

# 両生類における甲状腺ホルモン攪乱活性評価に向けた 体細胞および生殖細胞の遺伝子導入

バーバラ デメニーク

フランス 国立自然史博物館

ありがとうございます。最初に、主催者に対し、私を招いていただき、私たちのチームの研究について話す機会と、日本そして印象的な街である広島を再び訪れる機会を与えてくださったことに感謝いたします。本日私は、「両生類における甲状腺ホルモン攪乱活性評価に向けた体細胞および生殖細胞への遺伝子導入」というタイトルでお話しします。

まず、私の発表を手早く済ませたいと思います。吉崎先生とユンボ・シ先生が両生類における甲状腺ホルモン作用のメカニズムについて素晴らしい発表をなさいましたし、矢尾板先生が体細胞への遺伝子導入について発表してくださったので、私がこれからお話しする概念の一部は、皆さんはすでによくご存知だと思います。

私の研究室ではこの 10 年以上にわたり、両生類が変態するときの遺伝子制御を調べる目的で、体細胞への遺伝子導入法を開発してきました。つい最近には、すでに話題に出たクロル博士とアマヤ博士が開発した生殖細胞への遺伝子導入技術を取り入れました。

この研究は、パリの国立自然史博物館で行われました。私に許されたこの短い時間の中で、5 つの問題を急いで取り上げていこうと思います。その 1 つ目が、問題を定義することです。次に、*in vivo* での遺伝子レポーター試験を用いなければならない理由を説明します。そして、それを行う場合に用いなければならないのは体細胞と生殖細胞のどちらへの遺伝子導入なのかを説明します。次に、アフリカツメガエル (*Xenopus*) 属のどの種を使うべきかという問題を簡単に取り上げます。そして、甲状腺ホルモン攪乱活性を調べるものとしては、どのような遺伝子構成と試験プロトコルが最適かという問題についてお話しします。

さて、甲状腺ホルモン攪乱活性が話題になるときは、生体外化学物質の作用は模倣を遮断するのか、甲状腺ホルモン活性を変容するのかを判定する試験の構成が問題になります。生理学の立場で甲状腺ホルモン活性が問題になるときは、ここにいらっしゃるほとんどの方が理解されているように、アフリカツメガエルのオタマジャクシの変態が採用されます。この変態は典型的な甲状腺ホルモン依存性の発生過程であることは、先の講演者の方々が説明されました。また、この過程はトリヨードチロニンによって制御されていることを何年も前にパリ自然史博物館のジャック・ルルーが明らかにしました。

正しい時期に最小限の甲状腺ホルモンが存在しないと、オタマジャクシはカエルになれませんが、それだけでなくヒトの乳児がクレチン病になるということも忘れてはなりません。この病気は、かつては不幸にもよくある病気でしたが、今日では幸いなことに症例をほとんど見ることはありません。このような哺乳類なり両生類なりの発生系に化学物質が影響を与えるかどうかを明確にしたい時には、*in vivo* でのレポーター遺伝子試験を使う必要があると私も思います。

今日では、甲状腺ホルモンの血清中での輸送段階に干渉する甲状腺ホルモン攪乱物質が数多く知られていますが、攪乱が起きる段階がいずれであっても、トランスポーター段階の平衡が変化することで、遊離  $T_4$  および遊離  $T_3$  が変化するはずなので、当然それを調べます。

もっと直接的な作用がある場合には、標的遺伝子の転写の段階での影響を調べるのが常です。すなわち、先の 3 人の演者が話題にされた、甲状腺ホルモン応答配列の段階における転写活性の増減の影響を調べるわけです。

レポーター遺伝子として蛍光タンパク質遺伝子を導入した動物を用いると、*in vitro* 系が備える感度、特異性、低経費、必要とする試料が少量ですむ、高速処理/データベースによるスクリーニング法ができる、といった特性をすべてもたらし、同時に、物質の吸収、分布、代謝、排出といった生理面を考慮できるという *in vivo* 系が持つ長所を備えることができます。実は、*in vivo* 系にはもっと確定的な試験法があります。しかし、蛍光タンパク質遺伝子の導入を用いれば、*in vitro* 系の長所をすべて備えながら、こう

した作用のすべてを包括的に試験することができるのです。

では、*in vivo*系で行おうとした場合、体細胞と生殖細胞のどちらの細胞への遺伝子導入法を調べるべきなのでしょうか。先ほど言いましたように、私たちの研究室では、アンリク・アマヤの技術を最近採り入れ、中枢神経系のアポトーシスの研究にその技術を利用しています。

我々は、矢尾板先生の話にあったタンパク質の **Bcl-2** を過剰発現させました。その発現には動物の個体全体を用い、プロモーターとしてはすべての細胞で発現するもの、もしくは中枢神経系すなわちここに示しているように、脳や尾部神経に限定して発現するものを用いました。この技術で組織特異的もしくはホルモン特異的な反応のオン・オフを捕らえるには、この種のアプローチを採る必要があります。

しかし、体細胞の遺伝子導入を用いるほうが技術的にはもっと簡単です。これによって、制御の様子を調べたい遺伝子を調べたい組織に注入すると、筋組織や神経系において時間的・空間的な輪郭のはっきりとした発現が得られます。

しかも、用いる遺伝子構成の種類に応じて、プロモーターとその制御を同時に分析することが可能です。転写制御を調べるためには、**GFP** などのレポーター遺伝子が使えます。先ほどお見せしたように、転写が起こっているところではレポーター遺伝子が光り、起こっていないところでは光りません。もう一つのアプローチとしては、強力なプロモーターを用いて、調べたい遺伝子やタンパク質を強制的に発現させるということがあります。これだと、ある細胞や組織の中でのそのタンパク質の機能を調べることが可能になります。

そうするには、矢尾板博士のように裸の DNA を尾に注射することもできますし、リポフェクション試薬を混合した DNA を脳に注射することもできます。何枚かのスライドを急いでお見せします。尾に遺伝子を導入した後の  $\beta$  ガラクトースの発現、尾の **GFP** 像とその強拡大図、これは *Xenopus* の脳で、神経系の色々な細胞が **GFP** を発現しています。この赤いのは、*Xenopus* の脳室周囲の細胞における蛍光タンパク質です。*Xenopus laevis* を用いてこうしたことが可能であるならば、もっと効率の良い *Xenopus tropicalis* にも応用できるのではないのでしょうか。実際にはまさにその通りになります。

このスライドは、白が *laevis* におけるレベルを、ピンクが *tropicalis* におけるレベルを表しています。レポーター遺伝子のルシフェラーゼを脳に注入すると、光の相対強度で比べたり、タンパク質の重量 (mg) で標準化すると、同程度のレベルが得られます。同様に、尾に注入すると、光の相対強度は同程度のレベルになり、標準化すると *tropicalis* のレベルが若干低くなります。しかし、どちらの発現も依然としてとても高いレベルです。

体細胞への遺伝子導入を用いることに関してどんな議論があるのでしょうか。体細胞への遺伝子導入では、多数のいろいろな細胞系列を維持しておく必要がなく、生殖細胞遺伝子導入をする前に、組み合わせた遺伝子の機能を予備試験する方法として優れています。

しかし限界もあります。実験あたりのオタマジャクシが 100 個体を超えるような規模拡大が難しいのです。それに対して生殖細胞への遺伝子導入では、系統がいったん確立したならば、非常に多数の個体を得ることができます。バッチあたり数千個の胚も可能ですが、漏れのない低レベルのバックグラウンドを得るのが難しいことがよくあります。しかし、吉里博士が、まったく漏れのない動物のすばらしい例をいくつか見せてくださいました。

では、どちらの種を使うほうがいいのでしょうか。ここで、体細胞への遺伝子導入は *Xenopus laevis* と *tropicalis* の両方で利用できるという研究をご覧に入れます。今日までに、*tropicalis* の生殖細胞遺伝子導入に関する情報はあまり多くはありませんが、できることは確かです。

まだ言い足りないことがあります。それは、*tropicalis* において体細胞への遺伝子導入をする場合には、その個体を麻酔する必要があるのですが、*laevis* の場合にはその必要がありません。しかし、*tropicalis* には、変態の過程がずっと安定していて速いという優れた特長があります。

データを簡単にまとめてみました。*X. tropicalis* は、ステージ 58 から変態が始まり、ちょうど 9.5 日間で変態が完了します。それに対して *Xenopus laevis* はばらつきが大きく、我々の研究室の条件下では、13.5 日間から 18 日間までばらつきがあります。外来性物質が実際に変態を攪乱するかどうかを調べるために変態試験を用いるのであれば、非常に安定していて精度が高く、変化が速い *X. tropicalis* のほうが有利

なのは確かでしょう。

このスライドに、*X. tropicalis* の長所を挙げました。二倍体ですので、DNA アレイなどの機能ゲノミクスを利用する場合には、結果を比較するのに有利です。また、繁殖周期が短く、体型が小さいので、室内飼育にとっても向いています。

しかし現時点では、生殖細胞への遺伝子導入における *tropicalis* の有用性に関する情報があまりありません。また、明らかに脆弱です。それに対して *X. laevis* はずっと堅牢であり、卵のサイズが大きいので遺伝子導入が容易です。ただ、*X. laevis* は成熟するまでに時間がかかり、偽四倍体ですので、機能ゲノミクスのアプローチと組み合わせることが困難です。

結局、これら 2 種の動物を用いて甲状腺ホルモン攪乱現象を調べるには、どのような組み合わせや試験プロトコルが利用できるのでしょうか。甲状腺ホルモン様の物質の活性を調べることができるプロトコルが欲しいのであれば、短期間の転写試験が必要であり、それを実行するには、内因性甲状腺ホルモンの産生をブロックする必要があります。

オタマジャクシについて見てみると、甲状腺ホルモンの産生はステージ 44~50 に非常に低レベルで始まります。伝統的なチャートでは、高レベルの開始はだいたいステージ 58 からですが、オタマジャクシの形質転換受容性はすでに始まっています。すなわち、ユンボ先生が示したように、甲状腺ホルモンの受容体はステージ 44 から存在しています。

ただし、内因性ホルモンが存在していないので、過塩素酸ナトリウムで甲状腺ホルモンの産生をブロックする必要があることを忘れてはなりません。しかしそうすると、反応を調べる必要のある  $T_3$  依存性の受容体誘導も低下するという不利益が生じることになります。

そこで我々は、内因性の産生をどうすればブロックできるのか、そのうえでどうすれば  $T_3$  投与で有意な反応が得られるのかを検討するために、いろいろなプロトコルを試してみました。ステージ 55 のオタマジャクシを過塩素酸ナトリウムでブロックし、その 1 か月後に体細胞遺伝子導入によって  $T_3$  レポーター遺伝子を注入します。処置から 5 日間が経過すると、 $T_3$  反応が現れますが、大きくはありません。

我々は、 $10^{-13}$  という非常に低用量の  $T_3$  を短時間パルスで動物に投与し、数日間洗浄しました。すると、48 時間以内に  $10^{-8}$  の  $T_3$  という、ずっと良好で堅牢な甲状腺ホルモン反応が得られました。この反応により試験時間が短縮され、化学物質の甲状腺ホルモン攪乱作用の有無を、5 日間ではなく 48 時間で、しかも内因性ホルモンの干渉なしに調べることができるようになりました。我々はこの試験法を使って、 $T_4$ 、 $T_3$ 、および甲状腺ホルモンの類似物質である TRIAC を調べてみました。どの物質の場合も、基準レベルの 3~4 倍の転写が得られます。

同様に、例えば脳に、甲状腺ホルモン応答遺伝子である *c-myc* と組み合わせた *myc*-ルシフェラーゼを注入したような場合には、転写が抑制されます。私が考える理想的なプロトコルとは、疑いなくこの 2 種類の構造物を含んだものです。1 つは、赤い蛍光タンパク質と結合しており、もう 1 つは緑の蛍光タンパク質と結合しているものです。それによって二重に試験を行い、真の甲状腺ホルモン様活性を確実に調べられるようにするわけです。そのうえ、用量反応曲線を得ることができます。これは、TH/bZip とレポーター遺伝子の組み合わせを筋肉内に導入したものです。この種の前処置プロトコルで、良好な用量反応曲線が得られています。

結論です。*in vivo* でレポーター遺伝子試験をやれば、*in vivo* 系と *in vitro* 系の利点を合わせ持つことができます。遺伝子導入をするのは体細胞か生殖細胞かという設問に対する私の答えは、どちらも有用だが、体細胞のほうはプロトコルの予備試験において特に有用であり、生殖細胞のほうは大規模試験が可能になるということです。したがって、どちらかが他方より優れているということは、言えません。

*tropicalis* と *laevis* のそれぞれの種については、両方とも体細胞および生殖細胞の遺伝子導入を受け入れることができますが、系統の確立、ゲノミクス、変態の速さという点では、*Xenopus tropicalis* が大きな長所を有しており、そうした実験系を組みあげる価値はあるでしょう。

遺伝子の組み合わせについては、ポジティブとネガティブの調節遺伝子の両方ともこの試験法に利用可能であることをお見せしました。さらに、同じ個体の動物にその両方を同時に使うと効果的であることを強調しておきます。

詳しく述べる時間がありませんでしたが、巧みな生殖細胞への遺伝子導入のためには、遺伝子が染色体に組み込まれたときに、導入遺伝子と隣接した遺伝子との間の干渉を防ぐための絶縁体が必要でしょう。それには、ルシフェラーゼや蛍光タンパク質が使えます。

試験プロトコルの最適化については、同じプロトコルの中にポジティブとネガティブの配列を組み合わせるのがよいと思います。形質転換受容性を有したオタマジャクシを使う場合、アゴニストに関しては、過塩素酸のパルス処理を施すのならば、その形質転換受容性を維持させておかなければなりません、アンタゴニストに関しては、形質転換受容性を獲得する前のオタマジャクシでも作業が可能です。

最後に、私の共同研究者達に感謝の意を表したいと思います。ローラン・ザックスは *Xenopus* の体細胞遺伝子導入の技術を完成させてくれ、その後、ユンボ博士の下でポスドクになりました。ローラン・クーンは生殖細胞遺伝子導入を完成させました。ナタリー・チュルク、カロリン・アリオ、カリマ・パルミエ、セバスティアン・ル・ムブは、プロトコルに従った作業と、内分泌攪乱化学物質に適した構成をしてくれました。国立自然史博物館と CNRS がこの研究を助成してくれました。ご静聴ありがとうございました。

## 質疑応答

吉里：討論の時間が少しあります。質問をどうぞ。

質問：そうです。

質問：甲状腺ホルモン応答配列は、核内受容体スーパーファミリーに属する、例えばオーファン受容体といった他のいくつかの受容体とも反応します。そうしたメカニズムを通じての攪乱作用の排除は、どのように行っていますか。調べている化学物質が、甲状腺ホルモン反応を引き起こしているのか、それ以外の受容体反応を引き起こしているのかという点です。

デメニーク：USA 応答配列とともに GAL4 系を用いているのが、もっとも確かな方法でしょう。その系がいいと思います。この種の直接応答する配列を用いて、変態アッセイと組み合わせて、動物の変態が進行する速さを調べることで、対象にしている制御因子が TRE のレベルで作用していることと、その他の甲状腺ホルモン応答遺伝子のレベルで作用していることを示す生理学的な根拠が得られるでしょう。しかし、それはさほど重要な点ではありません。

デメニーク：ご質問の内容は、甲状腺ホルモン応答配列はその他の受容体とも反応可能かどうかということですか。

吉里：すばらしい講演をありがとうございました。

