

平成30年6月14日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440057

研究課題名(和文) TALENによる両生類変態の分子機構の解析—哺乳類の出生は変態か—

研究課題名(英文) The analysis of the molecular mechanism of amphibian metamorphosis using genomic editing

研究代表者

矢尾板 芳郎 (Yaoita, Yoshio)

広島大学・両生類研究センター・教授

研究者番号：00166472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では哺乳類の出生が変態に対応するか否かを検討した。げっ歯類では生後3週間の間に甲状腺ホルモンの上昇が観察される。ネッタイツメガエルの変態時に脳で発現が上昇する遺伝子、11個を詳細に検討し、それがげっ歯類の生後3週間でも発現が増加していることを示した。マウスの脳で生後3週間に増加している蛋白質の6個の遺伝子も無尾両生類の脳で上昇していることも明らかにした。これらの実験結果は、げっ歯類の生後3週間の高甲状腺ホルモン状態に無尾両生類の変態と同様な遺伝子発現が脳で起きていることを示しており、このことは、げっ歯類の脳で変態が起きていることを強く示唆している。

研究成果の概要(英文)：We have examined whether the birth of the mammalian newborn corresponds to metamorphosis. In rodent, the surge of thyroid hormone is observed in the first three postnatal weeks. Eleven genes up-regulated in the brain of *Xenopus tropicalis* during metamorphosis were analyzed in detail and their expression levels increased in the rodent brain during three postnatal weeks. The expression of six genes encoding proteins up-regulated in mouse brain during the three postnatal weeks was also induced in the tadpole brain during metamorphosis. These data indicate that the similar gene expression profile to that of metamorphosing tadpole brain was elicited in rodent brain and strongly suggested that the rodent brain undergoes metamorphosis.

研究分野：発生生物学

キーワード：変態 甲状腺ホルモン 両生類 げっ歯類 脳の変態 肝臓の変態 出生 ネッタイツメガエル

1. 研究開始当初の背景

甲状腺ホルモンの血中増加により、両生類の変態が短期間に起き、水棲・草食動物である幼生から陸上・肉食動物に全身の体の作り替えが起きる。四肢の発達、尾やエラの退縮、神経系の再構築、小腸の短縮と肉食用への変化、陸上生活のための皮膚の作り替え、膵臓や肝臓の作り替え、幼生型から成体型赤血球への交換、拒否反応の開始等が観察される。(1)「両生類の変態の分子機構は、いまだ、解明されていない。」

両生類の変態が起きる時にどのような遺伝子の発現が変化するかについては詳細に調べられてある。また、甲状腺ホルモン受容体のドミナントネガティブや若干の遺伝子の過剰発現・ノックダウンによる解析がされている。それらの実験結果から、変態の現象は甲状腺ホルモン受容体が甲状腺ホルモンとの結合を介し、始まることは間違いないが、その後は推測の域でしかない。例えば、甲状腺ホルモン応答転写因子が仲介して effector 遺伝子の発現を促すのか、甲状腺ホルモン受容体が、直接、effector 遺伝子を活性化することでさえ、賛否両論がある。また、重要な effector 遺伝子がどれであるかについてもノックダウンの実験結果しかないので、曖昧である。つまり、遺伝子のノックアウトによる解析は皆無であるために個々の遺伝子の機能の重要性を明確に示すことができない状態であり、変態の分子機構の全体像が明らかになっていない。

(2)「私たちの研究室では TALEN による標的遺伝子破壊技術が確立している。」

近年、ZFN (zinc finger nuclease)、TALEN (transcription activator-like effector nuclease)、CRISPR-Cas nucleases 等の多くの核酸配列特異的 DNase が開発され、マウスやラット以外の実験動物でも標的遺伝子のノックアウトやゲノム編集が容易になってきている。その中でも TALEN では、その一個一個のリポートが一個一個の核酸に対応しているため、デザインが簡単なこと、作製も比較的容易であること、off-target が少ないこと等から、注目されていると思われる。私たちの研究室でも両生類の標的遺伝子破壊を世界で2番目、国内では1番目に確立し、2倍体であるネットイツメガエルを用いた TALEN による標的遺伝子破壊を世界で3番目に国内では1番目に成功している。また、現在、遺伝子機能の解析のために更に高効率の遺伝子ノックアウト法を開発中である。

(3)「私たちの研究室では長年の変態の研究により多くの知識が集積している。」

四半世紀にわたる両生類変態の研究から、多くの知識が蓄積されている。甲状腺ホルモン受容体の発現調節 (Yaoita & Brown, *Genes & Development*, 1990) や尾の退縮時における筋細胞死の分子機構 (Nakajima &

Yaoita, *Developmental Dynamics*, 2003) を明らかにしてきた。また、近年では甲状腺ホルモン受容体 α の発現量が甲状腺ホルモンへの感受性を決めていて、後肢の発達後に尾が退縮する現象がそれで説明されることを示した。

2. 研究の目的

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ト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。相応する遺伝子のノックアウトマウスで報告されている表現型と比較することにより、両生類の変態が哺乳類どの時期に対応するかを検討する。現在まで、両生類の変態に多くの遺伝子の発現が重要であると提唱されているが、標的遺伝子破壊が行われていなかったので明確ではなかった。本申請書では、(1)関連遺伝子の破壊を行い、その表現型を調べ、どの遺伝子が変態のどの現象に必須であるかを明らかにすると共に、(2)哺乳類における出生と両生類の変態との関係を調べる。

3. 研究の方法

(1)両生類の変態に関係する多数の遺伝子を破壊して、その遺伝子機能が変態に及ぼしている影響を知る目的のために、遺伝子に対応する TALEN を設計し、mRNA を合成し、ネットイツメガエルの受精卵に注入し、ノックアウトガエルを作製する。そのカエルを交配し、目的の遺伝子のホモの変異体を得る。そのカエルの表現型を解析することにより、両生類の変態における様々な形態変化にどの遺伝子が必要かを調べる。

(2)相同遺伝子のノックアウトマウスで報告されている表現型と比較することにより、両生類における変態が哺乳類ではどの時期に対応しているかを検討する。

4. 研究成果

(1) 無尾両生類の尾の退縮に必要であると報告されていた *Ouro* 遺伝子の発現は必要ではなかった。(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、平良らが2009年にPNASに「*Ouro* 蛋白質を発現することが、尾が免疫系により拒絶されて退縮するための必要十分条件である。」という論文を発表した。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、平良らによれば、*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している。私たちは TALEN 法により *ouro1* 遺伝子と *ouro2* 遺伝子が破壊された幼生を多数作製し、それらを交配して、両染色体で機能を失った *ouro1* 遺伝子と *ouro2* 遺伝子の F1 /

ックアウトガエル (F1K0) をスクリーニングして解析した。ouro1 F1K0 ノックアウトでは、RT-PCR で ouro1 mRNA が 1/50 へ激減しており、Western blot で Ouro1 タンパク質も検出限界以下になっていた。更に Ouro1 タンパク質とヘテロダイマーを形成する Ouro2 タンパク質も正常な構造を保てなくなったと思われ、かろうじて検出できる程まですこぶる減少していた。ouro2F1K0 でも同様に、ouro2 mRNA は 1/50 へ激減しており、Ouro2 は発現しておらず、Ouro1 の発現量も激減していた。ouroF1K0 幼生では Ouro タンパク質が検出限界、もしくは、それ以下でありながら、尾は正常に退縮しており、尾が変態後に残ることも無かった。

TALEN 法で *Foxn1* 遺伝子を破壊し、先天性胸腺欠損症のカエルを作製した。そ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も観察されなかった。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し、尾が残存することもなかった。

これらの知見は Ouro タンパク質がツメガエル幼生の変態期における尾の退縮に必要なことを証明しており、従来の尾の退縮の免疫学的拒絶反応説を否定するものである。したがって、井筒、平良らの PNAS の論文は何らかの artifact を観察していた可能性が高い。

Yuya Nakai, [Keisuke Nakajima](#), Jacques Robert and [Yoshio Yaoita](#)

Ouro proteins are not essential to tail regression during *Xenopus tropicalis* metamorphosis

Genes to Cells 21, 275-286, 2016. doi: 10.1111/gtc.12337

(2) 同系統の幼生の皮膚移植断片が成体宿主上で変性する現象の解析

井筒が「同系統の幼生の皮膚移植断片が成体宿主により拒絶される。」という現象を 1993 年に発表し、幼生組織は成体によって拒絶されるという「変態における尾の免疫学的拒絶説」の基本的な根拠となっている。

私たちがネットイツメガエルを用いて追試し、1ヶ月以内に同系統の幼生の皮膚移植断片の変性を観察した。しかし、甲状腺ホルモン合成阻害剤の存在下で同様な実験をすると、150日以上も生着し、拒絶反応を観察できなかった。成体の血清の甲状腺ホルモンを測定してみると、T4 は $6.3 \text{ nM} \pm 1.6 \text{ nM}$ 、T3 は $1.1 \text{ nM} \pm 0.86 \text{ nM}$ と尾が退縮中のアフリカツメガエルの幼生の血清と類似の濃度が検出された。当然、甲状腺ホルモン合成阻害剤には免疫抑制活性が無いことは確認した。これらの結果は、成体で産生された甲状腺ホルモンに幼生由来の皮膚移植断片が反応して変性して行ったことを証明し、成体による幼生皮膚移植断片の免疫学的拒絶では無い

ことを示している。従来の尾の退縮の免疫学的拒絶反応説を基本的に否定するものである。

Yuya Nakai, [Keisuke Nakajima](#) and [Yoshio Yaoita](#)

An inhibitor of thyroid hormone synthesis protects tail skin grafts transplanted to syngenic adult frogs.

Zoolog Sci. 2017 Oct;34(5):414-418. doi: 10.2108/zs170011.

Yuya Nakai, [Keisuke Nakajima](#) and [Yoshio Yaoita](#)

Mechanisms of tail resorption during anuran metamorphosis

BioMolecular Concepts. 2017 Sep 26;8(3-4):179-183. doi:

10.1515/bmc-2017-0022.

(3) 甲状腺ホルモン受容体 α 、 β の変態における役割

私たちは TALEN 法により甲状腺ホルモン受容体 α 、 β 遺伝子を破壊し、得られた F0 を交配しスクリーニングすることにより、両染色体で甲状腺ホルモン受容体 α 、 β 遺伝子 (*TR α* 、*TR β*) が機能を失った F1 ノックアウトガエル (F1K0) を作製した。*TR β* KO カエルでは変態時の尾の退縮が著しく遅れていたが、*TR α* KO カエルでは野生型と変わらない退縮を示していた。その原因として、脊索の崩壊が *TR β* KO カエルではなかなか進まなかったことが挙げられる。尾の先の部分では細胞外基質分解酵素の発現が有意に低く、脊索崩壊の遅延に至ったと考えられる。また、*TR β* KO カエル特異的に嗅神経の短縮や鰓の退縮も遅れていた。*TR α* KO カエルでは尾や鰓の退縮や嗅神経の短縮の異常は観察されなかったが、後肢が変態前に異常成長していた。つまり、*TR α* 遺伝子は甲状腺ホルモンが存在しない変態前に後肢の成長を抑制しており、*TR α* KO カエルでは脱抑制され後肢が早い時期に発達したと考えられる。変態時に見られる小腸の変化の異常は、*TR α* KO カエル、*TR β* KO カエル、両方で観察されなかった。これらの実験結果により、*TR α* 遺伝子は変態前の後肢の発育抑制、*TR β* 遺伝子は尾や鰓の退縮や嗅神経の短縮に主な役割を果たしていることが示された。

[Keisuke Nakajima](#), [Ichiro Tazawa](#) and [Yoshio Yaoita](#)

Thyroid hormone receptor - and -knockout *Xenopus tropicalis* tadpoles reveal subtype-specific roles during development.

Endocrinology. 2018 Feb 1;159(2):733-743. doi: 10.1210/en.2017-00601.

(4) 無尾両生類は、甲状腺ホルモンの血中上昇の時に、四肢の発達、尾や鰓の退縮を含む様々な、ほぼ全身の再構築を行う。今まで、爬虫類や鳥類や哺乳類ではこのような変態

の現象は無いと考えられた。しかし、これらの動物でも甲状腺ホルモンの上昇があり、それが、親の世話を必要としなくなり、自律性の生存力を獲得する前後に観察されることが生態学的立場から報告されるようになってきた。本研究では変態が哺乳類の出生に対応するか否かを検討した。げっ歯類では生後3週間の間に甲状腺ホルモンの上昇が観察される。しかし、無尾両生類の変態とげっ歯類の出生に共通すると考えられてきた現象、皮膚の角質化、ヘモグロビンスイッチ、小腸の発達は時期的に一致しない。肝臓におけるアルブミン産生や一部のウレアサイクル関連酵素産生も無尾両生類の変態時には明確でなかったが、変態時に増加する酵素もあり、共通する遺伝子発現も見られた。ネッタイツメガエルの変態時に脳で発現が上昇する遺伝子、11個を詳細に検討し、それがげっ歯類の生後3週間でも発現が増加していることを示した。マウスの脳で生後3週間に増加している蛋白質の6個の遺伝子も無尾両生類の脳で上昇していることも明らかにした。これらの遺伝子には甲状腺ホルモン依存的に発現が増加する遺伝子、低甲状腺ホルモン状態で発現が低下する遺伝子、甲状腺ホルモン受容体遺伝子のノックアウトで発現が低下する遺伝子等が含まれていた。これらの実験結果は、げっ歯類の生後3週間の高甲状腺ホルモン状態に無尾両生類の変態と同様な遺伝子発現が脳で起きていることを示しており、このことは、げっ歯類の脳で変態が起きていることを強く示唆している。

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)

Keisuke Nakajima, Ichiro Tazawa and Yoshio Yaoita

Thyroid hormone receptor α - and β -knockout *Xenopus tropicalis* tadpoles reveal subtype-specific roles during development.

Endocrinology. 2018 Feb 1;159(2):733-743. doi: 10.1210/en.2017-00601. 査読有り

Ichiro Tazawa and Yoshio Yaoita

Vitamin A induced homeotic hindlimb formation on dorsal and ventral sides of regenerating tissue of amputated tails of Japanese brown frog tadpoles.

Dev Growth Differ. 2017 Dec;59(9):688-700. doi: 10.1111/dgd.12407. Epub 2017 Nov 1. 査読有り

Yuya Nakai, Keisuke Nakajima and Yoshio Yaoita

Mechanisms of tail resorption during anuran metamorphosis

BioMolecular Concepts. 2017 Sep

26:8(3-4):179-183.doi:

10.1515/bmc-2017-0022.査読有り

Yuya Nakai, Keisuke Nakajima and Yoshio Yaoita

An inhibitor of thyroid hormone synthesis protects tail skin grafts transplanted to syngenic adult frogs.

Zoolog Sci. 2017 Oct;34(5):414-418. doi: 10.2108/zs170011.査読有り

Takuya Nakayama, Keisuke Nakajima, Amanda Cox, Marilyn Fisher, Mary Howell, Margaret B. Fish, Yoshio Yaoita, and Robert M. Grainger

no privacy, a *Xenopus tropicalis* mutant, is a model of human Hermansky-Pudlak Syndrome and allows visualization of internal organogenesis during tadpole development.

Dev Biol. 2017 Jun 15;426(2):472-486. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.08.020. Epub 2016 Sep 3.査読有り

Keisuke Nakajima, Taeko Nakajima, and Yoshio Yaoita

Generation of albino *Cynops pyrrhogaster* by genomic editing of the *tyrosinase* gene Zoological Science, **33**(3), 290-294, 2016. doi: 10.2108/zs150203 査読有り

Yuya Nakai, Keisuke Nakajima, Jacques Robert and Yoshio Yaoita

Ouro proteins are not essential to tail regression during *Xenopus tropicalis* metamorphosis

Genes to Cells 21, 275-286, 2016. doi: 10.1111/gtc.12337 査読有り

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. 査読有り

Takuya Nakayama, Marilyn Fisher, Keisuke Nakajima, Akinleye O. Odeleye, Keith B. Zimmerman, Margaret B. Fish, Yoshio Yaoita, Jena L. Chojnowski, James D. Lauderdale, Peter A. Netland, Robert M. Grainger

[Xenopus pax6 mutants affect eye development and other organ systems, and have phenotypic similarities to human aniridia patients](#)

Developmental Biology 408, 328-344, 2015. doi: 10.1016/j.ydbio.2015.02.012.査読有り

Keisuke Nakajima and Yoshio Yaoita
Development of a new approach for
targeted gene editing in primordial germ
cells using TALENs in *Xenopus*
Biology Open 4, 259-266, 2015,
doi:10.1242/bio.201410926 査読有り

Keisuke Nakajima and Yoshio Yaoita
Highly efficient gene knockout by injection
of TALEN mRNAs into oocytes and host
transfer in *Xenopus laevis*
Biology Open, 4, 180-185, 2015,
doi:10.1242/bio.201410009 査読有り

〔雑誌論文〕(計 11 件)

〔学会発表〕(計 32 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢尾板 芳郎 (YAOITA YOSHIO)
広島大学・両生類研究センター・教授
研究者番号：00166472

(2) 研究分担者

中島 圭介 (NAKAJIMA KEISUKE)
広島大学・両生類研究センター・助教
研究者番号：60260311

(2) 研究分担者

田澤 一郎 (TAZAWA ICHIRO)