

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月8日現在

機関番号：54101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770222

研究課題名（和文） アフリカツメガエル変態期における赤血球動態の解析

研究課題名（英文） The analysis of red blood cell dynamics during metamorphosis of *Xenopus laevis*

研究代表者

山口 雅裕（YAMAGUCHI MASAHIRO）

鈴鹿工業高等専門学校・生物応用化学科・講師

研究者番号：00360660

研究成果の概要（和文）：両生類は変態期に多くの組織が幼生型から成体型に作り換えられる。赤血球も、幼生型ヘモグロビンを含む幼生型赤血球から成体型ヘモグロビンを含む成体型赤血球に置き換えられるが、どのような仕組みでこの変化が引き起こされるのかは分かっていない。本研究により、アフリカツメガエルにおいて赤血球の転換を引き起こすのは甲状腺ホルモンではなく、エリスロポエチンである可能性が示唆された。また、変態と赤血球転換が同調しないのはツメガエルに特有であり、多くの成体が陸上生活するカエルでは変態と赤血球転換が同調することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：During amphibian metamorphosis, most of the organs and tissues are remodeled. The red blood cells are also remodeled from larval type to adult type, but the mechanism regulating this switch is largely unknown. In this study, I suggest that not thyroid hormone, but erythropoietin induces the red blood cell transition in *Xenopus laevis*. I also found that the red blood cell transition in *Xenopus* does not synchronize to metamorphosis, showing striking contrast to the case in other terrestrial anuran species. This would suggest that the mechanism governs the transition in *Xenopus* is distinct from those in other species.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：赤血球・両生類・変態・甲状腺ホルモン・エリスロポエチン

### 1. 研究開始当初の背景

両生類の変態は劇的な体の作り換えであり、これは甲状腺ホルモンによって誘導される。また、尾の退縮や小腸のリモデリングには、甲状腺ホルモンが直接作用することが報告されている。

赤血球もまた、幼生型ヘモグロビンを含む幼生型赤血球から成体型ヘモグロビンを含む成体型赤血球に変化する。この変化は幼生型赤血球が成体型赤血球に置き換えられることによって生じる。これも甲状腺ホルモンの作用によって誘導されるとする報告があるが、詳しい作用機序は不明である。甲状腺ホルモンの作用によるのであれば、1) 幼生型赤血球の増殖停止、2) 幼生型赤血球の選択的除去、3) 成体型赤血球の増殖促進、などを甲状腺ホルモンが誘導する可能性があるが、直接の証拠は殆どない。

一方、アフリカツメガエルにおいては、幼生型赤血球が、血中甲状腺ホルモン濃度の低下した変態後もしばらく残存することから、甲状腺ホルモン以外の因子も赤血球転換を制御している可能性がある。しかし、これについてはほとんど調べられていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、両生類のモデル生物であるアフリカツメガエルを用い、赤血球転換の機構を解析することを目的とする。

(1) 各発生段階でどのタイプの赤血球が増殖しているか解析し、それによって赤血球転換期の赤血球細胞の動態を解析する。

(2) 各発生段階における赤血球、赤芽球が発現する遺伝子の解析を行い、そこから転換を誘導する因子の同定を行う。

(3) 貧血誘導が早熟的な赤血球転換を引き起こすとする報告がある一方、この早熟的転換には甲状腺ホルモンが必要であることを示唆するデータもある。そこで、貧血誘導と甲状腺ホルモンの関係を調べ、甲状腺ホルモン非存在下で赤血球転換が誘導される可能性を検証する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験動物

アフリカツメガエル幼生は、ワタナベ増殖(兵庫県)から購入した。シュレーゲルアオガエル幼生は、三重県近郊の池で採取した。変態を止める際には 100 mg/L のメチマゾール液中で幼生を飼育した。また、貧血を誘導する際にはフェニルヒドラジンを飼育水で 50000 倍希釈し、この中に個体を 10 分間浸し

た。10 分後、個体を普通の飼育水に戻し、7-10 日後に採血して解析に供した。

#### (2) 採血

動物は、MS222 で麻酔した後、心臓から血液を PBS 中で採取した。採取した血液は PBS で 2 回洗浄し、その後溶血し、遠心後、その上清を SDS-PAGE、もしくはウエスタンブロットのサンプルとした。

#### (3) in situ hybridization

麻酔した個体から肝臓を摘出し、定法に従い、パラフィン切片を作製した。作製したパラフィン切片は脱パラ、加水の後、界面活性剤、塩酸、パラフォルムアルデヒド、グリシン(内在性のアルカリフォスファターゼ活性除去)処理を行った後、室温でプレハイブリダイゼーションを行い、その後プローブと 45°C でオーバーナイトでハイブリダイゼーションを行った。用いたプローブは DIG でラベルされた幼生型 $\beta$ -グロビン、もしくは成体型 $\beta$ -グロビンの RNA プローブである。ハイブリダイゼーション後、プローブを洗浄し、ブロッキングしてからアルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体と反応させた。発色は FastRed で行った。

#### (4) 免疫組織化学

in situ hybridization に供された標本を洗浄後、95°C で加熱処理した。これによってアルカリフォスファターゼ活性が失活すると共に、PCNA の抗原基が賦活される。ブロッキング後、抗 PCNA 抗体と 4°C オーバーナイトで反応を行った。二次抗体にはアルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG を用い、発色は NBT/BCIP で行った。

#### (5) 密度勾配遠心

10X PBS を Percoll で 10 倍希釈し、これを SIP 液とした。これを順次 1X PBS で希釈し、Percoll の 80、70、60%溶液を作製し、これを重層して不連続な密度勾配を遠心管中に作製した。一番上に赤血球を載せたあと、400 g で 15 分間遠心した。その後、各層に分画された赤血球を回収し、解析に供した。

#### (6) RT-PCR

赤血球全体から RNA を抽出するのではなく、100 個の赤血球をサンプルとして用いた。100 個の赤血球を血球計算板を用いて単離した後、界面活性剤で処理し、ここに直接逆転写酵素を添加した。その後、TdT と dATP を加えて合成された cDNA に poly (dA) アダプターを付加し、oligo (dT) プライマーを用いた PCR で cDNA 全体を増幅して、これを RT-PCR の鋳型とした。幼生型グロビン、成体型グロビン、

EpoR, TR 発現の検出のため、それぞれ 100-500 bp 程度の PCR 産物が増えるようプライマーをデザインし、これを用いて RT-PCR を行った。

#### (7) SDS-PAGE

15%のアクリルアミドゲルを作製し、定法に従って行った。30 mA 定電流の条件で泳動した後、ゲルを CBB 染色液で染色した。

#### (7) ウェスタンブロッティング

SDS-PAGE を行った後、セミドライブロッティング装置でタンパク質を PVDF 膜に転写した。メンブレンの面積 (cm<sup>2</sup>) x 2mA の定電流で転写後、メンブレンをブロッキングしてから抗 PCNA 抗体と反応させた。二次抗体には抗マウス IgG を用い、発色は NBT/BCIP で行った。

### 4. 研究成果

(1) 赤血球転換には、幼生型細胞の増殖停止と成体型細胞の増殖促進という過程が含まれると考えられるが、そもそも両タイプの赤血球における増殖のプロファイルが分かっていない。そこで、幼生型グロビン、もしくは成体型グロビンの *in situ* hybridization と、増殖マーカーである PCNA の免疫染色による二重染色を変態期であるステージ 59 の肝臓を用いて行い、各タイプの赤血球増殖を解析した。その結果、幼生型グロビンと PCNA の両方でラベルされる赤血球が多数観察され、甲状腺ホルモンの血中濃度が上昇する発生段階であるにも関わらず、幼生型赤血球は増殖を続けていることが分かった。また、幼生型赤血球と成体型赤血球の間で、増殖率に有為な差は認められなかった。

また、ステージ 59 の末梢血を Percoll の密度勾配遠心によって分離し、それぞれの分画から抽出したタンパク質をウェスタンブロットして PCNA を検出したところ、増殖活性の高い分画と、低い分画に分けられることが分かった。それぞれの分画に含まれるグロビンのパターンを調べた結果、どちらの分画にもほぼ同じ割合で幼生型グロビンと成体型グロビンが含まれていた。

これらの結果から、変態期には成体型赤血球だけでなく、幼生型赤血球も同様に増殖していることが示唆された。

(2) 赤血球転換を誘導する因子に対する受容体が赤血球に発現すると考え、甲状腺ホルモン受容体 (TR) とエリスロポエチン受容体 (EpoR) に注目し、その発現を解析した。その際、末梢血全体から RNA を抽出すると、赤血球以外の細胞も多く含まれ、この遺伝子発現を検出する可能性がある。そこで、赤血球 1 個を単離し、発現しているグロビンの種類と、発現している受容体の種類を関連づけよ

うと試みた。しかし、赤血球 1 個当たりの RT-PCR では、グロビンの発現は検出できるものの、発現量の少ない受容体遺伝子は検出できなかった。そこで、赤血球 100 個を単離し、ここでの遺伝子発現を解析することとした。確率的に赤血球以外の細胞がここに含まれることはほぼないと考えられた。

ステージ 48 では、4 個体中 3 個体で幼生型グロビンのみを発現し、成体型グロビンを発現していなかった。しかし、残りの 1 個体では、まだ甲状腺ホルモンが合成されない時期であるにも関わらず、成体型グロビンも発現していた。興味深いことに、幼生型グロビンだけを発現している 3 個体では EpoR の発現が検出できなかったが、成体型グロビンも発現している 1 個体では EpoR の発現も検出された。ステージ 57、ステージ 59 でも幼生型グロビン、成体型グロビン、EpoR が全て発現していた。一方、変態が完了したステージ 66 では、幼生型グロビンと成体型グロビンの両方が発現していたものの、EpoR の発現は検出できなかった。これらの結果は、エリスロポエチンが赤血球転換を誘導する因子であることを強く示唆する。一方、変態完了個体で EpoR の発現が検出されなかったのは、末梢での造血活性が低くなり、主な造血の場が例えば肝臓などに移動したせいかもしれない。

一方、TR は全てのステージにおいてその発現を検出できなかった。未分化な血球前駆細胞に甲状腺ホルモンが作用している可能性があると考え、フェニルヒドラジンによって貧血を誘導し、末梢に大量の血球前駆細胞を放出させ、これを用いて同様の解析を行ったが、やはり TR の発現は検出できなかった。このことから、甲状腺ホルモンは少なくとも直接的には赤血球転換に作用していない可能性が示唆された。

(3) フェニルヒドラジンによって貧血を誘導すると、本来の転換より早熟的に赤血球転換が誘導できることが報告されている。これは甲状腺ホルモン非依存的に赤血球転換が起こることを示していると考えられるが、一方、若いステージでは早熟的転換が誘導されないことから、転換には甲状腺ホルモンの存在も必要である可能性がある。この点について解析するため、ステージ 57 の個体をメチマゾールで処理し、甲状腺ホルモンの合成を阻害して変態を完全に止めた後、貧血を誘導した。その結果、甲状腺ホルモンが存在しないにも関わらず、早熟的な赤血球転換を誘導できた。但し、誘導の程度は、メチマゾール未処理個体と比べると、小さかった。

このことから、貧血を誘導すれば、甲状腺ホルモンが存在しなくても赤血球転換を誘導できることが分かった。但し、甲状腺ホルモンが全く作用していないとは言えなかつ

た。メチマゾール未処理個体は貧血誘導時には既に変態を完了しているため、処理個体とは体内環境が全く異なると考えられる。今後はこの両者の差をもたらす因子について、甲状腺ホルモンも含めて解析する必要がある。

(4) 以上に述べてきたことから、アフリカツメガエルにおける赤血球転換には、甲状腺ホルモンによる制御が主要なものではない可能性が示唆された。このことは、変態後も数週間幼生型赤血球（幼生型グロビン）が残存するという結果と合致する。アフリカツメガエルは成体になっても水中生活を続ける、特殊な生活史を持った無尾両生類である。このことと赤血球転換のタイミングには関係があるのではないかと考え、陸生のヤマアカガエル、シュレーゲルアオガエルを用いて、赤血球転換のタイミングを解析した。

ヤマアカガエルにおいてもシュレーゲルアオガエルにおいても結果はほぼ同様であった。幼生に後肢が生える発生段階になると、SDS-PAGE で、それまでには見られなかったグロビンのバンドが検出できるようになり、これが成体型グロビンのバンドであると考えられた。更に発生が進み、変態最盛期になるとグロビンのバンドパターンを急激に変わり、変態完了と共にグロビンのパターンはほぼ完全に成体型に変化した。

このことから、アフリカツメガエルの赤血球転換は、他の無尾類とは異なり、変態と同調せずに著しくゆっくりと生じることが分かった。他の無尾類では変態期に甲状腺ホルモン依存的に生じる赤血球転換が、アフリカツメガエルでは甲状腺ホルモンの制御が進化の過程で外れたのかもしれない。

シュレーゲルアオガエルから TR 遺伝子の部分長を単離し、赤血球における TR の発現を予備的に調べたが、これまでのところ、シュレーゲルアオガエルでは赤血球に TR が発現しているというデータは得られていない。今後、より詳細に解析を勧めたいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 4 件)

1) 山口雅裕、アフリカツメガエル変態期における赤血球転換機構の解析、第 16 回高専シンポジウム in 米子 (米子市、2011 年)

2) 山口雅裕、川口唯、木下勉、アフリカツメガエル変態期における赤血球転換と細胞増殖の関係、日本動物学会第 82 回大会 (旭川市、2011 年)

3) 川口唯、松田伊世、山口雅裕、アフリカツメガエル変態期における赤血球増殖の解析、第 17 回高専シンポジウム in 熊本 (熊本市、2012 年)

4) 水谷太一、山口雅裕、ツメガエル及びシュレーゲルアオガエルにおける変態期赤血球転換機構の解析、第 17 回高専シンポジウム in 熊本 (熊本市、2012 年)

[その他]

ホームページ等

<http://www.suzuka-ct.ac.jp/sangaku/DB/node/167>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山口 雅裕 (YAMAGUCHI MASAHIRO)

鈴鹿工業高等専門学校・生物応用化学科・講師

研究者番号：003600660