

2015年度両生類研究施設研究活動及び成果報告書

平成28年9月23日

広島大学大学院理学研究科附属両生類研究施設



目次

I. 施設概要.....	3
II. 教育活動.....	5
III. 社会活動.....	6
IV. 国際交流活動とその他.....	8
V. 各研究グループの研究内容と研究業績.....	10
A) 「発生」研究グループ.....	10
B) 「進化多様性・生命サイクル」研究グループ ...	19
C) 「遺伝情報・環境影響」研究グループ.....	47

I. 施設概要

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

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

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

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

平成17年度に系統維持班の助教授が定員削減の対象となった。平成19年度に助手2と教務員2から助教4への振替が行われた。また、平成24年度4月からNBRP事業支援として、学長裁量経費により特任教授が採用された。平成27年度における施設教員の構成は教授1（矢尾板芳郎）、特任教授1（柏木昭彦）、准教授4（鈴木厚、古野伸明、三浦郁夫、高瀬稔）、助教4（中島圭介、倉林敦、花田秀樹、田澤一朗）、客員教授2（国立遺伝学研究所 北野潤教授、徳島大学 立花誠教授）、助教（Islam Mohammed Mafizul）、特任助教（Hasan Mahmudul）、研究員3（竹林公子、柏木啓子、）、契約一般職員（中島妙子）である。系統維持班の人員の構成は花田秀樹助教（兼任）、技術員1（宇都武司）、契約技能員2（難波ちよ、玉城淳子）、契約用務員2（水戸妙子、渡辺八重子）、である。事務室には契約一般職員1（岡下早耶佳）がいる。

系統維持班では、両生類39種（有尾類11種、無尾類28種）180系統（有尾類31系統、無尾類149系統）の野外系統及び突然変異系統等の特殊系統を保存している。これまでに確立されている系統には、野外種育成系統（148系統）、自然・人為色彩突然変異系統、四肢形成異常系統、癌多発系統、遺伝子組換え系統、遺伝子連鎖群解析系統、人工新種系統、核細胞質雑種系統および人為倍数体系統などがある。現在維持している変異系統は32系統にのぼる。

系統維持班では平成27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3,637匹の飼育に加えて、交配系統数：12系統、飼育幼生数：2,779匹、新しい系統数：24系統、新しい系統の飼育幼生数：408匹の系統維持活動を行い、7系統99匹を研究・教育材料として大学および高等学校、中学校、小学校に配布した。特に、系統維持班とNBRPからは広島県教育バザールへ参加し、生物教材としてアホロートルを17件248匹、およびフタホシコオロギ2,000匹を提供した。また、昭和51年より現在までに、日本や世界各地から収集されたおよそ10科110種のカエルと、実験的に作製された100系統のカエル、合計1万匹以上がマイナス80度に凍結保存されている。

文部科学省は平成14年から、生命科学を総合的に発展させる目的で、重要な動植物や微生物等のバイオリソースを研究者に提供するナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)を実施してきたが、平成27年より国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)の管理下で運営されることになった。各期が5年で、現在、本プロジェクトは第3期に入り、全国で29の研究機関が中核を形成している。両生類研究施設は「ネッタイツメガエルの近交化・標準系統の樹立・提供」というスローガンの下、NBRPに参画、ネッタイツメガエルの提供を行うわが国唯一の中核機関である。西アフリカの低地熱帯雨林に生息するネッタイツメガエル*Xenopus tropicalis*は、1) 2倍体で発生・成長が速く、生活環も短いなどの諸特徴を備えていることから遺伝学研究が容易、またCRISPR/Casシステム用いると迅速・高効率に遺伝子機能の解析が可能、2) ヒト疾患関連遺伝子の79%をオルソログとして所有、といった理由から、ネッタイツメガエルはポストゲノム時代の必要不可欠なモデル動物の一つと見做されている。NBRP-ネッタイツメガエルの課題管理者は柏木昭彦、特別研究員は柏木啓子、課題協力者に鈴木 厚、古野伸明、倉林 敦、中島圭介、花田秀樹、田澤一朗、竹林公子、彦坂 暁(総合科学院)がいる。また契約技術職員として、梶井陽子、村上 茂、三堂貴子、折羽邦彦の4名がいる。平成27年には以下の行事を開催した。①3月18日~19日にNBRP水生生物の4グループと共同で岡崎コンファレンスセンターにおいて国際シンポジウム『International Meeting on Aquatic Model Organism for Human Disease and Toxicology Research』(AMED後援)を開催、②日本動物学会第86回新潟大会シンポジウム開催 ナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)シンポジウム「ネッタイツメガエル」—新たな兆し~ネッタイツメガエル・アフリカツメガエルの研究舞台より— (9月18日, 新潟大学, 新潟市)、③NBRP「ネッタイツメガエル」運営委員会開催(12月2日 第38回日本分子生物学会開催期間中に国際会議場で、神戸市)、④第38回日本分子生物学会(12月1~3日, 神戸国際展示場、神戸市)でネッタイツメガエル展示とポスター発表「ネッタイツメガエルを用いた最近の研究」、⑤技術講習会を開催(両生類研究施設、2月29日~3月2日)、⑥見学者・訪問者全員に説明を行った。

特記事項として、ノーベル生理・医学賞受賞者J. B. Gurdon卿が3月7日、また著名な発生生物学者Scott Gilbert博士が3月22日にご来訪され、NBRP-ネッタイツメガエルに対して高い評価をいただいた。

平成24年度から総合博物館の理学研究科サテライト館のオープンスペースを玄関ロビーに開設しており、今年度の施設見学者/施設訪問者は29件824人であった。

平成23度から研究活動の活性化を目指して、研究員体制をはじめた。今年度は、学内から19名の研究員、学外海外から43名(うち10名が海外から)の客員研究員が推薦され、学内外および海外とも共同研究を展開している。共同研究相手先は、国内では東京大学、京都大学、九州大学、北海道大学、名古屋大学、岡山大学、総合研究大学院大学、山形大学、山口大学、鳥取大学、徳島大学、鹿児島大学、防衛大学、札幌医科大学、大阪市立大学、川崎医科大学、京都産業大学、県立広島大学、福岡教育大学、北里大学、麻生大学、長浜バイオ大学、いわき明星大学、大阪大谷大学、カズサDNA研究所、芝浦工業大学、基礎生物学研究所、海外ではNIH(米国)、コネチカット大学(米国)、カリフォルニア大学(米国)、ブラウンシュバイク工科大学(ドイツ)、ポーツマス大学(英国)、キャンベラ大学(豪州)、ラ トローブ大学(豪州)、ローザンヌ大学(スイス)、ノースウェスト大学(南アフリカ)、成都生物学研究所(中国)、バングラデシュ農業大学(バングラデシュ)等がある。

今年度は、1月5日に両生類研究施設運営委員会を開催した。

II. 教育活動

両生類研究施設は、生物科学専攻で「両生類発生遺伝学演習」、「両生類多様化機構学演習」、「両生類分化制御機構学演習」を開講し、「細胞と生命」、「形態形成」、「性の起源」、「分類・進化」の授業や「スロー生物学演習」、「社会実践生物学特論」、「生物科学特別研究」や「生物科学研究セミナー」に携わっている。今年度、博士課程前期1年に3名、2年に4名、後期1年に1名、2年に1名、3年に2名で合計11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2件、博士課程後期学生の国内学会発表は1件、原著論文発表が2編、博士課程前期・後期学生が共に共同発表した国内学会発表は2件、原著論文発表が1編である。

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

大学院生の教育活動の一環として、月に2回、教員、ポスドク、博士課程後期の大学院生が研究活動報告を両生類研究施設公開セミナーとして行っている。

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

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

III. 社会活動

○ 見学・研修等

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

・施設訪問者見学者：29件824人

鈴木 厚、竹林公子, 柏木昭彦、花田秀樹、柏木啓子, 難波ちよ、宇都武司

・広島県立教育センター主催の「第19回生物教材バザール」に参加、教材の提供および解説を行う（2015年5月 東広島）

○ セミナー・講義・講演会講師等

柏木昭彦

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

・安田女子短期大学非常勤講師 前期「人間と環境」を担当

鈴木 厚

・「ゲノム・遺伝子から見た発生の仕組みとナショナルバイオリソースプロジェクト・ネットイツメガエル」兵庫県赤穂市立有年中学校「理科おもしろ実験教室」における講演, およびツメガエル卵受精実験等の生物実験教室開催(2015年8月 赤穂)

・「両生類を用いた中胚葉誘導・神経誘導の研究と再生医学への応用」名古屋大学医学部における講義 (2015年12月 名古屋)

三浦郁夫

・「カエルの遺伝と進化」 第15回クリスマスレクチャー (2015年12月20日 広島国泰寺高校 広島市)

・「カエルの遺伝と進化学」 祇園北高校サイエンスセミナーII (2015年12月21日 広島市)

・「遺伝と進化学のエッセンス」 放送大学面接授業 (2015年8月5-6日 放送大学広島学習センター 広島市)

倉林 敦

・「Progress report of the Horizontal gene transfer project」ブラウنشユバイク工科大学動物学教室、動物学教室セミナー (2016年3月14日 ブラウンシュバイク工科大学ドイツ)

○ 各種役員, 委員

柏木昭彦

・生物遺伝資源委員会委員 (国立遺伝学研究所)

・文部科学省第3期NBRP「ネットイツメガエルの近交化・標準系統の樹立・提供」課題管理者

・山陽女子短期大学臨床検査学科客員教授

・安田女子短期大学非常勤講師

三浦郁夫

・(財)染色体学会・理事

・(財)染色体学会・学会賞選考常任委員

- Editorial Board of Asian Herpetological Research (編集委員)
- Editorial Board of Sexual Development (編集委員)
- Editorial Board of Chromosome Science (編集委員)
- Editorial Board of Dataset Papers in Biology (編集委員)
- キャンベラ大学 (豪州) 非常勤准教授

鈴木 厚

- 文部科学省/日本医療研究開発機構 (AMED) ナショナルバイオリソースプロジェクト ネットイツイメガエル 課題管理協力者 (非生体リソース, オープンラボ, 技術講習会, 国際連携, webフォーラムの担当, および責任者)
- 国際ツメガエルデータベース (Xenbase) ツメガエル遺伝子命名委員会 (*Xenopus* Gene Nomenclature Committee) 委員
- 英国ツメガエルリソース拠点 (EXRC) 運営会議 (Strategic Board Meeting) 委員
- 国際ツメガエルゲノムプロジェクト プロジェクトリーダーシップメンバー
- 日本ツメガエルゲノムプロジェクト ワーキンググループ委員 (ゲノム配列決定グループリーダーメンバー, RNA-seq解析グループリーダー, 遺伝子モデルグループリーダー)
- 日本ツメガエル研究会 世話人会委員
- 日本ツメガエル研究集会 組織委員
- 科学学習塾エデュパーク 学習成果発表会審査員

高瀬 稔

- 公益法人日本動物学会中国四国支部会計委員
- 第40回日本比較内分泌学会大会実行委員

倉林 敦

- 岩国市シロヘビ調査研究委員会

花田秀樹

- 日本動物学会中四国支部、会計監査

Mahmudul Hasan

- Committee member of Red list Assessment Group-Amphibians, IUCN, Bangladesh

IV. 国際交流活動とその他

〈国際交流活動〉

○国際共同研究

矢尾板芳郎・中島圭介

- ・ヴァージニア大学（米国）

研究テーマ：「ネットアイツメガエルの*nop*遺伝子KO個体作製と解析」

- ・NIH（米国）

研究テーマ：「ネットアイツメガエルの変態関連遺伝子A変異体作製」

- ・NIH（米国）

研究テーマ：「ネットアイツメガエルの変態関連遺伝子B変異体作製」

三浦郁夫

- ・キャンベラ大学（豪州） Dr. Tariq Ezaz

研究テーマ：性決定と性染色体の進化に関する研究

- ・ローザンヌ大学（スイス） Dr. Nicolas Perrin

研究テーマ：両生類の性染色体のターンオーバー

- ・Leibniz-Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries - IGB Germany Dr. Matthias Stöck

研究テーマ：アマガエルの系統進化に関する研究

鈴木 厚, 竹林公子

- ・米国エネルギー省、カリフォルニア大学、テキサス大学ほか

研究テーマ：「アフリカツメガエルゲノムプロジェクト」

- ・米国エネルギー省、カリフォルニア大学、Hudson alpha Institute for Biotechnology

研究テーマ：「アフリカツメガエルvg1遺伝子クラスターのゲノム解析」

- ・オランダ ラドバウド大学

研究テーマ：「アフリカツメガエルTGF-beta 経路とFGF経路のゲノム解析」

- ・英国ポーツマス大学, 英国ガードン研究所および米国ウッズホール海洋生物学研究所

研究テーマ：「ネットアイツメガエルリソースの系統解析」

- ・インドネシア ブラビジャヤ大学

研究テーマ：「神経誘導に働く新規タンパク質の解析」

- ・英国ポーツマス大学および米国ウッズホール海洋生物学研究所

研究テーマ：「国際ツメガエルリソースの国際拠点形成」

倉林 敦

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

研究テーマ：ヘビからカエルへの遺伝子水平伝播

- ・ブラウンシュバイク工科大学（ドイツ）・コネチカット大学（アメリカ）・ノースウェスト大学（南アフリカ）

研究テーマ：フクラガエルが生殖行為に用いる糊状物質の解明

- ・ブラウンシュバイク工科大学（ドイツ）

研究テーマ：両生類皮膚粘液に存在する細菌類の進化と分布の解明

- ・ビショップ博物館

研究テーマ：パプアヒメアマガエルの種インベントリー

Mahmudul Hasan

- ・国立台湾師範大学

研究テーマ： *Hylarana*属の分類学的問題の解決

○外国人留学生の受入れ

文部科学省国費留学生 (Sultana Nasrin, バングラデシュ)

〈その他 (特記事項)〉

・2016年3月7日に広島大学で開催されたノーベル生理・医学賞受賞者講演の実現に両生類研究施設は大きな貢献をしている。特にJ.B. Gurdon卿の招待は両生類研究施設により行われている。

・理学部・大学院理学研究科公開 (2015年11月7日) において研究施設を公開し、およそ140名が見学した。

鈴木 厚, 竹林公子

・近畿大学工学部 学部生に対するツメガエル受精実験と講義の指導 (2015年6~7月)

鈴木 厚・柏木昭彦・古野伸明・柏木啓子・花田秀樹・田澤一朗・倉林 敦・中島圭介・竹林公子・吉田和史・三堂貴子・村上 茂・折羽邦彦・榊井陽子・宇都武司・難波ちよ
[外部講師：荻野 肇・越智陽城]

・ナショナルバイオリソースプロジェクト ネットアイツメガエル実験技術講習会 開催 (2016年3月)

鈴木 厚・古野伸明・竹林公子

・日本生物学オリンピック広島大会 最先端研究室訪問・実験実習 開催 (2015年8月)

倉林 敦

・TV番組取材協力：1件 (NHK 『ダーウィンが来た』)

倉林 敦

・GGs Prize 2015受賞 (日本遺伝学会の出版する学会誌『Genes and Genetic Systems (GGS)』に掲載された論文を対象として、優れた学術論文1~2編に与えられる賞) 受賞論文：
Mitochondrial genomes of Japanese Babina frogs (Ranidae, Anura): unique gene arrangements and the phylogenetic position of genus Babina. R. Kakehashi, A. Kurabayashi, S. Oumi, S. Katsuren, M. Hoso and M. Sumida. Genes & Genetic Systems (2013) 88: 59-67.

V. 各研究グループの研究内容と研究業績

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

A) 「発生」研究グループ

平成27年度構成員：矢尾板芳郎（教授）、高瀬 稔（准教授）、中島圭介（助教）、
田澤一朗（助教）

本研究グループは「種々の両生類を材料として、遺伝学と発生学との新領域を開拓する。」ことを目標として、昭和42年6月に最初の両生類研究施設の研究部門として創設された。それから半世紀余りの間に古典的遺伝学的手法や実験動物学的手法に重きを置く研究から、次第に遺伝子工学的手法、細胞生物学的手法なども取り入れて、両生類の発生を分子生物学的視点から考察する研究へと進んでいる。

矢尾板芳郎（教授）

○研究活動の概要

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

井筒らが2009年にPNASに「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。」という説を発表した。本研究は、この免疫学的拒絶説を検証することを目的とする。井筒らによれば、*ouro1*遺伝子と*ouro2*遺伝子のどちらか一方のノックダウンで変態時の尾の退縮が抑制されると報告されている。TALEN法により*ouro1*遺伝子と*ouro2*遺伝子のノックアウト幼生を多数作製し、破壊された遺伝子のmRNAが激減していることをRT-PCRで示した。また、どちらのノックアウト幼生でも、尾ではOuro1蛋白質とOuro2蛋白質が発現されていないことをWestern blotで確認した。しかし、変態時の尾の退縮に関しては、何らの遅延も観察されなかった。TALEN法で*Foxn1*遺伝子が破壊された先天性胸腺欠損症のカエルの脾臓では細胞障害性T細胞（CD8陽性）が無くなっており、異系統のカエルの皮膚移植片の拒絶反応が観察されなかった。このノックアウト幼生でも尾の退縮の異常は見出せなかった。論文としてまとめ、投稿した。

2. TALENによる両生類変態の分子機構の解析

一連の変態関連遺伝子を標的としたTALENによる標的遺伝子破壊を行ったネッタイツメガエルの表現型の解析により変態関連遺伝子の機能を明らかにすることを目的とする。変態関連遺伝子として、甲状腺ホルモン受容体や細胞外基質分解酵素（MMP9TH）等を選び、各々の遺伝子に対してTALENを設計して、TALEN mRNAを受精卵に注入した。このF0の交配の結果、現在、各標的遺伝子が両染色体上で破壊されたF1が順次、得られ初めている。

3. アルビノアカハライモリの作製

ゲノム編集技術を用いてこれまでにネッタイツメガエル (Nakajima et al. 2012, Ishibashi et al. 2012)、アフリカツメガエル (Nakajima and Yaoita 2015, Suzuki et al. 2013)、イベリアトゲイモリ (Hayashi et al. 2014) でアルビノ両生類の作製が報告されてきた。今回我々は高い再生能力を持ち、かねてより実験動物として用いられてきたアカハライモリのチロシナーゼ遺伝子を破壊することによりアルビノ個体の作製に成功した。degenerate primerを用いてアカハライモリのチロシナーゼのクローニングした結果、登録されていたチロシナーゼよりも他の動物種に近い新たなチロシナーゼのクローニングに成功した。このチロシナーゼをターゲットとするTALENを作製してアカハライモリの受精卵に注入したところ、3個の卵から発生した個体のうち2個体は外見上完全なアルビノ個体となった。このことから今回、クローニングしたチロシナーゼが真にメラニン色素の合成に関わる遺伝子であることが示された。

4. レチノイド処理による無尾両生類幼生の尾部切断部におけるホメオティック肢形成過程の解析

1992年、インドの無尾両生類の幼生の尾部を切断しレチノイドで処理すると、尾ではなく、後肢の様な構造 (ホメオティック肢) が生じた。この現象は、実験によく使われる種では再現されなかったため、その解析はあまり進んでいなかった。しかし我々は、本邦で容易に入手可能な無尾両生類を用いてホメオティック肢形成の再現に成功し、現在この現象を研究することが可能である。

ホメオティック肢形成過程は殆ど観察されていない。そこで我々は先ずその詳細を明らかにすることにした。ホメオティック肢の形態、発生位置、および向きは、切断尾から生じた再生体の頭尾軸に関する位置値が本来よりも前方化していることを示唆するものだった。ホメオティック肢は再生体の上部および下部から生じた。このことは、ホメオティック肢を生じた尾再生体の上部および下部の位置値が、胴部側方に相当するものであることを示唆する。

○発表論文

1. 原著論文

Y. Nakai, K. Nakajima, J. Robert and Y. Yaoita. (2016) Ouro proteins are not essential to tail regression during *Xenopus tropicalis* metamorphosis.

Genes to Cells, 21(3): 275-286.

T. Nakayama, M. Fisher, K. Nakajima, A. O. Odeleye, K. B. Zimmerman, M. B. Fish, Y. Yaoita, J. L. Chojnowski, J. D. Lauderdale, P. A. Netland and R. M. Grainger. (2016) *Xenopus pax6* mutants affect eye development and other organ systems, and have phenotypic similarities to human aniridia patients

Developmental, 408(2): 328-344.

K. Nakajima, T. Nakajima, and Y. Yaoita. (2016) Generation of albino *Cynops pyrrhogaster* by genomic editing of the *tyrosinase* gene. Zoological Science, **33**(3), 290-294, doi: 10.2108/zs150203○

Kondo T, Okada M, Kunihiro K, Takahashi M, Yaoita Y, Hosoya H, Hamao K. Characterization of myosin II regulatory light chain isoforms in HeLa cells. Cytoskeleton (Hoboken). 2015 Dec;72(12):609-20. doi: 10.1002/cm.21268.

K. Nakajima and Y. Yaoita. (2015) Development of a new approach for targeted gene editing in

primordial germ cells using TALENs in *Xenopus* *Biology Open* 4, 259-266,
doi:10.1242/bio.201410926

K. Nakajima and Y. Yaoita. (2015) Highly efficient gene knockout by injection of TALEN mRNAs into oocytes and host transfer in *Xenopus laevis*. *Biology Open*, 4, 180-185,
doi:10.1242/bio.201410009

○ 講演

4. 国内学会での一般講演

中島圭介、矢尾板芳郎 「TALEN mRNA を注入した卵母細胞にホストトランスファー法を適用した高効率遺伝子破壊法」 第 38 回日本分子生物学会, 神戸市(2015 年 12 月)

中井裕也、中島圭介、矢尾板芳郎 「ツメガエルの変態における尾の退縮に Ouro 蛋白質は関係していない」 第 38 回日本分子生物学会, 神戸市(2015 年 12 月)

中島圭介、矢尾板芳郎 「TALEN mRNA の卵母細胞への注射と host transfer による高効率遺伝子破壊法」 第 86 回日本動物学会, 仙台市(2015 年 9 月)

中島圭介、矢尾板芳郎 「TALEN法による高効率遺伝子破壊法：*Xenopus laevis* 卵母細胞への mRNA 注入とホストトランスファー法の応用」 第9回日本ツメガエル研究集会, 秋田市(2015年9月)

田澤一朗・矢尾板芳郎 「無尾両生類ホメオティック肢の発生パターン」 日本動物学会第 86 回大会, 仙台市 (2015 年 9 月 17 日)

○ 研究助成金の受入状況

1. 科学研究費補助金

矢尾板芳郎

基盤研究(C) 「TALEN による両生類変態の分子機構の解明 ～ほ乳類の出生は変態か～」 1270 千円 (研究代表者)

矢尾板芳郎

基盤研究(C) 「ノックアウト効率の改善による初代完全ノックアウト動物の作製技術開発」 100 千円 (研究分担者)

2. 補助金

矢尾板芳郎

平成 27 年度特別研究 (プロジェクト) - 国際的に卓越した教育研究拠点機能の充実 - 世界トップレベル両生類研究拠点形成 - 日本の両生類研究のアドバンテージ向上 - 23,300 千円

○ 学界ならびに社会での活動

○ 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*nop*遺伝子KO個体作製と解析」

・NIH（米国）

研究テーマ：「ネッタイツメガエルの変態関連遺伝子A変異体作製」

・NIH（米国）

研究テーマ：「ネッタイツメガエルの変態関連遺伝子B変異体作製」

○特記事項

・3月7日に広島大学で開催されたノーベル生理・医学賞受賞者講演の実現に大きな貢献をしている。特にJ.B. Gurdon卿の招待は両生類研究施設により行われている。

○大学院教育

1. 大学院生の国内学会発表実績

◎中井裕也・中島圭介・矢尾板芳郎 「「ツメガエルの変態における尾の退縮に Ouro 蛋白質は関係していない」 第38回日本分子生物学会，神戸市(2015年12月)

4. 博士学位

中井裕也

6. 大学院教育の国際化 ← 国際化への対応等

矢尾板芳郎

発生遺伝学演習を英語化

高瀬 稔（准教授）

ネッタイツメガエルの性決定様式：超雄（YY）の作製および卵核二倍体の解析

ネッタイツメガエル (*Xenopus (Silurana) tropicalis*) の性決定様式はZZ/ZW型であることが、2017年にRocoらにより報告された。しかし今回、Ivory Coast系統からのネッタイツメガエルを用いた解析により、XX/XY型の性決定様式を示す結果を得た。また、両生類では未だに報告されていない超雄（YY）の作製にも成功した。

遺伝的雄の性転換個体（雌）と遺伝的雄との交配によって得られたF1から5匹の雄を選び、再度遺伝的雌と交配したところ、2匹の雄親由来のF2では全てが雄であった。これは、雄がXY型である場合にみられる性比であり、その2匹の雄親は超雄（YY）であると考えられる。一方、他の3匹の雄親由来のF2の性比は全てが約1対1であった。また、卵のみから発生させた2倍体（卵核二倍体）を作製して性比を調べたところ、全て雌であった。これは、雌がXX型である場合にみられる性比である。従って、本研究に用いたネッタイツメガエルの性決定様式はXX/XY型であることが考えられた。

全雄集団が得られることから、今後はネッタイツメガエル精巣分化機構の詳細な解析を行うことが可能になる。また、超雄を用いたY染色体特異的遺伝子の探索も可能になる。一方、雌がZW型であっても、全ての卵核二倍体において雌決定遺伝子が組み換えを起こしていた場合には全て雌になるため、追加実験によって雌がXX型であることを確認する必要がある。

あると考える。

○発表論文

1. 原著論文

N. Matsushima, S. Ihara, M. Takase, T. Horiguchi. Assessment of radiocesium contamination in frogs 18 months after the Fukushima Daiichi nuclear disaster. Scientific Reports 5, Article number: 9712 (2015). DOI: 10.1038/srep09712.

○講演

1. 国際会議での一般講演

Minoru Takase “A useful amphibian model for analyzing estrogenic effects: production of all-male tadpole by artificial mating using supermale (YY) *Silurana tropicalis*.” The 63rd NIBB conference Environment to Bioresponse, Okazaki, Japan, Nov 30-Dec 2, 2015.

2. 国内学会での一般講演

高瀬 稔 「ネッタイツメガエルの性決定様式：戻し交配による解析および温度処理による性比への影響」中国四国地区生物系三学会合同大会愛媛大会，松山市(2015年5月)

高瀬 稔 「ネッタイツメガエルの性決定様式：戻し交配および卵核二倍発生法による解析」第86回日本動物学会，新潟市(2015年9月)

高瀬 稔 「Generation of the YY supermale of the frog *Silurana tropicalis* and fertility of the F1 all-male frog」第40回日本比較内分泌学会大会，広島市(2015年12月)

○学界ならびに社会での活動

1. 学協会役員・委員

高瀬 稔

- ・公益法人日本動物学会中国四国支部会計委員

高瀬 稔

- ・第40回日本比較内分泌学会大会実行委員

中島圭介（助教）

○研究活動の概要

1. TALENによる両生類変態の分子機構の解析

一連の変態関連遺伝子を標的としたTALENによる標的遺伝子破壊を行ったネッタイツメガエルの表現型の解析により変態関連遺伝子の機能を明らかにすることを目的とする。変態関連遺伝子として、甲状腺ホルモン受容体や細胞外基質分解酵素 (MMP9TH) 等を選び、各々の遺伝子に対してTALENを設計して、TALEN mRNAを受精卵に注入した。このF0の交配の結果、現在、各標的遺伝子が両染色体上で破壊されたF1が順次、得られ初めている。

2. アルビノアカハライモリの作製

ゲノム編集技術を用いてこれまでにネッタイツメガエル (Nakajima et al. 2012, Ishibashi et al. 2012)、アフリカツメガエル (Nakajima and Yaoita 2015, Suzuki et al. 2013)、イベリアトゲイモリ (Hayashi et al. 2014) でアルビノ両生類の作製が報告されてきた。今回我々は高い再生能力を持ち、かねてより実験動物として用いられてきたアカハライモリのチロシナーゼ遺伝子を破壊することによりアルビノ個体の作製に成功した。アカハライモリは手足、顎、レンズ、網膜、心臓、脳など様々な器官を再生することが可能であることが知られており、その高い再生能力から再生研究の中心の実験動物の一つとして位置づけられている。このような高い再生能力を持つアカハライモリのアルビノ変異体は移植実験等で極めて有用であると考えられるが自然界ではほとんど見つかっていない。そのため、他の両生類と同様にチロシナーゼの破壊により人工的にアルビノ個体を作製することが待ち望まれてきた。本研究を始めるにあたり、アカハライモリのチロシナーゼ遺伝子は既にデータベースに登録されていたが、他の動物種 (ヒト、ニワトリ、カエル、サカナ) と比較すると明らかに相同性が低かった。そこで今回、degenerate primerを用いてアカハライモリのチロシナーゼのクローニングから実験を行った。その結果登録されていたチロシナーゼよりも他の動物種に近い新たなチロシナーゼのクローニングに成功した。このチロシナーゼをターゲットとするTALENを作製してアカハライモリの受精卵に注入したところ、3個の卵から発生した個体のうち2個体は外見上完全なアルビノ個体となった。また、これまで報告されていたチロシナーゼの発現量は野生型のものと比較して減少は見られなかった。これらのことから今回、クローニングしたチロシナーゼが真にメラニン色素の合成に関わる遺伝子であることが示された。今後はこのアルビノアカハライモリを繁殖させ、研究のために利用していきたいと考えている。

○ 発表論文

原著論文

- K. Nakajima, T. Nakajima, and Y. Yaoita. (2016) Generation of albino *Cynops pyrrhogaster* by genomic editing of the *tyrosinase* gene. *Zoological Science*, **33**(3), 290-294, doi: 10.2108/zs150203
- Y. Nakai, K. Nakajima, J. Robert and Y. Yaoita. (2016) Ouro proteins are not essential to tail regression during *Xenopus tropicalis* metamorphosis. *Genes to Cells*, **21**(3): 275-286
- T. Nakayama, M. Fisher, K. Nakajima, A. O. Odeleye, K. B. Zimmerman, M. B. Fish, Y. Yaoita, J. L. Chojnowski, J. D. Lauderdale, P. A. Netland and R. M. Grainger. (2015) *Xenopus pax6* mutants affect eye development and other organ systems, and have phenotypic similarities to human aniridia patients *Developmental*, **408**(2): 328-344
- K. Nakajima and Y. Yaoita. (2015) Development of a new approach for targeted gene editing in primordial germ cells using TALENs in *Xenopus* *Biology Open* **4**, 259-266, doi:10.1242/bio.201410926
- K. Nakajima and Y. Yaoita. (2015) Highly efficient gene knockout by injection of TALEN mRNAs into oocytes and host transfer in *Xenopus laevis*. *Biology Open*, **4**, 180-185, doi:10.1242/bio.201410009

○ 講演

国際会議での一般講演

Suzuki, A., Kashiwagi, K., Hanada, H., Furuno, N., Tazawa, I., Kurabayashi, A., Nakajima, K., Takebayashi-Suzuki, K., Igawa, T., Sumida, M., Yoshida, H., Kobayashi, S., Takenaka, J., Tamaki, J., Murakami, S., Mido T. and Kashiwagi, A. 「National BioResource Project (NBRP) for *Xenopus*: recent developments at the Asian hub for the international *Xenopus* research community」 口頭、*Xenopus Meeting 2015* (2015年9月29日 米国ウッズホール)

国内学会での一般講演

中島圭介、矢尾板芳郎 「TALEN mRNA を注入した卵母細胞にホストトランスファー法を適用した高効率遺伝子破壊法」 第38回日本分子生物学会, 神戸市(2015年12月)

中井裕也、中島圭介、矢尾板芳郎 「ツメガエルの変態における尾の退縮に Ouro 蛋白質は関係していない」 第38回日本分子生物学会, 神戸市(2015年12月)

中島圭介、矢尾板芳郎 「TALEN mRNA の卵母細胞への注射と host transfer による高効率遺伝子破壊法」 第86回日本動物学会, 仙台市(2015年9月)

中島圭介、矢尾板芳郎 「TALEN法による高効率遺伝子破壊法：*Xenopus laevis* 卵母細胞へのmRNA注入とホストトランスファー法の応用」 第9回日本ツメガエル研究集会, 秋田市(2015年9月)

柏木昭彦, 柏木啓子, 花田秀樹, 鈴木賢一, 鈴木 厚, 竹林公子, 倉林 敦, 中島圭介, 田澤一朗, 井川武, 古野伸明, 山本 卓, 住田正幸 「生命科学研究における近交系ネットイツメガエルの有用性」 ポスター 次世代両生類研究会2015 (2015年8月25日 岡崎コンファレンスセンター, 岡崎市)

柏木昭彦, 柏木啓子, 花田秀樹, 鈴木 厚, 竹林公子, 古野伸明, 田澤一朗, 倉林 敦, 中島圭介, 鈴木賢一, 山本 卓 「ネットイツメガエルを用いた最近の研究」 ポスター 第38回日本分子生物学会 (2015年12月1-3日, 神戸国際展示場, 神戸市)

○ 研究助成金の受入状況

科学研究費補助金

基盤研究(C) 「ノックアウト効率の改善による初代完全ノックアウト動物の作製技術開発」 1725千円 (研究代表者)

基盤研究(C) 「TALEN による両生類変態の分子機構の解明 ～ほ乳類の出生は変態か～」 100千円 (研究分担者)

○ 学界ならびに社会での活動

学協会役員・委員

文部科学省第3期 NBRP 「ネットイツメガエル」 課題管理協力者

○ 国際共同研究

・ヴァージニア大学 (米国)

研究テーマ: 「ネットイツメガエルの *nop* 遺伝子 KO 個体作製と解析」

・NIH (米国)

研究テーマ：「ネットイツメガエルの変態関連遺伝子A変異体作製」

・NIH（米国）

研究テーマ：「ネットイツメガエルの変態関連遺伝子B変異体作製」

○大学院教育

1. 大学院生の国内学会発表実績

◎中井裕也・中島圭介・矢尾板芳郎 「「ツメガエルの変態における尾の退縮に Ouro 蛋白質は関係していない」 第38回日本分子生物学会，神戸市(2015年12月)

6. 大学院教育の国際化 ← 国際化への対応等

中島圭介

発生遺伝学演習を英語化

田澤一朗（助教）

○研究活動の概要

レチノイド処理による無尾両生類幼生の尾部切断部におけるホメオティック肢形成過程の解析

1992年，脊椎動物のホメオティック変異が報告された。インドの無尾両生類の幼生の尾部を切断しレチノイドで処理すると，尾ではなく，後肢の様な構造（ホメオティック肢）が生じた。この現象は，実験によく使われる種では再現されなかったため，その解析はあまり進んでいなかった。しかし我々は，本邦で容易に入手可能な無尾両生類を用いてホメオティック肢形成の再現に成功し，現在この現象を研究することが可能である。

ホメオティック肢形成過程は殆ど観察されていない。そこで我々は先ずその詳細を明らかにすることにした。ホメオティック肢の形態、発生位置、および向きは、切断尾から生じた再生体の頭尾軸に関する位置価が本来よりも前方化していることを示唆するものだった。ホメオティック肢は再生体の上部および下部から生じた。このことは、ホメオティック肢を生じた尾再生体の上部および下部の位置価が、胴部側方に相当するものであることを示唆する。

○ 講演

2. 国際会議での一般講演

Suzuki, A., Kashiwagi, K., Hanada, H., Furuno, N., Tazawa, I., Kurabayashi, A., Nakajima, K., Takebayashi-Suzuki, K., Igawa, T., Sumida, M., Yoshida, H., Kobayashi, S., Takenaka, J., Tamaki, J., Murakami, S., Mido T. and Kashiwagi, A. 「National BioResource Project (NBRP) for *Xenopus*: recent developments at the Asian hub for the international *Xenopus* research community」 口頭、*Xenopus* Meeting 2015（2015年9月29日 米国ウッズホール）

Minoru Takase “A useful amphibian model for analyzing estrogenic effects: production of all-male tadpole by artificial mating using supermale (YY) *Silurana tropicalis*.” The 63rd NIBB conference Environment to Bioresponse, Okazaki, Japan, Nov 30-Dec 2, 2015.

4. 国内学会での一般

田澤一朗・矢尾板芳郎 「無尾両生類ホメオティック肢の発生パターン」日本動物学会第86回大会，仙台市（2015年9月17日）

柏木昭彦，柏木啓子，花田秀樹，鈴木賢一，鈴木 厚，竹林公子，倉林 敦，中島圭介，田澤一朗，井川武，古野伸明，山本 卓，住田正幸 「生命科学研究における近交系ネッタイツメガエルの有用性」ポスター 次世代両生類研究会2015（2015年8月25日 岡崎コンファレンスセンター，岡崎市）

柏木昭彦，柏木啓子，花田秀樹，鈴木 厚，竹林公子，古野伸明，田澤一朗，倉林 敦，中島圭介，鈴木賢一，山本 卓「ネッタイツメガエルを用いた最近の研究」ポスター 第38回日本分子生物学会（2015年12月1-3日，神戸国際展示場，神戸市）

○研究助成金の受入状況

1. 科学研究費補助金

田澤一朗

基盤研究(C)「TALEN による両生類変態の分子機構の解明 ～ほ乳類の出生は変態か～」
200千円（研究分担者）

○学界ならびに社会での活動

1. 学協会役員・委員

田澤一朗

・文部科学省第3期NBRP「ネッタイツメガエル」課題管理協力者

○大学院教育

6. 大学院教育の国際化 ← 国際化への対応等

矢尾板芳郎・中島圭介・田澤一朗

発生遺伝学演習を英語化

B) 「進化多様性・生命サイクル」研究グループ

平成27年度構成員：鈴木 厚（准教授），

倉林 敦（助教）， Islam Mohammed Mafizul（助教），

Hasan Mahmudul（特任助教），竹林公子（研究員），

本研究グループでは、分子生物学的手法や交雑実験を用い、両生類における種の多様性やゲノムの分子進化プロセスの究明を目的とした研究を推進している。さらに、人工繁殖と精子凍結保存による絶滅危惧種の効率的な保全方法の確立を目指した研究を進めている。また、両生類初期胚を用いた誘導因子による形態形成機構、誘導因子に対する細胞応答制御機構と幹細胞からの細胞分化機構、およびツメガエルの比較ゲノム解析に関する研究を展開している。さらに、英米ツメガエルリソース拠点との共同研究、国際ツメガエルデータベース拠点との連携を行い、国際的なリソース拠点ネットワークの形成を推進している。国際連携活動は、文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトの一環として行なっており、この他にcDNAと全ゲノムBACライブラリーを含む遺伝子リソース整備、実験技術講習会などの研究サポート・教育サービスも展開している。

鈴木 厚（准教授）

○研究活動の概要

両生類初期胚を用いた誘導因子による形態形成機構、誘導因子に対する細胞応答制御機構と幹細胞からの細胞分化機構、およびツメガエルの比較ゲノム解析・形態形成システムの多様化に関する研究を展開している。さらに、英米ツメガエルリソース拠点との共同研究、国際ツメガエルデータベース拠点との連携を行い、国際的なリソース拠点ネットワークの形成を推進している。国際連携活動は、文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトの一環として行なっており、この他にcDNAと全ゲノムBACライブラリーを含む遺伝子リソース整備、実験技術講習会などの研究サポート・教育サービスも展開している。平成27年度の研究・教育活動は以下の通りである。

1. 神経誘導の保証機構に働くネットワークの解明

～背腹と頭尾の両パターン形成を制御するBizとFoxB1転写因子の解析を通じて～

生物は遺伝的・環境的要因の変化に、うまく適応して生息圏を拡大している。例えば、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。これは生物が遺伝的・環境的变化に適応する仕組みを発達させてきたことを示唆し、わずかな遺伝的・環境的变化が生じても個体自身は大きく影響を受けない保証機構が存在すると考えられる。さらにヒト胎児の先天異常に着目すると、その発症原因には大きく分けて環境要因と遺伝要因があり、同じ環境要因にさらされても、重症化する場合と、逆に全く症状が出ない場合がある。これは個々の遺伝要因（保証機構の破綻）が先天異常の発症につながることを示唆する。中でも、ヒトの運動・知能・感覚を司る中枢神経系が、環境要因・遺伝要因の変化に関わらず発生過程で確実に形成されるためには神経形成の保証機構が必要だと考えられた。

これまでに、神経外胚葉に発現するFoxB1転写因子が、BMPとWntシグナル伝達経路の統合的制御にはたらき、カエル初期胚の背腹・前後軸を制御すること、また、上流で働くOct-25転写因子とfeed-forwardネットワークを形成し神経誘導を保証していることを明らかにしている(Takebayashi-Suzuki et al. *Developmental Biology*, 2011)。feed-forward遺伝子ネットワークの存在によってFoxB1単独の機能阻害は神経誘導にほとんど影響しない。その

理由として①外胚葉内の他の神経誘導因子と協調し神経誘導を保証している、②外胚葉を裏打ちする中胚葉との間の協調的な神経誘導保証作用が存在する、という2つの可能性が考えられた。FoxB1機能欠損マウス胚でも初期の神経誘導は正常で、後期の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), カエル以外の動物種にも保存された保証機構が存在する可能性が示唆された。また, FoxB1転写因子と同様に背腹軸と前後軸の両方の形成に関与するBiz転写因子の単離に成功しており, 外胚葉内でFoxB1とBiz転写因子が協調して神経誘導の保証機構にはたらく可能性も考えられた。本研究では, これらの協調作用を解析することによって, 外胚葉内の神経誘導保証機構を分子レベルで明らかにすること, さらに保証機構の障害により発生異常が生じるメカニズムを体系的に理解して, 先天異常の発症機構の解明につなげることを目的とした。

Biz転写因子は受精卵期から発現しており神経誘導期にも予定神経領域に発現していることを確認した。さらにBiz転写因子の過剰発現が, 神経マーカーの発現を誘導し表皮マーカーの発現を抑制すること(背腹軸の制御), および後方神経マーカーの発現を誘導し前方神経マーカーの発現を抑制すること(前後軸の制御)を明らかにした。FoxB1とBiz転写因子の各々を阻害するモルフォリノオリゴで機能阻害を行った結果, それぞれのMOをインジェクションした場合に比べ両者を組み合わせると神経マーカーNCAM, N-tubulin, および後方神経マーカーHoxB9の発現が著しく低下し, FoxB1とBiz転写因子が神経誘導の保証機構に重要な遺伝子ネットワークを形成していることが強く示唆された。さらに, BMPとWntシグナル伝達経路に対するBiz転写因子の作用機序についても明らかになりつつある。

2. 誘導因子に対する細胞応答の制御と尾部オーガナイザー形成・脊髄組織再生

受精卵を構成する個々の細胞は, 受容した誘導因子に応答して, その分化運命を決定していく。つまり, 発生初期には幹細胞として様々な細胞に分化する能力を持ち, 誘導因子に対する応答能力も高いが, 発生が進行するにつれて応答能力が制限される。しかしながら, 多能性の幹細胞状態から細胞応答が次第に制限されていく機構は明確ではない。鈴木・竹林は, この点に着目して中胚葉や神経誘導の制御に働くTGF-betaシグナル伝達経路を抑制する遺伝子群をスクリーニングし, Oct-25転写因子を単離することに成功している(Takebayashi-Suzuki et al. Mechanisms of Development 124, 840-855, 2007)。その後の解析から, Oct-25はBMPシグナルを抑制して神経を誘導するだけでなく, Activin/NodalやFGFのシグナルも調節することが可能で, より広域なシグナルに対する細胞応答を制御することが示されている。そこで, 誘導因子に対する細胞応答を制御する機構を明らかにすることを目的として, Oct-25が発現を制御する遺伝子の機能解析を行ない, これまでにFoxB1転写因子を単離・解析して論文を発表した(Takebayashi-Suzuki et al. Developmental Biology 360, 11-29, 2011)。

今年度は, 未解析の遺伝子に着目して機能解析を進めた結果, Oct-25によって発現が抑制されるJunB転写因子を初期胚で過剰発現すると2次尾部構造を誘導することが分かった。誘導された2次尾部構造を詳しく調べると, 体節(筋肉)を持たない尾部が形成されており, JunBは, 尾部オーガナイザー形成に関与する一方で, 尾部オーガナイザー領域における細胞応答を部分的に抑制している可能性が示唆された。次に, ヒトJunBは, 誘導因子として働くFGFとWntのシグナル伝達因子であるMAPKとGSK3betaによるリン酸化を受けて自身のタンパク質分解が促進されるため, 我々が単離したツメガエルJunBのリン酸化サイトを変異させたところ, JunBの2次尾部誘導活性が大幅に高まることが分かった。さらに, JunBを外胚葉組織で過剰発現すると, FGF3とWnt8の発現を誘導することも分かり, この発現誘導もリン酸化サイトを変異させたJunBでは強まっていた。したがって, JunBの活性は自ら誘導したFGF・Wntシグナルによるフィードバック制御を受けることが明らかになり, JunBが誘導因子シグナルを統合して尾部オーガナイザー領域に形成に働いている可能性が示唆された(Yoshida et al. Zoological Science 33, 282-289, 2016)。

尾部オーガナイザー領域は, 幹細胞様の性質を長期に渡って維持することで新しい細胞

を生み出し、尾部を伸長させることが知られている。したがって、今回同定した新規尾部誘導因子・JunBは、幹細胞の維持、および誘導因子に対する細胞応答能力を調節・制限する上で重要な役割を果たしていると考え、尾部の形成における解析を進めている。また、ツメガル幼生尾部領域を切断すると、損傷した脊髄が再生することが知られており、JunBの過剰発現が脊髄を誘導することも分かっていることから、脊髄損傷後の再生過程におけるJunBおよびその関連タンパク質の役割についても解析を進めている。

3. 神経誘導に働く新規タンパク質の解析

上記に述べたように、当研究グループの鈴木・竹林はOct-25転写因子が誘導因子に対する細胞応答を調節することを見出し、その下流因子の探索を進めている。この過程で新たに同定したNsk (Neural Specific Kinase)は、ツメガエルの神経板で強く発現し、Oct-25の過剰発現により遺伝子発現が誘導される。Nskの全長cDNAをネッタイツメガエル胚から単離して、初期胚で過剰発現したところ、弱い神経誘導を引き起こすことが分かった。培養細胞を用いたNskの先行研究において、リン酸化を受けたNskは不安定で速やかに分解されることが示されていたため、このリン酸化サイトに変異を導入したところ、カエル胚での神経誘導活性も増強された。また、神経誘導を引き起こすFGF処理もしくはドミナントネガティブBMP受容体によるBMPの抑制処理とNsk過剰発現を同時に行なったところ、Nskはこれらの処理と協調的に働いて、神経誘導を強めることが分かった。FGFは、その下流で働くMAPKを介してBMPシグナル伝達因子Smadをリン酸化することでSmadの分解を促進し、BMPシグナルを抑制することが知られている。したがって、NskがFGF処理やBMP抑制処理と協調作用を示したことは、NskがBMPシグナル伝達因子やその下流で働く転写因子群のいずれかをリン酸化することでBMPシグナルを調節する可能性を示唆する。現在、この可能性を検証する解析を行なっている。

4. アフリカツメガエルのゲノム解析、および異質倍数体のゲノム進化

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) は、医学生物学研究において長年使われており、膨大な研究成果を生んできた。近年のゲノム科学の進展に伴い、アフリカツメガエルのゲノムを解読して、これまでの研究成果を活用・展開させる機運が高まり、米国エネルギー省・カリフォルニア大学・テキサス大学、および東京大学・遺伝学研究所・広島大学などによる国際共同研究が開始されている。アフリカツメガエルは異質4倍体であり、本研究により初めて動物の異質倍数体ゲノムが解読されることになる。既にゲノムが解読された2倍体ネッタイツメガエル (*Xenopus (Silurana) tropicalis*) との比較解析を行い、ゲノム・遺伝子進化のメカニズムが明らかになりつつある。両生類研究施設では、当研究グループの鈴木がプロジェクト開始当時からアフリカツメガエルゲノムBACクローンの複製作業・凍結保存・管理を行なっている。一昨年度は、オリジナルプレート (350枚) からの複製・凍結保存作業 (計1400枚; 基礎生物学研究所IBBPセンターにおける共同作業) と海外リソース拠点への分譲作業 (350枚) を行なった。また、昨年度は、全ゲノムのカバー率を上げるために更に追加150枚のオリジナルプレートからの複製・凍結保存作業 (計450枚) を行なった。その他、鈴木は国内チームのゲノム配列決定グループリーダーメンバー、RNA-seq解析グループリーダー、遺伝子モデルグループリーダーとして、中心的な役割を果たしている。

60名以上の研究者の協同行なわれている国際プロジェクトの推進において、鈴木は上記の貢献に加えて、主論文の執筆・図版作成・投稿作業、シグナル伝達経路の遺伝子解析 (下記)、ゲノム解析に必須な遺伝子モデル改善作業、および国際スカイビデオ会議や東京会議のオーガナイズ等の中核的な役割を果たし、責任著者を含む12名の国際プロジェクトリーダーシップメンバーの一員としてプロジェクトを牽引している。

5. TGF-betaシグナル伝達経路の比較ゲノム解析とその進化

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

当研究グループの鈴木・竹林は、TGF-betaシグナル伝達経路の構成因子を幅広く調べ、Nodal3遺伝子クラスター、Vgl1遺伝子クラスター、ChordinなどのBMPアンタゴニスト遺伝子、TGF-beta受容体遺伝子、Smadシグナル伝達因子に非常に興味深い変化を見出した。比較対象として、FGFシグナル伝達経路の構成因子についても解析を進めた結果、TGF-betaシグナル伝達経路にユニークな変化が起きていることが明確になった。これらの結果を2つの論文に取りまとめて報告した (Suzuki et al. *Developmental Biology*, in press; Suzuki et al. *Developmental Biology*, in press)。

6. 国際ツメガエルリソース拠点ネットワークの構築

実験モデル動物として優れた特徴を持つネッタイツメガエルおよびアフリカツメガエルのバイオリソースを国際的な枠組みで保存・提供するために、および両生類研究施設が国際的に貢献するために、当研究グループの鈴木が中心となり、両生類研究施設と英国・米国のツメガエルリソース拠点の国際連携を行なっている。特に、ネッタイツメガエルについては、文部科学省/日本医療研究開発機構 (AMED) ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) の平成24年度新規採択課題としてサポートを受けており、鈴木・竹林は、国際ネットワークを活かした遺伝子リソースの整備・ネッタイツメガエル実験技術講習会主催などのサービスを充実させている。

今年度は、米国ウッズホールで開催された研究室主宰者会議において、英米のリソース拠点とともに両生類研究施設NBRP事業の招待講演を行い、広島大学の貢献と拠点ネットワークの連携状況を説明した。特に新しい進展として、世界で使われているネッタイツメガエル系統の解析状況およびアジアからの留学生教育を通じた人材育成も紹介した。昨年度には、全世界のツメガエル研究者が一同に集う国際ツメガエル会議 (米国カリフォルニア州アシロマで開催) において招待講演を行ない、NBRP事業に止まらず、現在中核的な貢献を果たしているツメガエルゲノム解析におけるBACライブラリーの国際共有・提供体制等についても紹介している。

また、日英米拠点間で開催している月例ビデオ会議 (両生類研 (鈴木) –英国リソース拠点 (Guille博士) –米国リソース拠点 (Horb博士)) も継続し、リソース拠点間の連携をさらに強化した。特に、ネッタイツメガエル系統の解析では、拠点間でカエルサンプルの共有・収集を行い、解析結果を協同研究として発表した (Igawa et al. *PLOS ONE* 10, e0133963, 2015)。国際レベルでのリソース整備を推進するために、鈴木は2014年から英国ツメガエルリソース拠点 (EXRC) 運営会議 (Strategic Board Meeting) 委員を委嘱され、2015年6月にはポーツマスで開催された運営会議に招聘されている (2016年も引き続き招聘予定)。さらに、国際ツメガエルデータベース拠点との (Xenbase) との連携についても積極的に進めている。2014年から鈴木が国際ツメガエルデータベース (Xenbase) ツメガエル遺伝子命名委員会 (*Xenopus* Gene Nomenclature Committee) 委員として活動し、国際ツメガエル会議中に行なわれた国際ゲノムプロジェクト-Xenbase合同会議およびメールで常時、積極的に提案・意見を述べて貢献・リーダーシップを発揮している。

7. アジアの国際拠点としての留学生教育および人材育成

平成24年度から新たに発足した文部科学省/日本医療研究開発機構 (AMED) 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事業と連携して、当研究グループ

の鈴木・竹林はアジア地域をターゲットにして国内外で人材育成を積極的に行なっている。2013年10月には、インドネシア・ブラビジャヤ大学 (Universitas Brawijaya) の招聘を受けて、学長招待講演および理学部招待講演をおこなった。さらに、これらの招聘・講演を契機にアジアでの連携を展開させ、2015年10月からはインドネシアおよびバングラデシュから2名の文部科学省国費留学生を獲得して、留学生の大学院教育を行なっている。

国内においては、2006年から名古屋大学医学部における発生学の非常勤講師を毎年継続しており、医学生物学領域における基礎研究および両生類研究の重要性を伝えている。また、当研究グループおよびNBRP事業で整備された実験室を活用して各種の実験実習を主催すると共に、鈴木が講演会の要望に応じている。研究者向け実習として、NBRP実験技術講習会 (2013年3月, 2014年3月, 2015年3月, 2016年3月), 小中高生および教員向け実習としてSuper Science High Schoolラボセミナー・実験実習 (2010年), 日本生物学オリンピック広島大会最先端研究室訪問・実験実習 (2011年8月, 2013年8月, 2015年8月), 高校教員研修会・実習「カエルの発生と中胚葉誘導・神経誘導」(2013年11月), 兵庫県赤穂市立有年中学校「理科おもしろ実験教室」(2014年8月, 2015年8月), 科学学習塾エデュパーク「2015エデュツアー」実験実習 (2015年11月) を行なった。高校教員向け講演会として、広島県高等学校教育研究会理科部会 (2012年3月), 広島市教育センター・高等学校教科教育専門研修Ⅱ (2013年7月), 広島市安佐北中学高等学校・広島市立高等学校公開研究授業 (2013年10月), 大学院生向け講演会として、生化学若い研究者の会中四国支部・生命科学春セミナー (2015年5月), 海外大学生 (ロシア・インドネシア) 向け講演会として, Introduction to Advanced and Integrated Science Lecture (2015年8月) を行なった。

○発表論文

1. 原著論文

- Suzuki, A., Yoshida, H., van Heeringen, S. J., Takebayashi-Suzuki, K., Veenstra, G. J. C. and Taira, M., Genomic organization and modulation of gene expression of the TGF-beta and FGF pathways in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. *Developmental Biology*, in press.
- Session, A. M., Uno Y., Kwon T., Chapman, J., Toyoda, A., Takahashi, S., Fukui, A., Hikosaka, A, Suzuki, A., Kondo, M. *et al.*, Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. *Nature*, in press.
- Suzuki, A., Uno, Y., Takahashi, S., Grimwood, J., Schmutz, J., Mawaribuchi, S., Yoshida, H., Takebayashi-Suzuki, K., Ito, M., Matsuda, Y., Rokhsar, D., and Taira, M. (2016) Genome organization of the *vgl* and *nodal3* gene clusters in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. *Developmental Biology*, in press.
- Haramoto, Y., Saijyo, T., Tanaka, T., Furuno, N., Suzuki, A., Ito, Y., Kondo, M., Taira, M., Takahashi, S. (2016) Identification and comparative analyses of Siamois cluster genes in the *Xenopus laevis* and *tropicalis*. *Developmental Biology*, in press.
- Yoshida, H., Okada M., Takebayashi-Suzuki, K., Ueno, N., and Suzuki, A. (2016) Involvement of JunB proto-oncogene in tail formation during early *Xenopus* embryogenesis. *Zoological Science*, 33, 282-289.
- Igawa, T., Watanabe, A., Suzuki, A., Kashiwagi, A., Kashiwagi, K., Noble, A., Guille, M., Simpson D. E., Horb, M., Fujii, T. and Sumida, M. (2015) Inbreeding ratio and genetic relationships among strains of the western clawed frog, *Xenopus*

tropicalis. PLoS ONE 10(7): e0133963.

2. 総説・解説

該当なし

○著書

該当なし

○取得特許

該当なし

○講演

1. 国際会議での招待講演

・ Atsushi Suzuki, Keiko Kashiwagi, Hideki Hanada, Nobuaki Furuno, Ichiro Tazawa, Atsushi Kurabayashi, Keisuke Nakajima, Kimiko Takebayashi-Suzuki, Takeshi Igawa, Masayuki Sumida, Hitoshi Yoshida, Satomi Kobayashi, Junko Takenaka, Yuuna Tamaki, Shigeru Murakami, Takako Mido and Akihiko Kashiwagi

“National BioResource Project (NBRP) for *Xenopus*: recent developments at the Asian hub for the international *Xenopus* research community” *Xenopus* PI meeting 2015, 2015年9月29日-10月1日, The Marine Biological Laboratory, Woods Hole, USA

2. 国際会議での一般講演

・ Atsushi Suzuki, Hitoshi Yoshida, Maya Okada, Kimiko Takebayashi-Suzuki, Naoto Ueno. A Role of JunB Proto-Oncogene in Tail Formation and Morphogen Signal Integration during Early *Xenopus* Embryogenesis. International Meeting on Aquatic Model Organisms for Human Disease and Toxicology Research, 2016年03月18日 Okazaki, Aichi, Japan

3. 国内学会での招待講演

・ 鈴木 厚 「学振・ポストク申請書を書く前にやっておくべきこと、およびナショナルバイオリソースプロジェクト・ネッタイツメガエル技術講習会」
生化学若い研究者の会中四国支部・生命科学春セミナー (2015年5月 広島)

・ 鈴木 厚 「ナショナルバイオリソースプロジェクト・ネッタイツメガエル」
第48回日本発生生物学会・日本ツメガエル研究会総会 (2015年6月 筑波)

・ 鈴木 厚 「ゲノム・遺伝子から見た発生の仕組みとナショナルバイオリソースプロジェクト・ネッタイツメガエル」 兵庫県赤穂市立有年中学校 (2015年8月 赤穂)

・ 鈴木 厚 「ナショナルバイオリソースプロジェクト・ネッタイツメガエル」
第9回日本ツメガエル研究集会 (2015年9月 秋田)

4. 国内学会での一般講演

・ 鈴木 厚・高橋秀治・宇野好宣・回渕修治・Jane Grimwood・松田洋一・伊藤道彦・Daniel Rokhsar・平良眞規 「*Xenopus laevis*全ゲノム解析：モデル両生類のゲノム進化におけるTGF-betaシグナル伝達経路のユニークな変化とその生物学的意義」
第38回日本分子生物学会年会 (2015年12月 神戸)

- ・ 原本悦和・田中利明・古野伸明・鈴木 厚・近藤真理子・平良眞規・高橋秀治「*Xenopus laevis*全ゲノム解析：アフリカツメガエルの*siamois*ファミリー遺伝子クラスターについての解析」第38回日本分子生物学会（2015年12月 神戸）
- ・ 柏木昭彦・柏木啓子・花田秀樹・鈴木 厚・竹林公子・古野伸明・田澤一朗・倉林 敦・中島圭介・鈴木賢一・山本 卓「ネットイツメガエルを用いた最近の研究」第38回日本分子生物学会年会（2015年12月 神戸）
- ・ 吉田和史・岡田麻耶・竹林公子・上野直人・鈴木 厚「複数のモルフォゲンシグナルを統合する新奇尾部誘導因子の解析」第9回日本ツメガエル研究集会（2015年09月15日 秋田）
- ・ 柏木昭彦・柏木啓子・花田秀樹・鈴木賢一・鈴木 厚・竹林公子・倉林 敦・中島圭介・田澤一朗・井川 武・古野伸明・山本 卓・住田正幸「生命科学研究における近交系ネットイツメガエルの有用性」次世代両生類研究会2015（2015年08月25日 岡崎）
- ・ 柏木昭彦・柏木啓子・花田秀樹・鈴木賢一・鈴木 厚・竹林公子・倉林 敦・中島圭介・田澤一朗・井川 武・古野伸明・山本 卓・住田正幸「ツメガエル類に関するさまざまな実験例」次世代両生類研究会2015（2015年08月25日 岡崎）
- ・ 井川 武・渡辺 愛・鈴木 厚・柏木昭彦・柏木啓子・Anna Noble・Matt Guille・David E. Simpson・Marko E. Horb・藤井 保・住田正幸「ネットイツメガエルの系統における遺伝的関係と近交度について」次世代両生類研究会2015（2015年08月25日 岡崎）
- ・ 鈴木 厚・宇野好宣・(3番目以降一部省略)・上野直人・平良眞規
「アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)のゲノム解析と異質倍数体におけるゲノム進化」新学術領域「ゲノム支援」班会議（2015年8月 神戸）
- ・ 吉田和史・岡田麻耶・竹林公子・上野直人・鈴木 厚「モルフォゲンシグナルの統合に働く新しい尾部オーガナイザー因子の同定と解析」第48回日本発生生物学会（2015年6月 筑波）

○各種研究員と外国人留学生の受入状況

1. 外国人留学生

- ・ 博士後期課程 文部科学省国費留学生 (Nusrat Jahan, バングラデシュ)
- ・ 博士前期課程 文部科学省国費留学生 (Regina Putri Virgiriina, インドネシア)

2. 外国人客員研究員

該当なし

3. 研究員

該当なし

○研究助成金の受入状況

1. 科学研究費補助金

- ・ 基盤研究(C)「神経誘導の保証機構に働くネットワークの解明」1,170千円

(研究代表者 竹林公子, 研究分担者 鈴木 厚)

2. 共同研究

- ・平成27年度基礎生物学研究所 共同利用研究 個別共同利用研究
「*Xenopus laevis* ゲノムプロジェクト完成に向けたFISH解析およびBACライブラリーの効率的な利用に向けた検討」

3. 補助金

- ・文部科学省/日本医療研究開発機構 (AMED) 第3期NBRP 「ネットイツメガエルの近交化・標準系統の樹立・提供」中核機関 (H27年度) 14,067千円 (課題管理代表者 柏木昭彦; 課題管理協力者 鈴木 厚, 竹林公子ほか)

○学界ならびに社会での活動

1. 学協会役員・委員

- ・文部科学省/日本医療研究開発機構 (AMED) ナショナルバイオリソースプロジェクト ネットイツメガエル 課題管理協力者 (非生体リソース, オープンラボ, 技術講習会, 国際連携, webフォーラムの担当, および責任者)
- ・国際ツメガエルデータベース (Xenbase) ツメガエル遺伝子命名委員会 (*Xenopus* Gene Nomenclature Committee) 委員
- ・英国ツメガエルリソース拠点 (EXRC) 運営会議 (Strategic Board Meeting) 委員
- ・国際ツメガエルゲノムプロジェクト プロジェクトリーダーシップメンバー
- ・日本ツメガエルゲノムプロジェクト ワーキンググループ委員 (ゲノム配列決定グループリーダーメンバー, RNA-seq解析グループリーダー, 遺伝子モデルグループリーダー)
- ・日本ツメガエル研究会 世話人会委員
- ・日本ツメガエル研究集会 組織委員
- ・国際誌論文レビューサービス: 2誌3件 (International Journal of Developmental Biology, Zoological Science)
- ・科学学習塾エデュパーク 学習成果発表会審査員

2. セミナー・講演会開催実績

- ・ナショナルバイオリソースプロジェクト ネットイツメガエル実験技術講習会を主催 (2016年3月)
- ・日本生物学オリンピック広島大会 最先端研究室訪問・実験実習を主催 (2015年8月)

3. 産学官連携実績

該当なし

4. セミナー・講義・講演会講師等

- ・施設訪問者見学者対象 NBRPオープンラボの概要説明 20件

- ・広島県立教育センター主催「第19回生物教材バザール」教材の提供および解説
(2015年5月 東広島)
- ・「ゲノム・遺伝子から見た発生の仕組みとナショナルバイオリソースプロジェクト・
ネットアイツメガエル」兵庫県赤穂市立有年中学校「理科おもしろ実験教室」における
講演, およびツメガエル卵受精実験等の生物実験教室開催(2015年8月 赤穂)
- ・「両生類を用いた中胚葉誘導・神経誘導の研究と再生医学への応用」名古屋大学医学部に
おける講義 (2015年12月 名古屋)

5. その他

○国際共同研究

- ・米国エネルギー省、カリフォルニア大学、テキサス大学ほか
研究テーマ:「アフリカツメガエルゲノムプロジェクト」
- ・米国エネルギー省、カリフォルニア大学、Hudson alpha Institute for Biotechnology
研究テーマ:「アフリカツメガエルvg1遺伝子クラスターのゲノム解析」
- ・オランダ ラドバウド大学
研究テーマ:「アフリカツメガエルTGF-beta 経路とFGF経路のゲノム解析」
- ・英国ポーツマス大学, 英国ガードン研究所および米国ウッズホール海洋生物学研究所
研究テーマ:「ネットアイツメガエルリソースの系統解析」
- ・インドネシア ブラビジャヤ大学
研究テーマ:「神経誘導に働く新規タンパク質の解析」
- ・英国ポーツマス大学および米国ウッズホール海洋生物学研究所
研究テーマ:「国際ツメガエルリソースの国際拠点形成」

○特記事項

- ・名古屋大学医学部 非常勤講師(発生学)を2006年から約10年に渡り毎年継続している。
- ・近畿大学工学部 学部生に対するツメガエル受精実験と講義の指導(2015年6~7月)

○大学院教育

1. 大学院生の国内学会発表実績: 2件

- ・吉田和史・岡田麻耶・竹林公子・上野直人・鈴木 厚「複数のモルフォゲンシグナルを
統合する新奇尾部誘導因子の解析」第9回日本ツメガエル研究集会(2015年09月15日 秋
田)
- ・吉田和史・岡田麻耶・竹林公子・上野直人・鈴木 厚「モルフォゲンシグナルの統合に
働く新しい尾部オーガナイザー因子の同定と解析」第48回日本発生生物学会(2015年6月
筑波)

2. 大学院生の国際学会発表実績

該当なし

3. 修士論文発表実績：1名

岡田麻耶

4. 博士学位：0名

5. TAの実績：2名

吉田和史・岡田麻耶

6. 大学院教育の国際化 ← 国際化への対応等

・文部科学省国費留学生の参加に伴い、多様化機構学演習を英語化

・学生指導や各種のメール伝達（研究室運営・セミナー案内など）を英語化

倉林 敦（助教）

○研究活動の概要

両生類における種の多様性やゲノムの分子進化プロセスの究明を目的とした研究を推進している。特に、転移因子に関わる研究を実施している。また、絶滅危惧両生類の保全に関わる研究を進めている。

1. 沖縄・鹿児島県産絶滅危惧種両生類の累代飼育

絶滅危惧両生類の域外保全を目的とし、これまでに人工繁殖・飼育下繁殖に成功した、沖縄・鹿児島県産絶滅危惧種両生類について累代飼育を継続している。これまでに、アマミシカワガエルについては、F2が得られているが、それ以外の種については、F1子孫までの樹立に留まっている。

2. 両生類皮膚粘液における細菌叢の解明

両生類の皮膚粘液には多様な細菌が存在し、様々な役割を果たしていると考えられるが、その細菌は生息場所や地域に依存するのか、あるいは種や系統に特異的なのかについてはほとんど知見がない。また、カエル・サンショウウオツボカビなどに耐性をもたらず細菌の存在が報告され、絶滅危惧保全の観点からも両生類皮膚粘液細菌叢の理解は重要である。両生類皮膚細菌叢国際プロジェクトに参加し、絶滅危惧種や外来種を中心に両生類皮膚粘液を採取し、上記の課題を明らかにする研究の実施をしている。本年度は、両生類研究施設で飼育されている無尾・有尾両生類について環境DNA解析手法を用いて解析した所、多くの種では背側と腹側皮膚に存在する細菌の種類に違いは見られないことが分かった。また、本研究によって、飼育下にある個体よりも野生個体の方が、皮膚に存在する最近の多様性が高いことが証明された。このことは、飼育による域外保全においては、共生細菌の減少についても注意が必要であることを示していた。

3. フクラガエル糊粘液成分の解明

主にアフリカの乾燥地帯に分布するフクラガエルは、雌が大きく雄が小さいという性的二型を示し、また地中生活への適応から、前肢がとても短い。その結果、フクラガエルは雄が雌を腕で抱くという通常の抱接が難しい為、皮膚から糊を出し、その糊で接着することで抱接を行うという奇妙な繁殖生態を示す。この現象は60年前に知られていたが、これまでに糊物質が何であるかと言う点は不明であった。本研究では、糊物質とその対応遺伝

子を明らかにすることを目的として研究を開始した。現在、プロテオームおよびトランスクリプトーム解析から、糊物質とその遺伝子の絞込みを行っている。

4. ヘビからカエルへの遺伝子水平伝播の系統地理学的起源の推定

捕食者であるヘビから被捕食者であるカエル類に水平伝播している奇妙な遺伝子（転移因子）を発見した。現在、世界多地域からヘビ・カエルサンプルを収集し、NGSを用いたアンプリコン解析によって、どの地域で、どのヘビ系統からどのカエル系統へ、何時頃水平伝播を生じたのか、と言う点についての解析を進めている。

○発表論文

1. 原著論文

Nakade, S., T. Sakuma, Y. Sakane, Y. Hara, A. Kurabayashi, K. Kashiwagi, A. Kashiwagi, T. Yamamoto, M. Obara (2015) Homeolog-specific targeted mutagenesis in *Xenopus laevis* using TALENs. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 51: 879-884.

Hasan, M., M. A. R. Sarker, A. Kurabayashi, M. Kuramoto, M. Sumida. Genetic variation, advertisement call, and morphometry of *Microhyla nilphamariensis* from Bangladesh. *Philippine Journal of Systematic Biology* 9: 63-80.

2. 総説・解説

該当なし

○著書

該当なし

○取得特許

該当なし

○講演

1. 国際会議での招待講演

©Atsushi Suzuki, Keiko Kashiwagi, Hideki Hanada, Nobuaki Furuno, Ichiro Tazawa, Atsushi Kurabayashi, Keisuke Nakajima, Kimiko Takebayashi-Suzuki, Takeshi Igawa, Masayuki Sumida, Hitoshi Yoshida, Satomi Kobayashi, Junko Takenaka, Yuuna Tamaki, Shigeru Murakami, Takako Mido and Akihiko Kashiwagi

“National BioResource Project (NBRP) for *Xenopus*: recent developments at the Asian hub for the international *Xenopus* research community” *Xenopus* PI meeting 2015, 2015年9月29日-10月1日, The Marine Biological Laboratory, Woods Hole, USA

2. 国際会議での一般講演

A. Kurabayashi, Hideaki Mizuno, Kazuhiko Ohshima, and Miguel Vences “Horizontal gene transfer from snakes to frogs” The 4th congress of herpetological Society of Indonesia and the 1st symposium on South East Asia Herpetology, 2015年8月28-29日, Brawijaya University, Indonesia.

M. M. Islam, T. Igawa, A. Kurabayashi, R. Kakehashi, N. Satou, N. Shintani, M. Tado, H. Sugawara, T. Nishitani, M. Uchida, M. Hasan, S. Oumi, S. Katsuren, T. Fujii and M. Sumida. “An ex situ conservation effort for several endangered and near-threatened amphibian species from the Ryukyu Archipelago, Japan by captive breeding and sperm

cryopreservation technique; and some recent research works with amphibians". The 2nd Hiroshima International Symposium on Future Science: Hi-SFs 2016-Current and Future trends on the Interdisciplinary Research in life Sciences. 2016年3月18日, Hiroshima University, Japan. March 18.

3. 国内学会での招待講演
該当なし

4. 国内学会での一般講演

柏木昭彦・柏木啓子・花田秀樹・鈴木 厚・竹林公子・古野伸明・田澤一朗・
倉林 敦・中島圭介・鈴木賢一・山本 卓「ネットイツメガエルを用いた最近の研究」
第38回日本分子生物学会年会（2015年12月 神戸）

柏木昭彦・柏木啓子・花田秀樹・鈴木賢一・鈴木 厚・竹林公子・倉林 敦・中島圭介・
田澤一朗・井川 武・古野伸明・山本 卓・住田正幸「生命科学研究における近交系ネッ
タイトツメガエルの有用性」次世代両生類研究会2015（2015年08月25日 岡崎）

柏木昭彦・柏木啓子・花田秀樹・鈴木賢一・鈴木 厚・竹林公子・倉林 敦・中島圭介・
田澤一朗・井川 武・古野伸明・山本 卓・住田正幸「ツメガエル類に関するさまざまな
実験例」次世代両生類研究会2015（2015年08月25日 岡崎）

○各種研究員と外国人留学生の受入状況

1. 外国人留学生
該当なし

2. 外国人客員研究員
該当なし

3. 研究員
掛橋竜祐（学振特別研究員）

○研究助成金の受入状況

1. 科学研究費補助金

基盤研究(B)「ヘビからカエルへの遺伝子水平伝播：起源系統と発生地域の解明および媒介
生物の特定」3,380千円（研究代表者 倉林 敦）

挑戦的萌芽研究「フクラガエルが生殖行為に用いる「糊状物質」の特性と成分の解明およ
び人工繁殖の試み」650千円（研究代表者 倉林 敦）

○学界ならびに社会での活動

1. 学協会役員・委員

倉林 敦

- ・文部科学省第3期NBRP「ネットイツメガエル」課題管理協力者
- ・岩国市シロヘビ調査研究委員会
- ・国際誌論文レビューサービス：2誌2件（GENE, Anatomical Science International）

2. セミナー・講演会開催実績

該当なし

3. 産学官連携実績

該当なし

4. セミナー・講義・講演会講師等

倉林 敦

・施設訪問者見学者対象 絶滅危惧種説明 多数

・「Progress report of the Horizontal gene transfer project」ブラウンシュバイク工科大学

動物学教室、動物学教室セミナー（2016年3月14日 ブラウンシュバイク工科大学ドイツ）

5. その他

○国際共同研究

倉林 敦

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

研究テーマ：ヘビからカエルへの遺伝子水平伝播

・ブラウンシュバイク工科大学（ドイツ）・コネチカット大学（アメリカ）・ノースウェスト大学（南アフリカ）

研究テーマ：フクラガエルが生殖行為に用いる糊状物質の解明

・ブラウンシュバイク工科大学（ドイツ）

研究テーマ：両生類皮膚粘液に存在する細菌類の進化と分布の解明

・ビショップ博物館

○特記事項

倉林 敦

・TV番組取材協力：1件（NHK『ダーウィンが来た』）

掛橋竜祐・倉林 敦

・GGs Prize 2015受賞（日本遺伝学会の出版する学会誌『Genes and Genetic Systems (GGS)』に掲載された論文を対象として、優れた学術論文1～2編に与えられる賞）受賞論文：Mitochondrial genomes of Japanese Babina frogs (Ranidae, Anura): unique gene arrangements and the phylogenetic position of genus Babina. R. Kakehashi, A. Kurabayashi, S. Oumi, S. Katsuren, M. Hosono and M. Sumida. Genes & Genetic Systems (2013) 88: 59-67.

○大学院教育

1. 大学院生の国内学会発表実績：2件

該当なし

2. 大学院生の国際学会発表実績

該当なし

3. 修士論文発表実績

該当なし

4. 博士学位：0名

5. TAの実績：1名

坂本詩織

6. 大学院教育の国際化 ← 国際化への対応等
該当なし

両生類における種の多様性やゲノムの分子進化プロセスの究明を目的とした研究を推進している。特に、転移因子に関わる研究を実施している。また、絶滅危惧両生類の保全に関わる研究を進めている。

1. 沖縄・鹿児島県産絶滅危惧種両生類の累代飼育

絶滅危惧両生類の域外保全を目的とし、これまでに人工繁殖・飼育下繁殖に成功した、沖縄・鹿児島県産絶滅危惧種両生類について累代飼育を継続している。これまでに、アマミシカワガエルについては、F2が得られているが、それ以外の種については、F1子孫までの樹立に留まっている。

2. 両生類皮膚粘液における細菌叢の解明

両生類の皮膚粘液には多様な細菌が存在し、様々な役割を果たしていると考えられるが、その細菌は生息場所や地域に依存するのか、あるいは種や系統に特異的なのかについてはほとんど知見がない。また、カエル・サンショウウオツボカビなどに耐性をもたらず細菌の存在が報告され、絶滅危惧保全の観点からも両生類皮膚粘液細菌叢の理解は重要である。両生類皮膚細菌叢国際プロジェクトに参加し、絶滅危惧種や外来種を中心に両生類皮膚粘液を採取し、上記の課題を明らかにする研究の実施をしている。本年度は、両生類研究施設で飼育されている無尾・有尾両生類について環境DNA解析手法を用いて解析した所、多くの種では背側と腹側皮膚に存在する細菌の種類に違いは見られないことが分かった。また、本研究によって、飼育下にある個体よりも野生個体の方が、皮膚に存在する最近の多様性が高いことが証明された。このことは、飼育による域外保全においては、共生細菌の減少についても注意が必要であることを示していた。

3. フクラガエル糊粘液成分の解明

主にアフリカの乾燥地帯に分布するフクラガエルは、雌が大きく雄が小さいという性的二型を示し、また地中生活への適応から、前肢がとても短い。その結果、フクラガエルは雄が雌を腕で抱くという通常の抱接が難しい為、皮膚から糊を出し、その糊で接着することで抱接を行うという奇妙な繁殖生態を示す。この現象は60年前に知られていたが、これまでに糊物質が何であるかという点は不明であった。本研究では、糊物質とその対応遺伝子を明らかにすることを目的として研究を開始した。現在、プロテオームおよびトランスクリプトーム解析から、糊物質とその遺伝子の絞込みを行っている。

4. ヘビからカエルへの遺伝子水平伝播の系統地理学的起源の推定

捕食者であるヘビから被捕食者であるカエル類に水平伝播している奇妙な遺伝子（転移因子）を発見した。現在、世界多地域からヘビ・カエルサンプルを収集し、NGSを用いたアンプリコン解析によって、どの地域で、どのヘビ系統からどのカエル系統へ、何時頃水平伝播を生じたのか、と言う点についての解析を進めている。

○発表論文

1. 原著論文

Nakade, S., T. Sakuma, Y. Sakane, Y. Hara, A. Kurabayashi, K. Kashiwagi, A. Kashiwagi, T. Yamamoto, M. Obara (2015) Homeolog-specific targeted mutagenesis in *Xenopus laevis* using TALENs. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 51: 879-884.

Hasan, M., M. A. R. Sarker, A. Kurabayashi, M. Kuramoto, M. Sumida. Genetic variation, advertisement call, and morphometry of *Microhyla nilphamariensis* from Bangladesh. *Philippine Journal of Systematic Biology* 9: 63-80.

2. 総説・解説

該当なし

○著書

該当なし

○取得特許

該当なし

○講演

1. 国際会議での招待講演

©Atsushi Suzuki, Keiko Kashiwagi, Hideki Hanada, Nobuaki Furuno, Ichiro Tazawa, Atsushi Kurabayashi, Keisuke Nakajima, Kimiko Takebayashi-Suzuki, Takeshi Igawa, Masayuki Sumida, Hitoshi Yoshida, Satomi Kobayashi, Junko Takenaka, Yuuna Tamaki, Shigeru Murakami, Takako Mido and Akihiko Kashiwagi

“National BioResource Project (NBRP) for *Xenopus*: recent developments at the Asian hub for the international *Xenopus* research community” *Xenopus* PI meeting 2015, 2015年9月29日-10月1日, The Marine Biological Laboratory, Woods Hole, USA

2. 国際会議での一般講演

A. Kurabayashi, Hideaki Mizuno, Kazuhiko Ohshima, and Miguel Vences “Horizontal gene transfer from snakes to frogs” The 4th congress of herpetological Society of Indonesia and the 1st symposium on South East Asia Herpetology, 2015年8月28-29日, Brawijaya University, Indonesia.

M. M. Islam, T. Igawa, A. Kurabayashi, R. Kakehashi, N. Satou, N. Shintani, M. Tado, H. Sugawara, T. Nishitani, M. Uchida, M. Hasan, S. Oumi, S. Katsuren, T. Fujii and M. Sumida. “An ex situ conservation effort for several endangered and near-threatened amphibian species from the Ryukyu Archipelago, Japan by captive breeding and sperm cryopreservation technique; and some recent research works with amphibians”. The 2nd Hiroshima International Symposium on Future Science: Hi-SFs 2016-Current and Future trends on the Interdisciplinary Research in life Sciences. 2016年3月18日, Hiroshima University, Japan. March 18.

3. 国内学会での招待講演

該当なし

4. 国内学会での一般講演

柏木昭彦・柏木啓子・花田秀樹・鈴木 厚・竹林公子・古野伸明・田澤一朗・
倉林 敦・中島圭介・鈴木賢一・山本 卓「ネットイツメガエルを用いた最近の研究」
第38回日本分子生物学会年会（2015年12月 神戸）

柏木昭彦・柏木啓子・花田秀樹・鈴木賢一・鈴木 厚・竹林公子・倉林 敦・中島圭介・
田澤一朗・井川 武・古野伸明・山本 卓・住田正幸「生命科学研究における近交系ネッ
タイツメガエルの有用性」次世代両生類研究会2015（2015年08月25日 岡崎）

柏木昭彦・柏木啓子・花田秀樹・鈴木賢一・鈴木 厚・竹林公子・倉林 敦・中島圭介・
田澤一朗・井川 武・古野伸明・山本 卓・住田正幸「ツメガエル類に関するさまざまな
実験例」次世代両生類研究会2015（2015年08月25日 岡崎）

○各種研究員と外国人留学生の受入状況

1. 外国人留学生

該当なし

2. 外国人客員研究員

該当なし

3. 研究員

掛橋竜祐（学振特別研究員）

○研究助成金の受入状況

1. 科学研究費補助金

基盤研究(B)「ヘビからカエルへの遺伝子水平伝播：起源系統と発生地域の解明および媒介
生物の特定」3,380千円（研究代表者 倉林 敦）

挑戦的萌芽研究「フクラガエルが生殖行為に用いる「糊状物質」の特性と成分の解明およ
び人工繁殖の試み」650千円（研究代表者 倉林 敦）

○学界ならびに社会での活動

1. 学協会役員・委員

倉林 敦

- ・文部科学省第3期NBRP「ネットイツメガエル」課題管理協力者
- ・岩国市シロヘビ調査研究委員会
- ・国際誌論文レビューサービス：2誌2件（GENE, Anatomical Science International）

2. セミナー・講演会開催実績

該当なし

3. 産学官連携実績

該当なし

4. セミナー・講義・講演会講師等

倉林 敦

- ・施設訪問者見学者対象 絶滅危惧種説明 多数

・「Progress report of the Horizontal gene transfer project」ブラウنشユバイク工
科

大学動物学教室、動物学教室セミナー（2016年3月14日 ブラウンシュバイク工科大学
ドイツ）

5. その他

○国際共同研究

倉林 敦

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

研究テーマ：ヘビからカエルへの遺伝子水平伝播

・ブラウنشユバイク工科大学（ドイツ）・コネチカット大学（アメリカ）・ノースウェス
ト大学（南アフリカ）

研究テーマ：フクラガエルが生殖行為に用いる糊状物質の解明

・ブラウنشユバイク工科大学（ドイツ）

研究テーマ：両生類皮膚粘液中に存在する細菌類の進化と分布の解明

・ビショップ博物館

○特記事項

倉林 敦

・TV番組取材協力：1件（NHK『ダーウィンが来た』）

掛橋竜祐・倉林 敦

・GGS Prize 2015受賞（日本遺伝学会の出版する学会誌『Genes and Genetic Systems (GGS)』
に掲載された論文を対象として、優れた学術論文1～2編に与えられる賞）受賞論文：
Mitochondrial genomes of Japanese Babina frogs (Ranidae, Anura): unique gene
arrangements and the phylogenetic position of genus Babina. R. Kakehashi, A.
Kurabayashi, S. Oumi, S. Katsuren, M. Hosono and M. Sumida. Genes & Genetic Systems
(2013) 88: 59-67.

○大学院教育

1. 大学院生の国内学会発表実績：2件

該当なし

2. 大学院生の国際学会発表実績

該当なし

3. 修士論文発表実績

該当なし

4. 博士学位：0名

5. TAの実績：1名

坂本詩織

6. 大学院教育の国際化 ← 国際化への対応等

該当なし

Islam Mohammed Mafizul (助教)

○**Summary of Researches**

1. Cryopreservation of sperm for the near threatened species *Rana kobai* and observation of mature offspring produced by cryopreserved sperm

Summary: I have conducted an experiment to develop sustainable technique for cryopreservation of sperm for Japanese land frog. Although this technique is well established for *Xenopus laevis* or *Silurana tropicalis*, there has not yet established technique for Japanese land frogs. I have conducted cryopreservation experiments to preserve the sperm of the Amami Brown frog (*Rana kobai*) using the low cost cryopreservation technique. I have preserved the sperm in -80°C freezer thus avoiding any use of liquid nitrogen. I have got a maximum of around 86% fertilization rate which is rare with cryopreserved sperms. I have got success with the sperm preserve for maximum 40 days by confirming fertilization and successive embryos. The embryos got by using the frozen sperm went through normal development and metamorphosed within the similar time compared to the control. I have also rear them until maturation and found that compare to control offspring obtained from cryopreserved sperm have individuals of both sex, normal growth and normal maturity.

Methods: At first several males were dissected and testes were brought out to an Eppendorf tube containing L-15 medium and calf serum and L-Glutamine to get the sperm suspension and they were immediately mixed with ice clod Cryoprotectant and the equally distributed in several thin walled 500µl tube. The tubes were then transferred in the Styrofoam box and immediately moved to a -80°C deep freeze for further use. During the breeding, I injected several females with Bullfrog pituitary and the ovulated eggs were fertilized with the frozen sperm as well as fresh sperm as control. The degree of development were count at each stage namely fertilized eggs, tail-buds, hatchlings, feeding tadpoles, 30-days- old tadpoles and metamorphosed frogs. The water temperature was maintained 18°C and the tadpoles were feed with boiled spinach where the metamorphosed frogs were fed with live cricket. I have checked the mature individuals after they become 2 years old as they usually mature by that time.

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

2. Induced breeding technique of Japanese Rice Frog (*Fejervarya kawamurai*) by using chemical stimulant Amphiplex instead of costly frog Pituitary Gland (PG) extract

Summary: I have done an experiment for hormonal induction of spawning in the Japanese rice frog (*Fejervarya kawamurai*) by using a combination of Gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) agonist and Dopamine antagonist termed as AMPHIPLEX (Trudeau et. al., 2010). The most common inducing agent until now for artificial breeding is Bullfrog Pituitary Gland which involve killing of frogs and not commercially available now- a-days. So we try for alternative inducing agent that might be useful for frog breeder as well as researchers I was able to get partial success as female ovulate when both male and female are injected and kept together but no female responded when I keep female separately.

Methods: I have collected many mature male and female individuals of *F. kawamurai* from the paddy fields in Higashihroshima during the breeding season. Two female and 3 male individuals are kept in one cemented tank with little water and float for the shelter of frogs. Frogs were injected with AMPHIPLEX and released in the same tank. The frogs were observed to notice amplexus couple. When I found the deposited eggs I collect them and rear for further development. I have also injected the female separately in keep the in the incubator.

Findings: I found some amplexus couples 2 hour post injection. I found the egg cluster in several tank but the rate is low (possibly 4 female out 23 female) ovulate. Later on I collect the eggs and check for further development and found that they went for normal development. No females were ovulated or deposited eggs when they were inject separately and kept only female frogs in a box within the incubator indicating female need both AMPHIPLEX and male for releasing egg.

3. Reproduction of Color mutant of *Rana japonica* to produce see-through frog again

Summary: Previously we succeeded to produce see-through frog by artificial breeding of Japanese brown Frog. As the see-through frogs are weaker compare to the wild individual they have less survivability and all see-through frogs and two color mutant (Black-eye and Grey-eye mutants) died. In order to fix the mutant we outbred them with the Wild *Rana japonica* from Hiroshima. I have used mature offspring (Hiroshima x Gray eye) and (Hiroshima x Heterogygus wild) to get some black-eye and grey-eye mutant. Due to poor performance of the sperm I was unable to get many viable offspring although I got many eggs.

Methods and Findings: I have applied established method of artificial breeding (Sumida et al., 2016) for production of see-through frog. I have found that the female are good enough and ovulate after injecting with PG but they cannot go for further development as the sperm density and number of motile sperm is very less compare with the wild.

Future research plan:

Using the resources, male and female of 2 combinations I shall perform a series of crossing, 1st to retain the Grey-eye mutant and Black-eye mutant and finally try to produce see-through frogs again in our laboratory.

○**Publications**

① 1. Original articles

- I. Sumida M., Islam M.M., Igawa T., Kurabayashi A., Furukawa Y., Sano N., Fujii T., and Yoshizaki N. (2016). The first see-through frog created by breeding: description, inheritance patterns, and dermal chromatophore structure. *Scientific Report*. 6: 24431

- II. Sultana N., Igawa T., Islam M.M., Hasan M., Alam M.S, Komaki S., Kawamura K., KhanM.M.R., and Sumida M. (2016). Inter- and intra-specific genetic divergence of Asian tiger frogs (genus *Hoplobatrachus*), with special reference to the population structure of *H. tigerinus* in Bangladesh. *Genes & Genetic Systems*. (in press)

○**Presentations**

1. Invited presentations in international meetings

Islam M. M., Igawa T., Kurabayashi A., Kakehashi R., Satou N., Shintani N., Tado M., Sugawara H., Nishitani T., Uchida M., Hasan M., Oumi S., Katsuren S., Fujii T., and Sumida M. An *ex situ* conservation effort for several endangered and near-threaten amphibian species from the Ryukyu Archipelago, Japan by captive breeding and sperm cryopreservation technique; and some recent research works with amphibians. The 2nd Hiroshima International Symposium on Future Science: Hi-SFs 2016-Current and Future trends on the Interdisciplinary Research in life Sciences, Hiroshima, Japan.

○**Activities in academic and general societies**

1. Committee of Academic Society

Zoological Society of Japan
The Herpetological Society of Japan
The Genetics Society of Japan

○ **International collaborations**

A permission letter is under processing to bring frog sample from Bangladesh and work in japan with the Forest Department, Government of Peoples Republic of Bangladesh

○ **Remarks**

Review journal papers for “European Journal of Herpetology”.

○ **Educations in Graduate school**

- Conduct course in undergraduate level in English title “Evolution and Systematics in Animals”.

- Conduct course for Graduate students titled “Evolution and Systematics”
- Support graduate students for “Biological Science Seminar” by helping and editing their English Abstracts and presentations.
- Taken a lecture for two groups of fresh undergraduate students in English as a part of super global program “Science Chat on Amphibian behavior and diversity”

Hasan Mahmudul (特任助教)

○ Summary of Researches

1. Identification of *Hylarana* species group from South Asia:

Summary:

For more than a century, *Hylarana tytleri* (Theobald 1868) has been confused with two congeneric species, *H. taipehensis* and *H. erythraea*, in Bangladesh and neighboring countries due to phenetic similarities as well as a lack of sufficient molecular and morphometric data. The holotype in the Zoological Survey of India, Kolkata, ZSI 10035, is the only extant specimen of this species, yet it is in a bad state of preservation and ineffective for use in comparative studies. To resolve these problems, we conducted molecular and morphological surveys of *Hylarana* species throughout Bangladesh and examined *H. taipehensis*, *H. erythraea*, and *H. macrodactyla* from Taiwan, Malaysia, and China, respectively. Based on mitochondrial DNA sequence data, *H. tytleri* was shown to be genetically divergent from these relatives (7.4, 11.8, and 12.3% for the 16S rRNA gene and 15.8, 19.8, and 20.9% for the Cytb b gene in relation to *H. macrodactyla*, *H. taipehensis*, and *H. erythraea*, respectively). Morphologically, *H. tytleri* could also be distinguished from these congeners by the following: snout–vent length (SVL): 20.0–41.8 mm, rounded snout, moderately elongated head and off-white dorsolateral folds. Although *H. tytleri* showed the closest affinity with *H. macrodactyla* in the molecular phylogeny, the former is strikingly different in the absence of a middorsal stripe. Frogs from Myanmar previously allied to *H. erythraea* and treated as *H. tytleri*, also showed genetic divergence (12.3 and 24.6% for the 16S rRNA and Cytb b genes, respectively) with respect to topotypic *H. tytleri*, suggesting that Myanmar *H. tytleri* represents a putative unnamed taxon. In the future, this data may be useful as a reference to avoid erroneous species identification of *Hylarana* species in these regions.

2. Reproductive isolating mechanism of Bangladesh coastal bullfrog *H. litoralis* and its congeneric species:

Summary:

To elucidate the reproductive isolating mechanisms in the Bangladesh coastal bullfrog *Hoplobatrachus litoralis* and its congeneric species, we performed crossing experiments using three species: *H. litoralis*, *H. tigerinus*, and *H. rugulosus*. In addition, we conducted histological and spermatogenesis observations using hybrids of these species. The reciprocal

hybrids between *H. litoralis* and *H. tigerinus* developed normally and had somewhat lower viability at the metamorphosis stage compared with the controls. Most of the metamorphosed frogs became mature. However, almost all hybrids between female *H. rugulosus* and male *H. litoralis* or *H. tigerinus* died of underdevelopment at the tadpole stage, and only a few hybrids metamorphosed normally and survived to maturity. The inner structures of the testes of the control *H. litoralis* and *H. tigerinus* were completely normal, with seminiferous tubules filled with compact bundles of normal spermatozoa. Those of the reciprocal hybrids between *H. litoralis* and *H. tigerinus* were almost normal or slightly abnormal, with seminiferous tubules that contained pycnotic nuclei in addition to normal bundles of normal spermatozoa, which demonstrates slight abnormalities in spermatogenesis. In contrast, the hybrids between female *H. rugulosus* and male *H. litoralis* or *H. tigerinus* had no bundles of spermatozoa nor spermatids in the seminiferous tubules, which indicates entirely abnormal spermatogenesis. Spermatogenesis observation showed slight abnormalities, with the occurrence of univalents and increase of rod-shaped bivalents, in the reciprocal hybrids between *H. litoralis* and *H. tigerinus*. These results may indicate that *H. litoralis* and *H. tigerinus* are not isolated from each other by hybrid inviability nor by hybrid sterility, but show a slight divergence because there is somewhat abnormal spermatogenesis in hybrids. However, *H. rugulosus* is isolated from both *H. litoralis* and *H. tigerinus* by incomplete hybrid inviability and complete hybrid sterility.

○ Publications

1. Original article

1. **M. Hasan**, M. A. R. Sarker, A. Kurabayashi, M. Kuramoto and M. Sumida. (2015) Genetic variation, advertisement call, and morphometry of *Microhyla nilphamariensis* from Bangladesh. Philippine Journal of Systematic Biology, 9:63-80.

2. N. Sultana, T. Igawa, M. M. Islam, **M. Hasan**, M. S. Alam, S. Komaki, K. Kawamura, M. M. R. Khan and M. Sumida. (2016) Inter- and intra-specific genetic divergence of Asian tiger frogs (genus *Hoplobatrachus*), with special reference to population structure of *H. tigerinus* in Bangladesh. Genes & Genetic Systems (in press).

2. Review

3. Others

○ Books

○ Patents

○ Presentations

1. Invited presentations in international meetings
2. Regular presentations in international meetings
3. Invited presentations in domestic meetings
4. Regular presentation in domestic meetings

M. Hasan. “Cryptic anuran biodiversity in Bangladesh with description of three new species”. International Union for Conservation of Nature (IUCN)-Bangladesh, Country Office, House 16, Road 2/3, Banani, Dhaka, Bangladesh. August 27, 2015 (Regular).

○ Research funds

1. KAKENHI
2. Others

○Activities in academic and general societies

1. Committee of Academic Society
2. Others

Red list Assessment Group-Amphibians, IUCN, Bangladesh.

○ International collaborations

There is a collaborative research with June-Shiang Lai (Department of Life Science, National Taiwan Normal University, Taiwan) to resolve the chaos of accurate identification of *Hylarana* species group from South Asia.

○ Remarks

○ Educations in Graduate school

1. Presentations of graduate students in domestic conference
2. Presentations of graduate students in international conference
3. Conferment of Master degree
4. Conferment of Doctoral degree
5. Teaching Assistants

6. Contribution to Globalization in Graduate school Educations

I contributed to the course of “Animal Morphology” for undergraduate student, Department of Biological Science, Graduate School of Science, Hiroshima University with Prof. Kinuya Yasui.

竹林公子（研究員）

○研究活動の概要

1. 神経誘導の保証機構に働くネットワークの解明

～背腹と頭尾の両パターン形成を制御するBizとFoxB1転写因子の解析を通じて～

生物は遺伝的・環境的要因の変化に、うまく適応して生息圏を拡大している。例えば、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。これは生物が遺伝的・環境的变化に適応する仕組みを発達させてきたことを示唆し、わずかな遺伝的・環境的变化が生じても個体自身は大きく影響を受けない保証機構が存在すると考えられる。さらにヒト胎児の先天異常に着目すると、その発症原因には大きく分けて環境要因と遺伝的要因があり、同じ環境要因にさらされても、重症化する場合と、逆に全く症状が出ない場合がある。これは個々の遺伝的要因（保証機構の破綻）が先天異常の発症につながることを示唆する。中でも、ヒトの運動・知能・感覚を司る中枢神経

系が、環境要因・遺伝要因の変化に関わらず発生過程で確実に形成されるためには神経形成の保証機構が必要だと考えられた。

これまでに、神経外胚葉に発現するFoxB1転写因子が、BMPとWntシグナル伝達経路の統合的制御にはたらき、カエル初期胚の背腹・前後軸を制御すること、また、上流で働くOct-25転写因子とfeed-forwardネットワークを形成し神経誘導を保証していることを明らかにしている(Takebayashi-Suzuki et al. *Developmental Biology*, 2011)。feed-forward遺伝子ネットワークの存在によってFoxB1単独の機能阻害は神経誘導にほとんど影響しない。その理由として①外胚葉内の他の神経誘導因子と協調し神経誘導を保証している、②外胚葉を裏打ちする中胚葉との間の協調的な神経誘導保証作用が存在する、という2つの可能性が考えられた。FoxB1機能欠損マウス胚でも初期の神経誘導は正常で、後期の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)、カエル以外の動物種にも保存された保証機構が存在する可能性が示唆された。また、FoxB1転写因子と同様に背腹軸と前後軸の両方の形成に関与するBiz転写因子の単離に成功しており、外胚葉内でFoxB1とBiz転写因子が協調して神経誘導の保証機構にはたらく可能性も考えられた。本研究では、これらの協調作用を解析することによって、外胚葉内の神経誘導保証機構を分子レベルで明らかにすること、さらに保証機構の障害により発生異常が生じるメカニズムを体系的に理解して、先天異常の発症機構の解明につなげることを目的とした。

Biz転写因子は受精卵期から発現しており神経誘導期にも予定神経領域に発現していることを確認した。さらにBiz転写因子の過剰発現が、神経マーカーの発現を誘導し表皮マーカーの発現を抑制すること(背腹軸の制御)、および後方神経マーカーの発現を誘導し前方神経マーカーの発現を抑制すること(前後軸の制御)を明らかにした。FoxB1とBiz転写因子の各々を阻害するモルフォリノオリゴで機能阻害を行った結果、それぞれのMOをインジェクションした場合に比べ両者を組み合わせると神経マーカーNCAM、N-tubulin、および後方神経マーカーHoxB9の発現が著しく低下し、FoxB1とBiz転写因子が神経誘導の保証機構に重要な遺伝子ネットワークを形成していることが強く示唆された。さらに、BMPとWntシグナル伝達経路に対するBiz転写因子の作用機序についても明らかになりつつある。

2. 誘導因子に対する細胞応答の制御と尾部オーガナイザー形成・組織再生

受精卵を構成する個々の細胞は、受容した誘導因子に応答して、その分化運命を決定していく。つまり、発生初期には幹細胞として様々な細胞に分化する能力を持ち、誘導因子に対する応答能力も高いが、発生が進行するにつれて応答能力が制限される。しかしながら、多能性の幹細胞状態から細胞応答が次第に制限されていく機構は明確ではない。この点に着目してこれまでに、中胚葉や神経誘導の制御に働くTGF-betaシグナル伝達経路を抑制する遺伝子群をスクリーニングし、Oct-25転写因子を単離することに成功している(Takebayashi-Suzuki et al. *Mechanisms of Development* 124, 840-855, 2007)。その後の解析から、Oct-25はBMPシグナルを抑制して神経を誘導するだけでなく、Activin/NodalやFGFのシグナルも調節することが可能で、より広域なシグナルに対する細胞応答を制御することが示されている。そこで、誘導因子に対する細胞応答を制御する機構を明らかにすることを目的として、Oct-25が発現を制御する遺伝子の機能解析を行ない、これまでにFoxB1転写因子を単離・解析して論文を発表した(Takebayashi-Suzuki et al. *Developmental Biology* 360, 11-29, 2011)。

今年度は、未解析の遺伝子に着目して機能解析を進めた結果、Oct-25によって発現が抑制されるJunB転写因子を初期胚で過剰発現すると2次尾部構造を誘導することが分かった。誘導された2次尾部構造を詳しく調べると、体節(筋肉)を持たない尾部が形成されており、JunBは、尾部オーガナイザー形成に関与する一方で、尾部オーガナイザー領域における細胞応答を部分的に抑制している可能性が示唆された。次に、ヒトJunBは、誘導因子として働くFGFとWntのシグナル伝達因子であるMAPKとGSK3betaによるリン酸化を受けて自身のタンパク質分解が促進されるため、我々が単離したツメガエルJunBのリン酸化サイトを変異

させたところ、JunBの2次尾部誘導活性が大幅に高まることが分かった。さらに、JunBを外胚葉組織で過剰発現すると、FGF3とWnt8の発現を誘導することも分かり、この発現誘導もリン酸化サイトを変異させたJunBでは強まっていた。したがって、JunBの活性は自ら誘導したFGF・Wntシグナルによるフィードバック制御を受けることが明らかになり、JunBが誘導因子シグナルを統合して尾部オーガナイザー領域に形成に働いている可能性が示唆された (Yoshida et al. *Zoological Science* 33, 282-289, 2016)。

尾部オーガナイザー領域は、幹細胞様の性質を長期に渡って維持することで新しい細胞を生み出し、尾部を伸長させることが知られている。したがって、今回同定した新規尾部誘導因子・JunBは、幹細胞の維持、および誘導因子に対する細胞応答能力を調節・制限する上で重要な役割を果たしていると考え、尾部の形成における解析を進めている。また、ツメガル幼生尾部領域を切断すると、損傷した脊髄が再生することが知られており、JunBの過剰発現が脊髄を誘導することも分かっていることから、脊髄損傷後の再生過程におけるJunBの役割についても解析を始めている。

3. 神経誘導に働く新規タンパク質の解析

項目2. に述べたように、Oct-25転写因子が誘導因子に対する細胞応答を調節することを見出し、その下流因子の探索を進めている。この過程で新たに同定したNsk (Neural Specific Kinase)は、ツメガエルの神経板で強く発現し、Oct-25の過剰発現により遺伝子発現が誘導される。Nskの全長cDNAをネットイツメガル胚から単離して、初期胚で過剰発現したところ、弱い神経誘導を引き起こすことが分かった。培養細胞を用いたNskの先行研究において、リン酸化を受けたNskは不安定で速やかに分解されることが示されていたため、このリン酸化サイトに変異を導入したところ、カエル胚での神経誘導活性も増強された。また、神経誘導を引き起こすFGF処理もしくはドミナントネガティブBMP受容体によるBMPの抑制処理とNsk過剰発現を同時に行なったところ、Nskはこれらの処理と協調的に働いて、神経誘導を強めることが分かった。FGFは、その下流で働くMAPKを介してBMPシグナル伝達因子Smadをリン酸化することでSmadの分解を促進し、BMPシグナルを抑制することが知られている。したがって、NskがFGF処理やBMP抑制処理と協調作用を示したことは、NskがBMPシグナル伝達因子やその下流で働く転写因子群のいずれかをリン酸化することでBMPシグナルを調節する可能性を示唆する。現在、この可能性を検証する解析を行なっている。

4. TGF-betaシグナル伝達経路の比較ゲノム解析とその進化

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

さらに、TGF-betaシグナル伝達経路の構成因子を幅広く調べ、Nodal3遺伝子クラスター、Vg1遺伝子クラスター、ChordinなどのBMPアンタゴニスト遺伝子、TGF-beta受容体遺伝子、Smadシグナル伝達因子に非常に興味深い変化を見出した。比較対象として、FGFシグナル伝達経路の構成因子についても解析を進めた結果、TGF-betaシグナル伝達経路にユニークな変化が起きていることが明確になった。これらの結果を2つの論文に取りまとめて報告した (Suzuki et al. *Developmental Biology*, in press; Suzuki et al. *Developmental Biology*, under revision)。

5. 国際ツメガルリソース拠点ネットワークの構築

実験モデル動物として優れた特徴を持つネットイツメガルおよびアフリカツメガル

のバイオリソースを国際的な枠組みで保存・提供するために、および両生類研究施設が国際的に貢献するために、当研究グループの鈴木が中心となり、両生類研究施設と英国・米国のツメガエルリソース拠点の国際連携を行なっている。特に、ネットイツメガエルについては、文部科学省/日本医療研究開発機構 (AMED) ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) の平成24年度新規採択課題としてサポートを受けており、国際ネットワークを活かした遺伝子リソースの整備・ネットイツメガエル実験技術講習会主催などのサービスを充実させている。

6. アジアの国際拠点としての留学生教育および人材育成

平成24年度から新たに発足した文部科学省/日本医療研究開発機構 (AMED) ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) ・ネットイツメガエル事業と連携して、アジア地域をターゲットにして国内外で人材育成を積極的に行なっている。特に基礎研究および両生類研究の重要性を伝えるべく、当研究グループおよびNBRP事業で整備された実験室を活用して各種の実験実習をおこなっている。研究者向け実習として、NBRP実験技術講習会 (2013年3月, 2014年3月, 2015年3月, 2016年3月), 小中高生および教員向け実習としてSuper Science High Schoolラボセミナー・実験実習 (2010年), 日本生物学オリンピック広島大会最先端研究室訪問・実験実習 (2011年8月, 2013年8月, 2015年8月), 高校教員研修会・実習「カエルの発生と中胚葉誘導・神経誘導」(2013年11月)を行なった。

○発表論文

1. 原著論文

Suzuki, A., Yoshida, H., van Heeringen, S. J., Takebayashi-Suzuki, K., Veenstra, G. J. C. and Taira, M., Genomic organization and modulation of gene expression of the TGF-beta and FGF pathways in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. *Developmental Biology*, in press.

Suzuki, A., Uno, Y., Takahashi, S., Grimwood, J., Schmutz, J., Mawaribuchi, S., Yoshida, H., Takebayashi-Suzuki, K., Ito, M., Matsuda, Y., Rokhsar, D., and Taira, M. (2016) Genome organization of the *vgl* and *nodal3* gene clusters in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. *Developmental Biology*, in press

Yoshida, H., Okada M., Takebayashi-Suzuki, K., Ueno, N., and Suzuki, A. (2016) Involvement of JunB proto-oncogene in tail formation during early *Xenopus* embryogenesis. *Zoological Science*, 33, 282-289.

2. 総説・解説

該当なし

○著書

該当なし

○取得特許

該当なし

○講演

1. 国際会議での招待講演

Atsushi Suzuki, Keiko Kashiwagi, Hideki Hanada, Nobuaki Furuno, Ichiro Tazawa, Atsushi Kurabayashi, Keisuke Nakajima, Kimiko Takebayashi-Suzuki, Takeshi Igawa,

Masayuki Sumida, Hitoshi Yoshida, Satomi Kobayashi, Junko Takenaka, Yuuna Tamaki, Shigeru Murakami, Takako Mido and Akihiko Kashiwagi

“National BioResource Project (NBRP) for *Xenopus*: recent developments at the Asian hub for the international *Xenopus* research community” *Xenopus* PI meeting 2015, 2015年9月29日-10月1日, The Marine Biological Laboratory, Woods Hole, USA

2. 国際会議での一般講演

Atsushi Suzuki, Hitoshi Yoshida, Maya Okada, Kimiko Takebayashi-Suzuki, Naoto Ueno. a role of JunB proto-oncogene in tail formation and morphogen signal integration during early *Xenopus* embryogenesis. International Meeting on Aquatic Model Organisms for Human Disease and Toxicology Research, 2016年03月18日 Okazaki, Aichi, Japan

3. 国内学会での招待講演

該当なし

4. 国内学会での一般講演

吉田和史・岡田麻耶・竹林公子・上野直人・鈴木 厚「モルフォゲンシグナルの統合に働く新しい尾部オーガナイザー因子の同定と解析」第48回日本発生物学会（2015年6月 筑波）

柏木昭彦・柏木啓子・花田秀樹・鈴木賢一・鈴木 厚・竹林公子・倉林 敦・中島圭介・田澤一朗・井川武・古野伸明・山本 卓・住田正幸 「生命科学研究における近交系ネットアイツメガエルの有用性」ポスター 次世代両生類研究会2015（2015年8月25日 岡崎コンファレンスセンター, 岡崎市）

柏木昭彦・柏木啓子・花田秀樹・鈴木賢一・鈴木 厚・竹林公子・倉林 敦・中島圭介・田澤一朗・井川 武・古野伸明・山本 卓・住田正幸「ツメガエル類に関するさまざまな実験例」次世代両生類研究会2015（2015年8月25日 岡崎コンファレンスセンター, 岡崎市）

吉田和史・岡田麻耶・竹林公子・上野直人・鈴木 厚「複数のモルフォゲンシグナルを統合する新奇尾部誘導因子の解析」第9回日本ツメガエル研究集会（2015年09月15日 秋田）

柏木昭彦・柏木啓子・花田秀樹・鈴木 厚・竹林公子・古野伸明・田澤一朗・倉林 敦・中島圭介・鈴木賢一・山本 卓「ネットアイツメガエルを用いた最近の研究」ポスター 第38回日本分子生物学会（2015年12月1-3日, 神戸国際展示場, 神戸市）

○研究助成金の受入状況

1. 科学研究費補助金

基盤研究(C)「神経誘導の保証機構に働くネットワークの解明」1,170千円
(研究代表者 竹林公子, 研究分担者 鈴木 厚)

2. 共同研究

該当なし

3. 補助金

文部科学省/日本医療研究開発機構(AMED) 第3期NBRP「ネットアイツメガエルの近変化・

標準系統の樹立・提供」中核機関（H27年度）14,067千円（課題管理代表者 柏木昭彦；
課題管理協力者 鈴木 厚，竹林公子ほか）

○学界ならびに社会での活動

1. 学協会役員・委員

- ・文部科学省/日本医療研究開発機構 (AMED) ナショナルバイオリソースプロジェクト
ネットイツメガエル 課題管理協力者（非生体リソース，オープンラボ，技術講習会，
国際連携の担当）

2. セミナー・講演会開催実績

- ・ナショナルバイオリソースプロジェクト ネットイツメガエル実験技術講習会 開催
（2016年3月）鈴木 厚・柏木昭彦・古野伸明・柏木啓子・花田秀樹・田澤一朗・倉林 敦・
中島圭介・竹林公子・吉田和史・三堂貴子・村上 茂・折羽邦彦・梶井陽子・宇都武司・
難波ちよ・[外部講師：荻野 肇・越智陽城]
- ・日本生物学オリンピック広島大会 最先端研究室訪問・実験実習 開催（2015年8月）
鈴木 厚・古野伸明・竹林公子

3. 産学官連携実績

該当なし

4. セミナー・講義・講演会講師等

- ・施設訪問者見学者対象 NBRPオープンラボの概要説明 20件
- ・広島県立教育センター主催「第19回生物教材バザール」教材の提供および解説
（2015年5月 東広島）

5. その他

○国際共同研究

- ・米国エネルギー省、カリフォルニア大学、Hudson alpha Institute for Biotechnology
研究テーマ：「アフリカツメガエルvg1遺伝子クラスターのゲノム解析」
- ・オランダ ラドバウド大学
研究テーマ：「アフリカツメガエルTGF-beta 経路とFGF経路のゲノム解析」
- ・インドネシア ブラビジャヤ大学
研究テーマ：「神経誘導に働く新規タンパク質の解析」
- ・英国ポーツマス大学および米国ウッズホール海洋生物学研究所
研究テーマ：「国際ツメガエルリソースの国際拠点形成」

○特記事項

- ・近畿大学工学部 学部生に対するツメガエル受精実験と講義の指導（2015年6～7月）
鈴木 厚・竹林公子

C) 「遺伝情報・環境影響」研究グループ

平成27年度構成員：柏木昭彦（特任教授），古野伸明（准教授），三浦郁夫（准教授），
花田秀樹（助教），柏木啓子（研究員）

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

柏木昭彦（特任教授）

○研究活動の概要

1. NBRP事業 ネツタイツメガエルの近交化・標準系統の樹立・提供

両生類研究施設は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)主催のナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)事業に参画、生命科学や医学の研究発展に貢献するため、良質なネツタイツメガエルを研究者や教育関係者に提供している。ネツタイツメガエルは2倍体であってゲノムサイズが小さく世代時間も短く、全ゲノム解読は完了しているため、遺伝学研究は著しく容易になった。さらに、ネツタイツメガエルはオルソログスとしてヒト疾患に関わる遺伝子の79%をもっており、ゲノム編集の技術も効率よく利用できることから、ヒト疾患研究のための次世代型モデル動物として広く国際的に認められている。だが、この動物種が科学界に登場してから日はまだ浅く、実験動物としては開発途上の段階にある。NBRP事業目的の一つは、汎用性のある良質なモデル動物ネツタイツメガエルを育成することである。両生類研究施設は兄妹交配の継続によって旺盛な繁殖力を備えた世界最高水準の高品質な近交系を作ること成功している。NBRPのネツタイツメガエルは近交化が順調に進んでおり、また殆どクローンといえるレベルのものも生存することがマイクロサテライトマーカー解析によって明らかになっている。こうした特徴は英米のリソースセンターにいるネツタイツメガエルにはない。各遺伝子座がホモ接合のクローン個体は高い再現性を必要とする研究に不可欠であるから、2倍性雌性発生法によっても作出し数を増やしている。平成28年3月末現在のNBRPネツタイツメガエル事業における収集・保存は6基準集団、125系統、9786匹。これら系統にはアウトブリードからインブリード、そしてクローンに至る様々なものが揃っている。提供数は毎年7000匹超。本リソースを用いてCRISPR/Casによるノックアウトガエルを作ったところ、F0世代胚の体細胞変異率は極めて高いことがわかり、短期間での迅速・高効率な遺伝子機能解析が可能となった。メタボリック質量分析イメージング(MALDI-MSI)解析はネツタイツメガエルオタマジヤクシの分子組織マーカーを同定・可視化するための有力なツールになることも判明している。今後はNBRP事業の一環として、遺伝子改変ガエルの寄託を受けて提供を行い、医療や再生に関する研究への貢献を目指す。

2. ネツタイツメガエルにおけるCRISPR/Cas9による迅速・高効率な遺伝子破壊

アフリカツメガエルやネツタイツメガエルは、先天性心臓病や内臓逆位、胃腸・膵臓の

疾患、神経発達障害等のヒト病気に関する理解を深め、また病気の原因となる分子機構を調べるのによく用いられる。特に、ネッタイツメガエルのゲノムにはヒト病気関連遺伝子のうちの79%がオルソログとして含まれる。TALENsやCRISPR/Casといったゲノム編集技術の利用は、ツメガエル類を含むいろいろな動物でもヒト遺伝病の仕組みの解明を可能にした。私達は、ヒト疾患の機能研究を推進するために突然変異ガエルを早急に作出する方法を探った。CRISPR/Casシステムを使って、広島大学両生類研究施設のNBRP「ネッタイツメガエル」系統の一つ、Goldenの遺伝子破壊を行った。その結果、F0胚で80~99%という体細胞変異率が得られることが確認され、高品質のネッタイツメガエルを用いたゲノム編集ツールは迅速・容易に、しかも高効率に遺伝子の機能解析を可能にすることが明らかとなった。

3. マトリックス支援型レーザー脱離イオン化を基盤とする質量分析イメージング (MALDI-MSI) 法によるネッタイツメガエルオタマジャクシ組織におけるメタボロームの局在解析

代謝物の動的プロフィールを調べることは極めて重要である。代謝物は多様性に富むため、その雑多な混合物の分析を行うのに質量分析 (MS)、およびMSと液体クロマトグラフィー (LC) やキャピラリー電気泳動 (CE) を組み合わせた方法が考案された。Onjikoら (2015) は CE-MS計を用いて、アフリカツメガエルの胚発生が進むにつれていくつかの代謝物は劇的に変化することを明らかにし、細胞の運命を変える原動力になっていると述べている。

MALDI-MSI法は、抗体や染色、複雑な前処理を必要とせず、切片標本上の小型代謝物の分布状態を可視化できるから、分子構造に関する情報を得ることが可能になる。この方法を適用して、私達はネッタイツメガエルオタマジャクシの19組織について組織特異的なピークを識別し、例えば、菱脳にL-ドーパ、内臓にコルチコステロン、下垂体にドーパミンの局在等を明らかにし、諸器官に特異的な分子マーカーを見出した。オタマジャクシの発生中または変態中の代謝物の同定は、両生類が哺乳類に類似の内部器官・骨格をもっているため、医科学研究においても重要である。

4. 生活関連物質の影響 実験にはツメガエル類が不可欠

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

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

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

ミトコンドリア膜透過遷移 (MPT) は無尾両生類の変態時におけるオタマジャクシの尾部

消失に重要である。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。私達の研究から、L-カルニチン処理はFFAsレベルを減少させ、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ている。その後の研究で、L-カルニチンと同じく脂肪酸酸化に関与するアセチル-L-カルニチン (ALC) に焦点を当て、ツチガエルオタマジャクシの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ところ、①T₃処理オタマジャクシの尾部アポトーシスの指標であるDNAラダー像形成およびカスパーゼ-3、カスパーゼ-9活性増加がALC添加によって抑制する。②ALC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り制御される自然変態を抑制、③それと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、ことがわかった。以上の結果は、FFAs活性増加がMPT開始を促進、変態時における無尾両生類オタマジャクシの尾部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た結論をさらに確実なものにする。

6. 両生類の生活環に対する過重力と強磁場影響

宇宙空間の無重力もしくは微小重力に曝されると、成人は起立性低血圧・筋委縮・悪心等の宇宙デコンディショニングに悩まされる。しかし、胎児・新生児への影響についてはその多くがまだ不明。これまで両生類は宇宙環境における短期影響実験によく用いられてきた。地上では無重力・微小重力環境下で長期にわたるin vivo実験のためのツールがないため、私達はネッタイツメガエルやアフリカツメガエルの受精卵～仔ガエルに至る各種発生段階の個体を2Gまたは5Gの過重力に曝露。また磁場に対する影響も調べるため、発生段階の異なる個体を強磁場の11T(-1400T²m⁻¹), 15T(0 T²m⁻¹), 12T(+1200 T²m⁻¹)に印加した。その結果、いずれの場合も受精卵に対する影響は最も著しく、曝露された受精卵からは双頭や小頭、小眼等の頭部に障害をもつものを含め、全身に異常をもつ個体が多数出現した。さらには前脳やセメント腺、および頭部形成に関わる遺伝子の発現抑制も明らかになった。

7. 精子凍結保存法の開発

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

○発表論文

1. 原著論文

- Shigeta, M., Sakane, Y., Iida, M., Suzuki, M., Kashiwagi, K., Kashiwagi, A., Fujii, S., Yamamoto, T. and Suzuki, K.T. (2016) A streamlined workflow for rapid and efficient gene disruption by CRISPR-Cas9 in *Xenopus tropicalis* founders. *Genes to Cells*. doi: 10.1111/gtc.12379.
- Nakade, S., Sakuma, T., Sakane, Y., Hara, Y., Kurabayashi, A., Kashiwagi, K., Kashiwagi, A., Yamamoto, T. and Obara, M. (2015) Homeolog-specific targeted mutagenesis in *Xenopus laevis* using TALENs. *In Vitro Cellular & Developmental Biology—Animal*, 51:879-884.

Igawa,T., Watanabe, A., Suzuki, A., Kashiwagi, A., Kashiwagi, K., Noble,A., Guille, M., Simpson, D.E., Horb, M.E., Fujii,T. and Sumida, M. (2015) Inbreeding ratio and genetic relationships among strains of the Western clawed frog, *Xenopus tropicalis*. PLoS ONE, 10(7): e0133963

Goto-Inoue,N., Kashiwagi,A., Kashiwagi,K. and Tsukasa Mori.(2016) Metabolomic approach for identifying and visualizing molecular tissue markers in tadpoles of *Xenopus tropicalis* by mass spectrometry imaging AUTHORS. Biology Open ID#: 019646

2. 総説・解説

該当なし

○著書

該当なし

○取得特許

該当なし

○講演

1. 国際会議での招待講演

Kashiwagi, A., Sanoh, S., Kashiwagi, K., Hanada, H., Suzuki, K.T. Shinkai, T., Yamamoto, T. and Ohta,S. 「Suppression in amiodarone on *Xenopus* metamorphosis」 口頭、国際シンポジウム (2016年3月19日、岡崎コンファレンスセンター、岡崎市)

Sanoh, S., Mori, Z., Suzuki, K.T., Kashiwagi, K., Hanada, H., Shigeta, M., Yamamoto,T., Sugihara, K., Kitamura, S., Kashiwagi, A. and Ohta, S. 「Developmental changes of drug-metabolizing enzymes related to accumulation of chemicals in tadpoles and adult frogs」口頭、国際シンポジウム (2016年3月19日、岡崎コンファレンスセンター、岡崎市)

Suzuki, A., Kashiwagi, K., Hanada, H., Furuno, N., Tazawa, I., Kurabayashi, K., Nakajima, K., Takebayashi-Suzuki, K., Igawa, T., Sumida, M., Yoshida, H., Kobayashi, S., Takenaka, J., Tamaki, J., Murakami, S., Mido, T. and Kashiwagi, A. 「National BioResource Project (NBRP) for *Xenopus*: recent developments at the Asian hub for the international *Xenopus* research community」口頭、*Xenopus* Meeting 2015 (2015年9月29日 米国ウッズホール)

2. 国際会議での一般講演

Sasado, T., Kashiwagi, K., Hanada, H., Seki, S., Suzuki, K.T., Yamamoto,T., Kashiwagi, A. and Naruse, K. 「A simple sperm-cryopreservation method established for medaka (*Oryzias latipes*) works in *Xenopus laevis*, *X. tropicalis*, and several other frogs.」ポスター 国際シンポジウム (2016年3月19日、岡崎コンファレンスセンター、岡崎市)

3. 国内学会での招待講演

柏木昭彦 「両生類における遺伝資源を凍結保存するための統合的な技術開発」

Cryopreservation Conference 2015 (2015年11月、岡崎コンファレンスセンター、岡崎市)

柏木昭彦 「NBRP・ネットアイツメガエルの紹介」次世代両生類研究会2015 (2015年8月25日 岡崎コンファレンスセンター 岡崎市)

4. 国内学会での一般講演

柏木昭彦 「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事業の紹介」口頭、日本動物学会第86回新潟大会2015シンポジウム（2015年9月18日新潟コンベンションセンター 新潟市）

柏木昭彦、柏木啓子、花田秀樹、鈴木賢一、鈴木 厚、竹林公子、倉林 敦、中島圭介、田澤一朗、井川 武、古野伸明、山本 卓、住田正幸「生命科学研究における近交系ネッタイツメガエルの有用性」ポスター 次世代両生類研究会2015（2015年8月25日 岡崎コンファレンスセンター，岡崎市）

井川 武、渡辺 愛、鈴木 厚、柏木昭彦、柏木啓子、Anna Noble、Matt Guille、David E. Simpson、Marko E. Horb、藤井保、住田正幸「ネッタイツメガエルの系統における遺伝的関係と近交度について」ポスター 次世代両生類研究会2015（2015年8月25日 岡崎コンファレンスセンター，岡崎市）

柏木昭彦、柏木啓子、花田秀樹、鈴木賢一、鈴木 厚、竹林公子、倉林 敦、中島圭介、田澤一朗、井川 武、古野伸明、山本 卓、住田正幸「ツメガエル類に関するさまざまな実験例」ポスター 次世代両生類研究会2015（2015年8月25日 岡崎コンファレンスセンター，岡崎市）

重田美津紀、坂根 祐人、鈴木 美有紀、柏木 啓子、柏木 昭彦、山本 卓、鈴木 賢一「Gene knockout using CRISPR/Cas9 in *Xenopus tropicalis*」ポスター 次世代両生類研2015（2015年8月25日 岡崎コンファレンスセンター，岡崎市）

笹土隆雄、花田秀樹、柏木啓子、関 信輔、鈴木賢一、山本 卓、柏木昭彦、成瀬 清「メダカ精子凍結法はネッタイツメガエルを初めとする様々なカエルに応用出来る」ポスター 次世代両生類研究会2015（2015年8月25日 岡崎コンファレンスセンター，岡崎市）

柏木昭彦、笹土隆雄、関 信輔、柏木啓子、花田秀樹、鈴木賢一、山本 卓、成瀬清「両生類における遺伝資源を凍結保存するための統合的な技術開発」口頭 Cryopreservation Conference 2015（2015年10月28日 岡崎コンファレンスセンター，岡崎市）

関 信輔、柏木啓子、花田秀樹、笹土隆雄、鈴木賢一、山本 卓、成瀬 清、柏木昭彦「両生類における生殖幹細胞凍結保存法の開発と代理親への移植法の開発」ポスター Cryopreservation Conference 2015（2015年10月28日 岡崎コンファレンスセンター，岡崎市）

笹土隆雄、柏木啓子、花田秀樹、関 信輔、鈴木賢一、山本 卓、成瀬 清、柏木昭彦「メダカ精子凍結法のネッタイツメガエルを始めとする様々なカエルへの応用」ポスターCryopreservation Conference 2015（2015年10月28日 岡崎コンファレンスセンター，岡崎市）

柏木昭彦、柏木啓子、花田秀樹、鈴木 厚、竹林公子、古野伸明、田澤一朗、倉林 敦、中島圭介、鈴木賢一、山本 卓「ネッタイツメガエルを用いた最近の研究」ポスター 第38回日本分子生物学会（2015年12月1-3日，神戸国際展示場，神戸市）

佐能正剛、森 淳平、鈴木賢一、柏木啓子、花田秀樹、重田美津紀、山本 卓、杉原数美、北村繁幸、柏木昭彦、太田 茂「ネッタイツメガエルの発達過程における肝臓中薬物代謝酵素の変動」口頭 衛生薬学フォーラム2015（2015年6月22日）

1. 外国人留学生

該当なし

2. 外国人客員研究員

該当なし

3. 研究員

該当なし

○研究助成金の受入状況

1. 科学研究費補助金

柏木昭彦

平成27年度IBBP共同科学研究

「両生類における遺伝資源を凍結保存するための統合的な技術開発」3,500千円（代表）

柏木昭彦・

平成27年度科学研究費基盤C（一般）

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

2. 共同研究

平成27年度基礎生物学研究所 共同利用研究 個別共同利用研究「両生類における遺伝資源を凍結保存するための統合的な技術開発」

3. 補助金

日本医療研究開発機構（AMED）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（H27年度）14,067千円（課題管理者 柏木昭彦）

○学界ならびに社会での活動

1. 学協会役員・委員

柏木昭彦

- ・生物遺伝資源委員会委員（国立遺伝学研究所）
- ・文部科学省第3期NBRP「ネッタイツメガエルの近交化・標準系統の樹立・提供」課題管理者
- ・山陽女子短期大学臨床検査学科客員教授
- ・安田女子短期大学非常勤講師
- ・広島大学総合博物館客員研究員

2. セミナー・講演会開催実績

柏木昭彦

国際セミナーの開催：Scott Gilbert 「The organisms as ecosystem: The developmental biology of holobionts」を開催。NBRP「メダカ・ネッタイツメガエル」共済（2016年 月 22 日、広島大学両生類研究施設、東広島市）オーガナイザー

柏木昭彦

日本動物学会第86回新潟大会2015シンポジウム ナショナルバイオリソースプロジェクト

クト(NBRP)シンポジウム「ネッタイツメガエル」—新たな兆し～ネッタイツメガエル・アフリカツメガエルの研究舞台より— (2015年9月18日, 新潟大学, 新潟市) オーガナイザー

講演者: 柏木昭彦, 平良眞規, 上野直人, 岡野俊行, 越智陽城, 加藤尚志

柏木昭彦

NBRP「ネッタイツメガエル」運営委員会開催 (2015年12月2日 第38回日本分子生物学会開催期間中に国際会議場で、神戸市) オーガナイザー

3. 産学官連携実績

柏木昭彦、柏木啓子、花田秀樹、鈴木 厚、竹林公子、古野伸明、田澤一朗、倉林 敦、中島圭介、鈴木賢一、山本 卓「ネッタイツメガエルを用いた最近の研究」ポスター 第38回日本分子生物学会 (2015年12月1-3日, 神戸国際展示場、神戸市)

柏木昭彦、花田秀樹、柏木啓子

広島県立教育センター主催の「第19回生物教材バザール」に参加、教材の提供を行う (2015年5月)

4. セミナー・講義・講演会講師等

柏木昭彦

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

柏木昭彦

安田女子短期大学非常勤講師 前期「人間と環境」を担当

柏木昭彦・古野伸明・三浦郁夫

広島大学教養授業「カエルから見た生命システム」を担当

5. その他

柏木昭彦

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

○国際共同研究

該当なし

○特記事項

- ・2013年にBiology Openに投稿したXenopusの論文が、発刊以降(5年目)の被引用回数がTop2としてEditorialで報告されている。
- ・ノーベル生理・医学賞受賞者J.B. Gurdon卿が3月7日ご来訪の際、NBRP事業について高い評価を受けた。
- ・著名な発生生物学者Scott Gilbert博士が3月22日ご来訪され、同様の評価を受けた。

○大学院教育

1. 大学院生の国内学会発表実績
該当なし
2. 大学院生の国際学会発表実績
該当なし
3. 修士論文発表実績
該当なし
4. 博士学位 ← 学位授与実績
該当なし
5. TAの実績
該当なし
6. 大学院教育の国際化 ← 国際化への対応等
該当なし

三浦郁夫（准教授）

○研究活動の概要

1. 日本のカエルで性の機能を解明：組換えが突然変異の蓄積を抑える

性の役割は、オスとメスの遺伝子を混合し、多様性を生み出すことにある。一方、オスではメスよりも突然変異が多く蓄積し、進化に大きく貢献する（オス駆動進化）ことが知られている。ただし、この理論は哺乳類と鳥類で検証されていたこと、性決定様式が異なる生物間で同時に検証されていなかったという背景があった。そこで、本研究者は、初めて両生類である日本のカエルを用いて、しかも性決定様式が異なる地域集団を同時に解析することで、オス駆動仮説の検証に取り組んだ。とくに、有性生殖の特徴である減数分裂時の“相同組換え”と、DNA複製回数に立脚した“オス駆動進化”理論との関連性に注目した。その結果、日本棲息のツチガエル（地域集団によってXX/XY型とZZ/ZW型が存在する世界で稀有な動物）を用いて、“オス駆動進化”理論を両生類で初めて証明した。さらに、XX/XY型とZZ/ZW型の集団において、メスに対するオスの突然変異率がZZ/ZW型に比べXX/XY型で有意に高いこと、ツチガエルの精子形成過程では染色体末端以外はペアリングが起きない（すなわち相同組換えも起きない）ことが明らかになった。この結果から、従来のオス駆動進化と突然変異との関係式に、相同組換えのファクターを付加した新たな関係式を構築した。その解析から、オス生殖細胞における染色体DNAの複製エラーによってもたらされる突然変異（オス駆動進化）は、相同組換えによって抑制されると考えられた。有性生殖における組換えという仕組みが、生物の進化における複製エラーの負の側面を解消する機能を明らかにした。

2. 性ホルモンによって誘導される生殖腺性転換の進化機構を解明

脊椎動物における生殖腺の性分化は、性ホルモンによって強く影響を受け、遺伝的な性が転換する。この現象は古くから知られており、種によって性ホルモンに体する感受性が著しく異なる。しかし、その感受性の違いと性染色体の分化、あるいは、性決定機構の違い（XX-XY型とZZ-ZW型）との関係はよく理解されていなかった。日本に生息するツチガエルは、地域によって性決定機構や性染色体の分化の程度が異なる。そこで、本種の地域集団を用いて、性ホルモン、性ホルモン阻害剤および性ホルモン受容体アンタゴニストを投与し、生殖腺への影響と性分化関連遺伝子の発現変化を網羅的に調べた。その結果、生殖

腺の性分化機構の元祖型は性ホルモンに対する感受性が高く、高頻度で性転換を生じること、そして、性染色体の分化や性決定機構の転換によって、性ホルモンへの感受性が低くなり、性ホルモンとは独立した生殖腺の性分化機構が進化していることが明らかとなった。

3. ヌマガエルにおける異常な性比の歪みと発生致死について

ヌマガエルは交配のシリーズによって著しい性比のゆがみと発生途上での致死を示す。その仕組みを解明するため、近親間、集団内、および集団間の交配を行って性比と発生を調べた。その結果、近親間では雄の比率と発生途上の致死率が高いこと、集団内交配では雄の比率は高いが致死率が低下すること、そして、集団間交配では雄の比率と致死率の両方が低下することがわかった。ヌマガエルの性決定は、これまでに知られている仕組みでは説明がむずかしく、新奇の仕組みによって制御されていることが示唆された。

○発表論文

1. 原著論文

1. Miura I, Ohtani H, Ogata M, Ezaz T. (2016) Evolutionary changes in sensitivity to hormonally induced gonadal sex reversal in a frog species. *Sexual Development* 10(2) DOI:10.1159/000445848.
2. Mawaribuchi S, Ito M, Ogata M, Oota H, Katsumura T, Takamatsu N, Miura I. (2016) Meiotic recombination counteracts male-biased mutation (male-driven evolution). *Proc Biol Sci.* doi: 10.1098/rspb.2015.2691.
3. Miura I, Ohtani H, Fujitani T. (2015) Unusual sex ratios and developmental mortality in the rice frog *Fejervarya kawamurai*. *Chromosome Science* 18: 53-57.
4. Kubiura M, Miura I, Tada M (2015) Chromosomal distribution patterns of global 5mC and 5hmC on the ZZ/ZW and XX/XY chromosomes in the Japanese wrinkled frog, *Rana rugosa*, induced by Tet methylcytosine dioxygenase enzymes. *Chromosome Science* 18: 3-8.

2. 総説・解説

○著書

○取得特許

○講演

1. 国際会議での招待講演

Miura I. A double sex-determining gene in the frog *Glandirana rugosa*. The 5th Asian Chromosome Colloquium. 29 April – 2 May, 2015. Bangkok (Kasetsart University), Thailand

2. 国際会議での一般講演

Kubiura M, Miura I, Tada M 2015 Intra-chromosomal distribution pattern of DNA

methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosin in mitogen-induced amphibian peripheral blood cells. The 5th Asian Chromosome Colloquium 29 April-2 May, 2015. Bangkok, Thailand.

Matsubara, K, Gamble T, O'Meally D, Edwards M, Holleley C, Georges A, Sare S, Matsuda Y, Miura I, Deakin J, Zhang X, Livernois A, Zarkower D, Graves J, Azad B, Ezaz T 2015 Comparative genomics of sex chromosomes in amniotes: Lessons from reptiles. The 5th Asian Chromosome Colloquium 29 April-2 May, 2015. Bangkok, Thailand.

3. 国内学会での招待講演
なし

4. 国内学会での一般講演

三浦郁夫、尾形光昭、長谷川嘉則、大谷浩己 ツチガエルのXX-XY型およびZZ-ZW型性決定 日本動物学会第86回年会 9月19日 新潟

三浦郁夫、尾形光昭 カエルのW染色体の若返り 日本進化学会第17回年大会 8月20日 東京

尾形光昭、太田宏、丸野内淳介、Ezaz Tariq、三浦郁夫 ツチガエルの性決定様式が異なる集団間境界における個体群動態 日本爬虫両棲類学会第54回大会 12月5日 習志野

○各種研究員と外国人留学生の受入状況

1. 外国人留学生

なし

2. 外国人客員研究員

なし

1. 研究員

なし

○研究助成金の受入状況

1. 科学研究費補助金

科学研究費基盤C (代表) 208万円 「性決定遺伝子の使い回しの分子機構」

3. その他

○学界ならびに社会での活動

1. 学協会役員・委員

(財) 染色体学会・理事

(財) 染色体学会・学会賞選考常任委員

Editorial Board of Asian Herpetological Research (編集委員)

Editorial Board of Sexual Development (編集委員)

Editorial Board of Chromosome Science (編集委員)

Editorial Board of Dataset Papers in Biology (編集委員)

キャンベラ大学(豪州) 非常勤准教授

2. セミナー・講演会開催実績

特別セミナー 性の生物学：進化とエピジェネティクス 3月15日(火) 30名 広島大学, 東広島 オーガナイザー

3. 産学官連携実績

なし

4. セミナー・講義・講演会講師等

三浦郁夫 カエルの遺伝と進化 第15回クリスマスレクチャー 広島国泰寺高校 12月20日(日) 広島

三浦郁夫 カエルの遺伝と進化学 祇園北高校サイエンスセミナーII 12月21日(月) 広島

三浦郁夫 遺伝と進化学のエッセンス 放送大学面接授業 放送大学広島学習センター 8月5-6日 広島市

7. その他

○国際共同研究

キャンベラ大学(豪州) Dr. Tariq Ezaz 性決定と性染色体の進化に関する研究
ローザンヌ大学(スイス) Dr. Nicolas Perrin 両生類の性染色体のターンオーバー
Leibniz-Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries - IGB Germany Dr. Matthias Stöck アマガエルの系統進化に関する研究

○特記事項

○大学院教育

1. 大学院生の国内学会発表実績

なし

2. 大学院生の国際学会発表実績

なし

3. 修士論文発表実績

なし

4. 博士学位 ← 学位授与実績

なし

5. TAの実績

なし

6. 大学院教育の国際化 ← 国際化への対応等

2015年10月、豪州キャンベラ大学応用生態学研究科と本学大学院理学研究科の間に部局間協定を締結した。

古野伸明（准教授）

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

遺伝学的手法が使える事が、モデル生物にとって非常に有用である。それ故に、系統が確立していず、種々の突然変異が収拾されていない生物にとっては遺伝学的手法が使えずそれが大きなデメリットであった。しかし、人工ヌクレアーゼ技術の開発によって遺伝子を破壊・改変、場合によっては挿入することができるようになったが、その改変技術法であるZNF, TALEN法はそれなりに難しく、汎用的でなかった。しかし、2012年に、より手軽で効率的な人工ヌクレアーゼ（CRIPR/CAS）システムが報告された。そこでアフルカツメガエルに来仕手CRISPR/CAS法によるゲノム編集を、メラニン合成酵素である*Tyrosinase*遺伝子に対して行った。その結果、モザイク状のアルビノが生じた。そのような個体で*Tyrosinase*遺伝子に変異が入っていることを確かめた。以上の結果から、CRIPR/CAS法はアフルカツメガエルに対して有効なゲノム編集のツールとなる事が示された。

2. ネットイツメガエル*Myt1*遺伝子の初期発生における機能解析

細胞周期（G1→S→G2→M→G1…）は、CDK/サイクリン複合体により主に正に調節されている。G1期、G2期にそれぞれ特異的なCDK/サイクリン複合体が活性化されることにより細胞周期がS期、M期にそれぞれ進行する。ツメガエル卵母細胞はG2期で停止しており、ホルモン刺激によりCDK/サイクリン複合体が活性化され、M期に進行し卵成熟を起こす。タンパク質リン酸化酵素である*Myt1*は、ホルモン刺激を受けるまでCDKをリン酸化することで活性を抑制し、細胞周期（卵成熟）を抑制すると考えられている。*Myt1*遺伝子は卵母細胞だけでなく初期胚でも発現しているが、初期発生での機能は知られていない。そこで、新しいモデル生物として脚光をあびているネットイツメガエル*Myt1*遺伝子のクローニングと初期発生における機能解析を行っている。今まで、クローニングしたネットイツメガエルの*Myt1*遺伝子にさまざまなアミノ酸変異を導入し、初期発生における機能解析行ってきた。具体的には、*Myt1*活性化型、ドミナントネガティブ(DN)型および機能欠失型の変異体を作製した後、それぞれのmRNAを合成しツメガエル初期胚へ顕微注射し初期卵割のパターンや初期発生に対する影響を調べた。その結果、野生型や機能欠失型の場合はほとんど影響が見られなかったが、活性化型、DN型の場合は初期卵割の遅れ(=細胞周期の抑制)が観察された。この結果は、卵成熟における*Myt1*遺伝子の機能と一致する。ただ、DN型は卵割が速くなる事が期待されたが、他のグループの結果から、結果的に問題ない事も分かった。したがって*Myt1*遺伝子は、ツメガエルの卵成熟だけでなく初期発生の過程でも、細胞周期の抑制因子として機能していることが示唆された。また、中期胚以後、初期胚は、特殊な細胞周期から体細胞型の細胞周期へ移行する。*Myt1*遺伝子が初期胚特異的に働いているか調べるため、体細胞で発現するプロモーターの下流に*Myt1*遺伝子をクローニングし、そのプラスミドDNAを顕微注射で2細胞期に導入して、その発生がどうなるか調べた。その結果、卵割に影響が見られた*Myt1*変異DNAを発現させても発生に影響が見られなかった。これらの事から、*Myt1*は卵母細胞、初期胚で特異的に働く事が示唆された。

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。ツメガエルの卵母細胞や胚ではサイクリンB1とサイクリンB2が主に発現しており、機能差を解析する良い系である。今までに、この系を用いて、サイクリンB1でなくサイクリンB2が正常な紡錘体の形成に関与することを明らかにした。また、サイクリンB2のN末端から約90アミノ酸から120アミノ酸までに2極の紡錘体を形成するのに働く領域があることがわかり、この領域がNES (Nuclear export signal)として働くことや、そのNESの機能と2極の紡錘体の形成能が関係していないことが明らかになった。さらに、そのCRS領域のC末側の7アミノ酸が最近、2極の正常な紡錘体の形成能に関与する事が明らかになった。また、正常なサイクリンB2は認識するが、B2のN末端には反応しない特別な抗体を作製する事で、正常はサイクリン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（実際、サイクリンB2のCRSをもったN末は正常なサイクリンB2の局在場所と同じ場所に局在している）、これがCRS過剰発現による2極紡錘体の形成異常を引き起こす原因であると推定された。

4. 卵形成における卵特異的細胞周期調節遺伝子の発現調節機構と機能解析

卵の分化機構を研究する為には、卵特異的に発現する遺伝子に着目し、その卵特異的な発現調節機構を解明することがきわめて重要であると考えられる。卵は、減数分裂や受精後に特殊な細胞分裂を行う。例えば、減数分裂では、DNA複製をスキップした2回の連続した分裂をするが、そのために、Mosという卵特異的な細胞周期調節因子を発現しており、この発現がDNA複製のスキップのため必須であることを報告した。また、受精後、卵は最初の一回を除き、G1, G2期のない細胞分裂（卵割）を中期胚まで行うが、そのためには、卵特異的な細胞周期調節因子であるWee1Aの発現が必須である。もし、体細胞特異的なWee1Bが発現すれば受精後の卵割は失敗する。よって、これらの卵特異的な細胞周期調節因子の発現調節機構の解明は、卵への決定・分化の機構解明につながる。現在、ネットイツメガエルのMosとWee1Aのプロモーター領域と思われる部分（翻訳開始点より10 kbp上流まで）をクローニングし、GFPの上流に挿入したtransgenic ガエル作製用のベクターを構築した。このコンストラクトや、プロモーターにいろんな欠失を導入したコンストラクトでtransgenic ガエルを作製し、卵特異的な発現に必要な領域を特定する。また、これらの遺伝子のノックアウトも行いたい。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。

5. アフリカツメガエルの形態形成に関する遺伝子の研究

胚発生における形態形成は分泌性のシグナル因子を介した細胞間コミュニケーションによって起こる。Wnt/b-caeninによって前後軸が、BMP/smadによって背腹軸が形成される。このWntの下流で発現される遺伝子の1つが*siamois*である。*Siamois*に関してはいくつかのファミリー遺伝子が知られているが、いくつあるか、それぞれの形態形成における活性の違い等ははっきり示されてなかった。最近、アフリカツメガエルのゲノムプロジェクトが完了したので、*siamois*遺伝子のゲノム構造を解析しそれぞれの遺伝子の活性を調べた。

その結果、ニシツメガエルにも従来の知られていた2つ以外に2つ、合計4つある事、アフリカツメガエルでは、異質4媒体であるため8つある事が分かった。遺伝子の構造から、8つのうち1つが偽遺伝子であることがわかった。さらに、残りの7つのcDNAからmRNAを作製して、受精卵に注射して活性を調べた所、1つはほとんど活性がなかった。この結果から、アフリカツメガエルで働いている *siamois* は6個であることが予想された。

6. mTOR情報伝達系の解析

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

7. 両生類の生活環に対する過重力と強磁場影響

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

○発表論文

1. 原著論文

2. 総説・解説

該当なし

○著書

該当なし

○取得特許

該当なし

○講演

1. 国際会議での招待講演

該当なし

2. 国際会議での一般講演

Suzuki, A., Kashiwagi, K., Hanada, H., Furuno, N., Tazawa, I., Kurabayashi, K., Nakajima, K., Takebayashi-Suzuki, K., Igawa, T., Sumida, M., Yoshida, H., Kobayashi, S., Takenaka, J., Tamaki, J., Murakami, S., Mido T. and Kashiwagi,

A. 「National BioResource Project (NBRP) for *Xenopus*: recent developments at the Asian hub for the international *Xenopus* research community」 *Xenopus* Meeting 2015 (2015年9月29日 米国ウッズホール)

3. 国内学会での招待講演

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」—新たな兆し〜ネッタイツメガエル・アフリカツメガエルの研究舞台より—「ネッタイツメガエル事業の紹介」 柏木昭彦日本動物学会第86回新潟大会2015シンポジウム (2015年9月18日新潟コンベンションセンター 新潟市)

4. 国内学会での一般講演

ネッタイツメガエル*Myt-1*遺伝子の初期発生における機能解析 北村友也、渡部稔、吉留賢、古野伸明 (広大院理、徳大総合科学部、いわき明星大学、薬学部) 日本動物学会第86回新潟大会 朱鷺メッセ (2015, 9月17日~19日)

「生命科学研究における近交系ネッタイツメガエルの有用性」 柏木昭彦, 柏木啓子, 花田秀樹, 鈴木賢一, 鈴木厚, 竹林公子, 倉林敦, 中島圭介, 田澤一郎, 井川武, 古野伸明, 山本卓, 住田正幸 次世代両生類研究会2015 (2015年8月25日 岡崎コンファレンスセンター, 岡崎市)

ツメガエル類に関するさまざまな実験例 柏木昭彦, 柏木啓子, 花田秀樹, 鈴木賢一, 鈴木厚, 竹林公子, 倉林敦, 中島圭介, 田澤一郎, 井川武, 古野伸明, 山本卓, 住田正幸次世代両生類研究会2015 (2015年8月25日 岡崎コンファレンスセンター, 岡崎市)

*Xenopus laevis*全ゲノム解析: アフリカツメガエルの*siamois*ファミリー遺伝子クラスターについての解析 原本悦和、田中利明、古野伸明、鈴木厚、近藤真理子、平良眞規、高橋秀治 (広大・院理・両生類研、産総研・創薬基盤・幹細胞工学、東工大・院・生命理工、東大・院理・生物科学、東大・院理・臨海)

ネッタイツメガエルを用いた最近の研究

柏木昭彦, 柏木啓子, 花田秀樹, 鈴木厚, 竹林公子, 古野伸明, 田澤一郎, 倉林敦, 中島圭介, 鈴木賢一, 山本卓 第38回日本分子生物学会 (2015年12月1-3日, 神戸国際展示場、神戸市)

○各種研究員と外国人留学生の受入状況

1. 外国人留学生

該当なし

2. 外国人客員研究員

該当なし

3. 研究員

該当なし

○研究助成金の受入状況

なし

○学界ならびに社会での活動

1. 学協会役員・委員

なし

2. セミナー・講演会開催実績

なし

3. 産学官連携実績

該当なし

4. セミナー・講義・講演会講師等

柏木昭彦, 古野伸明, 三浦郁夫

広島大学教養教育科目「カエルから見た生命システム」

7. その他

○国際共同研究

○特記事項

○大学院教育

1. 大学院生の国内学会発表実績

ネットイツメガエル*Myt-1*遺伝子の初期発生における機能解析

北村友也、渡部稔、吉留賢、古野伸明（広大院理、徳大総合科学部、いわき明星大学、薬学部）日本動物学会第86回新潟大会 朱鷺メッセ（2015, 9月17日～19日）

2. 大学院生の国際学会発表実績

該当なし

3. 修士論文発表実績

「ネットイツメガエル*Myt1*遺伝子の初期発生における機能解析」 北村友也

4. 博士学位

該当なし

5. TAの実績

北村友也（生物科学概説A）

6. 大学院教育の国際化 ← 国際化への対応等

古野伸明

分化制御学演習を英語化

花田秀樹（助教）

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

無尾両生類の変態時に見られるオタマジャクシの尾部消失にミトコンドリア膜透過遷移(MPT)が重要な役割を果たしている。L-カルニチンがβ酸化およびエネルギー生成のために遊離脂肪酸(FFAs)をサイトゾルからミトコンドリアマトリックスに移動させることはよく知られている。以前に私達が行った研究から、L-カルニチン処理はFFAsレベルを減少させ、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。

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

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

国際会議での招待講演

Kashiwagi, A., Sanoh, S., Kashiwagi, K., Hanada, H., Suzuki, K.T. Shinkai, T., Yamamoto, T. and Ohta, S. 「Suppression in amiodarone on *Xenopus* metamorphosis」 口頭、国際シンポジウム (2016年3月19日、岡崎コンファレンスセンター、岡崎市)

Sanoh, S., Mori, Z., Suzuki, K.T., Kashiwagi, K., Hanada, H., Shigeta, M., Yamamoto, T., Sugihara, K., Kitamura, S., Kashiwagi, A. and Ohta, S. 「Developmental changes of drug-metabolizing enzymes related to accumulation of chemicals in tadpoles and adult frogs」 口頭、国際シンポジウム (2016年3月19日、岡崎コンファレンスセンター、岡崎市)

Suzuki, A., Kashiwagi, K., Hanada, H., Furuno, N., Tazawa, I., Kurabayashi, K., Nakajima, K., Takebayashi-Suzuki, K., Igawa, T., Sumida, M., Yoshida, H., Kobayashi, S., Takenaka, J., Tamaki, J., Murakami, S., Mido, T. and Kashiwagi, A. 「National BioResource Project (NBRP) for *Xenopus*: recent developments at the Asian hub for the international *Xenopus* research community」 口頭、Xenopus Meeting 2015 (2015年9月29日 米国ウッズホール)

2. 国際会議での一般講演

Sasado, T., Kashiwagi, K., Hanada, H., Seki, S., Suzuki, K.T., Yamamoto, T., Kashiwagi, A. and Naruse, K. 「A simple sperm-cryopreservation method established for medaka

(*Oryzias latipes*) works in *Xenopus laevis*, *X. tropicalis*, and several other frogs.]
ポスター 国際シンポジウム (2016年3月19日、岡崎コンファレンスセンター、岡崎市)

4. 国内学会での一般講演

柏木昭彦、柏木啓子、花田秀樹、鈴木賢一、鈴木厚、竹林公子、倉林敦、中島圭介、田澤一郎、井川武、古野伸明、山本卓、住田正幸「生命科学研究における近交系ネットイツメガエルの有用性」ポスター 次世代両生類研究会2015 (2015年8月25日 岡崎コンファレンスセンター、岡崎市)

柏木昭彦、柏木啓子、花田秀樹、鈴木賢一、鈴木厚、竹林公子、倉林敦、中島圭介、田澤一郎、井川武、古野伸明、山本卓、住田正幸「ツメガエル類に関するさまざまな実験例」ポスター 次世代両生類研究会2015 (2015年8月25日 岡崎コンファレンスセンター、岡崎市)

笹土隆雄、花田秀樹、柏木啓子、関信輔、鈴木賢一、山本卓、柏木昭彦、成瀬清「メダカ精子凍結法はネットイツメガエルを初めとする様々なカエルに応用出来る」ポスター 次世代両生類研究会2015 (2015年8月25日 岡崎コンファレンスセンター、岡崎市)

柏木昭彦、笹土隆雄、関信輔、柏木啓子、花田秀樹、鈴木賢一、山本卓、成瀬清「両生類における遺伝資源を凍結保存するための統合的な技術開発」口頭 Cryopreservation Conference 2015 (2015年10月28日 岡崎コンファレンスセンター、岡崎市)

関信輔、柏木啓子、花田秀樹、笹土隆雄、鈴木賢一、山本卓、成瀬清、柏木昭彦「両生類における生殖幹細胞凍結保存法の開発と代理親への移植法の開発」ポスター Cryopreservation Conference 2015 (2015年10月28日 岡崎コンファレンスセンター、岡崎市)

笹土隆雄、柏木啓子、花田秀樹、関信輔、鈴木賢一、山本卓、成瀬清、柏木昭彦「メダカ精子凍結法のネットイツメガエルを始めとする様々なカエルへの応用」ポスター Cryopreservation Conference 2015 (2015年10月28日 岡崎コンファレンスセンター、岡崎市)

柏木昭彦、柏木啓子、花田秀樹、鈴木厚、竹林公子、古野伸明、田澤一郎、倉林敦、中島圭介、鈴木賢一、山本卓「ネットイツメガエルを用いた最近の研究」ポスター 第38回日本分子生物学会 (2015年12月1-3日、神戸国際展示場、神戸市)

佐能正剛、森淳平、鈴木賢一、柏木啓子、花田秀樹、重田美津紀、山本卓、杉原数美、北村繁幸、柏木昭彦、太田茂「ネットイツメガエルの発達過程における肝臓中薬物代謝酵素の変動」口頭 衛生薬学フォーラム2015 (2015年6月22日)

○研究助成金の受入状況

1. 科学研究費補助金

花田秀樹

平成27年度IBBP共同科学研究

「両生類における遺伝資源を凍結保存するための統合的な技術開発」900千円 (分担)

柏木昭彦・佐能正剛・柏木啓子・花田秀樹・鈴木賢一

平成27年度科学研究費基盤C (一般)

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

○学界ならびに社会での活動

1. 学協会役員・委員

花田秀樹

日本動物学会中四国支部、会計監査

文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクト 課題協力者

産学官連携実績

柏木昭彦、柏木啓子、花田秀樹、鈴木 厚、竹林公子、古野伸明、田澤一朗、倉林 敦、中島圭介、鈴木賢一、山本 卓「ネッタイツメガエルを用いた最近の研究」ポスター 第38回日本分子生物学会 (2015年12月1-3日, 神戸国際展示場、神戸市)

柏木昭彦、花田秀樹、柏木啓子

広島県立教育センター主催の「第19回生物教材バザール」に参加、教材の提供を行う (2015年5月)

5. その他

花田秀樹

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

NBRP「ネッタイツメガエル」運営委員会会場設定 (2015年12月, 神戸国際会議場、神戸市)
日本動物学会第86回新潟大会 2015 シンポジウム ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP)シンポジウム「ネッタイツメガエル」開催協力者 (2015年9月18日 新潟コンベンションセンター 新潟市)

寄稿依頼:花田秀樹、「どうしてどうして:かえるは、あさとよる よくなきます。なぜですか?」(後藤紗世 二年)に対する答え」日本の学童ほいく 2015年11月号 38ページ。

柏木啓子 (NBRP「ネッタイツメガエル」特別研究員)

○研究活動の概要

1. NBRP事業 ネッタイツメガエルの近交化・標準系統の樹立・提供

国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) はナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) 事業を主催、研究者に動植物・微生物・その他の生物資源を提供して生命科学や医学の発展に貢献することを目指す。両生類研究施設はネッタイツメガエルを提供する唯一の機関に指定されており、NBRP「ネッタイツメガエル」事業を展開している。私は本課題管理協力者として、努力を惜しまず職務を遂行している。アフリカツメガエルは半世紀以上にもわたり生物医学的モデル動物であったが、疑似4倍体であること、生活環が長いこと等の弱点を持ち合わせている。それに代わって注目されているのがネッタイツメガエルで、このカエルは2倍体でゲノムサイズが小さい、世代時間も短い、また全ゲノム解読は終了しているため、遺伝学研究に必須の実験材料となってきた。さらに、ネッタイツメガエルはヒトの疾患関連遺伝子のうちの79%をオルソログとして持っており、ゲノム編集技術適用ができることから、ヒト疾患研究のための次世代型モデル動物と見なされている。

この動物種が科学界に登場してから日はまだ浅く、実験動物としては開発途上の段階にある。両生類研究施設では高品質なアウトブリードガエルはもとより繁殖力の旺盛な汎用性の高い良質な近交系およびクローンネツタイツメガエルを育成している。多型性の高い60種類のマイクロサテライトマーカー解析によると、NBRPのネツタイツメガエルは近交化が順調に進んでおり、また殆どクローンといえるレベルのものも存在する。こうした特徴は英米の主要リソースセンターにいるネツタイツメガエルにはない。平成28年3月末現在のNBRPネツタイツメガエル事業における収集・保存は6基準集団、125系統、9786匹。毎年、7000匹以上の良質なネツタイツメガエルを研究者や教育関係者に提供している。NBRPのネツタイツメガエルを用いてCRISPR/Casによるノックアウトガエルを作ったところ、F0世代胚で早くも高率な体細胞変異が起こっていることがわかり、迅速・高効率な遺伝子機能解析が可能となった。そして、マトリックス支援型レーザー脱離イオン化を基盤とする質量分析イメージング(MALDI-MSI)解析はネツタイツメガエルオタマジャクシ組織内のメタボロームの局在解析にとって有力なツールになる。今後新たなNBRP事業の一環として、遺伝子改変ガエルの寄託を受けたのち提供を行い、医療や再生等に関する研究に貢献する。

2. 良質なネツタイツメガエルを用いたゲノム編集技術により迅速・高効率な遺伝子破壊が可能

研究材料としてツメガエル類は、ヒトの先天性心臓病や内臓逆位、胃腸・膵臓の疾患、神経発達障害等についての理解を深めるのに役立ち、また病気をもたらす分子機構の解明によく用いられる。特にネツタイツメガエルの場合、そのゲノムにヒト病気関連遺伝子のうちの79%がオルソログとして内臓されている。ゲノム編集技術であるTALENsやCRISPR/Casの利用は、ツメガエル類を含む各種動物でもヒト遺伝病の仕組みの説明を可能にした。私達は、ヒト疾患の機能研究推進の一環として突然変異ガエルを早急に作出する方法を試みた。CRISPR/Casシステムを使い、NBRP「ネツタイツメガエル」系統の一つ、Goldenの遺伝子破壊を行った。その結果、F0胚で80~99%という体細胞変異率が得られることが確認され、高品質のネツタイツメガエルを用いたゲノム編集技術は迅速・容易に、しかも高効率に遺伝子の機能解析を可能なことが明らかとなった。

3. マトリックス支援型レーザー脱離イオン化(MALDI)を基盤とする質量分析イメージング(MSI)解析によるネツタイツメガエルオタマジャクシ組織におけるメタボロームの局在解析

代謝物質の動態を調べることは極めて重要である。多様性に富む代謝物質の、様々な混合物の分析を行うのに、これまでに質量分析(MS)、およびMSと液体クロマトグラフィー(LC)やキャピラリー電気泳動(CE)を組み合わせた方法等が考案された。Onjikoら(2015)はCE-MS計により、アフリカツメガエルの胚発生の進行に伴っていくつかの代謝物は劇的に変化することを見出し、そのことが細胞の運命を変える原動力になっていると述べている。

MALDI-MSI法は、抗体や染色、複雑な前処理を必要とせず、切片標本上の代謝物の分布状態を可視化し、分子構造に関する情報を提供できる。この方法を適用して、私達はネツタイツメガエルオタマジャクシの19組織について組織特異的なピークをチェックし、例えば、菱脳にL-ドーパ、内臓にコルチコステロン、下垂体にドーパミンの局在等を明らかにしたのち、諸器官に特異的な分子マーカーを見出した。オタマジャクシの発生・変態中における

代謝物の同定は、両生類が哺乳類に類似の内部器官・骨格をもっていることからヒト医科学研究においても必要である。

4. 生活関連物質の影響研究にとってツメガエル類は不可欠

世界中の多くの国々の水系でごく微量の日用品や医薬品が常時検出されており、ヒトや野生生物への健康被害が懸念されている。それらの中には脂質性の非常に高いものもあり、臓器・組織の濃縮が指摘されている。半減期の長い物質の長期にわたる影響も当然考えられる。私達はツメガエル類の変態アッセイを用いて甲状腺ホルモン作用をかく乱するこれら生活関連物質のためのin vivoおよびin vitroスクリーニングシステムを開発している。LC50値の算出、オタマジャクシの生存・成長・変態への影響や、甲状腺ホルモン受容体介在性遺伝子発現、臓器中への生物濃縮等について調査している。こうした一連の研究にはネッタイツメガエルとアフリカツメガエルが有用である。

5. 両生類の生活環に対する過重力と強磁場影響

宇宙空間の無重力もしくは微小重力に曝されると、成人は起立性低血圧等の宇宙デコンディショニングを被る。しかし、胎児・新生児への影響についてはまだわかっていない。両生類は宇宙環境影響に関する短期実験によく用いられてきた。地上で無重力・微小重力環境下で長期にわたる各種in vivo実験はできないため、私達はネッタイツメガエルやアフリカツメガエルの受精卵～仔ガエルに至る様々な発生段階のものを2Gまたは5Gの過重力に曝露した。同時に磁場に対する影響も調べるため、発生段階の異なった個体を強磁場の11T(-1400T²m⁻¹), 15T(0 T²m⁻¹), 12T(+1200 T²m⁻¹)に印加した。その結果、受精卵への影響は特に顕著で、曝露受精卵から発生した個体には双頭や小頭、小眼等の頭部に障害をもつものを含め、全身に異常が認められた。また、前脳やセメント腺、および頭部形成に関わる遺伝子の発現が抑制されることもわかった。

6. 精子凍結保存法の開発

ツメガエル類は年間を通して繁殖が可能であり、また雌一腹から得られる卵の数も多い。NBRP「ネッタイツメガエル」事業においては時間経過につれて個体数は増加の一途をたどり飼育に莫大な時間と労力を要する。これを解消する有力な方法の一つが精子の凍結保存である。メダカで確立済みの簡便・確実な長期保存法をカエルに応用したところ、ネッタイツメガエルはもとより、アフリカツメガエル、トノサマガエル、アマガエル、チョウセンズガエルで良好な成果が得られている。今後は、遺伝子組換え体や突然変異体等、対象を広げていく予定である。

○発表論文

1. 原著論文

- Shigeta, M., Sakane, Y., Iida, M., Suzuki, M., Kashiwagi, K., Kashiwagi, A., Fujii, S., Yamamoto, T. and Suzuki, K.T. (2016) A streamlined workflow for rapid and efficient gene disruption by CRISPR-Cas9 in *Xenopus tropicalis* founders. *Genes to Cells*. doi: 10.1111/gtc.12379.
- Nakade, S., Sakuma, T., Sakane, Y., Hara, Y., Kurabayashi, A., Kashiwagi, K., Kashiwagi, A., Yamamoto, T. and Obara, M. (2015) Homeolog-specific targeted mutagenesis in *Xenopus*

- laevis* using TALENs. *In Vitro Cellular & Developmental Biology—Animal*, 51:879-884.
- Igawa, T., Watanabe, A., Suzuki, A., Kashiwagi, A., Kashiwagi, K., Noble, A., Guille, M., Simpson, D.E., Horb, M.E., Fujii, T. and Sumida, M. (2015) Inbreeding ratio and genetic relationships among strains of the Western clawed frog, *Xenopus tropicalis*. *PLoS ONE*, 10(7): e0133963
- Goto-Inoue, N., Kashiwagi, A., Kashiwagi, K. and Tsukasa Mori. (2016) Metabolomic approach for identifying and visualizing molecular tissue markers in tadpoles of *Xenopus tropicalis* by mass spectrometry imaging. *Biology Open* ID#: 019646

2. 総説・解説

該当なし

○著書

該当なし

○取得特許

該当なし

○講演

1. 国際会議での招待講演

- Kashiwagi, A., Sanoh, S., Kashiwagi, K., Hanada, H., Suzuki, K.T., Shinkai, T., Yamamoto, T. and Ohta, S. 「Suppression in amiodarone on *Xenopus* metamorphosis」 口頭、国際シンポジウム (2016年3月19日、岡崎コンファレンスセンター、岡崎市)
- Sanoh, S., Mori, Z., Suzuki, K.T., Kashiwagi, K., Hanada, H., Shigeta, M., Yamamoto, T., Sugihara, K., Kitamura, S., Kashiwagi, A. and Ohta, S. 「Developmental changes of drug-metabolizing enzymes related to accumulation of chemicals in tadpoles and adult frogs」 口頭、国際シンポジウム (2016年3月19日、岡崎コンファレンスセンター、岡崎市)
- Suzuki, A., Kashiwagi, K., Hanada, H., Furuno, N., Tazawa, I., Kurabayashi, K., Nakajima, K., Takebayashi-Suzuki, K., Igawa, T., Sumida, M., Yoshida, H., Kobayashi, S., Takenaka, J., Tamaki, J., Murakami, S., Mido, T. and Kashiwagi, A. 「National BioResource Project (NBRP) for *Xenopus*: recent developments at the Asian hub for the international *Xenopus* research community」 口頭、*Xenopus Meeting 2015* (2015年9月29日 米国ウッズホール)

2. 国際会議での一般講演

- Sasado, T., Kashiwagi, K., Hanada, H., Seki, S., Suzuki, K.T., Yamamoto, T., Kashiwagi, A. and Naruse, K. 「A simple sperm-cryopreservation method established for medaka (*Oryzias latipes*) works in *Xenopus laevis*, *X. tropicalis*, and several other frogs.」 ポスター 国際シンポジウム (2016年3月19日、岡崎コンファレンスセンター、岡崎市)

3. 国内学会での招待講演

該当なし

4. 国内学会での一般講演

柏木昭彦、柏木啓子、花田秀樹、鈴木賢一、鈴木厚、竹林公子、倉林敦、中島圭介、田澤一朗、井川武、古野伸明、山本卓、住田正幸「生命科学研究における近交系ネツタイツメガエルの有用性」ポスター 次世代両生類研究会2015（2015年8月25日 岡崎コンファレンスセンター，岡崎市）

井川武、渡辺愛、鈴木厚、柏木昭彦、柏木啓子、Anna Noble, Matt Guille, David E. Simpson, Marko E. Horb, 藤井保、住田正幸「ネツタイツメガエルの系統における遺伝的關係と近交度について」ポスター 次世代両生類研究会2015（2015年8月25日 岡崎コンファレンスセンター，岡崎市）

柏木昭彦、柏木啓子、花田秀樹、鈴木賢一、鈴木厚、竹林公子、倉林敦、中島圭介、田澤一朗、井川武、古野伸明、山本卓、住田正幸「ツメガエル類に関するさまざまな実験例」ポスター 次世代両生類研究会2015（2015年8月25日 岡崎コンファレンスセンター，岡崎市）

重田美津紀、坂根祐人、鈴木美有紀、柏木啓子、柏木昭彦、山本卓、鈴木賢一「Gene knockout using CRISPR/Cas9 in *Xenopus tropicalis*」ポスター 次世代両生類研2015（2015年8月25日 岡崎コンファレンスセンター，岡崎市）

笹土隆雄、花田秀樹、柏木啓子、関信輔、鈴木賢一、山本卓、柏木昭彦、成瀬清「メダカ精子凍結法はネツタイツメガエルを初めとする様々なカエルに応用出来る」ポスター 次世代両生類研究会2015（2015年8月25日 岡崎コンファレンスセンター，岡崎市）

柏木昭彦、笹土隆雄、関信輔、柏木啓子、花田秀樹、鈴木賢一、山本卓、成瀬清「両生類における遺伝資源を凍結保存するための統合的な技術開発」口頭 Cryopreservation Conference 2015（2015年10月28日 岡崎コンファレンスセンター，岡崎市）

関信輔、柏木啓子、花田秀樹、笹土隆雄、鈴木賢一、山本卓、成瀬清、柏木昭彦「両生類における生殖幹細胞凍結保存法の開発と代理親への移植法の開発」ポスター Cryopreservation Conference 2015（2015年10月28日 岡崎コンファレンスセンター，岡崎市）

笹土隆雄、柏木啓子、花田秀樹、関信輔、鈴木賢一、山本卓、成瀬清、柏木昭彦「メダカ精子凍結法のネツタイツメガエルを始めとする様々なカエルへの応用」ポスター Cryopreservation Conference 2015（2015年10月28日 岡崎コンファレンスセンター，岡崎市）

柏木昭彦、柏木啓子、花田秀樹、鈴木厚、竹林公子、古野伸明、田澤一朗、倉林敦、中島圭介、鈴木賢一、山本卓「ネツタイツメガエルを用いた最近の研究」ポスター 第38回日本分子生物学会（2015年12月1-3日，神戸国際展示場，神戸市）

佐能正剛、森淳平、鈴木賢一、柏木啓子、花田秀樹、重田美津紀、山本卓、杉原数美、北村繁幸、柏木昭彦、太田茂「ネツタイツメガエルの発達過程における肝臓中薬物代謝酵素の変動」口頭 衛生薬学フォーラム2015（2015年6月22日）

○各種研究員と外国人留学生の受入状況

1. 外国人留学生

該当なし

2. 外国人客員研究員

該当なし

3. 研究員
該当なし

○研究助成金の受入状況

1. 科学研究費補助金

柏木啓子

平成27年度IBBP共同科学研究

「両生類における遺伝資源を凍結保存するための統合的な技術開発」900千円（分担）

柏木昭彦・佐能正剛・柏木啓子・花田秀樹・鈴木賢一

平成27年度科学研究費基盤C（一般）

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

2. 共同研究

該当なし

3. 補助金

該当なし

○学界ならびに社会での活動

1. 学協会役員・委員

柏木啓子

文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクト 課題協力者（生体リソースの繁殖、維持管理、技術講習会、広報活動の担当）

2. セミナー・講演会開催実績

該当なし

3. 産学官連携実績

柏木昭彦、柏木啓子、花田秀樹、鈴木 厚、竹林公子、古野伸明、田澤一朗、倉林 敦、中島圭介、鈴木賢一、山本 卓「ネッタイツメガエルを用いた最近の研究」ポスター 第38回日本分子生物学会（2015年12月1-3日、神戸国際展示場、神戸市）

柏木昭彦、花田秀樹、柏木啓子

広島県立教育センター主催の「第19回生物教材バザール」に参加、教材の提供を行う（2015年5月 東広島）

4. セミナー・講義・講演会講師等

柏木啓子

ナショナルバイオリソースプロジェクト ネットアイツメガエル実験技術講習会講師（2015年3月）

5. その他

柏木啓子

施設見学者に対してNBRP「ネッタイツメガエル」の詳細を説明している。

柏木啓子

NBRP「ネッタイツメガエル」運営委員会会場設定および書記 (2015年12月, 神戸国際会議場、神戸市)

柏木啓子

日本動物学会第86回仙台大会2015シンポジウム ナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)シンポジウム「ネッタイツメガエル」開催協力者 (2015年9月18日 新潟コンベンションセンター 新潟市)

○国際共同研究

該当なし

○特記事項

- ・2013年にBiology Openに投稿したXenopusの論文が、発刊以降（5年目）の被引用回数がTop2としてEditorialで報告されている。
- ・ノーベル生理・医学賞受賞者J.B. Gurdon卿が3月7日ご来訪の際、NBRP事業について高い評価を受けた。
- ・著名な発生生物学者Scott Gilbert博士が3月22日ご来訪され、同様の評価を受けた。

○大学院教育

1. 大学院生の国内学会発表実績
該当なし
2. 大学院生の国際学会発表実績
該当なし
3. 修士論文発表実績
該当なし
4. 博士学位 ← 学位授与実績
該当なし
5. TAの実績
該当なし
6. 大学院教育の国際化 ← 国際化への対応等
該当なし