

2012年度両生類研究施設研究活動及び研究成果報告書



平成25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

撮影 檜垣俊忠

目次

I. 施設概要	3
II. 教育活動	5
III. 研究活動と研究内容現況	6
IV. 社会活動	18
V. 国際交流活動	20
VI. その他（特記事項）	21
VII. 各部門の研究内容と研究業績	23
発生遺伝学研究部門	23
分化制御機構研究部門	40
多様化機構研究部門	51
学長裁量による特任教員	89
生理生態学研究部門（客員部門）	
プロジェクト研究 ①	95
プロジェクト研究 ②	99
プロジェクト研究 ③	104

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，今年度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。平成24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），助教4（中島圭介、倉林敦、花田秀樹、田澤一朗），特任助教2（竹林公子、柏木啓子），客員教授2（Ezaz Tariq, Merila Juha），研究員（Alam Mohammad Shafiqul, Hasan Mahmudul, 岡田守弘<平成24年9月まで>）、契約一般職員（中島妙子）である。系統維持班の人員の構成は准教授1（高瀬稔、兼任），助教2（花田秀樹、田澤一朗、いずれも兼任），技術員1（宇都武司），契約技能員2（難波ちよ、玉城淳子），契約用務員2（水戸妙子、渡辺八重子）、である。事務室には契約一般職員1（島田歩稀）がいる。

系統維持班では，両生類37種196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，自然・人為色彩突然変異系統，野外種育成系統（近交系），四肢形成異常系統，癌多発系統，遺伝子組換え系統，遺伝子連鎖群解析系統，人工新種系統，核細胞質雑種系統お

よび人為倍数体系統などがある。現在維持している変異系統は50 系統にのぼる。系統維持班では平成 24 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 4500 匹の飼育に加えて、交配系統数：50 系統、飼育幼生数：5571 匹、新しい系統数：9 系統、新しい系統の飼育幼生数：522 匹の系統維持活動を行い、8 系統 1427 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、アズマヒキガエルを 37 件 364 匹、およびフタホシオオロギ 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、昨年度末で一旦終了した。今年度 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、このプロジェクトには 2 名の契約技術職員（小林里美、竹中純子〈平成 24 年 7 月から〉）が従事している。第 3 期 NBRP が 6 月 1 日から新規採択されたことに関連して、両生類研究施設で運営委員会&SiteVisit を 8 月 24 日に開催した。この委員会には、運営委員 5 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系研究科・教授 田村宏治、広島大学大学院理学系研究科・教授 住田正幸：代表機関課題管理者、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：オブザーバー）、NBRP 推進委員会委員 4 名（情報・システム研究機構国立遺伝学研究所・所長 小原雄治：主査、筑波大学生命環境系・教授 漆原秀子、自然科学研究機構基礎生物学研究所・所長 岡田清孝、独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター・特別顧問 森脇和郎）、NBRP 事務局 3 名（事務局長 佐藤清、事務局員 高野道子、平田裕美）、広島大学 3 名（理学研究科長 出口博則、研究企画室長 小佐古学、研究企画主査 伊賀敏明）、課題協力者 9 名（住田正幸、柏木昭彦、鈴木厚、古野伸明、倉林敦、中島圭介、柏木啓子、竹林公子、花田秀樹と田澤一朗は途中参加）が参加し、本事業の概要説明と施設見学のあとで、事業に対するコメントや助言をいただいた。さらに、第 3 期 NBRP 開始記念シンポジウム - 第 3 期への挑戦 - （11 月 21 日）で住田施設長が講演を行い、12 月 11 日～14 日分子生物学会での本リソースを展示し、3 月 13 日～16 日には実験技術講習会を開催した。今年度の保存実績は 7,061 匹、提供実績は 90 件 2,014 匹、論文実績は（当施設で把握している限りで）8 編（内 1 編は nature communication）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いる。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いる。今年で4年目であるため、全学での大型プロジェクト事業報告会(2012年12月11日)で矢尾板教授が成果発表を行った。最終年度の来年には総括として国際シンポジウムを計画している。終了後も、これらの成果をもとに、両生類研究リソースセンターの機能を備え持つ、世界的拠点形成を目指して、新規に概算要求を行っている。

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、今年度から「教養ゼミ」「生物の世界」「自然科学概説A」、教養教育科目「カエルから見た生命システム」、学部生チューター、教務委員などを担当している。来年度には学科専門科目「動物の系統と進化」「実習」を担当予定である。また、来年度から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」を開講予定している。部門制からグループ制と系統維持班の改組について、検討を開始した。

今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、4月26日オープニング講演会で住田施設長が講演を行い、一般公開を開始した。今年度の施設見学者/施設訪問者は32件719人で、その中には、益川敏英博士、高知大学と東京芸術大学の学長などもある。

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15名の研究員、学外海外から34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、徳島大学、鹿児島大学、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、いわき明星大学、芝浦工業大学、基礎生物学研究所、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)、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)、バンガラデシュ農業大学(バンガラシュ)、ブラビジャヤ大学(インドネシア)、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)等がある。

今年度は、6月11日と1月21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及び平成25年度の客員教員と研究員/客員研究員及び次期施設長の推薦を行った。

II. 教育活動

両生類研究施設は、生物科学専攻で両生類発生遺伝学演習、両生類多様化機構学演習、両生類分化制御機構学演習を開講し、細胞と生命、形態形成、性の起源、分類・進化の授業やスロー生物学演習、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

1名、2年に2名、後期1年に2名、2年に2名、3年に1名で合計8名の院生が在学しており、当施設で大学院研究に励んでいる。博士課程前期学生の国内学会発表は4件であり、博士課程後期学生の国際学会発表は2件、国内学会発表は4件である。原著論文発表は博士課程前期学生で1編、博士課程後期学生で6編である。大学院生によるRAは1件であり、TAは4件である。今年度は、博士課程前期学生2名が以下の修士論文により修士号を取得しており、博士課程後期学生1名が、以下の学位論文により博士号を取得している。

修士論文発表実績

中井裕也「ツメガエルの変態期の尾の退縮における *ouro* 遺伝子の役割の検討」
2013年2月
新谷 望「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」2013年2月

博士学位授与実績

柳澤 誠

Effects of hypergravity on gene expression and molecular analysis of head-defects in early *Xenopus* embryos
(アフリカツメガエル初期胚に対する過重力の遺伝子発現への影響と頭部形成異常の分子的解析)
2013年3月23日

学部教育科目として「教養ゼミ」「生物の世界」「自然科学概説A」「カエルから見た生命システム」を分担または担当し、さらに、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。

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すとともに、ノートルダム清心高等学校（広島市）では、高校生受講者約90名に出張講義を行った。倉林助教は安田女子高校で模擬授業の講師を勤めた（H24年12月）。

III. 研究活動と研究内容現況

発生遺伝学研究部門

○研究活動の概要

本研究部門は「種々の両生類を材料として、遺伝学と発生学との新領域を開

拓する。」ことを目標として、昭和42年6月に最初の両生類研究施設の研究部門として創設された。それから40年余りの間に古典的遺伝学的手法や実験動物学的手法に重きを置く研究から、次第に遺伝子工学的手法、細胞生物学的手法なども取り入れて、両生類の発生を分子生物学的視点から考察する研究へと進んでいる。平成24年度には本研究部門では、原著論文11編、総説・解説1編、国際学会での一般講演0件、国内学会での一般講演8件、研究助成金の受入は1件である。研究内容は以下の通りである。

1) ネットアイツメガエルでの遺伝子破壊法の確立およびアルビノ系統の確立

Zinc-finger nuclease (ZFN)法や Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)法は標的遺伝子を破壊するのに優れた方法である。メラニン色素合成に必須である tyrosinase 遺伝子を標的とする ZFN や TALEN を作製して、その mRNA を合成し、ネットアイツメガエル受精卵に注入した。皮膚のメラニン色素を一部欠損するキメラ個体 F0 を複数得た。F0 を交配することによって完全なアルビノネットアイツメガエルを得ることに成功し、アルビノ系統を樹立した。ネットアイツメガエルには今まで、アルビノ系統が無く、その作製が望まれていたので、その樹立はネットアイツメガエル研究者に貢献できる。

更に、TALEN の基幹構造を変化させることにより、ネットアイツメガエルでの標的遺伝子破壊方法を検討した。

2) 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

私たちは、「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。」と考えてきたが、井筒らが「*Ouro* 蛋白質を発現している尾が免疫系により拒絶されて退縮する。」という説を提唱している。「甲状腺ホルモンシグナルによる尾の退縮」と「*Ouro* 蛋白質への拒絶反応による尾の退縮」の関係を探るために以下の実験を行った。

a) *ouro* 1 遺伝子に EGFP 遺伝子を *ouro* 2 遺伝子に mCherry 遺伝子を融合させた発現型ベクターを作製して、幼生尾の筋細胞 (*ouro* 遺伝子が発現していない) に導入した。*ouro* 1 遺伝子と *ouro* 2 遺伝子の筋細胞での過剰発現は、変態最盛期でもその筋細胞死を促進しなかった。

b) 甲状腺ホルモンシグナルを阻止するドミナントネガティブ甲状腺ホルモン受容体を共発現させて、甲状腺ホルモンによる尾の筋細胞死を抑制させても、*ouro* 遺伝子の過剰発現による筋細胞死の促進は尾の退縮時でも観察されなかった。また、*ouro* 遺伝子の過剰発現に関わらず、ドミナントネガティブ甲状腺ホルモン受容体の共発現により、尾の筋細胞死は同様に抑制された。

したがって、*ouro* 遺伝子が発現していない尾の筋細胞では *ouro* 遺伝子を過剰発現させても変態時でさえ細胞死を促進できないと考えられる。

3) 無尾両生類の変態期尾退縮に於ける *Hox* 遺伝子の機能

無尾両生類幼生の尾部では変態期にプログラム細胞死が活発に起こる。一方、胴部では一部細胞死も起きるが、細胞増殖も起こり、結果として尾部のみが消

失する。この予定消失域を決定する機構において、体軸に沿って発現する Hox 遺伝子が重要な役割を担っているのではないかと仮説をたてて、本研究ではそれを検証することを目的としている。

尾部を切断した無尾類幼生をレチノイド処理することによって、尾のかわりに後肢様の構造が生じることが一部のカエルで知られていた。しかし、アフリカツメガエルや本邦産の無尾類ではこの現象は再現されていなかった。この状況下で我々はこの現象を再現させることを試み、本邦産無尾類を用いて初めて成功した。

4) 性転換機構の解析：両生類における精巣卵形成および雌への性転換誘導

本研究では、ツチガエルまたはトノサマガエルを用いて、雄の精巣における卵形成や雄から雌への性転換について調べた。

トノサマガエルおよびネッタイツメガエルの変態完了個体に対して環境化学物質であるビスフェノール A (BPA) やノニルフェノール (NP) を投与すると、トノサマガエルでのみ精巣卵が形成されることをこれまで明らかにしてきた。そこで、性分化後の幼生に対する BPA および NP の精巣卵形成に対する影響について、トノサマガエルに加えて、雌雄どちらにも性転換が誘導される広島県ツチガエルも用いて調べた。その結果、両種共に精巣卵形成が観察され、生殖細胞の減少および精細管の形成不全も観察された。さらにツチガエルでは、卵巣の発達抑制や退化が観察された。今後は広く感受性を持つ広島県ツチガエルをモデル実験両生類として、精巣卵形成機構を詳しく解析する予定である。

また、トノサマガエルにおいても広島県ツチガエルと同様に精巣卵形成が誘導された。そこで、トノサマガエル幼生の性分化前からエチニルエストロジオールを変態期近くまで投与したところ、対照群と比較して卵巣を持つ個体が有意に多く、雌への性転換が示唆された。トノサマガエルでは雌から雄への性転換が良く知られていることから、今回の実験結果からトノサマガエルも広島県ツチガエルと同様に雌雄どちらにも性転換が誘導される可能性が考えられた。今後、再現性を確かめる必要がある。

5) 生殖腺分化機構の解析：ネッタイツメガエル生殖腺分化に対する温度影響

エストロゲン投与により得られたネッタイツメガエル雌（遺伝的雄が性転換したと思われる個体）を用いた戻し交配により、雄が有意に多い幼生集団は得られたが、期待された全雄幼生集団は得られなかった。そこで、飼育条件、特に飼育温度による生殖腺分化への影響を調べた。その結果、高水温では卵巣の発達が悪く、雌の比率が高くなる傾向が見られた。従って、一部の幼生では高温飼育による雄から雌への性転換の可能性が考えられるが、低温域から適温域の飼育においても全雄幼生集団は得られなかった。そこで、全雄幼生集団が得られなかった理由として、ZZ/ZW型と考えられているネッタイツメガエルの性決定機構について再考するなど、飼育温度以外の可能性を考える必要がある。

6) ビタミンE合成アナログのブチル化ヒドロキシトルエンは除草剤パラコート

によって誘導される培養カエル白血球細胞の細胞遺伝毒性を強める

抗酸化物質ビタミンEはヒトや動物の生体で生じる脂質過酸化から防いでい

る。しかしながら、アズなどの化合物と共存下にあるビタミンEはヒト由来の低比重リポプロテインの酸化を促進することが知られている。最近、私は、ビタミンEが除草剤パラコートによって誘導される培養カエル白血球細胞の染色体異常をさらに増加させることを明らかにした。本研究において、ビタミンE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(BHT)もまたパラコートによって誘導される培養カエル白血球細胞の染色体異常をビタミンE同様に増加させることがわかった。この染色体異常の増加は脂質過酸化を抑制する働きのあるスーパーオキシドジスムターゼmimicの

Mn(III) tetrakis(1-methyl-4-pyridyl) porphyrineと過酸化水素のスカベンジャーであるカタラーゼのコンビネーションによって抑制されることもわかった。さらに、パラコートを使用した還元テストの結果、BHTはパラコートを化学的に還元しうることがわかった。以上のことから、BHTはパラコートの電子ドナーとして働き、パラコートを介して増幅される電子はスーパーオキシドなどの活性酸素を誘発し、染色体異常を増加させることが示唆された。

分化制御機構研究部門

○研究活動の概要

分化制御機構研究部門は、卵の分化、生殖腺、体色を決定する機構、環境と内分泌攪乱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24年度には本研究部門では、原著論文8編、著書・総説4編、国際学会での一般講演2件、国内学会での招待講演1件、国内学会での一般講演5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) 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

卵分化機構の研究を、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で進めている。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しない。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、ニシツメガエルのMosとWee1Aのプロモーター領域と思われる部分(翻訳開始点より10kbp上流まで)をクローニングし、GFPの上流に挿入したtransgenicガエル作製のベクターを構築した。このコンストラクトや、プロモーターにいろんな欠失を導入したコンストラクトでtransgenicガエルを作製し、卵特異的な発現に必要な領域を特定する。また、これらの遺伝子のノックアウトも行いたい。このようにして卵特異的な細胞周期調節因子の発現調節機構と機能の解析を行う。

2) 生殖腺性差構築機構の多様性と普遍性

ツチガエルの地域集団は性決定機構および性染色体の分化の程度によって大

大きく5つに分けられる。性染色体が未分化な東日本と東日本集団、そして性染色体の形態が分化したZW集団とXY集団、そして、XY集団からさらに分岐したNeo-ZW集団である。このうち、Neo-ZW集団を除く4つの集団において性ホルモンおよびその阻害剤による性転換の程度には違いが知られている。東日本と西日本の2つの集団は雄から雌、雌から雄への性転換が容易に誘導されるが、ZW型では雌から雄、XY集団では両方向への性転換に抵抗性を示す。今回、性転換に伴って変化する4つの性分化関連遺伝子 (*Dmrt1*, *Cyp17*, *Cyp19*, *Foxl2*) の発現を定量PCRによって調べた。その結果、性転換と強く連鎖して発現が変化する遺伝子は *Cyp19* と *Foxl2* の卵巣分化に関与する遺伝子であることがわかった。とくにZW集団ではZW雌における両遺伝子の高発現が変化せず、それが性転換を拒否する原因と推察された。一方、XY集団ではエストロゲンによる誘導とその阻害処理によって *Cyp19* の発現が変化したにも関わらず性転換は生じなかった。以上の結果と4つの地域集団の系統発生を合わせると、ツチガエルの元祖集団である西日本と東日本集団の生殖腺分化は性ホルモンに高い感受性を示すが、そこから派生したZW集団やXY集団では性ホルモンに対する感受性が失われており、その現象が性染色体の分化や新たな性決定機構の出現と密接に関連していることが考察された。特に、ZW集団ではW染色体上にある *Sox3* 遺伝子の卵巣決定機能が示唆された。今後、さらに詳細に調べていく。

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

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

ツメガエルの卵母細胞や胚ではサイクリンB1とサイクリンB2が主に発現しており、機能差を解析する良い系である。今までに、この系を用いて、サイクリンB1でなくサイクリンB2が正常な紡錘体の形成に関与することを明らかにした。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) 佐渡島で発見されたカエルをサドガエル (*Rugosa susurra*) と命名

佐渡島で発見され、形態的にユニークな特徴をもつカエルについて、これまで遺伝学的調査を行ってきた。今回、原種と予想されるツチガエルとの交雑を

行い、生殖的隔離の存在を調べた。その結果、正逆雑種はほぼすべて雄となり、極めて少数が雌となった。その雌の卵巣は退化的であった。また、雄の精巣内には精子が極めて少なく、もどし交配を行ったところ、わずかに発生した幼生も変態まではほとんど到達しなかった。さらに、鳴き声分析も両者間で著しい違いを明らかにした。以上の結果にもとづき、さらにタイプ標本を採集して外部形態の計測を行うことによって、この佐渡島のカエルをサドガエル (*Rugosa susurra*) と命名した。本種は集団が限定的であるため、既に希少種であり、今後保全に向けた活動も行っていく。

5) 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。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、頭部特異的な遺伝子発現 (Xag, Xotx2, En2) が過重力によって抑制されたが、後脳以降の神経マーカー (Krox20, HoxB9) は、影響を受けていなかった。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、RT-PCR を用いる事より、Wnt のシグナルの下流の遺伝子、Xnr-3 や Siamois の発現が、過重力で抑制されていることを示し、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。

6) TALEN によるアフリカツメガエルの F0 における遺伝子破壊

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

7) 両生類の生活環に対する強磁場の影響

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。カエル胚は、体外受精を行うので胚の観察が容易で、発生も早いことから、磁場の影響を調べるには有用と考えられる。アフリカツメガエルやニシツメガエルを用いて、卵減数分裂から変態までの磁場の影響を調べた。その結果、卵成熟過程において卵の色素の分布に影響を与える事や、初期発生にさまざまな影響を与える事が明らかになった。また、オタマジャクシを強磁場に曝露すると、行動に異常が生じる事もわかった。現在、その行動異常の原因を探っている。

8) mTOR 情報伝達系の解析

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

9) 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

サイトグロビンはミオグロビンやヘモグロビンの仲間、グロビン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。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。

10) Nramp ファミリーの新規バナジウム/プロトン共役輸送体の同定

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。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。

多様化機構研究部門

○研究活動の概要

多様化機構研究部門では、分子生物学的手法や交雑実験に基づいて両生類における種の多様性やゲノム構造の分子進化プロセスを究明するとともに、人工繁殖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24年度には本研究部門では、原著論文8編、総説・解説など4編、国際会議での一般講演13件、国内学会での招待講演2件、国内学会での一般講演12件、研究助成金の受入は6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

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、定量的な条件下での個体生存率の調査、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。その結果、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)

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

3) オットンガエル及び、ホルストガエルにおける新規マイクロサテライトマーカーの開発

オットンガエル (*Babina subaspera*) と、ホルストガエル (*B. holsti*) は、それぞれ奄美大島及び、沖縄島と渡嘉敷島に固有に生息する姉妹種であり、鹿児島県及び、沖縄県における天然記念物である。両種は元々島嶼という狭小な生息域であるのに加えて、森林の伐採による生息域の減少、マングースによる捕食などにより絶滅が危惧されており、IUCN レッドリストにおける絶滅危惧 B1 類に位置付けられている。このような絶滅危惧種の効率的な保全には分子マーカーによる集団構造及び、遺伝的多様性の解明が必要であり、すでにオットンガエルについては、Iwai et al. (2011) により 8 つのマイクロサテライトマーカーが単離されている。しかしながら、個体識別、親子鑑定といったより詳細な分析にはさらに多くの遺伝子座が必要である。また、これらの遺伝子座のホルストガエルでの有効性は確認されていない。そこで、両種における新規マイクロサテライトマーカーの開発を目的として、既存のマイクロサテライトマーカーのホルストガエルにおける増幅及び多型性の有無を確認すると同時に、新規マイクロサテライト遺伝子座の単離を行った。その結果、既知の 8 遺伝子座はすべてホルストガエルにおいて利用可能であり、オットンガエルと同等の十分な多型性を示した。また、新規にプライマーを設計した 16 遺伝子座のうち、オットンガエルにおいて 8 遺伝子座、ホルストガエルにおいて 4 遺伝子座が多型性を示した。最終的にオットンガエル及び、ホルストガエルにおいて利用可能な遺伝子座は、既知の 8 遺伝子座と合計して、それぞれ 16 遺伝子座及び 12 遺伝子座となった。

4) バングラデシュ産のトラフガエルにおける飼育下繁殖

バングラデシュでは乱獲等によりトラフガエル (*Hoplobatrachus 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。本研究では、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。トラフガエル *H. tigerinus* の雌親 2 匹と雄親 1 匹を用いて、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。その結果、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考えられた。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*

の繁殖力は正常であったが、*H. tigerinus*の子ガエルの大量生産にはさらに改善が必要である。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ことがわかった。

5) 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受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、液体窒素の代わりに -80°C のディープフリーザーを用い、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。凍結精子（27時間から1ヶ月、 -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受精を行った結果、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°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受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ものと考えられた。

6) アフリカガエル類 (Afrobatrachia) のミトコンドリアゲノム：ゲノム構造の多様化、遺伝子配置変化メカニズム、および配置変化遺伝子の進化的傾向

アフリカガエル類 (Afrobatrachia) は、2006年に Frost et al.によって新設された、カエル亜目 (Neobatrachia) に属する分類群で、ヒメアマガエル類 (Microhylidae) とアカガエル類 (Natatanura) とともに、アカガエル上科 (Ranoidea) を形成する3つの主要なグループの一つである。アフリカガエル類は、アナホリガエル科・フクラガエル科・サエズリガエル科・クサガエル科の4科を含み、その名の通り、アフリカ大陸にのみに分布する。これら4科の類縁関係は従来不明な点が多く議論が続いていた。最近の研究から、これらの科が単系統群である事が確かめられているが、アフリカガエル類を特徴づける共有派生形質はこれまでに発見されていない。アカガエル上科内でのアフリカガエル類の系統関係についてはコンセンサスが得られていない。本研究では、

(1) ミトゲノムおよび核遺伝子の大量塩基配列情報を用いたアフリカガエル類の系統的位置の解明。(2) アフリカガエル類ミトゲノムにおけるミトゲノム構造変化（遺伝子重複・遺伝子配置変化）の探索。(3) アカガエル上科におけるミトゲノム構造変化に基づく遺伝子配置メカニズムの検証。(4) 重複および配置変化ミトゲノム遺伝子の分子進化傾向の推定を目的とした。本研究の結果、

アフリカガエル類は単系統群となり、さらに、ヒメアマガエル類と姉妹群を形成した。また、アフリカガエル類を特徴づける共有派生形質はこれまでに見つかっていなかったが、今回解析したアフリカガエル類全種のみトゲノムにおいて、通常の WANCY- tRNAs という遺伝子配置から変化した、WNACY-tRNAs という配置が共有されていた。この新たに発見された遺伝子配置は、アフリカガエル類の共有派生形質としてみなせるものと考えられた。アフリカガエル類の中でも、*Hemisus* (アナホリガエル) のみトゲノムの遺伝子配置は、一般的なカエル亜目型とほぼ同じであった。一方で、他の 3 種のみトゲノムは、カエル亜目一般型から大きく逸脱していた。なお、動物のみトゲノムの遺伝子配置変化は、主に複製エラーによって生じる縦列重複を通じて生じると考えられてきた (TDRL モデル)。最近我々は、動物の mt ゲノムで、非縦列重複を説明するために、「第一縦列・第二非縦列モデル」を提唱した。アフリカガエル類のみトゲノムで多く観察された、縦列重複領域内に位置する非縦列重複遺伝子領域は、このモデルと同じプロセスによって、アフリカガエル類のみトゲノムの遺伝子配置変化が生じたことを実証するものであった。

7) 光る透明ガエル「スケルピオン」の作製

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。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ア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。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质と至適温度など、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。

8) ヌマガエル科 3 属 6 種における繁殖隔離機構

ヌマガエル科のカエルにおける交配後隔離機構を明らかにすることを目的に、ヌマガエル科の 3 属 (*Hoplobatrachus*, *Euphlyctis* と *Fejervarya*) から 6 種を使って交雑実験を行ない、雑種について生活力を調べ、成熟期に達した雑種については、形態計測、ミトコンドリア DNA 解析およびアロザイム分析を行うとともに、生殖腺で染色体観察や組織学的観察を行なった。本研究で *Hoplobatrachus* 属と *Euphlyctis* 属の間には、完全な雑種致死による隔離がある

ことがわかった。*H. tigerinus* 雌と *H. chinensis* 雄との雑種は、幼生の段階で発育不全により死亡したが、いくつかの雑種個体は正常に発育して、成熟期まで生き残った。染色体観察と mtDNA とアロザイム酵素分析により、これらの成熟した雑種は、2つの雌親ゲノムと1つの雄親ゲノムからなる異質三倍体であることを確認した。本結果は、異質三倍体が自発的に生産されたことを示唆した。さらに、組織学的観察によって、これらはすべて不妊の雄であることが明らかになった。本研究により、交配後隔離の程度は、系統関係を明確に反映することがわかった。

9) 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

初期発生過程で背腹と頭尾の体軸が形成されると初めて胚の3次元座標が決まり、基本的な体の設計図(ボディープラン)が確立する。背腹軸は腹側化因子(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、それぞれ決定される。胚が正常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、この調和機構の解析は進んでいない。本研究は、アフリカツメガエル胚から機能スクリーニングにより新たに単離したBiz(BMP inhibitory zinc-finger)タンパク質による体軸形成の調和機構を明らかにすることを目的とした。昨年度までに、Bizが腹側化因子BMPのシグナルを抑制して神経誘導(背側化)を引き起こすこと、さらに後方化因子Wntシグナルと協調して頭尾軸形成を調節することを明らかにした。Biz特異的なアンチセンスモルフォリノオリゴ(MO)を初期胚に注入して機能を阻害すると、後方神経マーカーHoxB9の発現が著しく低下したため、Bizが胚の後方形成に必要であることが分かった。一方、背腹軸形成について調べると、Biz MO注入胚では神経マーカーNCAMの発現が著しく低下した。興味深いことに、別の初期神経マーカーSox2の発現は、ほとんど影響を受けなかった。背腹軸形成が進行して背側と腹側にそれぞれ神経と表皮が分化し始めると、神経領域では最初にSox2が発現して神経分化への方向付けが行われ、続いて最終的な神経分化が進むとNCAMの発現が始まることが知られている。したがって、Bizは神経分化初期の方向付け段階ではなく、より後期の神経分化段階に必要であると考えられた。

10) ネットアイツメガエルを活用したBizの機能解析

本研究施設は、本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、ネットアイツメガエルのリソース拠点となった。そこで、アフリカツメガエルに比べて優れた特徴を持つネットアイツメガエルからBiz遺伝子(XtBiz)を単離し、機能解析に利用した。データベースの塩基配列を参考にして、PCR法によりXtBiz遺伝子を得た。次に、XtBiz特異的なアンチセンスモルフォリノオリゴ(XtBiz MO)を作製して機能阻害を行ったところ、尾部構造が縮小する一方、頭部構造が拡大した。この表現型は、アフリカツメガエルを用いたマーカー遺伝子発現解析から予想される表現型と一致していた。さらに、ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション法によって、発生過程におけるXtBiz遺伝子の発現を調べたところ、アフリカツメガエル胚を用いた解析に比べて遙かに良好な結果を得た。したがって、ネットアイツメガエルは、アフリカツメガエルに対して有利な点を持つことを改めて確認できた。これらの結果から、Biz遺伝子は予定神経領域に発現することが明らかになり、Bizが背腹軸と頭尾軸の調和に働く可能性がさらに強まった。

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保証機構の解析

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 が提唱する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、背腹と前後の軸が形成されボディープランが確立される。私たちが単離した FoxB1 転写因子は腹側化因子 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 (Takebayashi-Suzuki *et al.*, 2011)。本研究では、FoxB1 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した。昨年度までの研究から、FoxB1 と、その上流で働く Oct-25 は外胚葉中で feed-forward loop ネットワークを形成し、Oct-25 の働きが低下しても FoxB1 が神経誘導を保証していると考えられた。神経誘導には、外胚葉を裏打ちする中胚葉からのシグナルも重要である。そこで、外胚葉と裏打ちする中胚葉との組織間相互作用を弱めるため、神経外胚葉の一部を切り出して培養すると、FoxB1 機能阻害胚では神経誘導が著しく低下するが、FoxB1 が存在すると神経は正常レベルで誘導されていた。つまり、外胚葉に発現する FoxB1 と中胚葉の間にも、協調的な神経促進作用が存在することが確認できた。以上の結果から、FoxB1 は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と考えられた。

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 (2012年8月～2013年3月)

住田正幸

- ・淡島マリンパーク夏休み「日本のカエル天然記念物」特別展 (2012年7月～8月) (イボイモリ、オットンガエル、ホルストガエルの繁殖個体展示)

住田正幸、井川武、新谷望、Islam M. Mafizul、倉林 敦、大海昌平、勝連盛輝

- ・動物ひろば「見てみよう触ってみよう—多様な動物の世界」で『生きた化石「イボイモリ」と日本一きれいな「イシカワガエル」と内臓透視「スケルピョン」』展示 (大阪大学総合学術博物館) (2012年9月15日)

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 (2012年8月～2013年3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 (2012年8月～2013年3月)

柏木昭彦、鈴木厚

- ・「NBRP メダカ-NIBB 精子凍結・人工授精トレーニングコース」参加（2012年8月、基礎生物学研究所、岡崎）

柏木昭彦、田澤一朗

- ・「第6回 NBRP データベース研究会」参加（2013年3月、国立遺伝学研究所、三島）

柏木昭彦、柏木啓子、花田秀樹、小林里美、難波ちよ

- ・「教材としてのネッタイツメガエルおよびアホロートルの展示」第94回日本生物教育学会（2013年1月、広島大学、東広島）

柏木昭彦、柏木啓子、花田秀樹、小林里美、竹中純子、住田正幸

- ・「ツメガエルって、どんなカエル？」第83回日本動物学会（2012年9月、大阪大学、大阪）

柏木昭彦、柏木啓子、花田秀樹、中島圭介、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35回日本分子生物学会（2012年12月、マリンメッセ福岡、福岡）

○セミナー講演会講師等

矢尾板芳郎

- ・平成24年度 広島県科学オリンピック科学セミナー（生物分野）25人参加「カエルの解剖」2012年11月10日
- ・第4回遺伝子組換え実験安全研修会-遺伝子組換え実験の安全管理・教育訓練-、2012年7月7日、神戸市、神戸大学瀧川記念学術交流会館

矢尾板芳郎、住田正幸、倉林敦

- ・大型プロジェクト事業報告会「先駆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-」2012年12月11日（広島大学）

三浦郁夫

- ・“カエルの性決定：例外が進化を証明する”特別講義 東京大学水産実験所 1月9日（金）2012年 浜松市
- ・“生物と性の進化”放送大学面接授業 放送大学広島学習センター 11月27-28日 2012年 広島市
- ・“トキが見つけた新種のカエル” 東広島市河内地域センター 生涯学習まちづくり出前講座 11月29日（木）2012年 東広島市
- ・“科学研究の原点 -私と生物学-” 広島国泰寺高校 国泰寺科学クラブ 12月15日（土）2012年 広島市
- ・“新種サドガエル進化の謎 ~A new frog species “Sado-gaeru”: its evolutionary mysteries~ 広島大学大学院理学研究科理学融合センター・ランチタイムセミナー 1月22日（火）2013年 東広島市
- ・“トキが見つけた新種のカエル” 広島大学第47回東京イブニングセミナー 3月8日（金）2013年 東京

住田正幸

- ・総合博物館サテライト館オープニング講演会『世界でオンリーワンの両生類

研究施設』 2012年4月26日（広島大学理学研究科）

- ・第3期NBRP開始記念シンポジウム－第3期への挑戦－「ネッタイツメガエルの近交化・標準系統の樹立・提供」2012年11月21日（品川）
- ・第7回国際両生爬虫類会議「両生類景観生態学保全遺伝学」部門9演題座長
2012年8月11日（カナダ、バンクーバー）

鈴木厚

- ・MRC National Institute for Medical Research, London 研究所セミナー講師（イギリス）
- ・第6回日本ツメガエル研究集会・講演「NBRP ネッタイツメガエルの現況」2012年7月14日（立教大学・東京）

○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、学会賞選考常任委員、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
- ・ポーランド科学研究費審査員 (Narodowe Centrum Nauki)

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
- ・米国 Department of Cell, Developmental and Integrative Biology at the University of Alabama at Birmingham 教授選考業績評価者
- ・14th International Xenopus Conference（国際ツメガエル会議、フランス）
ポスター賞選考委員

倉林敦

- ・ISRN Genomics 編集委員

柏木昭彦

- ・広島工業大学および山陽女子短期大学の試験委員

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」

古野伸明

・レンヌ1大学（フランス）Prof. Claud Prigent

研究テーマ：「サイクリン B2 の卵成熟過程における紡錘体形成の機能解析」

三浦郁夫

・キャンベラ大学（豪州）Dr. Tariq Ezaz

研究テーマ：「性染色体に関する研究」

・成都生物研究所（中国）Dr. Xiaomao Zeng

研究テーマ：「ツチガエルの進化に関する研究」

住田正幸

・バングラデシュ農業大学（学部間協定締結校）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学研究所

研究テーマ：「国際ツメガエルリソース拠点形成」

倉林敦

・ブラウンシュバイク工科大学

研究テーマ：「無尾類における転移因子の研究」

○外国人研究員受入れ

住田正幸

・ Aris Soewondo (ブラビジャヤ大学・講師) 2012年6月1日～2012年7月1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) (研究生
2012年10月4日から)

VI. その他（特記事項）

・ 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」が新規に採択され、これに関連して、今年度は主に以下の事業を行った。NBRP 運営委員会&SiteVisit (H24年8月24日)。第3期 NBRP 開始記念シンポジウム-第3期への挑戦-で講演 (H24年11月21日)。3学会での展示説明 (第83回日本動物学会「動物学ひろば」H24年9月、第35回日本分子生物学会H24年12月、第94回日本生物教育学会H25年1月)。ネッタイツメガエル技術講習会開催 (H25年3月13日～16)。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、その成果は両生

類研究施設の紹介記事として、日本経済新聞「知の明日を築く」(H25年3月14日)に取り上げられた。

- 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。理学研究科で4月26日に記念講演会を開催した。
- 理学部・大学院理学研究科公開(2012年11月5日)において研究施設を公開し、およそ300名が見学した。上記とは別に、2012年度には37件総数500名が施設見学をしている。施設見学には、益川敏英先生(ノーベル物理学賞受賞)(2012年10月)および高知大学と東京芸術大学の学長(2012年5月、11月)などがある。
- 花田秀樹助教と田澤一朗助教は附属両生類研究施設で行われている系統保存事業に従事するとともに、総合博物館サテライトのオープンに貢献した。
- 三浦郁夫准教授らは佐渡島に新種のカエルを発見し、サドガエル(*Rugosa susurra*)と命名した。本州のカエルでは22年ぶりの発見であり、佐渡島における最初の脊椎動物固有種の記載である。これは、佐渡島の生物地理学的常識を覆す発見であり、主要新聞をはじめとして国内ほぼ全ての新聞に掲載された(2012年12月11~12日)。またテレビやラジオなどでも紹介され、大きな注目を集めた。
- 絶滅危惧種「アマミイシカワガエル」で人工繁殖による保全の成功について、紹介された(奄美新聞 2013年3月24日)。
- 三浦郁夫准教授は国際ワークショップ“The Workshop on Sex Determination in Dragons, Frogs and Fugu fish”を2013年3月6日、広島大学大学院理学研究科大会議室で開催した(招待講師:国内3名、国外2名)。
- 倉林敦助教はBMC Evolutionary Biology誌、Mitochondrial DNA誌において、論文レビューサービスを行った。
- 鈴木厚准教授と竹林公子特任助教は広島県立教育センター「第16回教材生物バザール」に出展・解説を行った。

VII. 各部門の研究内容と研究業績

[発生遺伝学研究部門]

教授・矢尾板芳郎 (Yoshio Yaoita)

研究内容

両生類の変態（メタモルフォシス）は、甲状腺ホルモンの血中濃度上昇に伴い、幼生から成体へと体の作り替えが起きる現象である。特に無尾両生類の変態は劇的であり、四肢の発生、成長と尾の退縮が連続して起きる。体長の2倍以上の長さである尾が数日のうちに完全に消失する。変態に伴い、ほとんど全ての体内器官が変化していく。このような体の再構成のメカニズムを分子生物学的な立場から明らかにすることを研究目的としている。

1. ネットイツメガエルでの遺伝子破壊法の確立およびアルビノ系統の確立

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

[目的]

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

[成果・考察]

1) メラニン色素合成に重要な役割を果たす tyrosinase 遺伝子を標的として ZFN を合成して、その mRNA をネットイツメガエル受精卵に注入した。皮膚のメラニン色素を一部欠損するキメラ個体 F0 を複数得た。F0 を交配することによって完全なアルビノネットイツメガエルを得ることに成功し、アルビノ系統を確立した。

2) TALEN 法を用いても効率良くアルビノネットイツメガエルを作製できた。

3) TALEN 法として様々なベクターが開発されてきた。それらを同一基準で比較したことにより、DNA 結合部位の N 末、C 末を欠損させることにより標的遺伝子破壊活性が高くなること、ヘテロダイマーを形成するベクターでは毒性が低くなることが明らかになった。

[将来の展望]

F0 で標的遺伝子をすべて破壊する方法や F1 で効率的にホモの変異を有する個体を獲得する手段を開発する。その上で変態に関係すると考えられてきた遺伝子を不活化して、機能を推定していく。

(共同研究者：中島圭介、中島妙子、高瀬稔、岡田守弘、中井裕也)

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

Reexamination of *ouro* gene function in tail regression during metamorphosis of *Xenopus* tadpole

[目的]

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

[成果・考察]

1) *ouro* 1 遺伝子に EGFP 遺伝子を *ouro* 2 遺伝子に mCherry 遺伝子を融合させた発現型ベクターを作製して、幼生尾の筋細胞に導入した。*ouro* 1 遺伝子と *ouro* 2 遺伝子の筋細胞での過剰発現は、変態クライマックスでもその筋細胞死を促進しなかった。

2) ドミナントネガティブ甲状腺ホルモン受容体を共発現させて、甲状腺ホルモンによる尾の筋細胞死を抑制させても、*ouro* 遺伝子の過剰発現による筋細胞死の促進は尾の退縮時でも観察されなかった。

したがって、*ouro* 遺伝子をほぼ発現していない尾の筋細胞で *ouro* 遺伝子を過剰発現させても変態時でさえ細胞死を促進できないと考えられる。

[将来の展望]

今後は TALEN 法を用いて *ouro* 遺伝子を破壊した場合、どのような表現型が出現するかを検討して行きたい。

(共同研究者：中井裕也、中島圭介)

3. 無尾両生類の変態期尾退縮に於ける Hox 遺伝子の機能

The function of the Hox genes during anuran tail resorption

[目的]

無尾両生類幼生の尾部では変態期にプログラム細胞死が活発に起こる。一方、胴部では一部細胞死も起きるが、細胞増殖も起こり、結果として尾部のみが消失する。この予定消失域を決定する機構において、体軸に沿って発現する Hox 遺伝子が重要な役割を担っているのではないかと仮説をたてて、本研究ではそれを検証することを目的としている。

[成果・考察]

尾部を切断した無尾類幼生をレチノイド処理することによって、尾のかわりに後肢様の構造が生じることが一部のカエルで知られていた。しかし、アフリカツメガエルや本邦産の無尾類ではこの現象は再現されていなかった。この状況下で我々はこの現象を再現させることを試み、本邦産無尾類を用いて初めて成功した。

[将来の展望]

レチノイド処理により生じた後肢様構造が成体であることを、成体型マーカー遺伝子発現で確かめる。レチノイド処理による後肢形成における Hox 遺伝子の発現変化と変態期細胞死および成体器官発生との関係を調べる。

(共同研究者：田澤 一朗)

研究業績

①原著論文

1. Keisuke Nakajima, Yuya Nakai, Morihiro Okada and Yoshio Yaoita
Targeted gene disruption in the *Xenopus tropicalis* genome using designed TALE nucleases
Zoological Science, in press
2. Morihiro Okada, Ichiro Tazawa, Keisuke Nakajima and Yoshio Yaoita
The expression of the *amelogenin* gene in the skin of *Xenopus tropicalis*
Zoological Science **30**(3), 154-159, 2013
3. Keisuke Nakajima, Taeko Nakajima, Minoru Takase & Yoshio Yaoita
Generation of albino *Xenopus tropicalis* using zinc-finger nucleases
Development, Growth & Differentiation **54**, 777-784, 2012
4. Keisuke Nakajima, Kenta Fujimoto and Yoshio Yaoita
Regulation of thyroid hormone sensitivity by differential expression of the thyroid hormone receptor during *Xenopus* metamorphosis
Genes to Cells **17**, 645-659, 2012
5. Morihiro Okada, Keisuke Nakajima, Yoshio Yaoita
Translational regulation by the 5'-UTR of thyroid hormone receptor α (TR α) mRNA.
J. Biochemistry **151**, 519-531, 2012

②総説・著書

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

年

③学会発表

国内学会

1. 岡田守弘、中島圭介、矢尾板芳郎

甲状腺ホルモン受容体 α mRNA の翻訳を抑制する 5'非翻訳領域の解析

第 53 回日本生化学会中国四国支部例会、2012 年 5 月 18 日、岡山市、岡山大学キャンパス

2. 矢尾板芳郎

検討中の拡散防止措置の例—カエル

第 4 回遺伝子組換え実験安全研修会—遺伝子組換え実験の安全管理・教育訓練一、2012 年 7 月 7 日、神戸市、神戸大学瀧川記念学術交流会館

3. 中島圭介、中井裕也、岡田守弘、高瀬稔、矢尾板芳郎

ネットイツメガエルにおけるノックアウト法の活用

第 83 回日本動物学会、大阪（2012 年 9 月 14 日）

4. 中井裕也、中島圭介、矢尾板芳郎

アフリカツメガエルの変態期の尾の筋細胞における Ouro の強制発現

第 83 回日本動物学会、大阪（2012 年 9 月 15 日）

5. 中島圭介、中島妙子、岡田守弘、矢尾板芳郎

Zinc-finger nucleases (ZFNs) を用いたアルビノ *Xenopus tropicalis* の作製

第 35 回日本分子生物学会年会、福岡（2012 年 12 月 12 日）

国際学会

該当なし

④科研費等の受け入れ状況

該当なし

准教授・高瀬 稔 (Minoru Takase)

研究内容

1. 性転換機構の解析： トノサマガエル幼生へのエストロゲン投与による生殖腺への影響

Analysis of mechanism of sex reversal in amphibians: Effects of estrogen on the gonad of the frog *Rana 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。

特に、すでに分化した生殖腺から精巣または卵巣への性転換現象には、

①脱分化・リプログラミングからなるとされる分化転換機構および生殖細胞などの生殖腺を形成する細胞の性分化機構

②幹細胞から生殖細胞などの生殖腺を形成する細胞への性分化機構

などの作用機構が、少なくとも一部には働いていることが考えられる。

これまで実験材料として、性ホルモン投与により雄へも雌へも性転換が誘導される利点を持つ広島県ツチガエル (*R. rugosa*) を主な実験材料として用いてきた。本研究では、ツチガエル同様に両方の性に性転換が誘導される種を見つけるために、アンドロゲンによって容易に雌から雄へ性転換が誘導されるトノサマガエル (*R. nigromaculata*) を用いて、性分化前から変態期までの長期間にエストロゲンを投与した時の性転換の有無を調べた。

[材料・方法]

材料には富山県で採集したトノサマガエルを用いた。人工媒精により受精卵を得て、受精後 10 日目の幼生を 2 匹/リットル飼育水で飼育し、人工エストロゲンであるエチニルエストラジオール (EE2) を終濃度が 0.3 および 3.0、30 nM になるように、それぞれ飼育水に添加した。その後、一日おきに EE2 を含んだ新しい飼育水に交換し、TK ステージ XX まで飼育した後に生殖腺を取り出した。取り出した生殖腺をブアン液に固定し、厚さ 7 mm のパラフィン薄切切片を作成した後にヘマトキシリン染色を行い、検鏡した。対照群として、溶媒である DMSO を飼育水に添加した。

[成果]

EE2 の 0.3 および 3.0 nM 処理では正常な精巣を持つ個体は見られなかったが、精巣卵を持つ個体が見られ、出現率はそれぞれ 14.3% および 12.5% であった。30 nM 処理では、全ての幼生は卵巣を持っていた。一方、対照群の性比は雄：雌 = 4 : 5 であった。

[考察]

今回、広島県ツチガエルの他に、富山県トノサマガエルも低濃度の性ホルモン投与により雄へも雌へも性転換が誘導される可能性が示唆された。富山県トノサマガエルは広島県トノサマガエルとは異なり、野外の雄において高率に精

巢卵が観察される。その原因が遺伝的背景によるのか、環境化学物質によるのかは研究中であるが、もしかしたら何らかの遺伝的背景が影響しているのかも知れない。

[将来の展望]

今回、EE2 の最小投与量においても高率に卵巢が誘導された。さらに低濃度のEE2 を投与し、濃度依存的に卵巢の誘導率が変化することを確かめる必要がある。また、広島県トノサマガエルの幼生を用いて、エストロゲン投与による性転換の有無を調べる必要がある。様々な両生類種における性転換現象を比較することにより、将来的に両生類性転換の共通機構が明らかになっていくことが期待される。

2. 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の影響

Analysis of mechanism of sex reversal in amphibians: Influences of estrogenic chemicals on the gonads of the frogs, *Rana rugosa* and *R. nigromaculata*

[目的]

これまで、トノサマガエルおよびネツタイツメガエルの変態完了個体に対して環境化学物質であるビスフェノールA (BPA) やノニルフェノール (NP) を投与したところ、トノサマガエルでのみ精巢卵が形成されることを明らかにしてきた。本研究では、トノサマガエルおよび広島県ツチガエルの性分化後の幼生に環境化学物質を投与した時の生殖腺への影響を組織学的に調べた。

[材料・方法]

野外個体において精巢卵出現率が異なる広島県および富山県のトノサマガエル、および広島県ツチガエルの TK ステージ X の幼生にノニルフェノール (NP) およびビスフェノール A (BPA) を飼育水に添加し、TK ステージ XX まで連続投与した。投与後に生殖腺を取り出し、組織学的解析を行った。対照群として、溶媒である DMSO を飼育水に添加した。

[成果]

両種共に精巢卵形成に加えて、生殖細胞の減少および精細管の形成不全が観察された。さらにツチガエルでは、卵巢の発達抑制や退化が観察された。

[考察]

ネツタイツメガエルおよびトノサマガエル (広島県産および富山県産)、ツチガエル (広島県産) の両生類 3 種の中では、広島県ツチガエルの生殖腺がより広く環境化学物質の影響を受けることが確かめられた。また、トノサマガエルにおいても、環境化学物質の影響を強く受けることが示された。ネツタイツメガエルは、エストロゲンにより性転換は誘導されるが、臨界期は限定的である。一方、ツチガエルおよびトノサマガエルはアンドロゲンにより性転換は誘導さ

れ、長い臨界期を持つ。また、エストロゲンによる性転換は、広島県ツチガエルにおいてすでに確かめられており、富山県トノサマガエルにおいても近年示唆された（研究内容1.を参照）。性分化後における環境化学物質の精巣卵形成作用は環境化学物質が持つと考えられている性ホルモン様作用とは異なると考えられるが、環境化学物質の影響と性転換能との間に何らかの関係があるのかも知れない。

[将来の展望]

今後、環境化学物質による精巣卵形成機構を解析するためのモデル実験両生類として広島県ツチガエルを用いて、精巣卵形成過程において発現変化する遺伝子を探索する予定である。精巣卵形成を誘導する環境化学物質作用は、性ホルモン様作用とは異なると考えられるため、生殖細胞分化に関するユニークな因子が同定されることが期待される。

3. 両生類生殖腺分化機構の解析：ネッタイツメガエル幼生の生殖腺分化に対する飼育温度の影響

Analysis of mechanism of gonad differentiation in amphibians: Influences of breeding temperature on the gonad of the tadpole 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材料になる。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。そして、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、戻し交配を行ったところ、雄が有意に多い幼生集団は得られるが、ほぼ全てが雄からなる幼生集団は得られなかった。そこで本研究では、飼育条件、特に飼育温度による性転換の可能性を調べた。

[材料・方法]

幼生期にエストロゲン処理したネッタイツメガエルの雌を用いて戻し交配を行い、得られた幼生をNFステージ45から水温20および22-23、24、26、28℃で飼育し、変態完了期の生殖腺を組織学的に解析した。

[成果]

全体的に、水温が高くなると雌の比率が高くなる傾向が見られた。しかし、ほとんど全てが雄からなる集団を安定して得ることはできなかった。また、水温20および28℃の飼育では、発達が遅れた卵巣が多く観察される傾向が見られた。

[考察]

高温飼育により、卵巣の分化や発達が影響を受ける可能性が示唆された。一

部は、雄から雌への性転換が誘導される可能性も考えられる。しかし、適温飼育を行ってもほとんど雄からなる幼生集団を安定して得ることはできなかった。従って、全雄幼生集団が得られない原因として、温度による雄から雌への性転換以外の可能性を考える必要がある。ネッタイツメガエルの性決定機構は遺伝学的に未だ確かめられていない。ZZ/ZW型の性決定機構を持つアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の近縁種であること、さらに ZZ/ZW型の性決定機構を持つ両生類種によく見られるエストロゲンによる雄から雌への性転換が観察されることから、ネッタイツメガエルの性決定機構はZZ/ZW型であると推察される。しかし、今回の異なる飼育温度における全ての幼生をまとめて性比を調べてみると、雄：雌=約3.4：1になる。これは、ネッタイツメガエルの性決定機構がXX/XY型であり、YY個体が生存可能であると仮定した場合の性比（雄：雌=3：1）に近い値である。また、アフリカツメガエルの卵巣分化誘導遺伝子である *DM-W* のオルソログがネッタイツメガエルからは単離されていない。従って、今後ネッタイツメガエルの性決定機構についても確かめる必要があると考える。

[将来の展望]

人工交配によりネッタイツメガエル全雄幼生集団を得ることができれば、ネッタイツメガエルの性転換・性分化機構を解析するための大変有用な材料になると考える。また、ネッタイツメガエルの性決定機構が確かめられた場合、アフリカツメガエルにおける性決定機構との比較から、大変興味深いテーマになる可能性がある。

研究業績

①原著論文

1. Takase M., Shinto H., Takao Y., Iguchi, T. (2012) Accumulation and pharmacokinetics of estrogenic chemicals in the pre- and post-hatch embryos of the frog *Rana rugosa*. *In Vivo* 26, 913-920.
2. Oka T., Mitsui-Watanabe N., Tatarazako N., Onishi Y., Katsu Y., Miyagawa S., Ogino Y., Yatsu R., Kohno S., Takase M., Kawashima Y., Ohta Y., Aoki Y., Guillette L.T. Jr. and Iguchi T. (2012) Establishment of transactivation assay systems using fish, amphibian, reptilian and human thyroid hormone receptors. *J. Appl. Toxicol.* doi: 10.1002/jat.2825.
3. Nakajima K., Nakajima T., Takase M., Yaoita Y. (2012) Generation of albino *Xenopus tropicalis* using zinc-finger nucleases. *Dev. Growth Differ.* 54, 777-784.

②総説・著書

該当なし

③学会発表

国内学会

高瀬 稔 「性分化後のツチガエルおよびトノサマガエルの生殖腺に対する
ノニルフェノールおよびビスフェノール A の影響」 環境ホルモン学会、

12/18-19、2012、東京.

国際学会
該当なし

④科研費等の受け入れ状況

科学研究補助金 基盤研究 (C) 「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 1,200 千円.

助教・中島圭介 (Keisuke Nakajima)

研究内容

1. ネットアイツメガエルにおける遺伝子破壊法の開発およびアルビノ系統の確立

The development of gene knock-out methods and the generation of albino *Xenopus tropicalis* line

[目的]

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

[材料・方法]

1) Sigma 社より購入したタイロシナーゼ遺伝子を破壊する ZFN の mRNA をネットアイツメガエルの受精卵にインジェクションし、体の一部でタイロシナーゼ遺伝子を欠失した個体、つまり体の一部が白い個体を作成する。この個体同士を掛け合わせ、タイロシナーゼ遺伝子を全く持たないアルビノ系統を確立する。

2) Golden Gate cloning 法を用いて、タイロシナーゼ遺伝子を破壊する TALEN を作成する。1) と同様にタイロシナーゼ遺伝子を一部欠失したキメラ個体を作成する。

[成果と考察]

ZFN 法によりタイロシナーゼ遺伝子を一部欠失したキメラ個体を得ることができた。さらにこのキメラ個体同士を交配させ、世界初の完全なアルビノネットアイツメガエルを作成した。また、Golden Gate cloning 法を用いて作成した TALEN が目的配列を切断する活性を持つこと、この変異が生殖細胞に導入されて次世代に伝わる事を確認した。この第一世代の TALEN よりも活性の強い GoldyTALEN、さらに DNA 切断酵素のホモ 2 量体化を抑えて毒性を弱めた ELD/KKR、2 量体化を抑える別のタイプである DAD/RVR、活性が更に 1.5 倍強いと報告された Sharkey 変異体等の活性と毒性を比較した。この結果 ELD/KKR タイプの GoldyTALEN が最も活性と毒性のバランスが優れている事を確認した。

ZFN 法は効果的では有るが、自分で作成するには技術的な困難が伴う。また、外注した場合は高額な研究費が必要となり、多種類の遺伝子破壊を行うことは現実的に不可能である。一方、初期の TALEN 法は ZFN 法と比較して活性は弱いものであったが、様々な改良により今では ZFN の数倍の活性と低毒性を獲得しており、低予算で自作できるという利点も有る。これらのことから今後は TALEN 法が主流となっていくものと思われる。

[将来の展望]

TALEN 法を用いて変態に関わると考えられている様々な遺伝子を破壊し、変態期の分子機構を明らかにしていく。同時に TALEN 法に更なる改良を加え、F0 で完全な遺伝子破壊個体を得る方法を模索する。

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

[目的]

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

[成果・考察]

1) *ouro* 1 遺伝子に EGFP 遺伝子を *ouro* 2 遺伝子に mCherry 遺伝子を融合させた発現型ベクターを作製して、幼生尾の筋細胞に導入させた。*ouro* 1 遺伝子と *ouro* 2 遺伝子の筋細胞での過剰発現は、変態クライマックスにその筋細胞死を促進しなかった。

2) ドミナントネガティブ甲状腺ホルモン受容体を共発現させて、甲状腺ホルモンによる尾の筋細胞死を抑制させても、*ouro* 遺伝子の過剰発現による筋細胞死の促進は尾の退縮時でも観察されなかった。

したがって、*ouro* 1 遺伝子や *ouro* 2 遺伝子をほぼ発現していない尾の筋細胞で過剰発現させても変態時の細胞死を促進できないと考えられる。

[将来の展望]

今後は TALEN 法を用いて *ouro* 遺伝子を破壊した場合、どのような表現型が出現するかを検討して行きたい。

研究業績

①原著論文

1. M. Okada, I. Tazawa, K. Nakajima and Y. Yaoita
Expression of the amelogenin Gene in the Skin of *Xenopus tropicalis*
Zoological Science 2013 Mar; 30(3): 154-159

2. K. Nakajima, T. Nakajima, M. Takase and Y. Yaoita

Generation of albino *Xenopus tropicalis* using zinc-finger nucleases
Development Growth & Differentiation 2012 December; 54(9): 777-784

3. K. Nakajima, K. Fujimoto and Y. Yaoita
Regulation of thyroid hormone sensitivity by differential expression of
the thyroid hormone receptor during *Xenopus* metamorphosis
Genes to Cells 2012 August; 17(8): 645-659

4. M. Okada, K. Nakajima and Y. Yaoita
Translational regulation by the 5' -UTR of thyroid hormone receptor α
mRNA
Journal of Biochemistry 2012 May; 151(5): 519-531

②総説・著書
該当なし

③学会発表
国内学会

1. ZFN-finger nuclease (ZFNs) を用いたアルビノ *Xenopus tropicalis* の作
製

中島圭介、中島妙子、高瀬稔、矢尾板芳郎
第 35 回日本分子生物学会年会、博多(2012, 12.12)

2. ネットアイツメガエルにおけるノックアウト法の活用

中島圭介、中井裕也、岡田守弘、高瀬稔、矢尾板芳郎
第 83 回日本動物学会、大阪(2012, 9.14)

3. アフリカツメガエルの変態期の尾の筋細胞における Ouro の強制発現

中井裕也、中島圭介、矢尾板芳郎
第 83 回日本動物学会、大阪(2012, 9.15)

4. ネットアイツメガエルでの TALEN 法の報告

中島圭介
XCIJ-A11/MA 研究集会、東京(2012, 7, 14)

5. 甲状腺ホルモン受容体 α mRNA の翻訳を抑制する 5' 非翻訳領域の解析

岡田守弘、中島圭介、矢尾板芳郎
第 53 回日本生化学会中国・四国支部例会、岡山(2012, 5.18)

国際学会
該当なし

④科研費の受け入れ状況 該当なし

助教・花田秀樹 (Hideki Hanada)

研究内容

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

1. 甲状腺ホルモン誘導による無尾両生類オタマジヤ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ヤクシ尾部短縮は変態期における無尾両生類の最も劇的な現象のうちの一つである。多くの研究はミトコンドリア膜透過性 (MPT) がアポトーシスの重要な役割を果たしていることが示してきた。これまで我々はサイクロスポリン A (CsA) が、甲状腺ホルモン (T_3) によって誘導されるミトコンドリアの膨潤と、それに伴って起こる MPT からのサイトクロム c (Cyt. c) 漏出を抑制することを報告してきた。オタマジヤ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 によってオタマジヤクシ尾部は短縮し、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

両生類が世界的にその数を急激に減らしている。その原因の一つに考えられるのが農薬などの化学物質の影響といわれている。ビタミン E は生体を脂質過酸化から防御するために欠かせない物質である。もし、ビタミン E の機能が農薬など化学物質によってその機能がかく乱されたとしたなら、生体内に発生する活性酸素を除去できず、悪影響を及ぼすことに疑いはない。農薬の一つであ

る除草剤パラコート (PQ) の遺伝毒性には脂質過酸化物が発生すると考えられており、ビタミン E はこの脂質過酸化物の発生を抑えることで染色体異常の誘起を阻害すると考えられた。しかしながら、PQ と共存下にあるビタミン E は PQ の遺伝毒性を阻害せず、むしろ、PQ の電子ドナーとなって遺伝毒性を強化することがわかった。

3. ブチル化ヒドロキシトルエンはパラコートによって誘起される培養カエル白血球細胞の染色体損傷を抑制しない

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

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

研究業績

①原著論文

1. Hanada, H. (2012) Phenolic antioxidant 2,6-di-tert-butyl-p-cresol (vitamin E synthetic analogue) does not inhibit 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridium dichloride (paraquat)-induced structural chromosomal damage in cultured leukocytes of the dark-spotted-frog *Pelophylax (Rana) nigromaculatus*. *Hereditas* 149, 173-177.
2. Yanagisawa, M., Furuno, N.*, Watanabe, M., Kashiwagi, K., Hanada, H., Shinkai, T., Yoshitome, S., Kubo, H., Sakai, M., Fujii, H., Suzuki, K., Yamashita, M. and Kashiwagi, A. (2012) Hypergravity specifically effects head formation in the *Xenopus* embryos raseid under hypergravity condition. *Space Utili. Res.* 28, 172-175.
3. Fujiwara, Y., Kashiwagi, K., Nakagawa, M., Shinkai, T., Yanagisawa, M., Furuno, N., Hanada, H., Suzuki, K., Katsu, K., Yamashita, M., Yamamoto, T., Tanimoto, Y. and Kashiwagi, A. (2012) Effects of magnetically controllled microgravity and hypergravity environment on amphibian behavior. *Space Utili. Res.* 28, 176-179.

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

②総説・著書・その他

該当なし

③学会発表

国内学会

1. 柏木 昭彦, 柏木 啓子, 花田 秀樹, 中島 圭介, 住田 正幸 NBRP「ネットアイツメガエル」: ネットアイツメガエルの近交化・標準系統の樹立・提供 第35回分子生物学会 特別企画「ナショナルバイオリソースプロジェクト」2012年12月11日～14日、福岡国際会議場・福岡マリンメッセ。

2. 柏木昭彦、柏木啓子、花田秀樹、小林里美、竹中純子、住田正幸 「ツメガエル」って、どんなカエル? 日本動物学会 第83回 動物学ひろば 2012年 9月15日、大阪。

3. 柏木昭彦、柏木啓子、花田秀樹、小林里美、難波ちよ 「教材としてのネットアイツメガエルおよびアホートルの展示」 第94回 日本生物教育学会 2013年 1月、広島大学、東広島。

国際学会

該当なし

④科研費等の受け入れ状況

該当なし

助教・田澤一朗 (Ichiro Tazawa)

研究内容

無尾両生類の変態期尾退縮に於ける Hox 遺伝子の機能

The function of the Hox genes during anuran tail resorption

[目的]

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

Hox 遺伝子群は初期発生の動物の細胞に体軸に沿った位置値を与えると考えられている。また、Hox 遺伝子による細胞死調節の報告もあることから、私は「無尾両生類幼生期に発現する Hox 遺伝子が消失域を決定する」という仮説（以下、仮説）を立てた。本研究の目的はこの仮説の検証である。

[材料と方法]

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

[2012年度までに得られた結果と考察]

無尾両生類の Hox 遺伝子発現パターンは、発生が進んだ尾退縮間近の幼生でも尾芽胚期とよく似ていることが本研究から明らかになった。このことから Hox 遺伝子が胚期だけではなく幼生期以降の部域性決定にも関わっているものと推測される。また、*HoxA13* など所謂「遠位側」Hox 遺伝子が尾部特異的発現をしていた。また、成熟個体の脊髄でも Hox 遺伝子が相当な量で発現しており、その胴部での発現パターンは幼生と基本的に同じであった。つまり、幼生尾部において検出された *HoxA13* は成熟個体ではほぼ検出されなかったのである。前述の仮説が正しければ、これらの「遠位側」Hox 遺伝子が変態期尾部特異的な尾部退縮に関わる遺伝子発現を制御している可能性が高い。

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

[2012年度内に得られた結果と考察]

尾部を切断した無尾類幼生をレチノイド処理することによって、尾のかわりに後肢様の構造が生じることが知られている。この現象は本仮説を検証するためには有用な系である。しかし、モデル実験動物であるアフリカツメガエルや本邦産の無尾類ではこの現象は再現されていない。そこで我々は実験条件を検討してこれらの無尾類などで現象を再現させることを試みた。その結果、本邦産無尾類でこの現象を再現させることに成功した。

[これからの展開]

脊髄や筋管での *Hoxa13* など尾部特異的の発現をする Hox 遺伝子の機能検定を *in vivo* で行うことが、本研究の仮説を証明する上でも棄却する上でも必要である。また、前述の通り、幼生をレチノイド処理することで Hox コードを変化させることができた。また、本来幼生器官である尾部が再生するべきところに成体器官の後肢様構造を生じさせることにも成功した。これらの処理による Hox コードの変化と変態期細胞死および成体器官発生との関係を調べることは仮説検証につながるものと期待できる。まずは、レチノイド処理により生じた後肢様構造が成体マーカー遺伝子を発現していることを確かめる。

研究業績

① 原著論文

M. Okada, I. Tazawa, K. Nakajima, Y. Yaoita. The expression of the *amelogenin* gene in the skin of *Xenopus tropicalis*. *Zoological Science*, vol. 30 (3): pp. 154-159 (2013)

② 総説・著書

該当なし

③ 学会発表

国内学会

倉林敦（発表者）、掛橋竜祐、田澤一朗、住田正幸、原本悦和、大嶋友美、伊藤弓弦「次世代モデル動物ネッタイツメガエルとその輸送法の改善について」日本爬虫両棲類学会第51回大会、豊田市、11月10-11日（発表日10日）、2012年

国際学会

該当なし

④ 科研費等の受け入れ状況

該当なし

[分化制御機構研究部門]

准教授・古野伸明 (Nobuaki Furuno)

研究内容

1. 卵形成における卵特異的細胞周期調節遺伝子の発現調節機構と機能解析

Analysis of the regulatory mechanisms of oocyte specific cell cycle gene expression and function during *Xenopus* oogenesis

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

[目的と結果]

細胞周期調節因子に母性型があると分かって来たのは最近であり、その発現調節機構の研究は今までに行われていない。現在、ニシツメガエルのMosとWee1Aのプロモーター領域と思われる部分(翻訳開始点より10kbp上流まで)をクローニングし、GFPの上流に挿入したtransgenicガエル作製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。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。

2. 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。

3. 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。

[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、頭部特異的な遺伝子発現 (Xag, Xotx2, En2) が過重力によって抑制されたが、後脳以降の神経マーカー (Krox20, HoxB9) は、影響を受けていなかった。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、RT-PCR を用いる事より、Wnt のシグナルの下流の遺伝子、Xnr-3 や Siamois の発現が、過重力で抑制されていることを示し、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。

研究業績

①原著論文

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

(* Corresponding author)

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

3. Yanagisawa, M., Kashiwagi, K., Hanada, H., Shinkai, T., Yoshitome, S., Kubo, H., Sakai, M., Fujii, H., Yamashi, M., Kashiwagi, A. Watanabe, M*, Furuno, N. *. (2012) Hypergravity specifically affects anterior head formation in early *Xenopus* embryos. Biol. Sci. Space, **26** 47-52
(* Corresponding author)

4. 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*. Biology Open, in press

5. Yanagisawa, M., Furuno, N.*, Watanabe, M., Kashiwagi, K., Hanada, H., Shinkai, T., Yoshitome, S., Kubo, H., Sakai, M., Fujii, H., Suzuki, K., Yamashita, M. and Kashiwagi, A. Hypergravity specifically effects head formation in the *Xenopus* embryos raseid under hypergravity condition. Space Utili. Res. 2012, in press (* Corresponding author)

6. Fujiwara, Y., Kashiwagi, K., Nakagawa, M., Shinkai, T., Yanagisawa, M., Furuno, N., Hanada, H., Suzuki, K., Katsu, K., Yamashita, M., Yamamoto, T., Tanimoto, Y. and Kashiwagi, A. Effects of magnetically controlled microgravity and hypergravity environment on amphibian behavior. Space Utili. Res. 2012, 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 印刷中

③学会発表

国内学会
該当なし

国際学会
該当なし

④科研費等の受け入れ状況

宇宙環境利用科学委員会研究班ワーキンググループ (2012) 両生類の生活環境に対する過重力の影響、15万円、研究分担者

准教授・三浦郁夫 (Ikuo Miura)

研究内容

1. 生殖腺性差構築機構の多様性と普遍性

The diversity and universality in the establishment mechanisms of gonadal sex-differences

ツチガエルの地域集団は性決定機構および性染色体の分化の程度によって大きく5つに分けられる。性染色体が未分化な東日本と東日本集団、そして性染色体の形態が分化したZW集団とXY集団、そして、XY集団からさらに分岐したNeo-ZW集団である。このうち、Neo-ZW集団を除く4つの集団において性ホルモンおよびその阻害剤による性転換の程度には違いが知られている。東日本と西日本の2つの集団は雄から雌、雌から雄への性転換が容易に誘導されるが、ZW型では雌から雄、XY集団では両方向への性転換に抵抗性を示す。今回、性転換に伴って変化する4つの性分化関連遺伝子 (*Dmrt1*, *Cyp17*, *Cyp19*, *Foxl2*) の発現を定量PCRによって調べた。その結果、性転換と強く連鎖して発現が変化する遺伝子は *Cyp19* と *Foxl2* の卵巣分化に関与する遺伝子であることがわかった。とくにZW集団ではZW雌における両遺伝子の高発現が変化せず、それが性転換を拒否する原因と推察された。一方、XY集団ではエストロゲンによる誘導とその阻害処理によって *Cyp19* の発現が変化したにも関わらず性転換は生じなかった。以上の結果と4つの地域集団の系統発生を合わせると、ツチガエルの元祖集団である西日本と東日本集団の生殖腺分化は性ホルモンに高い感受性を示すが、そこから派生したZW集団やXY集団では性ホルモンに対する感受性が失われており、その現象が性染色体の分化や新たな性決定機構の出現と密接に関連していることが考察された。特に、ZW集団ではW染色体上にある *Sox3* 遺伝子の卵巣決定機能が示唆された。今後、さらに詳細に調べていく。

2. 佐渡島で発見されたカエルをサドガエル (*Rugosa susurra*) と命名

Description of a new frog species *Rugosa susurra* found on Sado Island, Japan

佐渡島で発見され、形態的にユニークな特徴をもつカエルについて、これまで遺伝学的調査を行ってきた。今回、原種と予想されるツチガエルとの交雑を行い、生殖的隔離の存在を調べた。その結果、正逆雑種はほぼすべて雄となり、極めて少数が雌となった。その雌の卵巣は退化的であった。また、雄の精巣内には精子が極めて少なく、もどし交配を行ったところ、わずかに発生した幼生も変態まではほとんど到達しなかった。さらに、鳴き声分析も両者間で著しい違いを明らかにした。以上の結果にもとづき、さらにタイプ標本を採集して外部形態の計測を行うことによって、この佐渡島のカエルをサドガエル (*Rugosa susurra*) と命名した。本種は集団が限定的であるため、既に希少種であり、今後保全に向けた活動も行っていく。

研究業績

①原著論文

1. Sekiya K, Miura I, and Ogata M (2012) A new frog species of the genus *Rugosa* from Sado Island, Japan (Anura, Ranidae). *Zootaxa* 3575: 49-62.
2. Ohtani H, Sekiya K, Ogata M, and Miura I (2012) The postzygotic isolation of a unique morphotype of frog *Rana rugosa* found on Sado Island, Japan. *Journal of Herpetology* 46(3): 325-330.

②総説・著書

1. 三浦郁夫 (2013) 新種サドガエル -その誕生と進化の謎- 生物工学会誌 91: 161-164.
2. 三浦郁夫 (2013) 朱鷺がみつけた新種のサドガエル 私たちの自然 3: 5-7.
3. 土井敏男、三浦郁夫(2012) 神戸市で観察された局所的に尾が赤いニホンアマガエルの幼生 両生類誌 23: 11-12.

③学会発表

国内学会

1. 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 2012年8月21日 東京
2. 三浦郁夫、大谷浩己、尾形光昭、長谷川嘉則 ツチガエルの性決定に関する性連鎖遺伝子 *SOX3* と *AR* の機能解析 日本動物学会 2012年9月13日 大阪市
3. 三浦郁夫、尾形光昭 XY 型と ZW 型性決定機構： 天下分け目の戦い (財) 染色体学会 2012年10月5日 旭川市
4. 三浦郁夫、大谷浩己、藤谷武史 ヌマガエルの性比と性決定 日本爬虫両生類学会第51回大会 2012年11月10日 豊田市 (愛知県)
5. 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遺伝的調査 日本爬虫両生類学会第51回大会 2012年11月11日 豊田市 (愛知県)

国際学会

1. Miura I, Ohtani H, Koizumi Y, and Ogata M. Evolution of gonadal sex-differentiation mechanism from sex hormone dependent to independent in frog. Sixth international symposium on the biology of vertebrate sex determination. 23-27 April 2012. Hawaii (Kona), USA
2. Miura I and Ogata M. A battle between the XY and ZW systems in Japanese frog. Evolution of sex determination mechanisms. 6-9 June 2012, La Sage, Switzerland.

招待講演

1. 三浦郁夫 “性の起源はコピー伝達とう共生（寄生）体の生き残り戦略に発した” 日本動物学会第 83 回大会 シンポジウム 性と生殖の意味を問う
Reproduction and sexuality: What are these? 2012 年 9 月 14 日 大阪市
2. 三浦郁夫 “カエルの性決定：例外が進化を証明する “
特別講義 東京大学水産実験所 2012 年 11 月 9 日 浜松市
3. 三浦郁夫 “生物と性の進化” 放送大学面接授業 放送大学広島学習センター
2012 年 11 月 27-28 日 広島市
4. 三浦郁夫 “トキが見つけた新種のカエル “ 東広島市河内地域センター 生涯学習まちづくり出前講座 2012 年 11 月 29 日 東広島市
5. 三浦郁夫 “科学研究の原点 -私と生物学-” 広島国泰寺高校 国泰寺科学クラブ 2012 年 12 月 15 日 広島市
6. 三浦郁夫 “新種サドガエル進化の謎 ～A new frog species “Sado-gaeru”:
its evolutionary mysteries～ 広島大学大学院理学研究科理学融合センター・
ランチタイムセミナー 2013 年 1 月 22 日 東広島市
7. 三浦郁夫 “トキが見つけた新種のカエル” 広島大学第 47 回東京イブニング
セミナー 2013 年 3 月 8 日 東京

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 「ツチガエル地域集団における生殖腺性差構築システムの多様性と普遍性」
2. 科学研究費挑戦的萌芽研究（代表）1,300 千円 XY 型から ZW 型へ性決定機構の進化

特任助教・柏木啓子 (Keiko Kashiwagi)

1. 両生類における TALEN 技術を用いた標的遺伝子の破壊

Targeted gene disruption by TALENs in amphibians

[目的]

両生類の変態および再生は発生学や遺伝学、進化学的にも非常に興味深い生命現象である。特に無尾両生類は、オタマジャクシからカエルになる変態過程で尾の短縮など大掛かりな体の作り換えが起こることから、変態に関する分子機構を解明するための有用なモデルとなりうる。変態や再生に関与する遺伝子の機能を明らかにするために、特定の遺伝子を個体レベルで破壊する技術の確立は必要不可欠である。数理分子生命理学専攻の山本 卓教授と共同で、カスタマイズ TALE ヌレアーゼ (TALENs) を用いて、ツメガエルの標的遺伝子破壊を試みている。

[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、Ce1-1 アッセイ、及びシークエンス解析により検証した。

[成果と考察]

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

CMV:EGFP TALENs mRNA を注入した受精卵から発生し eGFP を全身に発現するトランスジェニックの胚 (F1) のうち殆どのものでは、顕著な eGFP 蛍光の減少が確認された。TALEN 標的領域を Ce1-1 アッセイやシークエンスにより解析したところ、高頻度で挿入や欠失による変異が確認された。*try* および *pax6* 両遺伝子も高効率で破壊されており、前者では白化現象、後者では無眼症・小眼症が見られた。

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. 両生類を用いた生活環に対する過重力および強磁場の影響

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

[目的]

今年の3月12日に米航空宇宙局(NASA)は、火星無人探査機キュリオシティが採取した岩石を調べたところ、地球型生命が活動を営むうえで必要な6元素が見つかったと発表、「火星にはかつて微生物の生存を支える環境があった」としている。これからも次々と新たな発見があるだろう。ところで、ヒトが長期間にわたって滞在する場合の宇宙環境の影響に関する研究は少ないため、詳細なデータの蓄積が必要である。両生類は宇宙環境が及ぼす影響を調べるうえで格好のモデル動物であって、これまでに多くの地上および宇宙実験の材料として用いられてきた。ツメガエルを用いて過重力や強磁場の影響を調べた。

[方法]

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

[成果と考察]

アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)およびネッタイツメガエル(*Xenopus (Silurana) tropicalis*)を用いた過重力・強磁場影響に関する私達の一連の研究から、発生段階中、受精直後～第一卵割開始にかけての感受性は最大で、曝露された受精卵から発生した胚には頭部における双頭・小頭・小眼など多様な奇形が発症した。過重力に曝露されて頭部に障害を持つ個体では頭部形成に関わる *Wnt* 遺伝子の発現が抑制されていることや、頭部の前方は特に過重力に対する感受性が高いことなどがわかった。また、強磁場に曝されたネッタイツメガエルオタマジャクシは回転運動をしたり、容器底面で横たわるなどの異常行動を示した。

[将来の展望]

過重力や強磁場曝露による影響のメカニズムを遺伝子レベルも含めて調べていく。

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 laevis*

[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系統を開発中である。その一例として、THにより活性化されるTR β 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) 系統について紹介する。この系統を利用したTHかく乱物質を評価する試験系の確立を目指し、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 β 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。

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* BIO_2013_3855.3d. doi: 10.1242/bio.20133855: 1-5.
3. Sakuma, T., Hosoi, S., Woltjen, K. I., Kashiwagi, K., Wada, H., Ochiai, H., Miyamoto, T., Kawai, N., Sasakura, Y. et al. 2013. Efficient TALEN construction and evaluation methods for human cell and animal applications. *Genes to Cells* 18(4): 315-326
4. Yanagisawa, M., Kashiwagi, K., Hanada, H., Shinkai, T., Yoshitome, S., Kubo, H., Sakai, M., Fujii, H., Yamashita, M., Kashiwagi, A., Watanabe, M. and Furuno, N. 2012. Analysis of the head-defects caused by hypergravity in early *Xenopus* embryos. *Biol. Sci. Space* 26: 1-6.
5. Yanagisawa, M., Kashiwagi, K., Hanada, H., Shinkai, T., Yoshitome, S., Kubo, H., Sakai, M., Fujii, H., Yamashita, M., Kashiwagi, A., Watanabe, M. and Furuno, N. 2012. Hypergravity specifically affects anterior head formation in early *Xenopus* embryos. *Biol. Sci. Space*. 26: 47-52.

② 総説・著書
該当なし

③ 学会発表
国内学会

1. 柏木昭彦、柏木啓子、花田秀樹、小林里美、難波ちよ「教材としてのネッタイツメガエルおよびアホロートルの展示」第94回日本生物教育学会（2013年1月、広島大学、東広島）
2. Ken-ichi T. Suzuki, Keiko Kashiwagi, Tetsushi Sakuma, Yukiko Isoyama, Hiroshi Ochiai, Akihiko Kashiwagi, Takashi Yamamoto. Targeted disruption of EGFP transgene in *Xenopus laevis* using customized transcription activator-like (JYSS1-18) effector nucleases (TALENs) 第45回日本発生物学会（2012年5月 神戸インターナショナル コンファレンスセンター 神戸）
3. 柏木昭彦、柏木啓子、花田秀樹、小林里美、竹中純子、住田正幸「ツメガエルって、どんなカエル？」第83回日本動物学会（2012年9月、大阪大学、大阪）
4. 柏木昭彦、柏木啓子、花田秀樹、中島圭介、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35回日本分子生物学会（2012年12月、マリンメッセ福岡、福岡）

5. 磯山由樹子、佐久間哲史、柏木啓子、落合 博、柏木昭彦、山本 卓、鈴木賢一「アフリカツメガエルにおける TALEN を用いた効率的な標的遺伝子破壊」第 35 回日本分子生物学会（2012 年 12 月、マリンメッセ福岡、福岡）
6. 佐能正剛、柏木啓子、花田秀樹、松原加奈、川畑公平、中村直樹、鈴木賢一、山本 卓、新海 正、藤本成明、杉原数美、北村繁幸、柏木昭彦、太田 茂「甲状腺ホルモン様化学物質アミオダロン曝露によるカエルの変態に対する影響」第 26 回環境ホルモン学会（2012 年 6 月、東京大学 山上会館、東京）

国際学会

該当無し

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」3000 千円（分担）
2. 宇宙環境利用科学 WG「両生類の生活環に対する重力影響」150 千円（分担）

⑤ その他（会合への参加・出席）

鈴木賢一、柏木啓子、磯山由樹子、佐久間哲史、落合 博、柏木昭彦、山本卓. 人工ヌクレアーゼを利用した両生類におけるゲノム編集. 第 2 回ゲノム編集研究会（2012 年 9 月 20 日、岡崎コンファレンスセンター）

[多様化機構研究部門]

教授・住田正幸 (Masayuki Sumida)

研究内容

1. ヌマガエル科 3 属 6 種における繁殖隔離機構

Postmating isolation in six species of three genera from Dicroglossidae (Anura),

[目的]

生物学的種概念によると、種は生殖的に隔離された集団である。ヌマガエル科のカエルにおける交配後隔離機構を明らかにすることを目的に、ヌマガエル科の 3 属 (*Hoplobatrachus*、*Euphlyctis* と *Fejervarya*) から 6 種を使って交雑実験を行ない、雑種の生活力を調べた。

[材料・方法]

ヌマガエル科の 3 属 (*Hoplobatrachus*、*Euphlyctis* と *Fejervarya*) から 6 種を使って交雑実験を行なった。雑種について、生活力を調べるとともに、成熟期に達した雑種については、形態計測、ミトコンドリア DNA 解析およびアロザイム分析を行うとともに、生殖腺で染色体観察や組織学的観察を行なった。

[成果・考察]

本研究で *E. cyanophlyctis* 雌と *H. tigerinus* 雄との雑種は、孵化の段階ですべて致死になり、*E. cyanophlyctis* 雌と *H. chinensis* 雄との雑種は、幼生の段階ですべて致死になった。これらの結果は、*Hoplobatrachus* 属と *Euphlyctis* 属の間には、完全な雑種致死による隔離があることを明示している。*H. tigerinus* 雌と *H. chinensis* 雄との雑種は、幼生の段階で発育不全により死亡した。ところが、いくつかの雑種個体は正常に発育して、成熟期まで生き残った。染色体観察と mtDNA とアロザイム酵素分析により、これらの成熟した雑種は、2 つの雌親ゲノムと 1 つの雄親ゲノムからなる異質三倍体であることを確認した。本結果は、異質三倍体が自発的に生産されたことを示唆した。さらに、組織学的観察によって、これらはすべて不妊の雄であることが明らかになった。また、ミトコンドリア DNA の Cytb、12SrRNA と 16S rRNA の遺伝子の塩基配列分析によって、*H. tigerinus*、*H. chinensis* と異質三倍体の系統関係を解明した。さらに、ミトコンドリアゲノムの母性遺伝は、雑種で保持されていることも明らかになった。本研究により、交配後隔離の程度は、系統関係を明確に反映することがわかった。

[将来の展望]

本研究により、交配後隔離の程度と系統関係は、相関することがわかった。これに加えて、異質三倍体が、近縁種の間で交雑を通して生産されるかもしれないと推測された。繁殖隔離と系統関係を直接比較した研究は、両生類研

究施設でしかなし得ない分野であり、今後も研究の発展が期待される。

2. バングラデシュ産のトラフガエルにおける飼育下繁殖

Artificial Breeding of the Endangered Indian Bull frog (*Hoplobatrachus tigerinus*) from Bangladesh: A Case Study of Production and Conservation

[目的]

バングラデシュでは乱獲等によりトラフガエル (*Hoplobatrachus 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。本研究では、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]

トラフガエル *H. tigerinus* の雌親 2 匹と雄親 1 匹を用いて、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]

2 匹の雌親から得られた合計 10,332 の卵を、1 匹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°C 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ことがわかった。

3. イボイモリの飼育下繁殖 (継続)

Attempts at natural reproduction in an endangered amphibian species *Echinotriton andersoni* from the Central Ryukyus

[目的]

中央琉球に分布する絶滅危惧 (および天然記念物) のイボイモリは、奄美大島や沖縄島北部などに分布する種で、鹿児島県と沖縄県の天然記念物に、環境省レッドリストの絶滅危惧 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、本絶滅危惧種について効率的な域外保全に資することを目的に、実験室での適切な人工繁殖・飼育維持方法を確立した。

[材料・方法]

イボイモリは鹿児島県と沖縄県で天然記念物に指定されているため、採集には各県の許可申請が必要であるが、著者らは、この種について、既に天然記念物現状変更許可申請を得ている。本種の飼育下繁殖を試みるため、野外の産卵場所を確認し、その状況をもとに飼育装置を作製して、その中で自然繁殖を試みた。

[成果・考察・将来の展望]

イボイモリでは、沖縄産と徳之島と奄美産で実験室に作製した飼育装置の中で自然産卵に成功した。産卵行動は2月下旬から6月上旬まで行われ、産卵場所は野外における産卵と同様に、水辺付近の直接水に浸らない斜面であった。実験室で自然繁殖した1～3年齢100個体が順調に生育している。将来的には必要に応じてリリースも考慮に入れ、これらの絶滅危惧種について飼育下繁殖と域外保全を行い、「両生類ノアの方舟」を目指している。

4. 光る透明ガエル「スケルピオン」の量産化（継続）

Production of illuminating see-through frogs by injecting into the transparent frogs an illuminating GFP protein gene attached to a gene

[目的]

ニホンアカガエルにおいては、黒色眼と灰色眼の二つの色彩突然変異系統があり、これらの突然変異系統を用いて、2007年には両生類で初となる体が透明で内臓が透けて見える「透明ガエル」（スケルピオン）を誕生させることに成功しており、「透明ガエルおよびその作製方法」については特許を取得している。本研究では、有用な実験動物の実用化を目的に、透明ガエルの量産化を行った。

[材料・方法]

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

[成果・将来の展望]

「透明ガエル」をふやし、今後も量産の目途をたてることに成功した。これらは、内臓透視のできる新しい実験動物として、環境、医学、生物学の分野において実験材料や教材として利用価値が高いと思われる、すでに需要がある。動物愛護の伝統がある欧米では特に「透明ガエル」への関心は高い。ただ、2代目の「透明ガエル」は生活力が弱いため、以降の継代飼育がかなり困難であったため、安定した系代飼育のため改良が必要であり、現在、生活力改善のために、改良を試みている。さらに今後は、実用化に向けては、背面の透明度を上げるような工夫（黄色素胞を欠く突然変異を導入）も必要で

ある。また、今後は、「透明ガエル」に GFP(蛍光蛋白質) 遺伝子をつないだベクターをインジェクションすることで、トランスジェニック「光る透明ガエル」を作成する計画である。これにより、遺伝子発現の様子を外部から蛍光によってリアルタイムで観察でき、この方法では、プロモーターの設計を変えることで、さまざまな遺伝子の発現解析への応用が可能である。

研究業績

①原著論文

1. Komaki, S., A. Kurabayashi, M. M. Islam, K. Tojo, and M. Sumida (2012) Distributional change and epidemic introgression in overlapping areas of Japanese pond frog species over 30 years. *Zool. Sci.*, 29: 351–358.
2. Hasan, M., M. Kuramoto, M. M. Islam, M. S. Alam, M. M. R. Khan and M. Sumida (2012) A new species of genus *Hoplobatrachus* (Anura, Dicroglossidae) from the coastal belt of Bangladesh. *Zootaxa*, 3312: 45–58.
3. Sugawara, H., T. Igawa, M. Yokogawa, M. Okuda, S. Oumi, S. Katsuren, S. Kaneko, T. Umino, Y. Isagi and M. Sumida (2012). Isolation and characterization of ten microsatellite loci of endangered Anderson's crocodile newt, *Echinotriton andersoni*. *Conser. Genet. Res.*, 4: 595–598.
4. Alam, M. S., M. M. Islam, M. M. R. Khan, M. Hasan, R. Wanichanon and M. Sumida (2012) Postmating isolation in six species of three genera (*Hoplobatrachus*, *Euphlyctis* and *Fejervarya*) from family Dicroglossidae (Anura), with special reference to spontaneous production of allotriploids. *Zool. Sci.*, 29: 743–752.
5. Igawa, T., S. Oumi, S. Katsuren and M. Sumida (2013) Population structure and landscape genetics of two endangered frog species of Genus *Odorranana*: different scenarios on two islands. *Heredity*, 110: 46–56.
6. 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.
7. 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: in press.

②総説・著書・その他

1. 住田正幸 (2012) 「東広島キャンパスにする棲息するカエル」 広島大学 環境報告書 Environmental Report 2012 : 20.
2. 住田正幸 (2012) 『世界でオンリーワンの両生類研究施設で誕生した世界初の「透明ガエル」』 広島大学 生協だより 129 : 1.
3. 住田正幸 (2012) 「サテライト館の整備-両生類研究施設展示スペース」 広島大学 総合博物館ニュースレター 6 : 9.
4. 住田正幸 (2012) 「ネッタイツメガエルの近交化・標準系統の樹立・提供」 第3期 NBRP 開始記念 シンポジウム - 第3期への挑戦 - 講演要旨集: 15.

③学会発表

国際学会

1. Komaki, S., A. Kurabayashi, M. M. Islam, K. Tojo, and M. Sumida “Distributional change and epidemic introgression in overlapping areas of Japanese pond frog species over 30 years” 7th World Congress of Herpetology (August 9, 2012, University of British Columbia, Vancouver, Canada)
2. Kurabayashi, A., M. Matsui, Daicus, M. B., H. S. Yong, N. Ahmad, A. Sudin, M. Kuramoto, A. Hamidy, and M. Sumida “From Antarctica or Asia? New colonization scenario for Australian-New Guinean narrow mouth toads suggested from the findings on a mysterious genus *Gastrophrynoides*” 7th World Congress of Herpetology (August 10, 2012, University of British Columbia, Vancouver, Canada)
3. Islam, M. M., H. Tokimitsu, M. Uchida, M. Iwanari, T. Fujii, and M. Sumida “Genetic divergence and postmating isolation among the brown frogs from Ryukyu Archipelago, Japan, elucidated by allozyme and mitochondrial gene sequence analyses, crossing experiments and cytological observations” 7th World Congress of Herpetology (August 11, 2012, University of British Columbia, Vancouver, Canada)
4. Sumida, M., N. Satou, M. M. Islam, T. Igawa, A. Kurabayashi, K. Ukena, S. Oumi, S. Katsuren, and T. Fujii “Artificial and natural breeding of the endangered frog species *Odorrana ishikawae* and *Odorrana splendida*, analysis of genetic diversity, and usage as resource materials: Case study of fauna conservation in Japan” 7th World Congress of Herpetology (August 11, 2012, University of British Columbia, Vancouver, Canada)
5. Alam, M. S., M. M. Islam, M. M. R. Khan, M. Hasan, R. Wanichanon and

M. Sumida “Postmating isolation in six species of three genera (*Hoplobatrachus*, *Euphlyctis* and *Fejervarya*) from family Dicroglossidae (Anura), with special reference to spontaneous production of allotriploids” 7th World Congress of Herpetology August 11, 2012, University of British Columbia, Vancouver, Canada)

6. Hasan, M., M. Kuramoto, M. M. Islam, M. S. Alam, M. M. R. Khan and M. Sumida “A new species of genus *Hoplobatrachus* (Anura, Dicroglossidae) from the coastal belt of Bangladesh” 7th World Congress of Herpetology (August 12, 2012, University of British Columbia, Vancouver, Canada)

7. Kakehashi, R., A. Kurabayashi, S. Oumi, S. Katsuren, M. Hosono, and M. Sumida “Complete mitochondrial sequences of the three Japanese *Babina* (Ranidae, Anura) species and the phylogenetic position among Ranidae” 7th World Congress of Herpetology (August 12, 2012, University of British Columbia, Vancouver, Canada)

8. Hasan, M., M. Kuramoto, M. M. Islam, M. S. Alam, M. M. R. Khan and M. Sumida “A new species of genus *Hoplobatrachus* (Anura, Dicroglossidae) from the coastal belt of Bangladesh” 18th Biennial International Conference and Annual General Meeting 2012, (December 22, 2012, University of Dhaka, Bangladesh)

国内学会

1. 住田正幸・井川武・Islam M. M.・新谷望・掛橋竜祐・菅原弘貴・倉林敦・大海昌平・勝連盛輝・田戸美雪・藤井保「中央琉球産絶滅危惧両生類 5 種の遺伝的分化と飼育下繁殖」

日本動物学会第 83 回大会 (2012 年 9 月 15 日、大阪大学、豊中)

2. Alam, M. S.・M. M. Islam・M. M. R. Khan・M. Hasan・R. Wanichanon・M. Sumida “Postmating isolation in six species of three genera (*Hoplobatrachus*, *Euphlyctis* and *Fejervarya*) from family Dicroglossidae (Anura), with special reference to spontaneous production of allotriploids” 日本動物学会第 83 回大会 (2012 年 9 月 15 日、大阪大学、豊中)

3. 小巻翔平・倉林敦・イスラム モハメド マフィズル・東城幸治・住田正幸「日本産トノサマガエル種群の分布重複域における浸透交雑と 30 年間で生じた分布変化」日本動物学会第 83 回大会 (2012 年 9 月 15 日、大阪大学、豊中)

4. 井川武・菅原弘貴・本田正尚・富永篤・大海昌平・勝連盛輝・太田英利・松井正文・松井正文「マイクロサテライトマーカーを用いた絶滅危惧種および天然記念物イボイモリの遺伝的集団構造の解明」日本遺伝学会第 84 回大会

(2012年9月25日、九州大学、福岡)

5. Islam, M. M.・H. Tokimitsu・M. Uchida・M. Iwanari・T. Fujii・M. Sumida
“Genetic divergence and postmating isolation among the brown frogs from Ryukyu Archipelago, Japan, elucidated by allozyme and mitochondrial gene sequence analyses, crossing experiments and cytological observations” 日本遺伝学会第84回大会(2012年9月26日、九州大学、福岡)

6. 住田正幸・井川武・イスラム モハメド マフィズル・新谷望・掛橋竜祐・菅原弘貴・西谷琢磨・倉林敦・大海昌平・勝連盛輝・田戸美雪・藤井保 「南西諸島の絶滅危惧両生類における遺伝的分化と飼育下繁殖」日本爬虫両棲類学会第51回大会(2012年11月10日、愛知学泉大学、豊田)

7. 新谷望・井川武・住田正幸 「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」日本爬虫両棲類学会第51回大会(2012年11月10日、愛知学泉大学、豊田)

8. 倉林敦・掛橋竜祐・田澤一朗・住田正幸・原本悦和・大嶋友美・伊藤弓弦
「次世代モデル動物ネッタイツメガエルとその輸送法の改善について」日本爬虫両棲類学会第51回大会(2012年11月10日、愛知学泉大学、豊田)

9. 徳増大輔・井川武・Min Mi-Sook・住田正幸 「ウシガエルはどこから来て、なぜ駆逐されないのか? : 侵入成功と個体群存続における遺伝的要因の調査」日本爬虫両棲類学会第51回大会(2012年11月10日~11日、愛知学泉大学、豊田)

10. Hasan, M.・M. Kuramoto・M. M. Islam・M. S. Alam・M. M. R. Khan・M. Sumida “A new species of genus *Hoplobatrachus* (Anura, Dicroglossidae) from the coastal belt of Bangladesh”
日本爬虫両棲類学会第51回大会(2012年11月11日、愛知学泉大学、豊田)

11. 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3期NBRP開始記念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-第3期への挑戦-(2012年11月21日、品川)

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 12,740千円 (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(H24年度)16,401千円(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」5,850 千円 (研究代表者 住田正幸)
4. 奨学寄付金「インドネシアの種多様性に関する研究」(ブラビジャヤ大学 Aris Soewondo) 3,000 ドル (担当 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

[目的]

初期発生過程において、背腹と頭尾の体軸が形成されると初めて胚の3次元座標が精確に決まり、基本的な体の体制（ボディープラン）が確立する。近年の研究から、様々な細胞増殖因子によって体軸形成が制御されることが知られており、背腹軸は腹側化因子（Bone Morphogenetic protein, BMP）によって、頭尾軸は後方化因子（Wnt・FGF・レチノイン酸）によって、それぞれ決定されている。胚が正常に発生するためには、背腹と頭尾の体軸形成が互いに調和しながら形成される必要があるが、この調和機構については、ほとんど理解が進んでいなかった。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 (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することを目的とした。

[成果と考察]

昨年度までの研究により、Biz が腹側化因子 BMP のシグナルを抑制して神経誘導（背側化）を引き起こすこと、および、他の細胞増殖因子シグナル（Wnt）と協調して頭尾軸形成を調節することを明らかにしてきた。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することが分かった。また、この表現型は、Biz MO の標的配列をもたない変異型 Biz の過剰発現によって回復することから、Biz 機能阻害による特異的な表現型であることが確認できた。したがって、Biz は、胚の後方領域の形成に重要であり、頭尾軸の制御に必要であると考えられる。一方、背腹軸形成について調べると、Biz MO 注入胚では、神経マーカー NCAM の発現が著しく低下することが分かった。しかし、興味深いことに、別の神経マーカー Sox2 の発現は、ほとんど影響を受けていなかった。背腹軸形成が進行して背側と腹側にそれぞれ神経と表皮が分化し始めると、神経領域では、最初に Sox2 が発現して神経分化への方向付けが行われ、続いて最終的な神経分化が進むと NCAM の発現が始まることが知られている。したがって、Biz 機能阻害により、Sox2 の発現が変化せずに NCAM の発現が抑制

されていることは、Biz が神経分化の方向付けの段階ではなく、より後期の神経分化段階に必要であることを示している。

両生類研究施設は、本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。ネッタイツメガエルは、アフリカツメガエルより優れた特徴を持つことから、背腹と頭尾のパターン形成機構の研究にもネッタイツメガエルを利用した。データベースに登録されている cDNA およびゲノム DNA の塩基配列を参考にして Biz 遺伝子特異的プライマーを作製し、PCR 法によりシングルバンドのネッタイツメガエル Biz 遺伝子を得た。塩基配列を決定したところ、5' および 3' UTR を含めて約 1.8 kb の領域について、データベースに登録された塩基配列と 1 塩基しか変わらず、この変異も同義置換であることが確認できた。これまで実験に用いていたアフリカツメガエルは 4 倍体であり、遺伝子増幅時に複数の PCR 産物 (バンド) が得られることが多く、塩基配列のバリエーションも極めて多様である。一方、両生類研究施設で増殖中のネッタイツメガエルを用いた今回の解析では、アフリカツメガエルで見られるような複雑性は全く無く、極めて容易に遺伝子の単離・解析を行うことが出来た。次に、ネッタイツメガエル Biz 遺伝子特異的なアンチセンスモルフォリノオリゴ (XtBiz MO) を作製し、ネッタイツメガエル Biz 遺伝子の機能阻害を行った。Biz 阻害胚を尾芽胚期まで発生させると、尾部構造が縮小し、頭部構造が拡大することが分かった。現在詳細な解析を始めた段階ではあるが、この表現型は、アフリカツメガエルを用いた解析から予想される表現型と一致していた。ホールマウン ト *in situ* ハイブリダイゼーション法による遺伝子発現解析についても、ネッタイツメガエルの優位性が明らかになっているので、今後は上記の遺伝学的な利点と併せて、ネッタイツメガエルを活用した解析を展開していく予定である。

[将来の展望]

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

研究業績

①原著論文

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
“The forkhead transcription factor FoxB1 mediates body axis coordination and developmental canalization during early *Xenopus* embryogenesis.”
第 45 回 日本発生生物学会 第 64 回日本細胞生物学会 合同年会 ワークショップ(2012 年 5 月 31 日、神戸)

2. 竹林公子、鈴木 厚

“The forkhead transcription factor FoxB1 mediates body axis coordination and developmental canalization during early *Xenopus* embryogenesis.
FoxB1 転写因子はツメガエル初期発生過程で神経誘導を保証している”
第 35 回 日本分子生物学会 (2012 年 12 月 12 日、福岡)

3. 鈴木 厚、竹林公子

“体軸パターン形成の統合的理解に向けて”
細胞のかたちと機能プロジェクト研究センター・成果発表会 (2013 年 3 月 26 日、東広島)

(国際学会)

1. Kimiko Takebayashi-Suzuki, Hidenori Konishi and Atsushi Suzuki
“The forkhead transcription factor FoxB1 mediates body axis coordination and developmental canalization during early *Xenopus* embryogenesis”
BSCB-BSDB-JSDB 2012 (2012 年 4 月 17 日、イギリス)

2. Atsushi Suzuki

“The forkhead transcription factor FoxB1 mediates body axis coordination and developmental canalization during early *Xenopus* embryogenesis”
MRC National Institute for Medical Research, London・研究所セミナー
(2012 年 4 月 20 日、イギリス)

3. Kimiko Takebayashi-Suzuki, Hidenori Konishi and Atsushi Suzuki

“The forkhead transcription factor FoxB1 mediates body axis coordination and developmental canalization during early *Xenopus* embryogenesis”
14th International *Xenopus* Conference (2012 年 9 月 11 日、フランス)

4. Shuji Takahashi, Atsushi Toyoda, Yoko Kuroki, Yoshinobu Uno, Yumi Izutsu, Atsushi Suzuki, Tatsuo Michiue, Hajime Ogino, Hirofumi Ochi, Toshiaki Tanaka, Akimasa Fukui, Yuzuru Ito Naoto Ueno, M. Asashima, Yoichi Matsuda, Masanori Taira and A. Fujiyama

“Analysis of the *Xenopus laevis* J-strain genome by BAC end sequencing, FISH, and RNA-sequence” 14th International *Xenopus* Conference (2012年9月11日、フランス)

5. Shuji Takahashi, Atsushi Toyoda, Yoko Kuroki, Yoshinobu Uno, Hideki Noguchi, Yumi Izutsu, Atsushi Suzuki, Tatsuo Michiue, Hajime Ogino, Hirofumi Ochi, Toshiaki Tanaka, Akimasa Fukui, Yuzuru Ito Naoto Ueno, M. Asashima, Yoichi Matsuda, Masanori Taira and A. Fujiyama

“Analysis of the *Xenopus laevis* J-strain genome by BAC end sequencing, FISH, and RNA-sequence” International Symposium on Genome Science “Expanding Frontiers of Genome Science” (2013年1月9日、東京)

④科研費等の受け入れ状況
該当なし

助教・倉林 敦 (Atsushi Kurabayashi)

研究内容

アフリカガエル類 (Afrobatrachia) のミトコンドリアゲノム：ゲノム構造の多様化、遺伝子配置変化メカニズム、および配置変化遺伝子の進化的傾向

Afrobatrachian mitochondrial genomes: Extensive genome reorganization, mechanism of gene rearrangement, and evolutionary trends of duplicated and rearranged genes

[目的]

アフリカガエル類 (Afrobatrachia) は、2006 年に Frost et al. によって新設された、カエル亜目 (Neobatrachia) に属する分類群で、ヒメアマガエル類 (Microhylidae) とアカガエル類 (Natatanura) とともに、アカガエル上科 (Ranoidea) を形成する 3 つの主要なグループの一つである。アフリカガエル類は、アナホリガエル科・フクラガエル科・サエズリガエル科・クサガエル科の 4 科を含み、その名の通り、アフリカ大陸にのみに分布する。これら 4 科の類縁関係は従来不明な点が多く議論が続いていた。最近の研究から、これらの科が単系統群である事が確かめられているが、アフリカガエル類を特徴づける共有派生形質はこれまでに発見されていない。アカガエル上科内でのアフリカガエル類の系統関係についてはコンセンサスが得られていない。

動物のミトコンドリアゲノム (ミトゲノム) において遺伝子が並んでいる順序 (遺伝子配置) は、一般的に保守性が高く、近縁な動物内では変化しない。アカガエル上科の中のヒメアマガエル類ではミトゲノムの遺伝子配置変化は知られていないが、アカガエル類では大規模な配置変化が生じていることが知られている。一方で、アフリカガエル類では、ミトゲノムの報告がなかった。さらに、ミトゲノムの遺伝子配置変化メカニズムについては、幾つかの仮説が提案されているが、それらを証拠づける観察は現時点では不十分であった。さらに最近、カエル類のミトゲノムでは、カエル亜目において、負の制約が緩むことで、ミトゲノム遺伝子の塩基置換速度が加速したことが示されたが、カエル亜目の中のミトゲノム遺伝子の分子進化速度の変化は詳しく調べられていない。さらに、重複や配置変化を起こしたミトゲノム遺伝子の分子進化の傾向については、これらの減少が稀であることからほとんど研究されてきていなかった。

以上の点をふまえ、以下の 4 点を目的として研究を行った。

(1) ミトゲノムおよび核遺伝子の大量塩基配列情報を用いたアフリカガエル類の系統的位置の解明。(2) アフリカガエル類ミトゲノムにおけるミトゲノム構造変化 (遺伝子重複・遺伝子配置変化) の探索。(3) アカガエル上科におけるミトゲノム構造変化に基づく遺伝子配置メカニズムの検証。(4) 重複および配置変化ミトゲノム遺伝子の分子進化傾向の推定。

[材料・方法]

アフリカガエル類各科から、1 種の代表種を選び (*Breviceps adspersus*、*Hemisus marmoratus*、*Hyperolius marmoratus*、および *Trichobatrachus robustus*)、ミトゲノム全塩基配列とゲノム構造を決定した。これらに加え、

5種のアカガエル類 (*Babina holsti*, *Lithobates catesbeianus*, *Buergeria buergeri*, *Hoplobatrachus tigerinus* と *Limnonectes fujianensis*) について、核タンパク質をコードする遺伝子 (BDNF、CXCR4、ヒストン-3A、POMC、RAG1、RAG2、rho、slc8a1、及び slc8a3) のシーケンスを行い、これらのデータをもとに系統解析と分岐年代推定を行った。

ミトゲノム増幅とシーケンスはLA-PCR法とプライマーウォーキング法を用いた。系統解析には、最尤法とベイズ法を用い、分岐年代解析には、Bayesian relaxed clock 法を用いた。それぞれの解析は、RaxML、MrBayes3.12、MCMCtree プログラムを用いた。さらに、分類群ごとのミトゲノム遺伝子の進化速度の差異を相対速度テストによって比較した。このテストには、RRTree プログラムを用いた。さらに、「ブランチモデル」の比較を行い、系統樹の枝ごとのミトゲノム遺伝子への選択圧の違いを推定した。この推定にはPAMLプログラムを用いた。

[結果・考察・成果]

(1) アフリカガエル類の系統的位置

ミトゲノムおよび9種の核遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列データに基づき分子系統解析を行った。その結果、どちらのデータでも、アフリカガエル類は単系統群となり、さらに、ヒメアマガエル類と姉妹群を形成した。アフリカガエル類と秘めアマガエル類の関係については、アミノ酸データを用いた場合のブートストラップ値は低かった(61%)ものの、塩基配列データでのブートストラップ値は比較的高く(76%)、どちらのデータでもベイズ事後確率については高い支持が得られた(100/99%)。これらの統計的信頼値に加え、本研究で用いた分子データがこれまでにアフリカガエル類の系統推定に用いられたものの中で最大であることを考慮すると、今回得られた仮説は信頼性の高いものであると考えられる。

また、アフリカガエル類を特徴づける共有派生形質はこれまでに見つかっていなかったが、今回解析したアフリカガエル類全種のミトゲノムにおいて、通常のWANCY-tRNAsという遺伝子配置から変化した、WNACY-tRNAsという配置が共有されていた。この新たに発見された遺伝子配置は、アフリカガエル類の共有派生形質としてみなせると考えられた。

また、アフリカガエル類と他のアカガエル上科の分岐年代はおよそ1億年前と推定された。これは、ゴンドワナ大陸分断の最終局面のアフリカと南アフリカの分断時期に近い。この分岐年代は、本グループがアフリカ大陸のみに分布していることの原因と考えられた(アフリカが他の大陸と分断した時期に出現したので、他の大陸に分布しない)。

(2) アフリカガエル類のミトゲノムの構造変化

アフリカガエル類の中でも、*Hemisus* (アナホリガエル) のミトゲノムの遺伝子配置は、一般的なカエル亜目型とほぼ同じで合った。一方で、他の3種のミトゲノムは、カエル亜目一般型から大きく逸脱していた。具体的には、*Breviceps* (フクラガエル) のミトゲノムでは、LTPF tRNs-12S rrn-trnV-16Srrn のからなる領域は、縦列に3重に重複しており、さらに、trnHS2 セグメントが3重領域の間に転座していた。さらに、trnWN-OL セグメントが重複し、この間にコント

ロール領域 (CR) が挿入されていた (結果的に CR は2つ存在した)。は、これらの2つのコピーの間に発生しました。これらの多数の重複領域の存在により、*Breviceps* のミトゲノムは、これまでに知られている脊椎動物のミトゲノムの中で最大のものとなっていた (28757 bp)。

Hyperolius (マダラクサガエル) のミトゲノムでは、典型的な LTPF tRNA クラスターが PTLF に再配置され、比較的大きな非コード領域が trnP と trnT (1.3 kbp) の間、および trnL2 と trnF (0.4 KBP) の間に発見された。さらに、trnM-ND2 セグメントが重複しており、この2つのコピーの間に2つめの CR が存在していた。同様に、*Trichobatrachus* (ケガエル) のミトゲノムでは、trnHS2-ND5 セグメントが縦列に重複しており、この2つのコピーの間に、余分な CR-LTPF tRNA セグメントが存在していた。

重複遺伝子の種類と遺伝子の配置変化パターンはアフリカガエル類の分類群間で異なっていた。したがって、大規模なミトゲノム再編成は、少なくとも3つの異なるアフリカガエル系統で独立に生じた結論できる。しかし、アフリカガエル類では、縦列に重複した遺伝子領域の間に、他の領域の挿入が(非縦列的に)生じているという点で共通性が見られた。

(3) 遺伝子配置・協調進化のメカニズム

動物のミトゲノムの遺伝子配置変化は、主に複製エラーによって生じる縦列重複を通じて生じると考えられてきた (TDRL モデル)。最近我々は、動物の mt ゲノムで、非縦列重複を説明するために、「第一縦列・第二非縦列モデル」を提唱した。アフリカガエル類のミトゲノムで多く観察された、縦列重複領域内に位置する非縦列重複遺伝子領域は、このモデルと同じプロセスによって、アフリカガエル類のミトゲノムの遺伝子配置変化が生じたことを実証するものであった。

これまでに、動物ミトゲノムの重複領域で観察される協調進化については、相同組換えモデルと、複製エラーモデルの、2つの異なるメカニズムが提案されている。アフリカガエル類の重複領域の多くは、互いに高い塩基配列相同性を示すため、これらの領域には協調進化が働いていることは間違いない。なかでも、*Breviceps* に見られた rRNA 遺伝子を含む3重重複領域では、3つのコピーのうち、隣り合わないコピー同士が協調進化を受けていた。複製エラーモデルでは、隣り合わないコピーの配列均質化の説明が困難であることから、*Breviceps* の3重重複領域では、組換え機構を介した協調進化が生じていることが示唆された。

(4) 重複・配置変化遺伝子の進化傾向

重複した遺伝子は、機能的に冗長なコピーがあるため、少なくとも片方のコピーにおいては、負の選択圧が緩和されると考えられ、これにより重複遺伝子の進化速度 (塩基置換速度) は高まると考えられる。この仮説を検証するために、アカガエル上科で重複や配置変化を起こした (配置変化遺伝子は、配置変化の過程で必ず重複時期を経験している) 遺伝子の進化速度を、重複や配置変化していない遺伝子と比較した。その結果、重複・配置変化遺伝子は、必ずしも速い塩基置換率を持っていないことが明らかになった。さらに、重複遺伝子や配置変化タンパク質遺伝子に対する選択圧を調べた所、必ずしも選択圧は緩んでいないことが示された。

また、脊椎動物のミトゲノムは、CRに存在するH鎖複製開始点からH鎖の複製が開始され、この複製がWANCYtRNAクラスターに存在するL鎖複製開始点に到達するまでの間H鎖が1本鎖の状態に留まるという特徴がある。DNAが1本鎖で存在する場合、脱アミノ基反応が生じやすくなり、この結果、C→T (U) と→ヒポキサンチン (Cとのペアリング) →Gの置換が生じやすくなる。このため、L鎖複製起点から遠い位置にある遺伝子ではGとTの組成が増え、近い位置の遺伝子はCとA組成が多くなる現象が知られている。アカガエル上科の中で配置変化を起こした遺伝子について、この塩基組成傾向が観察されるかを検証した所、本来の位置から、L鎖複製起点より遠い位置に移動した遺伝子は、必ずしも高いGT組成を持たないことが分かった。

特定の進化トレンドが、重複・配置変化遺伝子に存在する場合、これらの遺伝子からのデータが、系統構築を行う際に悪い影響（塩基組成の偏りや速い塩基置換速度）を与える可能性がある。しかし、本研究で明らかになったように、ミトゲノムの重複・配置変化遺伝子は特別な進化傾向を示さず、系統解析時のデータとして用いても、問題はないことが示唆された。

以上の成果を論文にまとめ、現在、国際誌に投稿中である。

研究業績

① 原著論文

1. Komaki, S., A. Kurabayashi, M. M. Islam, K. Tojo, & M. Sumida (2012) Distributional change and epidemic introgression in overlapping areas of Japanese pond frog species over 30 years *Zoological Science* 29: 351-358.
2. 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 総説・著書

なし

③ 学会発表

国際学会

1. Kurabayashi, A., Matsui, M., Daicus, M. B., Ong, H.-S., Ahmad, N., Ahmad, S., Kuramoto, M., Hamidy, A., and Sumida, M. "From Antarctica or Asia? New colonization scenario for Australian - New Guinean narrow mouth toads suggested from the findings on a mysterious genus *Gastrophrynoideus*" 2012 7th World Congress of Herpetology (August 8-14 2012, Vancouver, Canada)
2. Kakehashi, R., Kurabayashi, A., Oumi, S., Katsuren, S., Hosono, M., and Sumida, M. "Complete mitochondrial sequences of three Japanese *Babina*

(Ranidae, Anura) species and their phylogenetic position in Ranidae”
2012 7th World Congress of Herpetology (August 8-14 2012, Vancouver,
Canada)

3. Komaki, S., Kurabayashi, A., Islam, M.M., Tojo, K., and Sumida, M.
“Distributional change and epidemic introgression in overlapping areas
of Japanese pond frog species over 30 years” 2012 7th World Congress of
Herpetology (August 8-14 2012, Vancouver, Canada)
4. Sumida, M., N. Satou, M. M. Islam, T. Igawa, A. Kurabayashi, K. Ukena,
S. Oumi, S. Katsuren, and T. Fujii “Artificial and natural breeding of
the endangered frog species *Odorrana ishikawae* and *Odorrana splendida*,
analysis of genetic diversity, and usage as resource materials: Case
study of fauna conservation in Japan” 7th World Congress of Herpetology
(August 11, 2012, University of British Columbia, Vancouver, Canada)

国内学会

1. 倉林敦・掛橋竜祐・田澤一朗・住田正幸（広島大・両生類研）・原本悦和、
大嶋友美、伊藤弓弦（産総研・幹細胞）「次世代モデル動物ネッタイツメガ
エルとその輸送法の改善について」日本爬虫両棲類学会 第51回記念大会（11
月10-11日、2012年、豊田市、愛知県）
 2. 住田正幸・井川武・Islam M. M.・新谷望・掛橋竜祐・菅原弘貴・倉林敦・
大海昌平・勝連盛輝・田戸美雪・藤井保「中央琉球産絶滅危惧両生類5種の
遺伝的分化と飼育下繁殖」日本動物学会第83回大会（2012年9月15日、大
阪大学、豊中）
 3. 小巻翔平・倉林敦・イスラム モハメド マフィズル・東城幸治・住田正幸
「日本産トノサマガエル種群の分布重複域における浸透交雑と30年間で生
じた分布変化」日本動物学会第83回大会（2012年9月15日、大阪大学、豊中）
 4. 住田正幸・井川武・イスラム モハメド マフィズル・新谷望・掛橋竜祐・
菅原弘貴・西谷琢磨・倉林敦・大海昌平・勝連盛輝・田戸美雪・藤井保「南
西諸島の絶滅危惧両生類における遺伝的分化と飼育下繁殖」日本爬虫両棲類
学会第51回大会（2012年11月10日、愛知学泉大学、豊田）
- ④ 科研費等の受け入れ状況
1. 日本学術振興会科学研究費補助金・若手研究（B）2012年 130万円（研
究代表）
 2. 日本学術振興会科学研究費補助金・基盤研究（B）2012年 30万円（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保証機構の解析

The forkhead transcription factor FoxB1 mediates body axis coordination and developmental canalization 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。本研究では、FoxB1 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 転写因子の下流遺伝子として同定した FoxB1 転写因子が背腹・前後軸の両方を制御してボディープランの成立に働くことを明らかにした。しかしながら、FoxB1 の単独機能欠損胚では、前方構造が拡大し後方形成が阻害されて前後軸パターン形成は影響を受けたが、背側組織である神経の誘導は、ほぼ正常で背腹軸形成にほとんど影響がなかった。そこで FoxB1 と、その上流で働く Oct-25 の両方を同時に機能欠損させると、神経誘導が著しく低下した。また、Oct-25 による神経形成の促進作用は、FoxB1 M0 注入胚で部

分的に抑制されることから、Oct-25 転写因子は FoxB1 を介した経路を使って神経を誘導していることがわかった。したがって、Oct-25 と FoxB1 は外胚葉中で feed-forward loop ネットワークを形成しており、Oct-25 の働きが低下しても FoxB1 が機能すれば、ある程度、正常に神経が誘導されるシステムが存在すると考えられた。神経誘導には、外胚葉を裏打ちする中胚葉からのシグナルも重要である。そこで、外胚葉と裏打ちする中胚葉との組織間相互作用を弱めるため、神経外胚葉の一部を切り出して培養すると、FoxB1 機能阻害胚では神経誘導が著しく低下するが、FoxB1 が存在すると神経は正常レベルで誘導されていた。つまり、外胚葉に発現する FoxB1 と中胚葉との間にも、協調的な神経促進作用が存在することが確認できた。中胚葉には複数の神経誘導因子 (noggin, chordin, follistatin, cerberus 等) が発現して外胚葉との組織間相互作用に関与すると考えられている。現在、中胚葉に発現する神経誘導因子の候補対象を拡げて FoxB1 と協調的な神経促進作用に働く中胚葉からのシグナルを同定するため、詳細な解析を進めている。以上の結果から、FoxB1 は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と考えられた。

私達の研究グループでは、FoxB1 転写因子以外にも体軸形成の調和機構に関わる因子として、Biz (BMP inhibitory zinc-finger) 遺伝子を機能スクリーニングにより単離している (詳細については本研究部門・鈴木准教授の項目を参照)。Biz 遺伝子は腹側化因子 BMP のシグナルを抑制して神経誘導を引き起こすこと、さらに 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を明らかにした。発生過程においてボディープランが確立される時期に Biz 遺伝子が発現するかを調べたところ、アフリカツメガエル胚ではシグナルが非常に弱く確認が難しかった。そこで、ホールマウント in situ ハイブリダイゼーション法による遺伝子発現解析について優位性が明らかかなネツタイツメガエル胚を用いて Biz 遺伝子の発現解析をおこなった。その結果、神経誘導がおこる原腸胚期に、背側外胚葉を中心に Biz 遺伝子の発現が確認され、神経胚期にわたって予定神経領域に発現が続くことが明らかになった。したがって、Biz 遺伝子は、実際の体軸形成期に神経領域に発現しており、背腹軸と頭尾軸の調和に働く可能性がさらに強まった。

[将来の展望]

FoxB1 転写因子が、背腹軸と頭尾軸の調和機構だけでなく、神経誘導の保証機構にも重要であることが明らかになりつつあるが、FoxB1 機能欠損マウス胚でも神経形成に異常が認められることから (Labosky et al., Development, 1997, 他数編)、動物種間で保存された神経誘導の保証機構が存在する可能性が考えられる。今後は、外胚葉に発現する FoxB1 と、中胚葉由来神経誘導因子との協調作用 (組織間相互作用に基づく保証機構)、および、私たちが既に同定している新規 Oct-25 下流因子と Oct-25/FoxB1 feed-forward loop ネットワークとの協調作用 (外胚葉内の保証機構) を詳細に調べる。さらに、Biz 遺伝子も、FoxB1 転

写因子と同様に体軸形成の調和に関与するので、FoxB1 と Biz の機能的な関連や役割分担についても明らかにしたい。また、本年度確立したネッタ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とネッタイツメガエル胚の両方の種を用いて、未解析の Oct-25 転写因子下流遺伝子の発現についても解析をおこなう予定である。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, Konishi H. and Atsushi Suzuki

“The forkhead transcription factor FoxB1 mediates body axis coordination and developmental canalization during early *Xenopus* embryogenesis.”

第 45 回 日本発生生物学会 第 64 回日本細胞生物学会 合同年会 (2012 年 5 月 31 日、神戸)

2. 竹林公子、鈴木 厚

「The forkhead transcription factor FoxB1 mediates body axis coordination and developmental canalization during early *Xenopus* embryogenesis.

FoxB1 転写因子はツメガエル初期発生過程で神経誘導を保証している」

第 35 回 日本分子生物学会 (2012 年 12 月 12 日、福岡)

3. 鈴木 厚、竹林公子

“体軸パターン形成の統合的理解に向けて”

細胞のかたちと機能プロジェクト研究センター・成果発表会 (2013 年 3 月 26 日、東広島)

国際学会

1. Takebayashi-Suzuki, K., Konishi, H. and Suzuki, A.

“The forkhead transcription factor FoxB1 mediates body axis coordination and developmental canalization during early *Xenopus* embryogenesis”

BSCB-BSDB-JSDB 2012 (2012 年 4 月 17 日、イギリス)

2. Takebayashi-Suzuki, K., Konishi, H. and Suzuki, A.

“The forkhead transcription factor FoxB1 mediates body axis coordination and developmental canalization during early *Xenopus* embryogenesis”

14th International *Xenopus* Conference (2012年9月11日、フランス)

④科研費等の受け入れ状況

該当なし

特任助教・井川 武 (Takeshi Igawa)

研究内容

1. 絶滅危惧種イボイモリにおける遺伝的集団構造の解明

Population structure of an endangered 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。そこで本研究では種内の遺伝的構造と、集団内の遺伝的多様性を評価することを目的として、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マイクロサテライトマーカーに基づいて集団遺伝学的解析を行った。

[材料・方法]

奄美大島産 31 個体、請島産 3 個体、徳之島産 29 個体、沖縄島産 95 個体、瀬底島産 3 個体、渡嘉敷島産 13 個体からゲノム DNA を抽出し、本種におけるマイクロサテライト遺伝子座 (Sugawara et al., 2011) のうち、9 座位について遺伝子型を決定した。その後、個体ごとの遺伝的要素をハーディー=ワインベルグ平衡を指標として検出する方法を実装したソフトウェア、Structure (Pritchard et al., 2000)、および Geneland (Guillot et al., 2005) を用いて集団構造を推定するとともに、それぞれの集団内の遺伝的多様性について、ヘテロ接合度、有効アリル数などの基礎的データを求めた。

[結果・考察・成果]

集団構造解析の結果、イボイモリは、奄美系統（奄美大島全域+請島）、徳之島系統（徳之島全域）、沖縄系統（沖縄島全域+瀬底島+渡嘉敷島）の 3 つの遺伝的クラスタに分けられた。さらに、それぞれのクラスタ内で詳細に解析を行ったところ、請島、瀬底島、渡嘉敷島などの小さな島嶼も遺伝的に分化しており、奄美大島、徳之島、沖縄島内にも遺伝的に異なる集団が検出された。特に沖縄島では最大で 8 つの分集団に分けることができ、北部地域では複数の集団が狭い地域に混在する独特の集団構造が観察された。これらの知見は、ミトコンドリア遺伝子による解析 (Honda et al., 2012) と基本的には矛盾していないことから、主な集団構造は大過去に生じた分断イベントによって形成され、一部の集団ではその後も、ある程度の生殖的隔離が持続していると考えられた。また、各集団内の遺伝的多様性を比較したところ、島の面積とある程度相関が見られた。

2. オットンガエル及び、ホルストガエルにおける新規マイクロサテライトマーカーの開発

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*)

[目的]

オットンガエル (*Babina subaspera*) と、ホルストガエル (*B. holsti*) は、それぞれ奄美大島及び、沖縄島と渡嘉敷島に固有に生息する姉妹種であり、鹿児島県及び、沖縄県における天然記念物である。両種は元々島嶼という狭小な生息域であるのに加えて、森林の伐採による生息域の減少、マングースによる捕食などにより絶滅が危惧されており、IUCN レッドリストにおける絶滅危惧 B1 類に位置付けられている。このような絶滅危惧種の効率的な保全には分子マーカーによる集団構造及び、遺伝的多様性の解明が必要であり、すでにオットンガエルについては、Iwai et al. (2011) により 8 つのマイクロサテライトマーカーが単離されている。しかしながら、個体識別、親子鑑定といったより詳細な分析にはさらに多くの遺伝子座が必要である。また、これらの遺伝子座のホルストガエルでの有効性は確認されていない。そこで、両種における新規マイクロサテライトマーカーの開発を目的として、既存のマイクロサテライトマーカーのホルストガエルにおける増幅及び多型性の有無を確認すると同時に、新規マイクロサテライト遺伝子座の単離を行った。

[材料・方法]

Iwai et al. (2011) の方法に従って、オットンガエルより得られたマイクロサテライト遺伝子座のうち、16 の新規遺伝子座について MSATCOMMANDER (Faircloth 2008) を用いてプライマーを設計した。その後、それぞれ奄美大島、沖縄島内の 1 集団に由来するオットンガエル及び、ホルストガエル 10 個体において、これらの遺伝子座の増幅及び、多型性を確認した。

[成果・考察]

既知の 8 遺伝子座はすべてホルストガエルにおいて利用可能であり、オットンガエルと同等の十分な多型性を示した。また、新規にプライマーを設計した 16 遺伝子座のうち、オットンガエルにおいて 8 遺伝子座、ホルストガエルにおいて 4 遺伝子座が多型性を示した。最終的にオットンガエル及び、ホルストガエルにおいて利用可能な遺伝子座は、既知の 8 遺伝子座と合計して、それぞれ 16 遺伝子座及び、12 遺伝子座となった。これらの遺伝子座については、集団遺伝学的解析および、個体識別に有用なマイクロサテライトマーカーとして Conservation Genetics Resources 誌に掲載予定である。

3. 飼育下における温度条件と遺伝的要因がアマミイシカワガエルの生活力に与える影響

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

[目的]

遺伝的多様性と生活力の相関は様々な分類群で報告されており、特に絶滅危惧種においては、個体数減少との負のフィードバックにより深刻な影響を及ぼすことが知られている。また、近年、地球温暖化により両生類の生息環境も気温が上昇傾向にあり、生存率における影響が懸念されている。アマミイシカワガエルは奄美大島の固有種で、IUCN レッドリストの絶滅危惧 IB 類に指定される絶滅危惧種である。我々は既に本種の人工交配と継代飼育に成功しており (Sumida et al., 2011)、さらに野外個体群における遺伝的集団構造も明らかにしている (Igawa et al., 2013)。そこで、本研究では、実験室内における均一な環境的・生理的条件下において、個体生存率に対する飼育温度及び、遺伝的要因の影響を検証することを目的として、人工交配及び、飼育試験を行い子孫の生存率を検証した。

[材料・方法]

奄美大島・福元地区で採集されたアマミイシカワガエルの単一のペアの子で、実験室にて成熟させたメス 3 個体について、それぞれの卵を 3 つに分け、次の血縁度の異なる 3 種類のオスの精子と交配させた。①同じペアの子でメスと兄妹関係にあるオス (兄妹交配=近親交配)、②同じ福元地区で採集された別ペアの子でメスとは兄妹関係にはないオス (非兄妹交配)、③福元地区の個体群とは遺伝的に異なる奄美大島・西古見地区で採集されたオス (異系交配)。これらの受精卵をさらに 18°C、20°C、22°C の 3 つの温度条件で変態するまで飼育し、各発生段階における生存率を観察した。

[成果・考察]

その結果、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。

研究業績

①原著論文

1. Igawa, T., Oumi, S., Katsuren, S., and Sumida, M. (2013). Population structure and landscape genetics of two endangered frog species of genus *Odorrana*: different scenarios on two islands. *Heredity*, 110, 46–56.
2. Kim, H. L., Iwase, M., Igawa, T., Nishioka, T., Kaneko, S., Katsura, Y., Takahata, N., and Satta, Y. (2012). Genomic structure and evolution of multigene families: “flowers” on the human genome. *International journal of evolutionary biology*, 2012, 917678.
3. Sugawara, H., Igawa, T., Yokogawa, M., Okuda, M., Oumi, S., Katsuren, S., Kaneko, S., Umino, T., Isagi, Y., and Sumida, M. (2012). Isolation and characterization of ten microsatellite loci of endangered Anderson’s

crocodile newt, *Echinotriton andersoni*. Conservation Genetics Resources, 4(3), 595–598.

4. 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: in press.

② 総説・著書
該当なし

③ 学会発表
国際学会

1. Sumida, M., Satou, N., Islam, MM., Igawa, T., Kurabayashi, A., Ukena, K., Oumi, S., Katsuren, S., and Fujii, T. “Artificial and natural breeding of the endangered frog species *Odorrana ishikawae* and *Odorrana splendida*, analysis of genetic diversity, and usage as resource materials: Case study of fauna conservation in Japan” World Congress of Herpetology (WCH) 2012 (2012年8月, バンクーバー, カナダ)

国内学会

1. 井川武, 菅原弘貴, 本多正尚, 富永篤, 大海昌平, 勝連盛輝, 太田英利, 松井正文, 住田正幸 「マイクロサテライトマーカーを用いた絶滅危惧種および天然記念物イボイモリの遺伝的集団構造の解明」日本遺伝学会 第84回大会 (2012年9月, 福岡)
2. 住田正幸, 井川武, Islam MM, 新谷望, 掛橋竜祐, 菅原弘貴, 倉林敦, 大海昌平, 勝連盛輝, 田戸美雪, 藤井保 「西南諸島の絶滅危惧両生類における飼育下繁殖と遺伝的分化」日本爬虫両棲類学会 第51回大会 (2012年11月, 愛知)
3. 新谷望, 井川武, 住田正幸 「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」日本爬虫両生類学会 第51回大会 (2012年11月, 愛知)
4. 徳増大輔, 井川武, Min Mi-Sook, 住田正幸 「ウシガエルはどこから来て, なぜ駆逐されないのか? : 侵入成功と個体群存続における遺伝的要因の調査」
5. 住田正幸・井川武・Islam M. M.・新谷望・掛橋竜祐・菅原弘貴・倉林敦・大海昌平・勝連盛輝・田戸美雪・藤井保 「中央琉球産絶滅危惧両生類5種の遺伝的分化と飼育下繁殖」日本動物学会第83回大会 (2012年9月15日, 大阪大学、豊中)

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 1300 千円

2. 科学研究費補助金 基盤研究 (B) 2012 年 20 万円 (分担)

Assistant Professor • Islam Mohammed Mafizul

Title:

1. Genetic divergence and postmating isolation between endangered Holst's frog and Otton frog from the Ryukyu Archipelago, Japan, elucidated by allozyme analyses, crossing experiments and cytological observations.

Summary:

I have conducted a comparison between two allopatric endangered species of genus *Babina* namely *B. holsti* and *B. subaspera* from the Ryukyu Archipelago to elucidate their genetic divergence and postmating isolation. I performed allozyme electrophoresis at several loci, crossing experiments using both male and female of both frogs and spermatogenesis and histological observation of testes of hybrids and their controls. They were found to be significantly diverged based on allozyme data, In contrast, they were not reproductively isolated based on the developmental capacity of their reciprocal hybrids compared with the controls. Not only the hybrids were viable but also their sperm shape indicated their fertility. Spermatogenesis and histological observation of the testes from reciprocal hybrids confirmed that there was no reproductive isolation. Thus there exist morphological and genetic divergences between them, but no reproductive isolation to support their specific entity based on biological species concept.

Materials and Methods:

Allozyme electrophoresis: A total of 12 individuals of both male and female individuals of the *B. holsti*, that of 10 individuals of *B. subaspera*, 7 individuals of *B. okinavana* were used for allozyme study, whereas 2 individuals of each *Odorrana splendida*, *O. ishikawae*, *O. amamiensis*, *O. narina*, *O. supranarina*, and *O. otsunomiyaorum* were used for comparison and *Rana okinavana* as outgroup. Muscle sample were collected from thigh region of the frogs immediately after sacrificing them and same time blood samples were also collected and stored in freezer. Sixteen enzymes and two blood proteins were analyzed by Horizontal starch gel electrophoresis that was conducted based on the technique described by Nishioka *et al.* 1980 and 1992 with some modification. The detection of the enzyme was carried out after staining of the gel performed by agar overlay method outline by Harris and Hopkins, 1976. The detection of blood proteins were made by amino-black staining. Analyses were done by using the Phylip version 3.65 and POPGENE version 1.32 computer software.

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

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

Histological observations: Testes of mature male frogs of all hybrids and their controls were collected from the live frog and were fixed in Novashin fixative. After subsequent tissue processing, embedding, and microsectioning, slides were prepared and slides were stained with Heidenhain's iron hematoxylin for histological observation and mounted with Canada balsam. The prepared slides were observed under optical microscope and necessary photos were taken using digital camera.

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

Findings:

From the allozyme analyses it was possible to find several diagnostic alleles between *B. holsti* and *B. subaspera*. Also they showed remarkable genetic distance to support their specific entity. But little bit contradictory results were found in crossing experiments. During the crossing experiments it was established that there was no reproductive isolation exist between this two species. After preparation slides of meiotic chromosomes, spermatocytes at the first meiosis and chromosome complements in the hybrids indicated that they were almost similar with the control offspring thus there were no abnormalities in the hybrids. Also histological observation of testes indicated presence of normal sperm which indicates their fertility.

2. Postmating isolation among several brown frogs from Honshu and Ryukyu of Japan, and Mongolia by crossing experiments and cytological observations.

Summary:

I have conducted crossing experiments between several brown frogs namely *Rana japonica* from mainland Japan, *Rana ulma* from Amamioshima Island (previously known as *Rana okinawa*) and *Rana amurensis* from Mongolia to elucidate their postmating isolation. It was found that although taxonomically they are diverged well but they produce viable hybrids. Compare to the control the developmental capacity of hybrids were also well. But after studying the spermatogenesis and histology of their testes, I have found extreme abnormalities by means of 100% univalent in spermatogenesis and irregular shaped testes in histological observations. Thus it was concluded that even this three allopatric brown frogs were able to produce some viable hybrids they are completely differentiated by means of reproductive isolation.

Materials and Methods:

I have conducted the crossing experiments with the similar method mentioned in previous *Babina* crossing experiment but it was important to maintain suitable temperature for each hybrid and their controls as all three mention species has different temperature preferences. For spermatogenesis and Histological observations I have also followed the same technique as mentioned in previous work.

Findings:

Crossing experiments indicated the hybrids between *R. ulma* and *R. japonica* was more viable compared to that of *R. amurensis* and *R. japonica* although we did not able to get hybrid between *R. amurensis* and *R. ulma*. But after studying the spermatogenesis and histology of their testes I have found strange result. In case of spermatocytes at 1st meiosis, extreme abnormalities by means of 100% or very high number of univalent were found which indicating their reproductive isolation. Histological observations also let me know the presence of irregular shaped spermatocyte which indicated their sterility. Thus it was concluded that even this three allopatric brown frogs were able to produce some viable hybrids reprotuvelily they are isolated from each other as confirmed from the cytological observation of the testes of their hybrids.

3. Conservation of endemic Amami Tip-nosed frog (*Odorrana amamiensis*) from Amamioshima Island by artificial breeding and subsequent rearing in the laboratory.

Amami tip-nosed frog, *Odorrana amamiensis* is one of the endangered frog species distributed only in Amamioshima and Tokunoshima Islands of Ryukyu Archipelago. In Amamioshima Island the species is commonly found in mountain streams and occasionally in mountain paths in night, but is rare in lowland. This species share almost similar habitat with *Odorrana splendida* another national monument from the same island. The possible reasons for population degradation are loss of habitat, natural predator etc., thus it was essential to develop some suitable technique of artificial breeding in the laboratory to conserve the species. It was possible to breed the frogs in the laboratory by using typical artificial breeding technique developed in our laboratory using *Lithobates catesbeianus* PG. 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. In this species a low temperature of 18°C was found preferable for their early development and for tadpoles. Finally, it was possible get many offspring which finally metamorphosed and now kept in our laboratory.

4. First attempt of cryopreservation of sperm with Japanese brown frog (*Rana japonica*) and conservation of two endangered species from Ryukyu Archipelago by cryopreservation of their sperm

Summary:

Amphibian decline is a common trend all over the world. Due to environmental degradation, global warming and other man made causes, biodiversity is threatened in all over the world and frogs are most prone to this environmental degradation. It is a major concern of all naturalists especially to herpetologists to find some sustainable techniques of anuran conservation. Cryopreservation is one of the techniques that have already been applied for many higher taxon animals also for some European and African frogs. So far our knowledge, this is the first attempt in cryopreservation of any Japanese anurans. For this study I have considered 4 species such as Japanese brown frog *Rana japonica*, as a typical Japanese frog; Amami Ishikawa frog *Odorrana splendida*, as an endangered species and national monuments and Amami tip-nosed frog *Odorrana amamiensis* an endangered species from Amami and *Babina holsti*, an endangered species from Okinawa islands. For assessment of success of cryopreservation technique,

I not only depend on motility of the sperms but also confirm their ability of fertilization by fertilizing the eggs. Among them, I was able to get fertilized eggs and offspring in case of *R. japonica* using 24hrs frozen sperm and 10 days frozen sperm. In case of *O. splendida* and *O. amamiensis* I was able to fertilize egg using 24 hours frozen sperm although I have not find good eggs from any female *B. holsti* to confirm the fertility of frozen sperm of *B. holsti*.

Materials and Methods:

Sperm was collected from the of mature male from after dissecting the frog and bringing out the testes and minced the testes with L-15 media in a thin-walled eppendorf tube to obtain a suitable concentration of sperm. The sperm suspension was mixed with same volume of cryoprotectent. Then it was mixed by inverting and immediately transferred into the -80°C deep freezer within a Styrofoam box. 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 immediately used to fertilize the eggs. At same time, motility of sperms were checked and sperm concentration 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 *R. japonica*, *O. splendida* and *O. amamiensis*. In case of *R. japonica*, a maximum fertilization rate above 30% were found using 24hrs sperm and some success using 10 days sperm. In other frog case availability of good quality eggs were limitations to perform the fertility test of sperm thus checked and confirm sperm activity only for 24hours frozen sperm. Sperm concentration was found stable and some motility up to 30 days sperm were recorded in other endangered species.

Future research plan:

Research is going on to establish the sustainable artificial breeding technique for endangered *Odorrana amamiensis* and some other endangered frogs followed by mass production of their offspring with an aim to conserve these endangered species as it has already been developed for *O. splendida* in our laboratory. I am planning to make several trial of cryopreservation in next breeding season using all *R. japonica*, *O. splendida*, *O. amamiensis*

and *B. holsti* using all 24 hours, 7 days, 30 days and 1 year frozen sperm to optimized cryopreservation technique of their sperm and for this purpose I am rearing many mature males and females of these species.

Research Achievements:

Original paper

1. Komaki, S., A. Kurabayashi, M. M. Islam, K. Tojo, and M. Sumida (2012) Distributional change and epidemic introgression in overlapping areas of Japanese pond frog species over 30 years. *Zool. Sci.*, 29: 351-358.
2. Hasan, M., M. Kuramoto, M. M. Islam, M. S. Alam, M. M. R. Khan and M. Sumida (2012) A new species of genus *Hoplobatrachus* (Anura, Dicroglossidae) from the coastal belt of Bangladesh. *Zootaxa*, 3312: 45-58.
3. Alam, M. S., M. M. Islam, M. M. R. Khan, M. Hasan, R. Wanichanon and M. Sumida (2012) Postmating isolation in six species of three genera (*Hoplobatrachus*, *Euphlyctis* and *Fejervarya*) from family Dicroglossidae (Anura), with special reference to spontaneous production of allotriploids. *Zool. Sci.*, 29: 743-752.

Presentation in conferences

(International conference)

1. Islam, M. M., H. Tokimitsu, M. Uchida, M. Iwanari, T. Fujii, and M. Sumida “Genetic divergence and postmating isolation among the brown frogs from Ryukyu Archipelago, Japan, elucidated by allozyme and mitochondrial gene sequence analyses, crossing experiments and cytological observations” 7th World Congress of Herpetology (August 11, 2012, University of British Columbia, Vancouver, Canada)
2. Komaki, S., A. Kurabayashi, M. M. Islam, K. Tojo, and M. Sumida “Distributional change and epidemic introgression in overlapping areas of Japanese pond frog species over 30 years” 7th World Congress of Herpetology (August 9, 2012, University of British Columbia, Vancouver, Canada)
3. Alam, M. S., M. M. Islam, M. M. R. Khan, M. Hasan, R. Wanichanon and M. Sumida “Postmating isolation in six species of three genera (*Hoplobatrachus*, *Euphlyctis* and *Fejervarya*) from family Dicroglossidae (Anura), with special reference to spontaneous production of allotriploids” 7th World Congress of Herpetology August 11, 2012, University of British Columbia, Vancouver, Canada)
4. Hasan, M., M. Kuramoto, M. M. Islam, M. S. Alam, M. M. R. Khan and M.

Sumida “A new species of genus *Hoplobatrachus* (Anura, Dicroglossidae) from the coastal belt of Bangladesh” 7th World Congress of Herpetology (August 12, 2012, University of British Columbia, Vancouver, Canada)

5. Sumida, M., N. Satou, M. M. Islam, T. Igawa, A. Kurabayashi, K. Ukena, S. Oumi, S. Katsuren, and T. Fujii “Artificial and natural breeding of the endangered frog species *Odorrana ishikawae* and *Odorrana splendida*, analysis of genetic diversity, and usage as resource materials: Case study of fauna conservation in Japan” 7th World Congress of Herpetology (August 11, 2012, University of British Columbia, Vancouver, Canada)

6. Hasan, M., M. Kuramoto, M. M. Islam, M. S. Alam, M. M. R. Khan and M. Sumida “A new species of genus *Hoplobatrachus* (Anura, Dicroglossidae) from the coastal belt of Bangladesh” 18th Biennial International Conference and Annual General Meeting 2012, (December 22, 2012, University of Dhaka, Bangladesh)

(National conference)

1. 住田正幸・井川武・Islam M. M.・新谷望・掛橋竜祐・菅原弘貴・倉林敦・大海昌平・勝連盛輝・田戸美雪・藤井保「中央琉球産絶滅危惧両生類 5 種の遺伝的分化と飼育下繁殖」日本動物学会第 83 回大会 (2012 年 9 月 15 日、大阪大学、豊中)

2. Alam, M. S.・M. M. Islam・M. M. R. Khan・M. Hasan・R. Wanichanon・M. Sumida “Postmating isolation in six species of three genera (*Hoplobatrachus*, *Euphlyctis* and *Fejervarya*) from family Dicroglossidae (Anura), with special reference to spontaneous production of allotriploids” 日本動物学会第 83 回大会 (2012 年 9 月 15 日、大阪大学、豊中)

3. 小巻翔平・倉林敦・イスラム モハメド マフィズル・東城幸治・住田正幸「日本産トノサマガエル種群の分布重複域における浸透交雑と 30 年間で生じた分布変化」日本動物学会第 83 回大会 (2012 年 9 月 15 日、大阪大学、豊中)

4. Islam, M. M.・H. Tokimitsu・M. Uchida・M. Iwanari・T. Fujii・M. Sumida “Genetic divergence and postmating isolation among the brown frogs from Ryukyu Archipelago, Japan, elucidated by allozyme and mitochondrial gene sequence analyses, crossing experiments and cytological observations” 日本遺伝学会第 84 回大会 (2012 年 9 月 26 日、九州大学、福岡)

5. 住田正幸・井川武・イスラム モハメド マフィズル・新谷望・掛橋竜祐・菅原弘貴・西谷琢磨・倉林敦・大海昌平・勝連盛輝・田戸美雪・藤井保 「南西諸島の絶滅危惧両生類における遺伝的分化と飼育下繁殖」日本爬虫両棲類学会第 51 回大会 (2012 年 11 月 10 日、愛知学泉大学、豊田)

6. Hasan, M. • M. Kuramoto • M. M. Islam • M. S. Alam • M. M. R. Khan • M. Sumida
“A new species of genus *Hoplobatrachus* (Anura, Dicroglossidae) from the
coastal belt of Bangladesh”

日本爬虫両棲類学会第 51 回大会 (2012 年 11 月 11 日、愛知学泉大学、豊田)

Grants

Grants-in-Aid for Scientific Research (B) (No.24310173) (Partaker)

Researcher • Alam Mohammad Shafiqul

Title:

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

Introduction:

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

Materials and Methods:

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

Results:

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

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

Conclusion:

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

Future research plan:

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

Research Achievements:

Original Paper:

1. Alam, M. S., M. M. Islam, M. M. R. Khan, M. Hasan, R. Wanichanon and M. Sumida (2012) Postmating isolation in six species of three genera (*Hoplobatrachus*, *Euphlyctis* and *Fejervarya*) from family Dicroglossidae (Anura), with special reference to spontaneous production of allotriploids. Zool. Sci., 29: 743-752.
2. Hasan, M., M. Kuramoto, M. M. Islam, M. S. Alam, M. M. R. Khan and M. Sumida (2012) A new species of genus *Hoplobatrachus* (Anura, Dicroglossidae) from the coastal belt of Bangladesh. Zootaxa, 3312: 45-58.

Presentation in Conferences:

(International Conference)

1. Alam, M. S., M. M. Islam, M. M. R. Khan, M. Hasan, R. Wanichanon and M. Sumida "Postmating isolation in six species of three genera (*Hoplobatrachus*, *Euphlyctis* and *Fejervarya*) from family Dicroglossidae (Anura), with special reference to spontaneous production of allotriploids" 7th World Congress of Herpetology August 11, 2012, University of British Columbia, Vancouver, Canada)
2. Hasan, M., M. Kuramoto, M. M. Islam, M. S. Alam, M. M. R. Khan and M. Sumida "A new species of genus *Hoplobatrachus* (Anura, Dicroglossidae) from the coastal belt of Bangladesh" 7th World Congress of Herpetology (August 12, 2012, University of British Columbia, Vancouver, Canada)
3. Hasan, M., M. Kuramoto, M. M. Islam, M. S. Alam, M. M. R. Khan and M. Sumida "A new species of genus *Hoplobatrachus* (Anura, Dicroglossidae) from the coastal belt of Bangladesh" 18th Biennial International Conference and Annual General Meeting 2012, (December 22, 2012, University of Dhaka, Bangladesh)

(National Conference)

1. Alam, M. S., M. M. Islam, M. M. R. Khan, M. Hasan, R. Wanichanon and M. Sumida "Postmating isolation in six species of three genera (*Hoplobatrachus*, *Euphlyctis* and *Fejervarya*) from family Dicroglossidae (Anura), with special reference to spontaneous production of allotriploids" 83th Annual Meeting of the Zoological Society The 83rd Annual Meeting of the Zoological Society of Japan, Toyonaka, September 15, 2012.
2. Hasan, M., M. Kuramoto, M. M. Islam, M. S. Alam, M. M. R. Khan and M.

Sumida “A new species of genus *Hoplobatrachus* (Anura, Dicroglossidae) from the coastal belt of Bangladesh” The 51st Annual Meeting of the Herpetological Society of Japan, Yoyota, November 11, 2012.

[学長裁量による特任教員]

特任教授・柏木昭彦 (Akihiko Kashiwagi)

大学院理学研究科附属両生類研究施設は、平成 24 年 6 月から 5 年間の予定で文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) に参加、“ネットイツメガエル” を研究者・教育担当者の要望に応じて提供を行う、わが国で唯一の中核期間である。広島大学学長のご要請をお受けして平成 24 年 4 月 1 日から特任教授として採用され、「ネットイツメガエルの近交化・保存・提供」の任務に当たっている。平成 24 年度に実施した主な行事について以下に挙げる。

- ・提供: 学内はもとより京都大学、奈良女子大学、日本大学等に提供を行った。平成 25 年 3 月 31 日の時点で、提供した件数 88、個体数 2,014 に上った。この数値はいずれも平成 24 年度の目標を大幅に上回り、5 年後のそれに迫るものとなった。

- ・個別指導: ネットイツメガエルを受け入れたものの飼育が思うようにいかない、などといった不満の声が研究者らから聞こえてきた。そこで、希望者を募って両生類研究施設 NBRP に来てもらい 1 週間以上にわたり、飼育のための個別指導を行っている。京都大学、日本大学、大阪大学から教員もしくは大学院生を受け入れた。

- ・展示: 第 83 回日本動物学会・動物学ひろば (大阪、9 月)、第 35 回日本分子生物学会 (福岡、12 月)、第 94 回日本生物教育学会 (東広島、1 月)

- ・見学: ノーベル物理学賞受賞者の益川敏英先生を含め 405 名の方々が NBRP の見学に来られ案内した。

研究内容等は以下の通りである。

[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]

これまで半世紀以上にわたって、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) は医学・生物学における重要なモデル生物であったが、一方、ごく最近になってネットイツメガエル (*Xenopus (Silurana) tropicalis*) が両生類のモデル生物として舞台に登場してきた。それには次のような理由が挙げられる: ① ネットイツメガエルは 2 倍体で、世代時間が比較的短く (雄 6 ヶ月、雌 8 ヶ月)、ゲノムや遺伝学の研究を行うのに好都合である。これに対して、アフリカツメガエルには異質 4 倍体、生活環が長い (1.5~2 年) とといった欠点がある。② ネットイツメガエルのゲノム配列は決定されている。

ネットイツメガエルの属名についての論争がある。以前、ピパ科のカエルはピパ (*Pipa*)、ツメガエル (*Xenopus*)、コンゴツメガエル (*Hymenochirus*)、

コンゴツメガエルモドキ (*Pseudhymenochirus*) と 4 属から構成され、ネッタイツメガエルはツメガエル属の 1 種とされていた。ところが形態計測解析から、ネッタイツメガエルはツメガエル属のカエルよりも他の 3 属に近いことがわかり、別系統とみなしてネッタイツメガエル属 (*Silurana*) の中に置くことが提案された (Cannatella and Trueb, 1988)。これに対して、リボソーム DNA 配列解析によれば、ネッタイツメガエルはツメガエル属のカエルと近縁である (de Sa and Hillis, 1990)。ネッタイツメガエルの種名を *Xenopus (Silurana) tropicalis* と表記する研究者は多く、私達もそれを受け入れる。

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、研究目的のためにネッタイツメガエルを提供する中核機関に指名されている。

[将来の展望] 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べ、そして化学物質の作用をスクリーニングするための遺伝子改変ガエルを作製しているところである。今後は、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、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ている。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システムを開発する。

[方法]

甲状腺ホルモン応答レセプター依存性ルシフェラーゼ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、甲状腺ホルモンおよびその合成を阻害するメチマゾールに曝露した。

[結果と考察]

あらかじめメチマゾール処理を施して甲状腺ホルモン合成を抑制しておいたトランスジェニック F1 幼生を甲状腺ホルモンに曝したところ、幼生のルシフェラーゼ活性は甲状腺ホルモン濃度に依存して増加した。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ガエル系統を使って甲状腺ホルモンアゴニズムもしくはアンタゴニズムを有する化学物質を簡単に迅速にしかも高感度で *in vivo* バイオアッセイのできる事がわかった。

[将来の展望]

このトランスジェニック系統を用いて、多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 法の開発によって両生類逆遺伝学は新たな段階に突入した。

4. 両生類の生活環に対する過重力と強磁場影響 Effects of hypergravity and strong static magnetic fields on amphibian life cycles

[目的]

宇宙開発の長期ビジョンとしては、宇宙誕生の謎の解明、宇宙航空技術の活用による安全で豊かな社会の実現、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。宇宙環境影響の標的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。

[方法]

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 ($-1400\text{T}^2\text{m}^{-1}$)、15T ($0\text{T}^2\text{m}^{-1}$)、12T ($+1200\text{T}^2\text{m}^{-1}$) を若いネッタイツメガエルオタマジャクシに印加した。

[結果と考察]

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をしたり、容器底面で横たわるなどの異常行動が認められた。

[将来の展望] 過重力印加による頭部障害の誘起や、強磁場曝露による異常行動のメカニズムを調べる。

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* BIO_2013_3855.3d. doi: 10.1242/bio.20133855: 1-5.
3. Yanagisawa, M., Kashiwagi, K., Hanada, H., Shinkai, T., Yoshitome, S., Kubo, H., Sakai, M., Fujii, H., Yamashita, M., Kashiwagi, A., Watanabe, M. and Furuno, N. 2012. Analysis of the head-defects caused by hypergravity in early *Xenopus* embryos. *Biol. Sci. Space* 26: 1-6.
4. Yanagisawa, M., Kashiwagi, K., Hanada, H., Shinkai, T., Yoshitome, S., Kubo, H., Sakai, M., Fujii, H., Yamashita, M., Kashiwagi, A., Watanabe, M. and Furuno, N. 2012. Hypergravity specifically affects anterior head formation in early *Xenopus* embryos. *Biol. Sci. Space*. 26: 47-52.

② 総説・著書

該当なし

④ 学会発表

国内学会

1. 柏木昭彦、柏木啓子、花田秀樹、小林里美、難波ちよ「教材としてのネットアイツメガエルおよびアホロートルの展示」第94回日本生物教育学会（2013年1月、広島大学、東広島）
2. Ken-ichi T. Suzuki¹, Keiko Kashiwagi, Tetsushi Sakuma, Yukiko Isoyama, Hiroshi Ochiai, Akihiko Kashiwagi, Takashi Yamamoto. Targeted disruption of EGFP transgene in *Xenopus laevis* using customized transcription activator-like (JYSS1-18) effector nucleases (TALENs) 第45回日本発生物学会（2012年5月 神戸インターナショナル コンファレンスセンター 神戸）
3. 柏木昭彦、柏木啓子、花田秀樹、小林里美、竹中純子、住田正幸「ツメガエルって、どんなカエル？」第83回日本動物学会（2012年9月、大阪大学、大阪）
4. 柏木昭彦、柏木啓子、花田秀樹、中島圭介、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35回日本分子生物学会（2012年12月、マリンメッセ福岡、福岡）
5. 磯山由樹子、佐久間哲史、柏木啓子、落合 博、柏木昭彦、山本 卓、鈴木賢一「アフリカツメガエルにおける TALEN を用いた効率的な標的遺伝子破壊」第35回日本分子生物学会（2012年12月、マリンメッセ福岡、福岡）
6. 佐能正剛、柏木啓子、花田秀樹、松原加奈、川畑公平、中村直樹、鈴木賢一、山本 卓、新海 正、藤本成明、杉原数美、北村繁幸、柏木昭彦、太田 茂「甲状腺ホルモン様化学物質アミオダロン曝露によるカエルの変態に対する影響」第26回環境ホルモン学会（2012年6月、東京大学 山上会館、東京）

国際学会

該当なし

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」3000千円（代表）
2. 宇宙環境利用科学委員会ワーキンググループ(WG)活動（JAXA）「両生類の生活環境に対する過重力および磁場の影響」150千円（代表）

⑤ その他（会合への参加・出席）

1. 柏木昭彦、鈴木 厚「NBRP メダカ-NIBB 精子凍結・人工授精トレーニングコース」(2012年8月、基礎生物学研究所、岡崎)
2. 鈴木賢一、柏木啓子、磯山由樹子、佐久間哲史、落合 博、柏木昭彦、山本卓、「人工ヌクレアーゼを利用した両生類におけるゲノム編集」第2回ゲノム編集研究会 (2012年9月20日、岡崎コンファレンスセンター、岡崎)
3. 柏木昭彦、田澤一朗「第6回NBRPデータベース研究会」(2013年3月、国立遺伝学研究所、三島)

プロジェクト研究①

[1] ネットア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)

ネットア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したり、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。

[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

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医薬品・生活関連物質 (Pharmaceuticals and Personal Care Products; PPCPs) など多数の化学物質が世界の環境中から見つかっている。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システムを開発し、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。

[3] 両生類の生活環に対する過重力と強磁場影響

Effects of hypergravity and strong static magnetic fields on amphibian life

cycles

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

宇宙開発の長期ビジョンとしては、宇宙誕生の謎の解明、宇宙航空技術の活用による安全で豊かな社会の実現、宇宙空間での生活や火星への移住、などが挙げられる。しかし実際に、宇宙空間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。宇宙環境影響の標的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よく用いられてきた。

これまで10年以上にわたって、私達はJAXAが主催する宇宙環境利用研究班・ワーキンググループ活動に参加し、両生類を用いて過重力および強磁場の実験を手がけてきた。過重力・強磁場の初期胚に与える影響は特に顕著で、発生阻害や形態形成不全、遺伝子発現低下などを引き起こす。今後は、こうした異常誘発のメカニズムを解明したいと考えている。

[4] 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 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。

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* BIO_2013_3855.3d. doi: 10.1242/bio.20133855: 1-5.
3. Sakuma, T., Hosoi, S., Woltjen, K. I., Kashiwagi, K., Wada, H., Ochiai, H., Miyamoto, T., Kawai, N., Sasakura, Y. et al. 2013. Efficient TALEN construction and evaluation methods for human cell and animal applications. *Genes to Cells* 18(4): 315-326
4. Yanagisawa, M., Kashiwagi, K., Hanada, H., Shinkai, T., Yoshitome, S., Kubo, H., Sakai, M., Fujii, H., Yamashita, M., Kashiwagi, A., Watanabe, M. and Furuno, N. 2012. Analysis of the head-defects caused by hypergravity in early *Xenopus* embryos. *Biol. Sci. Space* 26: 1-6.
5. Yanagisawa, M., Kashiwagi, K., Hanada, H., Shinkai, T., Yoshitome, S., Kubo, H., Sakai, M., Fujii, H., Yamashita, M., Kashiwagi, A., Watanabe, M. and Furuno, N. 2012. Hypergravity specifically affects anterior head formation in early *Xenopus* embryos. *Biol. Sci. Space*. 26: 47-52.

② 総説・著書

該当なし

③ 学会発表

国内学会

1. 柏木昭彦、柏木啓子、花田秀樹、小林里美、難波ちよ「教材としてのネットアイツメガエルおよびアホロートルの展示」第94回日本生物教育学会（2013年1月、広島大学、東広島）
2. Ken-ichi T. Suzuki¹, Keiko Kashiwagi, Tetsushi Sakuma, Yukiko Isoyama, Hiroshi Ochiai, Akihiko Kashiwagi, Takashi Yamamoto. Targeted disruption

of EGFP transgene in *Xenopus laevis* using customized transcription activator-like (JYSS1-18) effector nucleases (TALENs) 第45回日本発
生生物学会 (2012年 5月 神戸インターナショナル コンファレンスセン
ター 神戸)

3. 柏木昭彦、柏木啓子、花田秀樹、小林里美、竹中純子、住田正幸「ツメガエルって、どんなカエル？」第 83 回日本動物学会 (2012 年 9 月、大阪大学、大阪)
4. 柏木昭彦、柏木啓子、花田秀樹、中島圭介、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 35 回日本分子生物学会 (2012 年 12 月、マリンメッセ福岡、福岡)
5. 磯山由樹子、佐久間哲史、柏木啓子、落合 博、柏木昭彦、山本 卓、鈴木賢一「アフリカツメガエルにおける TALEN を用いた効率的な標的遺伝子破壊」第 35 回日本分子生物学会 (2012 年 12 月、マリンメッセ福岡、福岡)
6. 佐能正剛、柏木啓子、花田秀樹、松原加奈、川畑公平、中村直樹、鈴木賢一、山本 卓、新海 正、藤本成明、杉原数美、北村繁幸、柏木昭彦、太田 茂「甲状腺ホルモン様化学物質アミオダロン曝露によるカエルの変態に対する影響」第 26 回環境ホルモン学会 (2012 年 6 月、東京大学 山上会館、東京)

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」3,000 千円 (代表)
2. 宇宙環境利用科学委員会ワーキンググループ(WG)活動 (JAXA)「両生類の生活環に対する過重力および磁場の影響」150 千円 (代表)

⑤ その他 (会合への参加・出席)

1. 柏木昭彦、鈴木 厚「NBRP メダカ-NIBB 精子凍結・人工授精トレーニングコース」(2012 年 8 月、基礎生物学研究所、岡崎)
2. 鈴木賢一、柏木啓子、磯山由樹子、佐久間哲史、落合 博、柏木昭彦、山本卓、「人工ヌクレアーゼを利用した両生類におけるゲノム編集」第 2 回ゲノム編集研究会 (2012 年 9 月 20 日、岡崎コンファレンスセンター、岡崎)
3. 柏木昭彦、田澤一朗「第 6 回 NBRP データベース研究会」(2013 年 3 月、国立遺伝学研究所、三島)

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り、内分泌系にも影響を与える事が明らかになった。

[2] 両生類の生活環に対する強磁場の影響

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

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

[目的と成果]

カエル胚は、体外受精を行うので胚の観察が容易で、発生も早いことから、磁場の影響を調べるには有用と考えられる。アフリカツメガエルやニシツメガエルを用いて、卵減数分裂から変態までの磁場の影響を調べた。その結果、卵成熟過程において卵の色素の分布に影響を与える事や、初期発生にさまざまな影響を与える事が明らかになった。また、オタマジャクシを強磁場に曝露すると、行動に異常が生じる事もわかった。現在、その行動異常の原因を探っている。

[3] 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きているが、それ以外の動物ではES細胞が確立されていない事で不可能である。しかしながら、最近、ZNF (Zinc finger nuclease), 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。その結果、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。

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

(* Corresponding author)

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

3. Yanagisawa, M., Kashiwagi, K., Hanada, H., Shinkai, T., Yoshitome, S., Kubo, H., Sakai, M., Fujii, H., Yamashi, M., Kashiwagi, A. Watanabe, M*, Furuno, N. *. (2012) Hypergravity specifically affects anterior head formation in early *Xenopus* embryos. Biol. Sci. Space, **26** 47-52

(* Corresponding author)

4. 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*. Biology Open, in press

5. Yanagisawa, M., Furuno, N.*, Watanabe, M., Kashiwagi, K., Hanada, H., Shinkai, T., Yoshitome, S., Kubo, H., Sakai, M., Fujii, H., Suzuki, K., Yamashita, M. and Kashiwagi, A. Hypergravity specifically effects head formation in the *Xenopus* embryos raseid under hypergravity condition. Space Utili. Res. 2012, in press (* Corresponding author)

6. Fujiwara, Y., Kashiwagi, K., Nakagawa, M., Shinkai, T., Yanagisawa, M., Furuno, N., Hanada, H., Suzuki, K., Katsu, K., Yamashita, M., Yamamoto, T., Tanimoto, Y. and Kashiwagi, A. Effects of magnetically controlled microgravity and hypergravity environment on amphibian behavior. Space Utili. Res. 2012, 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 印刷中

③学会発表

国内学会

国際学会

④科研費等の受け入れ状況

宇宙環境利用科学委員会研究班ワーキンググループ (2012) 両生類の生活環に対する過重力の影響 15万円、研究分但者

プロジェクト研究③

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–

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

¹⁾ 広島大学大学院理学研究科附属両生類研究施設

²⁾ 宗像市ひかりが丘 3-6-15

³⁾ 奄美市農林課

⁴⁾ 沖縄県環境衛生研究所

⁵⁾ 広島大学大学院生物圏科学研究科

⁶⁾ 広島大学大学院総合科学研究科

⁷⁾ 広島県立大学人間文化学部

⁸⁾ 京都大学大学院農学研究科

研究内容

[1] 絶滅危惧種アマミ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

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℃、20℃、22℃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℃が最も高く、20℃では劣り、22℃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℃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、孵化まではならず、ヤエヤマハラブチガエルとオットン・ホルストガエル（狭義の *Babina* 属）の間には、完全な交配後隔離が発達していることが示されている。

[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

昨年に続き、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

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
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. lateralis* 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
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°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°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°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 IB 類に分類されており、沖縄県と鹿児島県では天然記念物に指定されている。一方、本種は人工繁殖に成功しており、飼育室では感染症に対する抵抗性を示すことが分かっている。このことから絶滅危惧に瀕している原因の一つに、野生環境下での自然免疫システムの低下の可能性が考えられる。水辺という微生物の攻撃を受けやすい環境にいるカエルにとって、皮膚から分泌される抗菌ペプチドは重要な生体防御因子であり、自然免疫システムの要と

なっている。先行研究により、イシカワガエルの皮膚から生化学的手法により 10 種類の抗菌ペプチドが単離・同定されている。さらに、分子生物学的手法により 12 種類の分泌ペプチドが推定され、これらの中には既存の抗菌ペプチドファミリーとは全く異なる構造を持つ新奇なペプチドが含まれている。本研究では、これら 22 種類のペプチドのグラム陰性菌・グラム陽性菌・真菌に対する最小発育阻止濃度 (Minimal inhibitory concentration ; MIC) を測定し、有効菌種のレパートリーを示す抗菌スペクトルを評価することを目的とした。

[材料・方法]

最小発育阻止濃度測定は、96 穴プレートに各ウェルに培地 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 *Odorrana* 属・*Rana* 属のカエルの遺伝子発現レベルや抗菌活性と水質悪化や環境ホルモンなどとの関係を解析することで、野生環境におけるイシカワガエルの絶滅危惧の要因を解明していきたいと考えている。

[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ックア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ックア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ックア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. Komaki, S., A. Kurabayashi, M. M. Islam, K. Tojo, and M. Sumida (2012)

Distributional change and epidemic introgression in overlapping areas of Japanese pond frog species over 30 years. *Zool. Sci.*, 29: 351–358.

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

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

4. Alam, M. S., M. M. Islam, M. M. R. Khan, M. Hasan, R. Wanichanon and M. Sumida (2012) Postmating isolation in six species of three genera (*Hoplobatrachus*, *Euphlyctis* and *Fejervarya*) from family Dicroglossidae (Anura), with special reference to spontaneous production of allotriploids. *Zool. Sci.*, 29: 743–752.

5. Igawa, T., S. Oumi, S. Katsuren and M. Sumida (2013) Population structure and landscape genetics of two endangered frog species of Genus *Odorrana*: different scenarios on two islands. *Heredity*, 110: 46–56.

6. 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.

7. 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: in press.

②総説・著書・その他
該当無し

③学会発表
国際学会

1. Komaki, S., A. Kurabayashi, M. M. Islam, K. Tojo, and M. Sumida “Distributional change and epidemic introgression in overlapping areas of Japanese pond frog species over 30 years” 7th World Congress of Herpetology (August 9, 2012, University of British Columbia, Vancouver,

Canada)

2. Kurabayashi, A., M. Matsui, Daicus, M. B., H. S. Yong, N. Ahmad, A. Sudin, M. Kuramoto, A. Hamidy, and M. Sumida “From Antarctica or Asia? New colonization scenario for Australian–New Guinean narrow mouth toads suggested from the findings on a mysterious genus *Gastrophrynoides*” 7th World Congress of Herpetology (August 10, 2012, University of British Columbia, Vancouver, Canada)

3. Islam, M. M., H. Tokimitsu, M. Uchida, M. Iwanari, T. Fujii, and M. Sumida “Genetic divergence and postmating isolation among the brown frogs from Ryukyu Archipelago, Japan, elucidated by allozyme and mitochondrial gene sequence analyses, crossing experiments and cytological observations” 7th World Congress of Herpetology (August 11, 2012, University of British Columbia, Vancouver, Canada)

4. Sumida, M., N. Satou, M. M. Islam, T. Igawa, A. Kurabayashi, K. Ukena, S. Oumi, S. Katsuren, and T. Fujii “Artificial and natural breeding of the endangered frog species *Odorrana ishikawae* and *Odorrana splendida*, analysis of genetic diversity, and usage as resource materials: Case study of fauna conservation in Japan” 7th World Congress of Herpetology (August 11, 2012, University of British Columbia, Vancouver, Canada)

5. Alam, M. S., M. M. Islam, M. M. R. Khan, M. Hasan, R. Wanichanon and M. Sumida “Postmating isolation in six species of three genera (*Hoplobatrachus*, *Euphlyctis* and *Fejervarya*) from family *Dicroglossidae* (Anura), with special reference to spontaneous production of allotriploids” 7th World Congress of Herpetology August 11, 2012, University of British Columbia, Vancouver, Canada)

6. Hasan, M., M. Kuramoto, M. M. Islam, M. S. Alam, M. M. R. Khan and M. Sumida “A new species of genus *Hoplobatrachus* (Anura, *Dicroglossidae*) from the coastal belt of Bangladesh” 7th World Congress of Herpetology (August 12, 2012, University of British Columbia, Vancouver, Canada)

7. Kakehashi, R., A. Kurabayashi, S. Oumi, S. Katsuren, M. Hosoi, and M. Sumida “Complete mitochondrial sequences of the three Japanese *Babina* (*Ranidae*, Anura) species and the phylogenetic position among *Ranidae*” 7th World Congress of Herpetology (August 12, 2012, University of British Columbia, Vancouver, Canada)

8. Hasan, M., M. Kuramoto, M. M. Islam, M. S. Alam, M. M. R. Khan and M. Sumida “A new species of genus *Hoplobatrachus* (Anura, *Dicroglossidae*)

from the coastal belt of Bangladesh” 18th Biennial International Conference and Annual General Meeting 2012, (December 22, 2012, University of Dhaka, Bangladesh)

国内学会

1. 住田正幸・井川武・Islam M. M.・新谷望・掛橋竜祐・菅原弘貴・倉林敦・大海昌平・勝連盛輝・田戸美雪・藤井保「中央琉球産絶滅危惧両生類 5 種の遺伝的分化と飼育下繁殖」

日本動物学会第 83 回大会 (2012 年 9 月 15 日、大阪大学、豊中)

2. Alam, M. S.・M. M. Islam・M. M. R. Khan・M. Hasan・R. Wanichanon・M. Sumida “Postmating isolation in six species of three genera (Hoplobatrachus, Euphlyctis and Fejervarya) from family Dicroglossidae (Anura), with special reference to spontaneous production of allotriploids” 日本動物学会第 83 回大会 (2012 年 9 月 15 日、大阪大学、豊中)

3. 小巻翔平・倉林敦・イスラム モハメド マフィズル・東城幸治・住田正幸「日本産トノサマガエル種群の分布重複域における浸透交雑と 30 年間で生じた分布変化」日本動物学会第 83 回大会 (2012 年 9 月 15 日、大阪大学、豊中)

4. 井川武・菅原弘貴・本田正尚・富永篤・大海昌平・勝連盛輝・太田英利・松井正文・松井正文「マイクロサテライトマーカーを用いた絶滅危惧種および天然記念物イボイモリの遺伝的集団構造の解明」日本遺伝学会第 84 回大会 (2012 年 9 月 25 日、九州大学、福岡)

5. Islam, M. M.・H. Tokimitsu・M. Uchida・M. Iwanari・T. Fujii・M. Sumida “Genetic divergence and postmating isolation among the brown frogs from Ryukyu Archipelago, Japan, elucidated by allozyme and mitochondrial gene sequence analyses, crossing experiments and cytological observations” 日本遺伝学会第 84 回大会 (2012 年 9 月 26 日、九州大学、福岡)

6. 住田正幸・井川武・イスラム モハメド マフィズル・新谷望・掛橋竜祐・菅原弘貴・西谷琢磨・倉林敦・大海昌平・勝連盛輝・田戸美雪・藤井保「南西諸島の絶滅危惧両生類における遺伝的分化と飼育下繁殖」日本爬虫両棲類学会第 51 回大会 (2012 年 11 月 10 日、愛知学泉大学、豊田)

7. 新谷望・井川武・住田正幸「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」日本爬虫両棲類学会第 51 回大会 (2012 年 11 月 10 日、愛知学泉大学、豊田)

8. 倉林敦・掛橋竜祐・田澤一朗・住田正幸・原本悦和・大嶋友美・伊藤弓弦「次世代モデル動物ネッタイツメガエルとその輸送法の改善について」日本

爬虫両棲類学会第 51 回大会 (2012 年 11 月 10 日、愛知学泉大学、豊田)

9. 徳増大輔・井川武・Min Mi-Sook・住田正幸「ウシガエルはどこから来て、なぜ駆逐されないのか? : 侵入成功と個体群存続における遺伝的要因の調査」
日本爬虫両棲類学会第 51 回大会 (2012 年 11 月 10 日~11 日、愛知学泉大学、豊田)

10. Hasan, M.・M. Kuramoto・M. M. Islam・M. S. Alam・M. M. R. Khan・M. Sumida “A new species of genus Hoplobatrachus (Anura, Dicroglossidae) from the coastal belt of Bangladesh”
日本爬虫両棲類学会第 51 回大会 (2012 年 11 月 11 日、愛知学泉大学、豊田)

11. 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 3 期 NBRP 開始記念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-第 3 期への挑戦- (2012 年 11 月 21 日、品川)

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 12,740 千円 (担当: 住田正幸、矢尾板芳郎)

2. 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」5,850 千円 (研究代表者: 住田正幸、研究分担者: 倉林敦、井川武、Islam M. M.)

3. 奨学寄付金「インドネシアの種多様性に関する研究」(Brawijaya 大学 Aris Soewondo) 3,000 ドル (担当: 住田正幸)

4. 科学研究費補助金 若手研究 (B) 「西南諸島に産する両生類絶滅危惧種の遺伝的多様性の解明と飼育繁殖における遺伝的管理」1,300 千円 (担当: 井川武)