

両生類の発生における甲状腺ホルモン受容体の二重機能

ユンボ シ
米国 国立衛生研究所

この重要なシンポジウムにお招きくださりありがとうございます。ご存知の通り、また、ただいまお聞きになった通り、両生類は、これまでも、また今後も恐らく内分泌攪乱の最も重要な指標の1つであり続けるでしょう。

しかし、ご存知の通り、過去または現在も、両生類から得られた所見を哺乳動物、特にヒトに適用したり、方針の変更に適用したりすることは困難であり、遅れています。この理由の一部は、多くの場合、我々は生きた動物がその体内で内分泌攪乱化学物質の影響を受ける基本的機序または分子的経路が分かっていないためです。

本日は、アフリカツメガエルをモデルとして用いて、脊椎動物の発生における甲状腺ホルモン受容体の機能と基本的な機序を調査した我々の研究についてお話ししたいと思います。

2つの大きな問題は、まず、脊椎動物の発生におけるリガンド結合型およびリガンド非結合型甲状腺ホルモン受容体すなわち TR にはどのような役割があるか、そして、どのように TR が *in vivo* でターゲット遺伝子発現を調節するかということです。

申しあげました通り、我々はアフリカツメガエルをモデルとして用いています。第一に、我々が行ったのは、ある単純な仮説を用いることでした。すなわち、甲状腺ホルモンをウイルスのように見なすことです。甲状腺ホルモンは、早期の遺伝子や後期の遺伝子を誘導するウイルス感染のように、遺伝子調節のカスケードを形成することにより変態や脊椎動物の発生を誘発させます。

多くの講演者による多くの研究から、特に本日このあとで皆さんがお聞きになる研究から、ヘテロダイマーとしての甲状腺ホルモン受容体の機能が RXR (9-シスレチノイン酸受容体) により形成されることが分かっています。TR/RXR ヘテロダイマーは構成要素として核に存在し、クロマチンすなわち *in vivo* のターゲットに結合すると考えられています。

つまり、甲状腺ホルモンが核に進入すると、受容体に結合し、それが受容体複合体を活性化します。それにより、まず、初期の甲状腺ホルモン応答遺伝子、次いで、後期の甲状腺ホルモン応答遺伝子の活性化が導かれ、最終的に組織に特異的な変化を生じさせます。

従って、甲状腺ホルモンによる両生類の変態を生じさせている分子的経路を理解するには、取り組まなければならない問題が実は2つあります。第1の問題は、発生においてリガンド結合型およびリガンド非結合型の甲状腺ホルモン受容体がどのような種類の機能を果たしているのか、また、その基礎となる機序は何かということです。第2の問題は、甲状腺ホルモンにより誘発される遺伝子とは何か、また次にどのようにしてそれら遺伝子が下流のイベントを調節するのかということです。本日はこの最初の問題、つまり、発生においてリガンド結合型およびリガンド非結合型の甲状腺ホルモン受容体がどのような種類の機能を果たしているのか、またその基礎となる機序は何かについてお話しします。

甲状腺ホルモン受容体の機能に関する最初のヒントが示されたのは、約10年以上前に、矢尾板芳郎博士と Don Brown がアフリカツメガエルで甲状腺ホルモン受容体のクローンを作成して、それらの発現を解析したときです。彼らが発見したのは、甲状腺ホルモン受容体 α 遺伝子です。アフリカツメガエルには2つの TR α 遺伝子と2つの TR β 遺伝子があります。なぜなら、アフリカツメガエルは偽4倍体生物だからです。 α 遺伝子は、ステージ35、36でオタマジャクシが孵化した後に活性化されます。

ステージ45でオタマジャクシが摂食を開始すると、mRNAの濃度が高くなり、変態が完了するまでの発生過程では高い状態を維持します。一方、TR β 遺伝子は、変態までは発現しないか発現しても非常に低濃度で、その間は内因性甲状腺ホルモン T₃ または T₄ 濃度が上昇しています。実際、TR β 遺伝子は直接的な甲状腺ホルモン応答遺伝子です。

RXR 遺伝子のクローンを作成したときに、我々は RXR 遺伝子の発現を分析しました。ここに示しているのは RXR α の mRNA 発現または濃度です。ご覧の通り、TR α のように、RXR α は孵化のすぐ後からオ

タマジャクシが摂食を始める時までは高濃度で発現し、成長中も高濃度を維持します。

このような発現プロファイルは、受容体が発生において二重の機能をもっている可能性を示すものです。すなわち、TR/RXR は、オタマジャクシの変態前の成長期間に甲状腺ホルモン応答遺伝子を抑制する複合体をリガンドの欠如下で形成することです。すなわち、リガンド非結合型受容体は、変態の準備が整うまで動物が成長することを可能にしているのでしょう。

その後、 T_3 または T_4 が存在している変態の間は、この受容体はリガンド結合型になり、ここでは抑制されていた同じ遺伝子が活性化され、それにより、オタマジャクシがカエルに変態することを可能にしています。従って、問題は我々がこの二重機能をテストすることができるかどうかということです。

我々が行ったのは、実際にこのウィンドウ期間、すなわち発生の最初の数日間を利用することでした。アフリカツメガエルでは、ここ（受精）から（ステージ）35 までは 2 日間で、（ステージ）45 までは約 1 週間です。それで、我々は、このウィンドウ期間に受容体を誘導したら何が起るかという問題について考えました。通常ならばずっとあとで起る分子経路を再現することができるのでしょうか。

これを行う方法は実際にはかなり簡単です。ステージ 1 の受精卵を採取し、mRNA コード化 TR または RXR の一方または両方をその受精卵にマイクロインジェクトし、甲状腺ホルモンの存在下または欠如下で受精卵を育てます。

ここで我々が発見したのは、TR/RXR を加えずに、甲状腺ホルモンの欠如下では、正常に成長する対照動物が、甲状腺ホルモンだけを投与すると、最初の数日はまったく問題ありません。（ここに示しているのは）2 日齢の胚です。なぜなら、この試験系では受容体がないからです。

TR と RXR の両方を低濃度で過剰発現させると、ホルモンなしでは動物は正常ですが、ホルモンがあると異常が見られます。高濃度の TR/RXR を投与すると、ホルモンなしでも異常が生じます。形態がここから非常に異なることが分かります。

それは、リガンド非結合型受容体が転写抑制体であり、リガンド結合型受容体が転写活性体であるという考えと一致しています。受容体とホルモンを高濃度で投与すると、たいていの胚は成長途中で死亡し、間違ったステージでホルモンと受容体が過剰であると成長に影響を及ぼすことを示唆しています。

さらに重要な点は、この種のアッセイと甲状腺ホルモン応答遺伝子の分子分析を使用するときは、RXR が成長途中の動物の TR 機能に不可欠であることを発見したことです。すなわち、*in vivo* では、TR は RXR がなければ至適機能を果たさないということです。また我々は TR/RXR ヘテロダイマーがリガンドの欠如下で内因性甲状腺ホルモン応答遺伝子を抑制することを発見しました。

最終的に、リガンドの存在下では、TR/RXR はそれら同じ内因性甲状腺ホルモン応答遺伝子を活性化することができます。従って、これは実際には初期胚の過剰発現分析です。次の問題は、我々は実際に甲状腺ホルモン受容体が両生類の変態に重要であることを証明することができるかということです。すなわち、（発生の）もっとあとの時期における受容体の機能を示すことができるかという問題です。

ここで我々が行った方法は、吉里博士が言及された遺伝子導入法を用いることでした。この方法については詳しく述べずに、ここに異なるレベルの導入遺伝子を発現する 5 匹の（アフリカツメガエルの）オタマジャクシについて述べることにします。すなわち、異なる濃度でドミナントネガティブ TR を過剰発現させています。これは、最低濃度で、実際に検出可能な受容体がありません。そして、これは最高濃度のドミナントネガティブ（の過剰発現）です。

我々が発見したのは、これらの動物に 1 週間にわたり甲状腺ホルモンを投与すると、甲状腺ホルモンなしで、この動物が変態に進むことです。甲状腺ホルモンの欠如下または高濃度のドミナントネガティブ受容体の存在下では、口の形態が四角ではなく、とがっていることがご覧いただけます。

我々は、形態の変化がドミナントネガティブの過剰発現の濃度と逆相関していることを発見しました。また、さらに重要な点は、甲状腺ホルモン応答遺伝子の発現を解析したときに、高濃度のドミナントネガティブ甲状腺ホルモン受容体を発現させると、ホルモンによる内因性甲状腺ホルモン応答遺伝子の誘導が行われないことを発見したことです。この種の分析は、甲状腺ホルモン受容体が形態と分子レベルの両方で両生類の変態に重要であることを証明しています。

次の問題は、それがどのように機能するかということです。多くの研究室で行われている *in vitro* 研究

と組織培養細胞研究に基づいて、甲状腺ホルモン応答遺伝子は、変態に重要な遺伝子であり、胚形成において最初に発現し、その際、受容体とホルモンが存在しないために低い基礎濃度で発現すると仮定または予測しました。

変態前のステージでは、TR/RXR が発現し、甲状腺ホルモンは存在しないが、それら受容体はターゲットサイトに結合する予測しました。この結合は転写を抑制しています。受容体がオタマジヤクシのターゲットに結合することができることを示すため、我々は比較的新しい方法を利用しました。それは数年前に開発されたいわゆるクロマチン免疫沈降アッセイすなわち ChIP アッセイです。

簡潔に述べると、このアッセイで行うのは、動物組織または胚全体から核を分離することです。次に、タンパクに DNA をクロスリンクさせ、次に超音波処理して小片に分けます。それから、我々が興味を持っている甲状腺ホルモン受容体またはタンパクに対する抗体を使用して、受容体タンパクに免疫沈降反応を生じさせます。受容体が *in vivo* でターゲットに結合するのならば、DNA は抗体と受容体と共に沈降するはずですが、その後、DNA を精製すると、どのような遺伝子が受容体で結合されているかを検討することができます。

我々がこのアッセイを実施したときに発見したのは、TR または RXR に対する抗体を使用して、TR β 遺伝子プロモーターと TH/bZip 遺伝子プロモーターの 2 つのプロモーターを分析すると、両方の遺伝子が甲状腺ホルモン応答因子を含んでいることです。そのため、我々はプロモーターの甲状腺ホルモン結合領域を分析しました。

我々が発見したのは、ステージ 20 の胚では、TR と RXR については、ごくわずかの結合しかないことです。また、TR α と RXR α が高濃度で発現するステージ 47 のオタマジヤクシを観察すると、TR が両方のプロモーターに結合しており、RXR も同様で、強化された結合がたくさん観察されます。受容体が結合することを確認した後、我々は、それがどのようにして転写を抑制するかを調べました。

再び、哺乳動物や組織培養細胞の研究および *in vitro* 研究を参考に、コリプレッサー複合体が誘導されると予測しました。最も研究が進んでいるコリプレッサー複合体の 1 つは、いわゆる N-CoR コリプレッサー複合体です。N-CoR 複合体は、ヒストン脱アセチル酵素複合体であることが知られています。我々は、アフリカツメガエルの N-CoR のクローンを作成し、TR/RXR により N-CoR がこれら変態前のオタマジヤクシのターゲットに誘導されるかどうかを調べました。

その結果は、イエスです。ステージ 45~55 のオタマジヤクシの尾と腸の両方の（アフリカツメガエル）N-CoR に対する抗体を使用して ChIP アッセイを行うと、対照群では、尾で両方のプロモーターが N-CoR により結合されることが観察されます。そして甲状腺ホルモンを加えると、コリプレッサー複合体は外れると考えられています。実際、我々は尾と腸の両方でコリプレッサー複合体の結合が外れることを発見しました。

既に申し上げた通り、コリプレッサー複合体はヒストン脱アセチル酵素を含んでいます。従って、オタマジヤクシに甲状腺ホルモンを投与すると、コリプレッサー複合体が外れ、そのため脱アセチル酵素も除去され、その結果、プロモーターにおけるヒストンアセチル化レベルが増大すると予測しました。

再び、アセチル化ヒストン H4 に対する抗体を使用して ChIP アッセイを行い、プロモーターにおけるアセチル化レベルを検討しました。ここに示しているのは、TR β と TH/bZip プロモーターの両方で、甲状腺ホルモン処理の用量の増加に伴ってアセチル化レベルが増大することです。

我々は、陽性対照として、ヒストン脱アセチル酵素の非特異的阻害物質であるトリコスタチン A (TSA) を使用しました。TSA は日本のグループが最初に発見しました。ここに示しているのは、オタマジヤクシの TSA 処理が両方のプロモーターにアセチル化を誘発させることです。我々は陰性対照として腸の脂肪酸結合タンパク遺伝子プロモーターを分析しました。我々が知っているこのプロモーターは甲状腺ホルモンでは制御されません。ここで発見したのは、TSA はより高いレベルのアセチル化を誘発させるが、甲状腺ホルモンを投与してもアセチル化レベルが変化しないことです。

これらの種類の研究に基づいて、ヒストンアセチル化が甲状腺ホルモン応答遺伝子の転写を調節する役割を果たしていると推理しました。すなわち、ヒストンアセチル化レベルを増大させると、プロモーターからの転写も増加するはずですが、トリコスタチン A は人工的にアセチル化レベルを誘導させることがで

きるため、トリコスタチン A でオタマジックシを処理すれば、 T_3 と同じような甲状腺ホルモン応答遺伝子を誘発させることができるかどうかを検討しました。

答えは、イエスです。再び、腸を分析しましたが、簡単に説明するためには、全体を説明することが必要であり、動物全体を分析すると、転写の調節はかなり複雑です。時間が限られているので、ここでは詳しく述べません。

TR β 遺伝子と TH/bZip 遺伝子の RT-PCR による発現を観察すると、対照動物では、ごくわずかしこ発現しません。甲状腺ホルモン T_3 でオタマジックシを処理すると、両方の遺伝子が誘導されるのが観察されます。興味深い事であり、我々の予測と一致していることは、トリコスタチン A でオタマジックシを処理すると、人工的なヒストンアセチル化が誘導され、両方の遺伝子も誘導されることが観察されます。

この結果と我々の予測から、トリコスタチン A は甲状腺ホルモン応答遺伝子の転写を誘導させることによって甲状腺ホルモンのように作用すると思われるため、 T_3 の代わりにトリコスタチン A で変態を誘発させることができるのではないかと考えました。

この実験を行ったところ、驚くべきことに、TSA が実際に変態を遮断するというまったく正反対のことを発見しました。ご覧の通り、自然な変態を見ると、0 日目では変態前のオタマジックシです。さらに 10 日間成長させると、小さなカエルに変態し、尾がなく、前足と後足があります。

トリコスタチン A (TSA) を加えると、0 日目は問題ありませんが、10 日目に形態の変化が見られず、ほとんど変化は生じていません。我々は、甲状腺ホルモンで誘発させた変態でもこの種の分析を行うことができます。

ご覧の通り、対照動物を取る場合、処理はしません。次に約 5 日間にわたり甲状腺ホルモンを投与します。すると、TSA が肢の形成と体部と頭部の改変を誘発させるのが観察されます。しかし、 T_3 と共に TSA を加えると、すべての形態的な変化が遮断されます。

これは幾分驚くべきことでした。そこで、再び調査し、TSA が甲状腺ホルモン応答遺伝子を遮断しないことを確認しました。ここに示しているのは、対照動物の TR α が甲状腺ホルモンによって制御されず、どのような状況下でも変化がないことです。TR β は甲状腺ホルモンにより誘導されることが知られています。こちらは対照動物で、ここで観察されるのは、 T_3 は、TR β を誘導し、さきほど申し上げました通り、TSA は TR β 遺伝子も誘導しています。

T_3 と TSA を一緒に加えると、(T_3 による) 誘導は抑制されません。いくつかの他の甲状腺ホルモン誘導性遺伝子を観察すると、同じ結果が得られます。すなわち、TSA は甲状腺ホルモンにより誘導された甲状腺ホルモン応答遺伝子の転写を阻害しません。

従って、問題は、TSA はどのようにして変態を遮断するのかということです。そこで、さらに下流の遺伝子を分析しました。さきほど申し上げました通り、甲状腺ホルモンが遺伝子調節カスケードを誘導させます。初期の遺伝子があり、次に後期の遺伝子があります。後期の遺伝子は、甲状腺ホルモンにより間接的に調節されます。最初の 2 つの遺伝子を分析したところ、甲状腺ホルモンによるダウンレギュレーションを受けます。

すなわち、2 日目に腸脂肪酸結合タンパク遺伝子 (IFABP) を観察すると、どのような処理であっても何の変化もありません。しかし、3 日間にわたり処理した後は、 T_3 は間接的にこの遺伝子の抑制を誘導し、TSA は何もしません。しかし、 T_3 と共に TSA を加えると、このダウンレギュレーションが妨げられます。

しかし、リン酸ナトリウムコトランスポータ遺伝子は、甲状腺ホルモン誘導性遺伝子の 1 つで、初期の遺伝子の 1 つです。ご覧の通り、 T_3 は最初の 1 日または 2 日後にリン酸ナトリウムコトランスポータ遺伝子を誘導します。しかし、動物をより長期にわたり処理すると、この遺伝子は甲状腺ホルモンによって抑制されます。ここでご覧頂ける通り、3 日間にわたる処理後は、この遺伝子は抑制されているのに対し、対照動物には誘導も抑制もありません。従って、 T_3 処理は 3 日後に抑制効果を示します。

今度は TSA を加えると、TSA は初期には T_3 のように作用し、この遺伝子を誘導します。なぜなら、TSA はヒストン脱アセチル化を遮断するからです。次に 3 日後に、この遺伝子が依然として発現していることが観察されます。しかし、 T_3 と TSA を同時に加えると、誘導は妨げませんが、抑制を妨げます。すなわち、下流の後期のイベントは TSA により遮断されます。

さらに、我々は（ヒストン脱アセチル酵素である）Sin3 と Rpd3 の 2 つの遺伝子を分析しました。両方の遺伝子は、甲状腺ホルモンにより数日間の処理後に誘導されました。それらは後期に誘導される遺伝子です。ここで分かるのは、TSA と T_3 を同時に加えると、TSA が誘導を遮断するという事です。従って、この結果は、この動物が成体の臓器を発生させるために変態の後期ステージでヒストン脱アセチル酵素複合体を利用していることを示唆しています。

最後に重要な点を再び指摘して、受容体機能に関する私の話を終えたいと思います。甲状腺ホルモン応答遺伝子は通常は基礎濃度で発現し、それら甲状腺ホルモン応答遺伝子の多くは実際に形態発生と器官発生に関与している遺伝子です。従って、それらの最初の発現は基礎濃度ですが、胚形成でオタマジャクシの臓器の発生を可能にするために重要な役割を果たしています。

オタマジャクシが発生を完了すると、それら遺伝子は必要でなくなり、それら遺伝子は機能を停止しなければなりません。機能を停止するために、この動物はリガンド非結合型受容体を発生上のスイッチとして用いています。このことは重要であると思います。なぜなら、それら同じ遺伝子が変態のときに成体の臓器を発生させるために再び使用されるからです。従って、それらの遺伝子を永久的に停止することはできません。発生上のスイッチを使用することが必要です。スイッチとしてはリガンド非結合型受容体の機能を使用しなければなりません。

この受容体が変態前のオタマジャクシのターゲットに結合します。そして、これが、それら遺伝子を抑制して、動物の成長を可能にします。この成長期間がなければ、動物は適切に成長しません。それから甲状腺ホルモンが現れ、コリプレッサー複合体が消え、そしてコアクティベーターであるヒストンアセチルトランスフェラーゼ複合体が誘導されます。そしてこれがそれら遺伝子を活性化して、変態の進行を可能にします。

しかし、この活性化は単に最初のステップに過ぎません。下流には調節を必要とする数多くの遺伝子があり、下流でのイベントにおけるそれら遺伝子の調節にも脱アセチル酵素複合体が必要です。この種の二重機能モデルは両生類に特有ではないかもしれませんが。実際、私は数年前に行われた J. R. Tata 博士のプレゼンテーションからこのパネルを借用しました。このパネルは、ヒト胎児の血漿中の甲状腺ホルモン濃度を観察すると、我々が両生類で発見したものと類似したパターンが見られることを示しています。

変態のときには甲状腺ホルモン濃度がピークに達するのが観察されます。しかし、ヒト胎児の甲状腺ホルモン濃度を観察すると、妊娠と胎児の発生の最初の 5 カ月には、甲状腺ホルモンは非常にわずかか、検出不可能であり、この時期は受容体が抑制体として作用しているオタマジャクシの変態前の期間に類似していると言えるかもしれません。

次に、変態期または周産期には、甲状腺ホルモン濃度が上昇します。詳しくは述べませんが、哺乳動物の発生と変態には発生上のプロセスに多くの類似性があります。我々が両生類の研究で発見したものは、少なくともある程度は、哺乳動物の発生にも当てはまると思います。現在または将来において両生類または哺乳類のホルモン濃度を変調する薬剤や内分泌攪乱化学物質は、発生を変調させるという意味では、同様の作用があるに違いありません。

最後に、この研究に携わったすべての人々に感謝の意を表したいと思います。初期の胚への注射を行った研究は、以前ポスドクとして参加していた Monika Puzianowska-Kuznicki と Sash Damjanovski が行いました。ChIP アッセイと TSA の研究は、以前ポスドクとして研究していた Laurent Sachs がほとんど一人で行いました。N-CoR のクローン作成は Laurent Sachs と Peter Jones が行いました。遺伝子導入の作業は、スライドを 1 枚のみご覧頂きましたが、Dan Buchholz が行いました。そしてこちらに示しているのが、現在行われているコアクティベーターとコリプレッサーの研究のいくつかに関与している他の 2 名のポスドクです。ご清聴ありがとうございました。

質疑応答

吉里：ディスカッションの時間が少しあります。
シ博士への質問または議論がありましたらどうぞ。

質問：TSAを用いたパルス処理を試みましたか。

シ：パルス処理ですか。いいえ、行っていません。

質問：あなたは、ChIP アッセイを用いて、TR β (および TH/bZip) プロモーターを調査されています。この ChIP アッセイでは他の遺伝子はありましたか。

シ：我々が試みた時には、実際に TH/bZip と TR β の 2 つのプロモーターだけがありました。そして両方とも同じ挙動でした。現在では、ストロメリシン 3 プロモーターに TRE を発見していることを指摘しておきます。Laurent (Sachs) は Barbara (Demeneix) と一緒に今フランスに戻っていますが、Barbara がそれについて良く知っているかもしれないと思います。彼女はストロメリシン 3 遺伝子に結合する TR を分析しようとしています。しかし、私はまだ知りません。

質問：あなたは甲状腺ホルモン受容体の発現を示されました。実際には、どの部分について話をされていたのですか。

シ：発現プロファイルです。かなり始めのほうでご覧頂いたチャートですが、それらは矢尾板博士と Dr. Brown が発表したものです。それらは動物全体を用いた研究でした。矢尾板博士が発表されたように、メッセンジャーレベルで個々の臓器を観察すると、それらは非常に多様です。どの臓器かによって異なります。しかし、一般にそれらは非常に相関性があります。変態の際にはメッセンジャーの濃度が上昇します。しかし、発現の濃度は異なりますが変態前の動物にも存在しています。

質問：つまり、あなたが仰っているのは、甲状腺ホルモン受容体の調節と発現に関しては組織の間に基本的に差がないということですか。

シ：差はあります。組織が異なれば濃度も異なります。

質問：しかし調節が異なるのですか。

シ：TR 遺伝子の誘導に関しては、TR β 遺伝子は我々や他の研究者が分析したすべての臓器において甲状腺ホルモンで活性化されています。実際、それは *in vivo* での機序を研究するためのモデルとして両生類を用いることの利点の 1 つです。なぜなら、すべての細胞に受容体があるため、この動物全体が組織培養基細胞のようであるからです。そのため、ChIP アッセイやあらゆるアッセイが可能です。

質問：いくつかの遺伝子は最初に ON にされ、3 日後に OFF にされると述べられました。また、ホルモンの欠如下で応答が停止するが、T₃ は依然として存在すると述べられました。では、どのようにして応答が停止すると考えていますか。

シ：TR β 、ストロメリシン-3、あるいは TH/bZip とこれを含む多くの遺伝子は腸に存在し、T₃ の存在下で約 3 日または 4 日後に、メッセンジャーは再び抑制されます。実際には抑制は細胞タイプの永久的な変化を反映しており、受容体を介したものではないと思います。それは部分的にはリプレッサー遺伝子や他の活性体の活性化や抑制に起因しています。

ご存知の通り、それぞれの遺伝子やプロモーターはしばしば多数の転写因子を含みます。従って、他の転写因子が変化して、それが抑制を誘導している可能性があります。一例にリン酸ナトリウムコアクティベーターのケースにおける可能性のある機序について述べると、リン酸ナトリウムコアクティベーターは腸の上皮細胞のみに発現し、3 日後に幼生の上皮細胞はアポトーシスに進みません。細胞が死にかけているため、遺伝子が OFF になります。

これが可能性のある機序の 1 つです。その後成体の上皮細胞が分化するときに、この遺伝子は実際に再活性化されます。そしてそれは甲状腺ホルモンに依存しているかもしれないし、そうでないかもしれません。そこには異なる機序があるかも知れません。

質問：ChIP アッセイを用いた際に遺伝子に何らかの
コアクティベーターがありましたか。何らかの
コアクティベーターが誘導されましたか。

シ：我々は実際にコアクティベーターに関して
ChIP アッセイを行っていません。我々は2つのコ
アクティベーターのクローンを作成するか、コア
クティベーターに対する抗体を作成しました。1
つはSRC-3で、もう1つはp300です。しかし、
ChIP アッセイは行いませんでした。我々はそれら

の発現を分析しました。それらは変態の際に表現
され、そして、SRC-2ではなく、SRC-3が実際に
甲状腺ホルモンによって誘導されましたが、それ
は3日後の遅発性の応答です。SRC-2は変化しま
せん。また、SRC-1は（アフリカツメガエル）で
はまだクローンを作成していません。

吉里：シ博士、素晴らしい発表をありがとうございました。