidated by mitochondrial genes and microsatellite

- markers.」日本爬虫両棲類学会 第53回大会 2014年11月8-9日 神戸山手大学 神戸
- ◎渡辺 愛・井川 武・柏木昭彦・鈴木 厚・倉林 敦・藤井 保・住田正幸
「次世代モデルリソース・ネットアイツメガエル7系統における近交度及び遺伝的關係」
日本爬虫両棲類学会 第53回大会 2014年11月8-9日 神戸山手大学 神戸
- 小巻翔平・井川 武・林思民・東城幸治・Min Mi-Sook・住田正幸「東アジア産トノサマ
ガエル種群の遺伝子浸透」
- 吉田和史・岡田麻耶・竹林公子・上野直人・鈴木 厚「神経形成に関わるXO_{ct}-25転写因
子の下流因子の解析」第38回日本分子生物学会年会 2014年11月25-27日 神奈川県横浜
市
- 吉田和史・岡田麻耶・竹林公子・上野直人・鈴木 厚「モルフォゲンシグナルの統合に
働く新しい尾部オーガナイザー因子の同定と解析」日本動物学会中国四国支部・県例
会 2015年3月3日 広島県東広島市

2. 大学院生の国際学会発表実績
該当なし
3. 修士論文発表実績：1名
渡辺愛子
4. 博士学位：2名
小巻翔平・掛橋竜祐
5. TAの実績：4名
渡辺愛子・坂本詩織・吉田和史・岡田麻耶
6. 大学院教育の国際化 ← 国際化への対応等
該当なし

C) 「遺伝情報・環境影響」研究グループ

平成26年度構成員：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（研究員）

○研究活動の概要

本研究グループの両生類を用いた研究活動は以下の通りである。（1）ネッタイツメガエルの近交化・標準系統の樹立・提供，（2）化学物質の影響，（3）卵形成および卵成熟機構の解明，（4）性決定機構の解明，（5）精子の凍結保存法開発

1. NBRP事業 ネッタイツメガエルの近交化・標準系統の樹立・提供

両生類研究施設は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)主催のナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)事業に参画、良質なネッタイツメガエルを研究者や教育関係者に提供している。ネッタイツメガエルは前途有望な次世代のモデル動物で、アフリカツメガエルにはない注目値する特徴を備えている。科学界に登場してからの日は浅いため、実験動物としては開発途上の状態にある。NBRP事業の目的は、ネッタイツメガエルを標準モデル動物として確立すること、および実験用リソースとしての価値を高めることである。兄妹交配による近交化が順調に進んでいることはマイクロサテライトマーカー解析から明らかになっている。品質改良を重ねた結果、Nigerian H, GoldenおよびIvory Coastはすでに標準系統としての十分に優れた特質を有している。この事業は、ネッタイツメガエルの現有数およそ8000匹、毎年の提供数が7000匹を越えるまでに順調に成長している。ゲノム編集法やトランスジェニック法による遺伝子組換えネッタイツメガエルを作出し、環境化学物質のスクリーニング法の開発等にも役立てている。また、精子凍結のための簡便で確実な方法の開発や、雌性発生2倍体法による同質遺伝子個体群の作製にも着手している。

2. 生活関連物質の影響 実験にはツメガエル類が不可欠

ごく微量の日用品や医薬品が多くの国々の水系で検出されており、ヒトや野生生物への健康被害が懸念されている。それらの物質の中には脂質性の非常に高いものもあり、各種の臓器・組織内での濃縮を指摘する研究者も多い。また半減期の長い物質の場合、長期にわたる影響も考えられる。

私達はツメガエル類の変態アッセイを用いて甲状腺ホルモン作用をかく乱する生活関連物質のためのin vivoおよびin vitroスクリーニングシステムを開発している。そのために、LC50値を求め、さらにはオタマジャクシの生存・成長・変態への影響や甲状腺ホルモン受容体介在性遺伝子発現への影響、臓器への生物濃縮等について多方面から調べている。生活関連物質の生物に対する影響に関する研究には、ネッタイツメガエルとアフリカツメガエルが有用である。

3. 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

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 β 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、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。

4. 除草剤パラコート誘起培養カエル白血球細胞の染色体損傷に対するフェノール系抗酸化剤の機能かく乱

複数の化学物質による化学的変化が生物に与える影響はよくわかっていない。フェノール系抗酸化剤であるビタミンEおよびブチル化ヒドロキシトルエンは脂質過酸化を抑制し、それによって染色体損傷の増加を抑えられていると考えられている。しかしながら、パラコートによって誘起された培養カエル白血球細胞の染色体損傷を抑制することはせず、むしろ染色体損傷を増加させた。このようなことから、パラコートの共存下にあるビタミンEおよびブチル化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。

5. 人工ヌクレアーゼ(CRISPR/CAS)のアフリカツメガエル初期胚への応用

最近、人工ヌクレアーゼによって遺伝子を破壊・改変、場合によっては挿入することができるようになり、ゲノム編集が急速に身近になってきた。それにより、今まで遺伝学が使えなかった生物種にも光が当たるようになった。しかしながら、その改変技術法であるZNF, TALEN法はそれなりに難しく、汎用的でなかった。しかし、2012年に全く新しいタイプの、より手軽で効率的な人工ヌクレアーゼ(CRIPR/CAS)システムが報告された。そこでアフリカツメガエルに来仕手CRISPR/CAS法によるゲノム編集を、メラニン合成酵素である*Tyrosinase*遺伝子に対して行った。その結果、モザイク状のアルビノが生じた。そのような個体で*Tyrosinase*遺伝子に変異が入っている事を確かめた。以上の結果から、CRIPR/CAS法はアフリカツメガエルに対して有効なゲノム編集のツールとなる事が示された。

6. ネットイツメガエルMyt-1遺伝子の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, ネットイツメガエルのMyt1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ている。一昨年クローニングしたネットイツメガエルのMyt1遺伝子の初期発生における機能解析のため, Myt1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(DN)型および機能欠失型の変異体を作製した。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, DN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Myt1遺伝子の機能と一致する。ただ, DN型は卵割が速くなる事が期待されたが, 他のグループの結果から, 結果的に問題ない事も分かった。したがってMyt1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。

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。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ないことが明らかになった。さらに, そのCRS領域のC末側の7アミノ酸が最近, 2極の正常な紡錘体の形成能に関与する事が明らかになった。また, 正常なサイクリンB2は認識するが, B2のN末端には反応しない特別な抗体を作製する事で, 正常なサイクリン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(実際, サイクリンB2のCRSをもったN末は正常なサイクリンB2の局在場所と同じ場所に局在している), 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。

8. 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こと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ことを報告した。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。現在、ネッタイツメガエルのMosとWee1Aのプロモーター領域と思われる部分(翻訳開始点より10kbo上流まで)をクローニングし、GFPの上流に挿入したtransgenic ガエル作製用のベクターを構築した。このコンストラクトや、プロモーターにいろんな欠失を導入したコンストラクトでtransgenic ガエルを作製し、卵特異的な発現に必要な領域を特定する。また、これらの遺伝子のノックアウトも行いたい。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。

9. mTOR情報伝達系の解析

炎症は、生体の損傷に対する組織の反応であり、その反応の一部にはmTOR (mammalian target of rapamycinの略。ほ乳類などの動物の細胞内シグナル伝達に関与するタンパク質キナーゼ。最初にrapamycinの標的タンパク質として見つかったのでこの名前がついた)情報伝達系が関与している。この情報伝達系の研究を進めている。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。また、それらのタンパク質が相互作用するのに必要な領域や、必須なアミノ酸を同定した。

10. 両生類の生活環に対する過重力と強磁場影響

最近の宇宙開発の流れは、短期での宇宙空間での滞在から宇宙空間での生活や火星への移住、などが挙げられる。しかし、宇宙環境中にヒトが長期間置かれたときの健康影響についてはまだよくわかっていない。宇宙環境影響のモデル生物種として、両生類は地上および宇宙空間における各種の実験に用いられてきた。過重力の実験ではアフリカツメガエルの受精卵を2Gまたは5Gに曝露した。また強磁場の実験では11T(-1400T²m⁻¹), 15T(0 T²m⁻¹), 12T(+1200 T²m⁻¹)を若いネッタイツメガエルオタマジャクシに印加した。過重力に曝された胚には多様な異常が認められたが、もっとも多いのが小頭症や小眼症であった。こうした頭部障害を持つ個体では頭部形成に関わる*Wnt*遺伝子の発現が抑えられていること、頭部前方は特に過重力に対する感受性が高いこと、などが明らかになった。強磁場に曝されたオタマジャクシには回転運動や、容器底面で横たわるなどの異常行動が認められた。また頭部への異常も多く観察された。現在、それらの強磁場での仕事を纏めている。

11. 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最適な研究材料である。本種のZW型およびXY型集団では、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ZW型集団ではZW幼生メスの未分化生殖腺において、一方、XY型集団ではXY幼生オ

スで高い発現が観察されている。そこで、*SOX3* 遺伝子のZW卵巣およびXY精巣の分化決定機能を検証するため、昨年度に引き続き、遺伝子導入による機能誘導実験とTALEN法ゲノム編集を用いた機能阻害実験を行った。まず、TALEN法によって昨年度、ZWオス1個体を得たが、今年度はさらに精巣をもつZW2個体を得た。その1個体は右が精巣、左が卵巣であり、精巣の組織では*SOX3* 遺伝子のおよそ半数にmutationが生じていたが、卵巣組織では検出されなかった。一方、XY集団では機能阻害の効果は見られなかった。しかし、Y-*SOX3* 遺伝子をXX受精卵に導入した実験では、XX2個体が精巣を形成した。以上の結果から、*SOX3* はZW型集団において卵巣決定、XY集団では精巣決定の初期因子として機能することが示唆される。

1 2. 性染色体の若返り

Y染色体やW染色体は、構造変化によってひとたびXないしZ染色体との乗り換えが阻害されると、遺伝子退化やトランスポゾンの蓄積が誘導され、ヘテロクロマチン化を伴い矮小化へと向う。ツチガエルのいくつかの集団では、性染色体が形態的に分化しており、とくに、近畿地方ではXY型とZW型の地域集団が近接している。私達が琵琶湖を取り巻く集団を調べたところ、そこでは過去に西のZW集団と東のXY集団がすでに交雑を起し、その結果、新たに進化したZW型集団であることがわかった。この集団の性染色体の分子マーカーを調べたところ、元のW染色体は検出されず、代わりにXY集団のX染色体が新たにW染色体として進化していることがわかった。さらに、この新しいW染色体には致死遺伝子が存在していなかった。従って、致死遺伝子が蓄積した元のW染色体はこの集団では消失し、代わりに致死遺伝子を持たないX染色体がW染色体として進化したことがわかった。これは性染色体の若返り現象として捉えることができる。これまでに知られている性染色体の退化、消失とは逆方向への進化機構である。

1 3. 精子凍結保存法の開発

多数の両生類を飼育するには莫大な時間と労力を要する。これを解消する有力な方法の一つに精子の凍結保存があり、メダカでは簡便で確実なガラス化保存法がすでに確立されている。この凍結保存と解凍復活技術をカエルに応用したところ、ネットアイツメガエル、アフリカツメガエル、トノサマガエル、アマガエル、チョウセンスズガエルで良好な成果が得られている。今後は、遺伝子組換え体や突然変異体等にも広げていく予定である。

○発表論文

1. 原著論文

Xia, Y., Zheng, Y., Miura, I., Wong, P.B., Murphy, R.W., Zeng, X. (2014) The evolution of mitochondrial genomes in modern frogs (Neobatrachia): nonadaptive evolution of mitochondrial genome reorganization. *BMC Genomics* 15:691.

Hanada, H. (2014) Disruption of vitamin E and butylated hydroxytoluene antioxidant function in response to paraquat-induced chromosomal damage in cultured anuran leukocytes. *Biology and Medicine*, <http://dx.doi.org/10.4172/0974-8369.1000222>.

○Hanada, H., Kashiwagi, K., Suzuki, K., Yamamoto, T. and Kashiwagi, A. (2014) Suppression of anuran metamorphosis by synthetic chemicals. *Frogs: Genetic*

Diversity, Neural Development and Environmental Influences. p.73-88. (Nova, Sweden).

○Nakade, S., Sakuma, T., Sakane, Y., Hara, Y., Kurabayashi, A., Kashiwagi, K., Kashiwagi, A., Yamamoto, T. and Obara, M. (2014) Homeolog-specific targeted mutagenesis in *Xenopus laevis* using TALENs. (in press) *In Vitro Cellular & Developmental Biology—Animal*

Sekiguchi, T., Kamada, Y., Furuno, N., Funakoshi, M. and Kobayashi, H. (2014) 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* 19, 449-463

2. 総説・解説

三浦郁夫 (2015) オオサンショウウオの遺伝的地域分化 -西側の集団は過去に一度絶滅を経験したという仮説- *SUZUKURI* 44: 10-11.

○著書

該当なし

○取得特許

該当なし

○講演

1. 国際会議での招待講演

Kashiwagi, A. EXTEND 2010 公開セミナー「Development of Screening System for Thyroid Hormone Disrupting Substances Using *Xenopus* Metamorphosis Assay」(2015年1月, 浜離宮朝日ホール, 東京)

Atsushi Suzuki, Akihiko Kashiwagi and Masayuki Sumida “National BioResource Project for *Xenopus*” 15th International *Xenopus* Conference 2014年8月24-28日 Asilomar Conference Center in Pacific Grove, California.

Miura I. A double sex-determining gene in the frog. IAE seminar, university of Canberra, 6th March 2015 University of Canberra, Canberra, Australia

Miura I. Functional analyses of Sox3 for sex determination in XY and ZW systems in the frog. Mini-workshop, 4th March 2015, University of Canberra, Canberra, Australia.

2. 国際会議での一般講演

Suzuki, K., Kashiwagi, K., Sakuma, T., Kashiwagi, A., Mochii, M. and Yamamoto, T. A novel function of keratin in fin formation in *X. laevis*.

15th International *Xenopus* Conference 2014年8月24-28日 Asilomar Conference Center in Pacific Grove, California.

3. 国内学会での招待講演

- 柏木昭彦 Cryopreservation Conference 2014「両生類における遺伝資源を凍結保存するための統合的な技術開発」(2014年10月, 岡崎コンファレンスセンター, 岡崎市)
- 三浦郁夫 オオサンショウウオの遺伝学的解析 ～極端に小さい地域差が示す進化の道筋～ 安佐動物公園共同研究発表会 (10月12日 2014年 安佐動物公園, 広島市)
- 三浦郁夫 カエルのオスとメスはどのように決まるのか 染色体学会市民公開講演会 ゲノムと性 -オスとメスを決めるからくり- (10月25日(土) 2014年 倉敷市芸文館 アイシアター)
- 三浦郁夫 脊椎動物(両生爬虫類)の性決定 第13回爬虫類・両生類の臨床と病理に関するワークショップ -特集-両生類・爬虫類の系統, 進化と・・・ (11月22日(土) 麻布大学 相模原市)

4. 国内学会での一般講演

- 柏木昭彦・柏木啓子・花田秀樹・鈴木賢一・鈴木 厚・古野伸明・田澤一朗・倉林 敦・中島圭介・竹林公子・小林里美・竹中純子・杉原麻美・山本 卓・住田正幸 「高品質な近交系ネットイツメガエルを用いた生物学の研究」第61回日本実験動物学会総会, 第48回日本実験動物学会技術者協会総会 日本動物科学技術さっぽろ2014 (2014年5月, 札幌コンベンションセンター, 札幌市)
- 北村友也・渡部 稔・吉留 賢・古野伸明 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 中国四国地区生物系三学会合同大会 岡山理科大 (2014, 5月10日～11日)
- 三浦郁夫・尾形光昭・長谷川嘉則・大谷浩己 ツチガエルW染色体のSOX3遺伝子はメスを決定する 日本進化学会第16回大会 (2014年8月22日 大阪)
- 柏木昭彦・柏木啓子・花田秀樹・鈴木賢一・鈴木 厚・古野伸明・田澤一朗・倉林 敦・中島圭介・竹林公子・小林里美・竹中純子・杉原麻美・山本 卓・住田正幸 動物学ひろば「重要な実験動物——ツメガエル」第85回日本動物学会 要旨・ポスター発表 (2014年9月, 東北大学, 仙台市)
- 佐能正剛・中村直樹・鈴木賢一・柏木啓子・花田秀樹・山本 卓・新海 正・杉原数美・藤本成明・北村繁幸・柏木昭彦・太田 茂 環境化学物質におけるカエル甲状腺ホルモン作用のアゴニストおよびアンタゴニスト活性, フォーラム2014衛生薬学・環境トキシコロジー (2014年9月19-20日, つくば市)
- 坂根祐人・佐久間哲史・鈴木美有紀・柏木啓子・柏木昭彦・坂本尚昭・山本卓・鈴木賢一 「アフリカツメガエルにおけるTALENを用いた標的遺伝子の改変」第4回ゲノム編集研究会 (2014年10月6日-7日, 広島市)
- 柏木昭彦・笹土隆雄・柏木啓子・花田秀樹・関 信輔・鈴木賢一・山本 卓・成瀬 清 「両生類における遺伝資源を凍結保存する為の統合的な技術開発 (ネットイツメガエル・アフリカツメガエルを始めとカエル及び, 各種両生類)」2014年10月23日, Cryopreservation Conference (2014年10月23日 岡崎市), 口頭発表およびポスター発表
- 笹土隆雄・柏木啓子・花田秀樹・関 信輔・鈴木賢一・山本 卓・成瀬 清・柏木昭彦

「アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*), ネットアイツメガエル(*X. tropicalis*)を始めとする様々なカエルの精子凍結法の開発」Cryopreservation Conference (2014年10月23日岡崎市)

三浦郁夫・尾形光昭・長谷川嘉則・大谷浩己 XY型とZW型ツチガエルにおけるSOX3遺伝子の性決定に関する機能解析 染色体学会第65回年会 (2014年10月24日 倉敷市)

尾形光昭・三浦郁夫 ツチガエルのXY型とZW型の人工交雑 日本爬虫両生類学会第5回大会 (2014年11月8日 神戸市)

○渡辺 愛・井川 武・柏木昭彦・鈴木 厚・倉林 敦・藤井 保・住田正幸

「次世代モデルリソース・ネットアイツメガエル7系統における近交度及び遺伝的關係」日本爬虫両棲類学会 第53回大会 2014年11月8-9日 神戸山手大学 神戸

○柏木昭彦・柏木啓子・花田秀樹・鈴木賢一・鈴木 厚・竹林公子・古野伸明・田澤一朗・倉林 敦・中島圭介・小林里美・竹中純子・杉原麻美・山本 卓・住田正幸

「近交系ネットアイツメガエルを用いた生命科学」第37回日本分子生物学会(2014年11月, パシフィコ横浜, 横浜市)

○笹土隆雄・柏木啓子・花田秀樹・関 信輔・鈴木賢一・山本 卓・成瀬 清・柏木昭彦
「アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*), ネットアイツメガエル(*X. tropicalis*)の簡便な精子凍結法の開発」第37回分子生物学会年会 (2014年11月27日横浜市)

○各種研究員と外国人留学生の受入状況

1. 外国人留学生

該当なし

2. 外国人客員研究員

該当なし

3. 研究員

該当なし

○研究助成金の受入状況

1. 科学研究費補助金

三浦郁夫

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」

科学研究費挑戦的萌芽研究(代表) 600千円

「XY型からZW型へ性決定機構の進化」

柏木昭彦

平成26~27年度IBBP共同科学研究

「両生類における遺伝資源を凍結保存するための統合的な技術開発」3,000千円(代表)

花田秀樹

平成26~27年度IBBP共同科学研究

「両生類における遺伝資源を凍結保存するための統合的な技術開発」3,000千円(分担)

柏木啓子

平成26～27年度IBBP共同科学研究

「両生類における遺伝資源を凍結保存するための統合的な技術開発」3,000千円（分担）

柏木昭彦・佐能正剛・柏木啓子・花田秀樹・鈴木賢一

平成26～28年度科学研究費基盤C（一般）

「ツメガエル発達過程における化学物質の動態変化と環境毒性影響」400千円（分担）

2. 共同研究

該当なし

3. その他

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
(H26年度) 11,410千円（課題代表者 住田正幸 11月以降 柏木昭彦）

○学界ならびに社会での活動

1. 学協会役員・委員

柏木昭彦

- ・生物遺伝資源委員会委員（国立遺伝学研究所）
- ・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」
課題管理者(11月から)
- ・山陽女子短期大学臨床検査学科客員教授
- ・安田女子短期大学非常勤講師
- ・広島大学総合博物館客員研究員

三浦郁夫

- ・(財)染色体学会・理事
- ・(財)染色体学会・学会賞選考常任委員
- ・Editorial Board of Asian Herpetological Research（編集委員）
- ・Editorial Board of Sexual Development（編集委員）
- ・Editorial Board of Chromosome Science（編集委員）
- ・Editorial Board of Dataset Papers in Biology（編集委員）
- ・キャンベラ大学（豪州）非常勤准教授

古野伸明

- ・文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクト 課題協力者

花田秀樹

- ・日本動物学会中四国支部、会計監査
- ・文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクト 課題協力者

柏木啓子

- ・文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクト 課題協力者
- ・ネッタイツメガエルの作出・維持・管理

2. セミナー・講演会開催実績

柏木昭彦

NBRP-メダカ・NBRP-ネッタイツメガエルによる合同国際トレーニングコース

「Experimental techniques using medaka and Xenopus——The merits of using both」

(2014年9月, 10月, 基礎生物学研究所, 岡崎市) オーガナイザー

柏木昭彦

日本動物学会第85回仙台大会2014シンポジウム ナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)シンポジウム「ネッタイツメガエル」——ツメガエルを用いた機能ゲノム科学研究—— 共済:NBRP広報企画ワーキンググループ(2014年9月, 東北大学, 仙台市) オーガナイザー

柏木昭彦

NBRP「ネッタイツメガエル」運営委員会開催(2014年11月パシフィコ横浜, 横浜市)

三浦郁夫

基礎研究を畜産技術開発につなげるトランスレーショナル型研究拠点-日本型(発)

畜産・酪農技術開発センター 特別セミナー 「精子と卵子の膜融合のメカニズム」

10月17日(金) 30名 広島大学, 東広島 オーガナイザー

3. 産学官連携実績

柏木昭彦・柏木啓子・花田秀樹・鈴木賢一・鈴木 厚・古野伸明・田澤一朗・倉林 敦・中島圭介・竹林公子・小林里美・竹中純子・杉原麻美・山本 卓・住田正幸

「高品質な近交系ネッタイツメガエルを用いた生物学の研究」第61回日本実験動物学会総会, 第48回日本実験動物学会技術者協会総会 日本動物科学技術さっぽろ2014(2014年5月, 札幌コンベンションセンター, 札幌市) ポスター発表

柏木昭彦

第85回日本動物学会仙台大会 2014 シンポジウム ナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)シンポジウム開催 「ネッタイツメガエル」——ツメガエルを用いた機能ゲノム科学研究—— オーガナイザー 共済:NBRP 広報企画ワーキンググループ(2014年9月, 東北大学, 仙台市) 講演者:山本 卓, 荻野 肇, 安岡有理, 鈴木賢一

柏木昭彦・柏木啓子・花田秀樹・鈴木賢一・鈴木 厚・古野伸明・田澤一朗・倉林 敦・中島圭介・竹林公子・小林里美・竹中純子・杉原麻美・山本 卓・住田正幸

第85回日本動物学会仙台大会 動物学ひろば「重要な実験動物——ツメガエル」第85回日本動物学会 要旨・ポスター発表(2014年9月, 東北大学, 仙台市)

柏木昭彦・柏木啓子・花田秀樹・鈴木賢一・鈴木 厚・竹林公子・古野伸明・田澤一朗・倉林 敦・中島圭介・小林里美・竹中純子・杉原麻美・山本 卓・住田 正幸

「近交系ネッタイツメガエルを用いた生命科学」第37回日本分子生物学会(2014年11月パシフィコ横浜, 横浜市) 展示・ポスター発表

柏木昭彦・花田秀樹・柏木啓子・鈴木賢一・宮本 圭

NBRP-メダカ・NBRP-ネッタイツメガエルによる合同国際トレーニングコース開催

オーガナイザーおよび講師「Experimental techniques using medaka and Xenopus——The merits of using both」(2014年9月, 10月, 基礎生物学研究所, 岡崎市)

4. セミナー・講義・講演会講師等

柏木昭彦

第13回未病臨床セミナー「化学物質が及ぼす内分泌かく乱作用」(2014年12月, 国民宿舎みやじま社の宿, 廿日市市)

柏木昭彦

NBRP-メダカ・NBRP-ネッタイツメガエルによる合同国際トレーニングコース
「Experimental techniques using medaka and Xenopus——The merits of using both」
(2014年9月, 10月, 基礎生物学研究所, 岡崎市) 講師

柏木昭彦

山陽女子短期大学臨床検査学科客員教授 前期「生物学」・後期「遺伝子・染色体検査学」を担当

柏木昭彦

安田女子短期大学非常勤講師 前期「人間と環境」を担当

柏木昭彦・古野伸明・三浦郁夫

教養授業『カエルから見た生命システム』を担当

三浦郁夫

カエルの遺伝学 先導科学考究 総合研究大学院大学 11月18日(火) 神奈川県三浦郡葉山町 修士および博士課程後期学生対象

三浦郁夫

遺伝と進化学のエッセンス 放送大学面接授業 放送大学福山学習センター11月11-12日 福山市 放送大学学生対象

三浦郁夫

The Amphibian Genetics Lecture to 3 year conservation ecology students on 'Genetic Variation and Genetic Markers' 2nd March 2015, University of Canberra, Canberra, Australia キャンベラ大学学部3年生対象

花田秀樹

広島大学生物科学科セミナー, 'Acetyl- L-Carnitine Suppresses Thyroid Hormone-Induced and Spontaneous Anuran Tadpole Tail Shortening' 2014年 5月

花田秀樹

NBRP-メダカ・NBRP-ネッタイツメガエルによる合同国際トレーニングコース
「Experimental techniques using medaka and Xenopus——The merits of using both」
(2014年9月, 10月, 基礎生物学研究所, 岡崎市) 講師

花田秀樹

東広島サムエル保育園(東広島市高屋)にて保育園児らを対象にしたカエルに関する講演を行った。2014年7月8日

柏木啓子

NBRP-メダカ・NBRP-ネッタイツメガエルによる合同国際トレーニングコース
「Experimental techniques using medaka and Xenopus——The merits of using both」
(2014年9月, 10月, 基礎生物学研究所, 岡崎市) 講師

柏木啓子

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実験技術講習会講師
(2015年3月)

5. その他

花田秀樹

系統維持班のカエルの維持管理を行うと同時に施設見学者に対して系統維持班のカエルについて説明している

花田秀樹

NBRP「ネットイツメガエル」運営委員会会場設定 (2014年11月, パシフィコ横浜, 横浜市)

花田秀樹

日本動物学会第85回仙台大会2014シンポジウム ナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)シンポジウム「ネットイツメガエル」開催協力者 (2014年9月, 東北大学, 仙台市)

柏木啓子

施設見学者に対してNBRPネットイツメガエルの詳細を説明している。

柏木啓子

NBRP「ネットイツメガエル」運営委員会会場設定および書記 (2014年11月, パシフィコ横浜, 横浜市)

柏木啓子

日本動物学会第85回仙台大会2014シンポジウム ナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)シンポジウム「ネットイツメガエル」開催協力者 (2014年9月, 東北大学, 仙台市)

○国際共同研究

三浦郁夫

- ・キャンベラ大学 (豪州) Dr. Tariq Ezaz 性決定と性染色体の進化に関する研究
- ・成都生物研究所 (中国) Dr. Xiaomao Zeng ツチガエルの進化に関する研究
- ・Leibniz-Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries - IGB Germany Dr. Matthias Stöck カエルの系統進化に関する研究

○特記事項

該当なし

○大学院教育

1. 大学院生の国内学会発表実績

北村友也, 渡部 稔, 吉留 賢, 古野伸明 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 中国四国地区生物系三学会合同大会 岡山理科大 (2014, 5月10日~11日)

2. 大学院生の国際学会発表実績

該当なし

3. 修士論文発表実績

該当なし

4. 博士学位 ← 学位授与実績

該当なし

5. TAの実績

北村友也（生物科学概説A）

6. 大学院教育の国際化 ← 国際化への対応等

古野伸明

分化制御学演習を英語化

D) リーディングプログラムによる特任教員

平成26年度構成員：高橋秀治（特任准教授）

○研究活動の概要

1. アフリカツメガエルのゲノム解読

*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。25年度も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、研究に使用した。また要望に応じて提供している。

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次世代シーケンサでは解読が不可能であるnodal遺伝子クラスター領域（*Xenopus tropicalis*でも解読されていない）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。また、および siamois 遺伝子クラスターについても担当し、その構造、機能、発現パターンを明らかにしている。現在、日米コンソーシアムの努力により、全ゲノムとGene model構築およびgene model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と考えている。また、曾木発生に関わる遺伝子の研究、純系モデル両生類を利用した放射線照射研究、遺伝子編集技術を利用した疾患モデル研究なども行っている。

2. 初期発生に関与する遺伝子の解析

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。

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。26年度はインシュリ

ン関連遺伝子である Insulin3 の解析を行い、この Insulin3 と IGF が、インスリンレセプターやIGFレセプターを介さずに、直接 WNT のリガンド自体とそのレセプターを阻害することによって Wnt シグナルを阻害し、頭部神経形成を促進していることを明らかにした。また、米国との共同研究で次世代シーケンサを利用した 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。初期発生に関わる転写因子の網羅的解析を行い転写ネットワークの解明を試みている。また東京大学との共同研究で 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。

○発表論文

1. 原著論文

©Haramoto Y, Oshima T, Takahashi S, Asashima M, Ito Y, Kurabayashi A. Complete mitochondrial genome of "Xenopus tropicalis" Asashima line (Anura: Pipidae), a possible undescribed species. Posted online on February 25, 2015. (doi:10.3109/19401736.2015.1018213)

Haramoto Y, Oshima T, Takahashi S, Ito Y. Characterization of the insulin-like growth factor binding protein family in *Xenopus tropicalis*. *Int J Dev Biol*. 2014;58(9):705-11. doi: 10.1387/ijdb.150032yi.

Ninomiya H, Mizuno K, Terada R, Miura T, Ohnuma K, Takahashi S, Asashima M, Michiue T. Improved efficiency of definitive endoderm induction from human induced pluripotent stem cells in feeder and serum-free culture system. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2015 Jan;51(1):1-8. doi: 10.1007/s11626-014-9801-y.

Yasuoka Y, Suzuki Y, Takahashi S, Someya H, Sudou N, Haramoto Y, Cho KW, Asashima M8, Sugano S2, Taira M9. Occupancy of tissue-specific cis-regulatory modules by Otx2 and TLE/Groucho for embryonic head specification. *Nat Commun*. 2014 Jul 9;5:4322. doi: 10.1038/ncomms5322.

2. 総説・解説

該当なし

○著書

該当なし

○取得特許

該当なし

○講演

1. 国際会議での招待講演

該当なし

2. 国際会議での一般講演

Yuuri Yasuoka, Yutaka Suzuki, Shuji Takahashi, Haruka Someya, Norihiro Sudou, Yoshikazu Haramoto, Ken Cho, Makoto Asashima, Sumio Sugano, Masanori Taira “Genomics Study of the Spemann-Mangold Organizer: Occupancy of Tissue-Specific cis-Regulatory Modules by Otx2 and TLE/Groucho for Embryonic Head Specification.” 15th International Xenopus Conference, Asilomar (California, USA) (2014年8月24日～30日)

Yoshikazu Haramoto, Tomomi Ooshima, Shuji Takahashi, Makoto Asashima, Yuzuru Ito “Comparative analysis of insulin-like growth factor binding proteins.” 15th International Xenopus Conference, Asilomar (California, USA) (2014年8月24日～30日)

3. 国内学会での招待講演

該当なし

4. 国内学会での一般講演

原本悦和・高橋秀治 (広島大)・小沼泰子・伊藤弓弦・浅島 誠 “Functional analyses of a novel insulin-like factor” 第47回日本発生生物学会, 名古屋 (2014年5月27日～30日)

今井紗綾・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 “内胚葉系列の分化を担う発生準備エンハンサーの形成メカニズムの解析” (今井, 口頭・ポスター発表) 第37回分子生物学会年会, 横浜 (2014年11月25日～27日)

佐藤夢子・柴野卓志・儘田博志・南 航平・細野枝里菜・岡田 甫・高橋秀治・浅島 誠・平良眞規 “眼の初期発生における転写活性調節に関わる細胞周期依存的な Otx2 のリン酸化修飾の役割” (佐藤, ポスター発表) 第37回分子生物学会年会, 横浜 (2014年11月25日～27日)

○各種研究員と外国人留学生の受入状況

1. 外国人留学生

該当なし

2. 外国人客員研究員

該当なし

3. 研究員

該当なし

○研究助成金の受入状況

1. 科学研究費補助金

高橋秀治

科学研究費補助金・基盤研究C 2014年 100万円 (研究代表)

科学研究費補助金・基盤研究C 2013年 15万円 (分担)

科学研究費補助金・基盤研究C 2013年 15万円 (分担)

2. 補助金

高橋秀治

国立大学改革強化推進補助金 2013年 195万円 (分担)

3. 共同研究

高橋秀治

日米アフリカツメガエルゲノムコンソーシアム
自治医科大学 (嶋崎晴雄)
AIST (浅島 誠, 伊藤弓弦, 原本悦和, 二宮裕将)
東京大学 (道上達男)
東京工業大学 (田中利明)

4. その他

該当なし

○学界ならびに社会での活動

1. 学協会役員・委員

高橋秀治

- ・XCIJ日本ツメガエル研究集会 (XCIJ-JXM) 運営委員会委員
- ・Xenopusゲノムプロジェクト (XGP) 推進委員会委員

2. セミナー・講演会開催実績

該当なし

3. 産学官連携実績

該当なし

4. セミナー・講義・講演会講師等

該当なし

5. その他

該当なし

○国際共同研究

高橋秀治

- ・日米アフリカツメガエルゲノムコンソーシアム
- ・スウェーデン Ludwig Institute for Cancer Research Ltd (Jan M. Stenman)
- ・米国カリフォルニア州立大学アーバイン校 (Ken Cho)

○特記事項

該当なし

○大学院教育

1. 大学院生の国内学会発表実績

該当なし

2. 大学院生の国際学会発表実績

該当なし

3. 修士論文発表実績

該当なし

4. 博士学位

該当なし

5. TAの実績

該当なし

6. 大学院教育の国際化 ← 国際化への対応等

高橋秀治

第4回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国際シンポジウム開催 2014年2月14-15日 国際交流委員会委員, 第3回国際シンポジウムWGメンバーとしてシンポジウム運営に参加