

セッション2 カエル

無尾類の変態 - 幼生から成体への組織再編の仕組みの研究及び甲状腺攪乱物質を検出するための魅力的生物過程 -

吉里 勝利

広島大学

無尾類幼生は水棲から陸棲への生活環境の変化に合わせてその組織を成体組織に再編します。この再編は変態と呼ばれ甲状腺ホルモン (TH) によって引き起こされます。私達は、これまで、この過程に主要な役割を果たす細胞や遺伝子・蛋白質を明らかにするために、皮膚に注目して研究してきました。さらに、これらの細胞の生物学的性質や分子の発現に対するTHの作用とその機構を明らかにする研究を展開しています。発達段階初期の幼生の全身は均一な幼生皮膚で覆われています。やがて、カエルの種類によって異なりますが、一定の段階になりますと、皮膚変換中心が体の一部に出現します。この中心で、幼生皮膚は前成体皮膚に変化します。この中心は、将来成体の真皮になる第2次結合組織が表皮基底膜とコラーゲン層の間に形成されるという組織変化が起こっている場所として認識できます。皮膚変換中心は幼生皮膚と前成体皮膚の前線成す境界線です。この中心は体全体に移動しますが、尾域には前進できません。

中心での皮膚変換は表皮・間充織相互作用を伴って進行します。まず、未同定の間充織因子が幼生表皮基底細胞に作用してこれを前成体基底細胞に分化させます。前成体基底細胞はPDGF (platelet-derived growth factor) -Aを分泌し、この受容体 (PDGFR-a) を発現している間充織細胞を活性化します。実際、幼生皮膚を培養して、PDGFR tyrosine kinaseの阻害剤 (AG1296) や機能欠失型PDGFR-aを培養液に添加しますと、THは間充織細胞を活性化できず、その結果、幼生皮膚を成体皮膚に変換できません。私達の最近の実験結果は、活性化間充織細胞は第2次結合組織を構築する共に、FGF-10を分泌して、その受容体FGFR2IIIbを発現している前成体基底細胞を成体基底細胞に分化させるという考え方を支持しています。これら変換中心で進行する表皮・間充織相互作用はTHによって促進されます。

上述したことから明らかなように、THは変態過程の引き金であるばかりでなく、その後の変態の進行を制御しています。このため、無尾類の変態は、甲状腺攪乱物質を検出するためのユニークでかつ単純な生物反応系となり得ます。ある物質をオタマジャクシに与えた時、変態過程が促進されたり抑制されたりすると、その物質は、甲状腺攪乱物質である可能性があります。そのような物質として、最近、私達はビスフェノールを同定しました。この物質でオタマジャクシを処理すると、変態が抑制されます。

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

シ ョンボ

米国 国立衛生研究所

甲状腺ホルモン(T3)は、胚形成や生後発達から成体の臓器機能や代謝に至るまで、非常に多様な生物学的過程に作用する。甲状腺ホルモンは両生類の変態を誘起する物質である。T3がその機能を発揮するのはT3受容体(TR)を介してであると考えられている。以前の研究により、カエルの発生においてTRとRXR(9 シスレチノイン酸受容体)のヘテロダイマーを用いた二重機能モデルの着想に至った。すなわち、TR/RXRが変態前期のオタマジャクシにおいてはリガンド非結合型抑制因子として働いて個体の成長を促進し、一方T3が結合すると転写活性化因子として働き、変態組織の変形を促すというモデルである。我々は、何種類かの相補的な手法でもってこのモデルを試験し、関与するメカニズムを調べた。

我々は、TRやRXRをアフリカツメガエルの胚に導入することで、TR/RXRヘテロダイマーはT3が加わると、変態期においてT3に反応することが知られている内因性遺伝子を成熟前の段階で活性化するが、それはTRおよびRXRの単独の場合では起こらないことと、T3が存在しない状況下ではこれらの遺伝子は抑制されることを明らかにした。変態期におけるTRの働きを調べるために、精子ベクター遺伝子導入法を用いてドミナントネガティブ性TRを発現する遺伝子組み換え動物を作成した。表現型を分析すると、ドミナントネガティブ性TRが過度に発現することで、甲状腺ホルモンTH誘導の変態を抑制していることが分かった。さらに重要なこととして、ドミナントネガティブ性TRは、我々や他研究者が以前特定したTH反応遺伝子の発現を特異的に阻害していることが明らかになった。

発生期の動物における遺伝子制御のメカニズムを明らかにする目的で、クロマチン免疫沈降アッセイを行なったところ、変態前のオタマジャクシでは、TR/RXRヘテロダイマーがT3反応遺伝子に選択的に結合することが明らかになった。さらに我々は、T3の結合によって、TRに結合したコリプレッサーであるN-CoRと、N-CoRを関連があるヒストン脱アセチル化酵素の遊離が誘導され、標的遺伝子のヒストンアセチル化レベルが上昇することも明らかにした。今回の結果は、胚子期以降の発生においてリガンド非結合型およびT3結合型の両方のTRが関与していることを強く支持するものであり、脊椎動物の発生系においてそれを示した初めてのものである。我々はさらに、ヒストンアセチル化レベルの変化を伴うクロマチン・リモデリングは、TRが*in vivo*(生体内)において遺伝子発現を制御するメカニズムとして考えられることを示した。

変態期の遺伝子制御におけるヒストンアセチル化の役割を直接調べるために、我々はオタマジャクシをトリコスタチンA(TSA)で処置して、内因性のヒストン脱アセチル化酵素を阻害した。これによりT3標的遺伝子の成熟前の段階での誘導が起こり、変態前のオタマジャクシにおいて、ヒストン脱アセチル化酵素がリガンド非結合型TRによる遺伝子抑制に重要なものであることが確認された。また、TSAブロックを継続処置すると、T3標的遺伝子の活性化には何の影響がないにもかかわらず、通常の変態及びT3に誘導される変態のいずれもが阻害されることから、脱アセチル化酵素が変態に必須であることも明らかにした。以上のデータにより、脱アセチル化酵素は発生の2つの段階で関与していることが考えられる。1つ目は、変態前のオタマジャクシにおけるリガンド非結合型TRによる転写抑制の段階であり、2つ目は、胚子期以降の組織の再構築におけるT3結合型TRによるTHシグナルのダウンストリームの転写制御の段階である。

両生類幼生の尾における甲状腺ホルモンによる筋細胞死の分子機構

矢尾板 芳郎

広島大学

血漿中の甲状腺ホルモン (TH) の上昇につれておきる両生類の変態において、四肢の発達や尾と鰓の退縮など、ほとんど総べての器官が変化する。退縮中の尾におけるTHによる細胞死の分子機構に関してはほとんど理解されていない。THによる尾の退縮には蛋白の新たな合成が必要とされ、それを根拠としてTHが退縮中の尾における細胞死を引き起こす遺伝子の発現を調節していると考えられている。幼生の尾の鰓や鰓の器官培養の際、THによってコラーゲナーゼ活性の上昇と器官の大きさの減少が観察されることから、THによるコラーゲナーゼ合成がコラーゲンの再構成に関わっていると思われる。退縮中の尾でTHによって発現が増減する多くの遺伝子がPCRを用いたsubtractive hybridizationにより単離され、*in situ* hybridizationにより解析された。Stromelysin-3やcollagenase-3などの細胞外基質を破壊する酵素は、筋組織をとりまく皮下線維芽細胞では高く発現しているが、尾の筋組織では発現していない。これらの酵素は筋繊維が付着している筋腱結合部位でもよく発現している。これらのことから、THにより分泌性のマトリックスメタロプロテアーゼが増加し、筋腱結合部位が破壊され、筋細胞が細胞外基質から離れ細胞死が起きると考えられている (他殺説)。この考えは、正常上皮細胞と細胞外基質の間の結合が壊れることによるアポトーシス、即ち、“*anoikis*”という現象により支持されている。

一方、私たちは幼生の尾由来の筋芽細胞株がTHによりアポトーシスを起こすことを報告しており、それは尾の筋細胞が自律的に死ぬことを示唆している (自殺説)。しかし、これは培養系の実験によるものであり、細胞外基質と結合している生体内細胞の生理的死を反映していない可能性がある。更に、TH処理された筋芽細胞が分泌した可溶性の因子により、相互に殺している可能性も否定できない。

ドミナントネガティブ甲状腺ホルモン受容体 (DNTR) はTH反応性塩基配列には結合するがTHには付かないので、正常甲状腺ホルモン受容体によるTH反応性遺伝子の転写を抑制する。基本的なメカニズムを調べるために、2つの方法をとった。最初に培養筋細胞の死へのDNTRの影響をみた。DNTRの過剰発現により尾由来の筋芽細胞株のTH誘導性細胞死が抑制された。次に、幼生の尾にマーカー遺伝子とDNTR発現型ベクターを注入し、筋細胞におけるマーカー遺伝子発現を自然な変態の間、観察した。対照の幼生ではstage 57で始まるマーカー遺伝子の発現の減少がDNTRの過剰発現により抑制されたが、尾が急速に退縮し筋細胞が丸まるstage 63における大量の筋細胞死は数日遅延したが起きた。いくつかのDNTRの過剰発現細胞は変態後2-3週間でも残っていた。以上の結果により、THはstage 57-62の間では尾の筋細胞の自殺 (細胞自律的な死) を誘導し、stage 62-64では筋肉を急速に完全に取り除くために他殺と自殺の機序を介して筋細胞死を執行するという仮説を提唱する。

内分泌攪乱化学物質検出用の遺伝子組み換えアフリカツメガエルモデル作成に向けた 甲状腺ホルモン反応性レポーター遺伝子の構成とその試験

バーバラ デメニーク、ナタリー チュルク、カロリーヌ アリオ、カリマ パルミエ

フランス 国立自然史博物館

現在では、多くの天然・合成化学物質が野生動物およびヒトの生殖や一般代謝に有害作用を及ぼすことに関する優れた文献が多数存在している。最初のうちは、一般的にエストロゲン様作用を持つ物質が注目され、多くの研究がなされた。しかし最近では、内分泌攪乱化学物質は内分泌系の全体、例えばアンドロゲン機能や甲状腺機能などにも影響を及ぼしうることが明らかにされてきた。

ヒトの活動の中で作り出されてきた数千種の化学物質のうちで、内分泌攪乱化学物質作用の有無について試験されたものは残念ながらわずかである。したがって、OECDを初めとする規制当局は、*in vitro*で(生体外)であっても*in vivo*(生体内)であっても各々異なる試験法を審査している。我々の研究室では、遺伝子組み換えアフリカツメガエル(参考文献: Coen et al. 2001 Proc. Natl Acad. Sci USA)を用いた両生類の変態による*in vivo*試験法を開発した。アフリカツメガエルモデルは、成体のカエルになる変態期までは水生のオタマジャクシであるので、化学物質を容易に水に添加することができる。またオタマジャクシの皮膚はかなり透き通っているため、侵入性手法を採らなくとも蛍光タンパク質の発現をスクリーニングすることが可能である。さらに、数千個の卵から同腹仔を得ることができるという利点もある。このようにこの*in vivo*手法は、*in vitro*の高生産性スクリーニング法の感度と量的能力に、試験物質の取込み、代謝、排泄を扱うことができる*in vivo*生理学系の利点を兼ね備えたものである。したがって、この手法は甲状腺攪乱作用を持つ化学物質のスクリーニングにおける強力なシステムになりうる。

我々が開発したモデルは、複合的レポーター遺伝子に蛍光タンパク質のホルモン感受性調節領域アップストリームを組み合わせたデザインを基本にしている。こうした構造をまず、アフリカツメガエルのオタマジャクシに由来する細胞を使って*in vitro*培養で試験し、続いて体細胞遺伝子移植検査法で試験した(de Luze et al. 1993; Proc. Natl Acad. Sci USA)。そのもっとも良好な構造を用いることで、アフリカツメガエルのいろいろなトランスジェニック系統が作成できる。次に、複数のプロモーターを試験する。その中には、組織や細胞において特異的な発現パターンを示すものもある。こうしたプロモーターをいろいろな蛍光遺伝子(ds RFPまたはGFP)と結合させることで、一つのトランスジェニック系統において2つの遺伝子構造を組み合わせることができるようになる。安定した高感度遺伝子構造が得られれば、既知の化学物質の用量作用実験を比較的短期間(48時間以内)で実行できるようになるはずである。同じ系統のオタマジャクシを、変態期における化学物質の影響をふまえて、長期間の化学物質による曝露影響を研究するのに用いることも可能である。

両生類の発生と内分泌生理機能へのポリ塩化ビフェニル類による影響

ロバート J. デンバー

米国 ミシガン大学

ポリ塩化ビフェニル類(PCBs)は、ヒトおよび野生生物において甲状腺機能を攪乱することが知られている。哺乳類に関してはPCBsによる甲状腺機能攪乱の作用部位としては、少なくとも2つが明らかになっている。その第1は、PCBsによって、UDP グルクロニルトランスフェラーゼを介したT₄抱合が変化することで、甲状腺ホルモン(TH)分泌/代謝が変化することである。第2は、PCBがトランスチレチン(TTR)の結合と競合することで、血中サイロキシン(T₄)の輸送を攪乱することである。哺乳類においては、TTRはT₄に特異的な結合タンパク質である。しかし哺乳類以外の生物種では、TTRはTHの生物活性型である3,5,3'-トリヨードサイロニン(T₃)と結合し、その結合親和性はT₄よりもはるかに高い。我々は、何種類かのPCB類または水酸化したPCB類の競争的結合アッセイを行い、ウシガエルの組換えTTR(rbTTR)に対して [¹²⁵I]-T₃との間で競争的結合活性を示すかどうかを判定した。種々なPCB類についてのT₄様性質及びT₃様性質を(ヒトTTRの観察研究および分子モデルの両方に基づいて)予測を評価することが、目的の一つである。調査した12種のPCB類のうち8種が、rbTTRに対する中程度から強度の親和性を示す結果であった。この所見から次のような結論が導かれる。(1)分子モデルに基づく、種々なPCB類が有するT₃様性質及びおよびT₄様性質の予測は、rbTTRへの競争的結合アッセイによって強く支持された。哺乳類TTR結合アッセイにおいて結合能を示さなかったPCB類(T₃様物質であると予測される)は、rbTTRに対しては [¹²⁵I]-T₃の強い競合物質である。これらT₃様のPCB類はいずれも、核内TH受容体との相互作用の可能性を何らかの動物種で調べられたことがこれまでになかったものである。これらのPCB類は(おそらく、その他の種類のPCB類も含めて)、そのT₃様性質によって、TH受容体に対するアゴニスト(または、アンタゴニスト)として作用する可能性があると考えられる。(2)哺乳類と両生類の間には、TTRと相互作用できるPCB類の種類に関して重要な種差が存在する。これにより、ある特定のPCB類が有する内分泌を攪乱する性質の予測は、対象とする動物の種類に大きく依存することが示唆される。(3)PCB類は両生類TTRと相互作用することが可能であり、このことは、オタマジャクシ期においてTH輸送が攪乱される、およびその結果としてのホルモン代謝や作用が攪乱される可能性があることを示している。ウシガエルのオタマジャクシにPCB類処理を実施したところ、発育が遅くなり、血清 [¹²⁵I]-T₃結合能および脳内T₃量に変化した。こうした変化によって、変態を制御する主要なモルフォゲンがTHである両生類では、THに依存する発育に対して有害な影響が起こる可能性がある。(ミシガン州五大湖保護基金による助成研究 [GL00-019])