

血球を用いた TNT など検出物質の「染色体障害能調査」を行うと共に、山田緑地と近傍地のカエルの遺伝子配列を比較して山田緑地カエルの遺伝子に変異が生じているかどうかを直接判定する「遺伝子比較調査」などを実施する予定である。

### 〔3〕 環境汚染モニター動物（トランスゲニックカエル）の作製

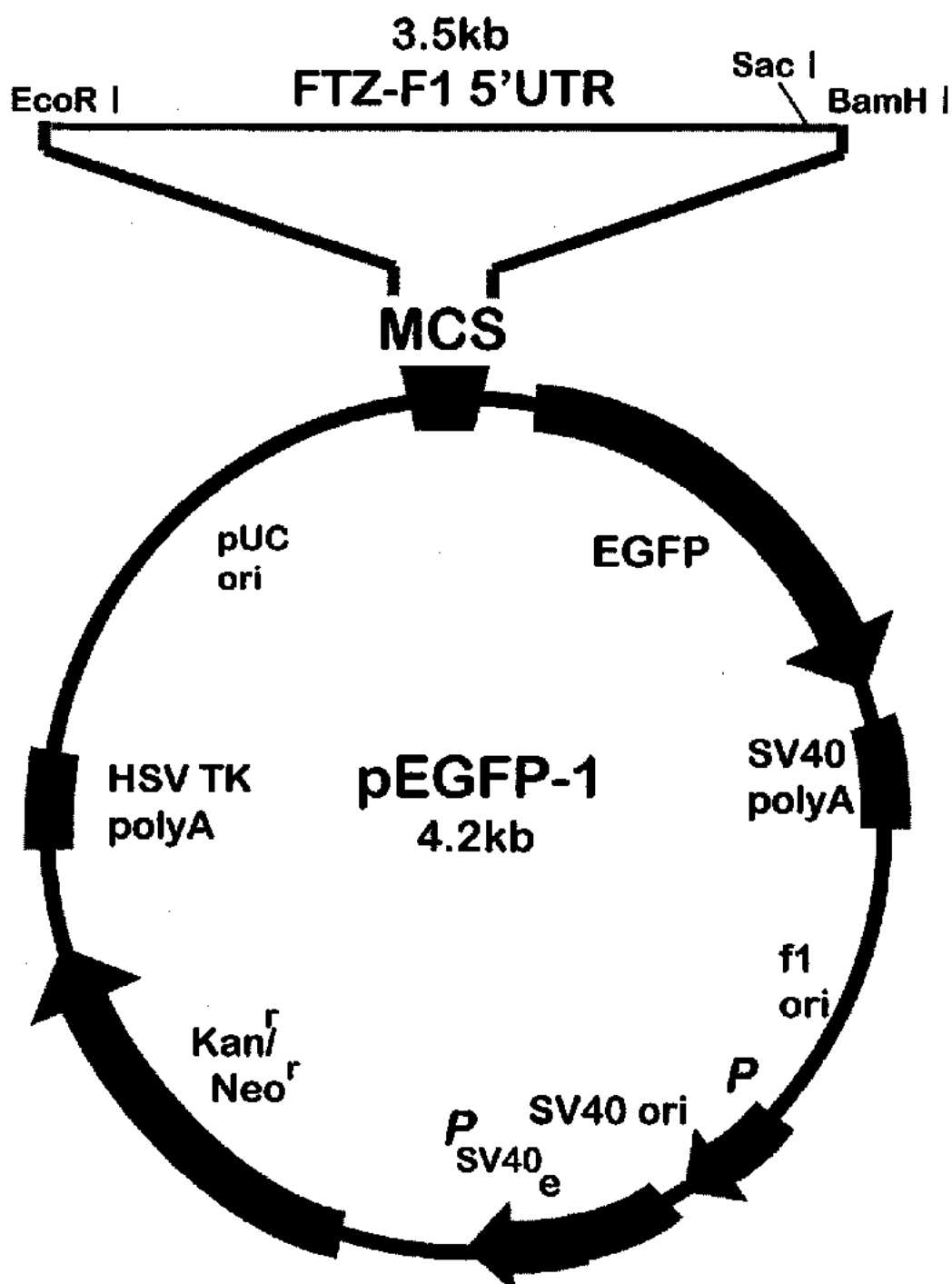
#### 〔結果〕

我々が単離した両生類の性腺で発現する *FTZ-F1* 遺伝子（中嶋ら, Gene 2000）を用いてトランスゲニックカエルを作製した。*FTZ-F1* 蛋白は、ショウジョウバエの体節形成に関わる *fushi tarazu* 遺伝子の転写調節因子として発見され、脊椎動物でも類似遺伝子が単離されていたが、その発現場所や機能は不明であった。しかし、我々の研究によって、次のことが判明した。*FTZ-F1* 遺伝子は、変態2ヶ月後、ツチガエル（亜成体）の卵巢の初期卵細胞で発現することを *in situ* ハイブリダイゼーション法によって確認した（高瀬ら, BBA 2000）。また、この蛋白の存在を *FTZ-F1* 蛋白に対する抗体を用い蛍光抗体免疫染色法で確認した（高瀬等, GCE 2001）。これらの結果を基に、*FTZ-F1* 遺伝子の転写調節領域（3.5-kbp；中嶋ら, Gene 2000）を GFP ベクターに挿入し、DNA コンストラクトを作成した（図1-1）。この DNA コンストラクトを制限酵素を用いて直線化した後、Kroll & Anaya の方法（Development, 1996；図1-2）でアフリカツメガエルの未受精卵に注入して発生させた。その結果、*FTZ-F1* 遺伝子の転写調節領域がプロモーターとして働き、変態2ヶ月後のアフリカツメガエル卵巢内の卵細胞で GFP 遺伝子が発現して蛋白が作られることが分かった（図1-3）。即ち、ツチガエルの卵巢内で発現する遺伝子をアフリカツメガエル卵にそのプロモーター領域を注入することによって変態3ヶ月後の卵巢内の卵細胞で GFP 蛋白を合成させることに世界ではじめて成功した。*Sf-I* をモニター遺伝子とするトランスゲニックカエルの作製については、現在、幼生を飼育しており（図1-3）、近日中に解析する予定である。

#### 〔考察〕

今回の実験でツチガエルの性腺で発現する遺伝子の転写調節領域をアフリカツメガエル卵に注入し、トランスゲニックカエルの作製に成功した。現在、カエルの変態に関与する甲状腺刺激ホルモンやその受容体遺伝子などを導入したトランスゲニックカエルが作製されている。内分泌攪乱化学物質の作用機序を解明するには、カエルの生殖系とは別の遺伝子（例えば変態に関与する遺伝子）が発現するトランスゲニックカエルを用いるよりも、生殖腺で発現する遺伝子を導入したトランスゲニックカエルを用いた方がよい。従って、我々が作製に成功したこのトランスゲニックカエルを使用すれば、その遺伝子の発現異常を指標として内分泌攪乱化学物質の性分化に対する影響を調べることができる。加えて、*Sf-I* 遺伝子の転写調節領域を導入したトランスゲニックカエルを作製することができれば、*Sf-I* 遺伝子が脳・生殖腺系列で非常に重要な役割を果たしていることから、複数の遺伝子をモニターとして、内分泌攪乱化学物質の生殖腺及び脳の性分化に対する影響を解析することが可能となる。我々が作製した汚染モニター動物（トランスゲニックカエル）は、今後、内分泌攪乱化学物質の作用機序を解明するうえで大きく貢献することになる。

図1-1 トランスゲニック用DNAコンストラクト



# トランスゲニックカエルの作製法

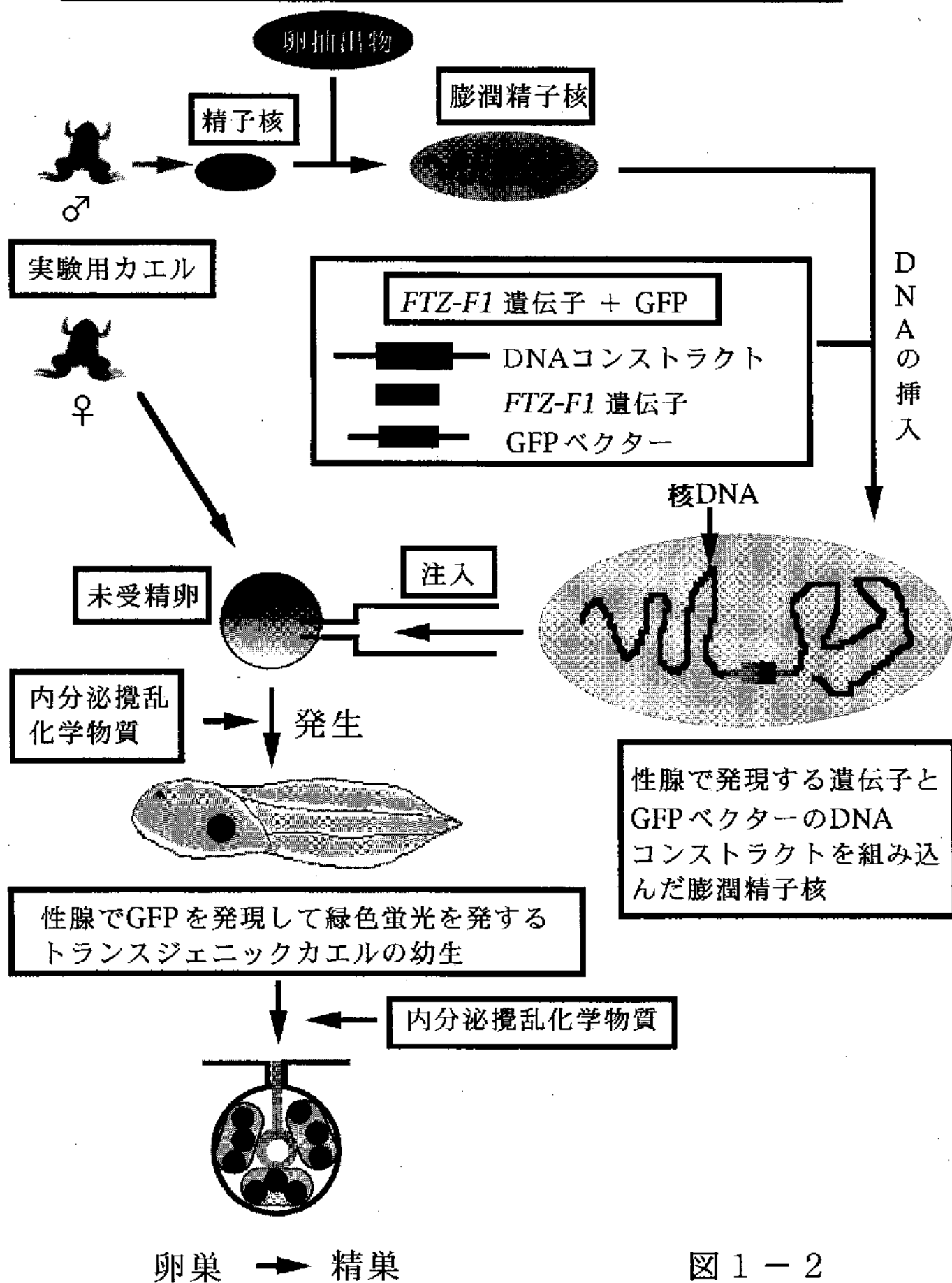
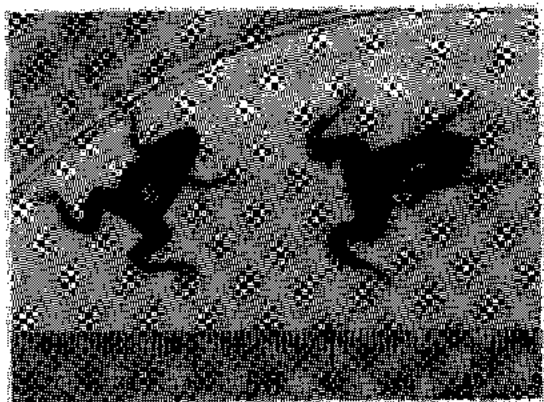


図 1 - 2



変態後2ヶ月のFTZ-F1トランスゲニックカエル

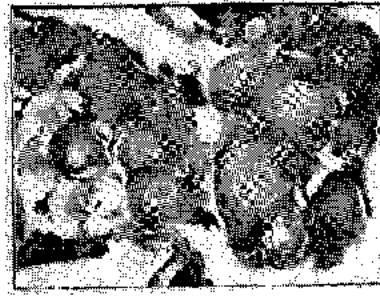
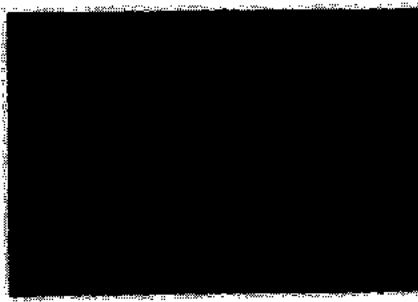
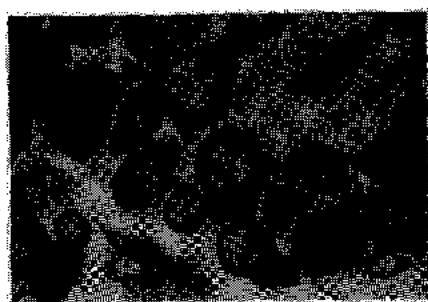


変態後6ヶ月のFTZ-F1トランスゲニックカエル

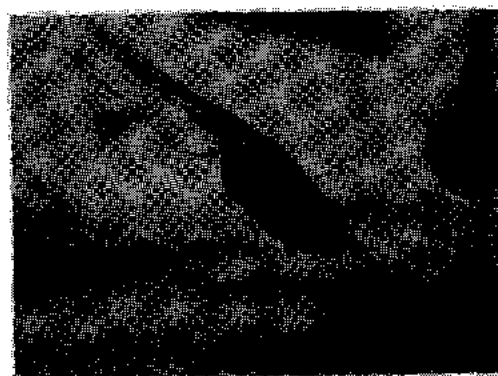
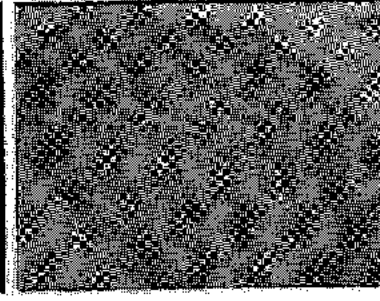
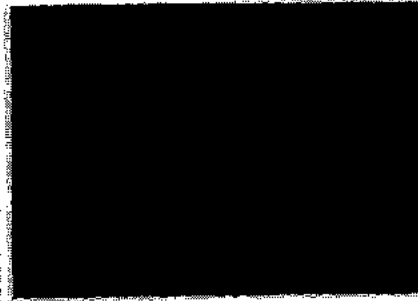
# トランスゲニックカエル変態2ヶ月後の卵巣

*in situ* ハイブリダイゼーション 蛍光免疫染色 (抗FTZ抗体) ABC免疫染色 (抗GFP抗体)

実験群



対照群



SF-1トランスゲニックツメガエル幼生

図1-3 トランスゲニックカエルにおけるFTZ-F1遺伝子の解析

## 参考文献

1. Minoru Takase, Satoru Noguchi and Masahisa Nakamura.  
Two *Sox9* messenger RNA isoforms: isolation of cDNAs and their expression during gonadal development in the frog *Rana rugosa*.  
FEBS Letters 466 (2000) 249-254.
2. Takeshi Nakajima, Minoru Takase, Ikuo Miura and Masahisa Nakamura.  
Two isoforms of *FTZ-F1* messenger RNA: molecular cloning and their expression in the frog testis. Gene 248 (2000) 203-212.
3. Minoru Takase, Takeshi Nakajima and Masahisa Nakamura.  
*FTZ-F1 $\alpha$*  is expressed in the developing gonad of frogs.  
Biochim. Biophys. Acta 91465 (2000) 1-6.
4. Minoru Takase, Takeshi Nakajima and Masahisa Nakamura.  
Expression of *FTZ-F1 $\alpha$*  in frog testicular cells.  
Journal of Experimental Zoology. 2001. In press.
5. Ki-ichiro Kawano, Shuichi Furusawa, Haruo Matsuda, Minoru Takase and Masahisa Nakamura.  
Expression of steroidogenic factor-1 in frog embryo and developing gonad.  
General and Comparative Endocrinology 2001. In press.

Investigation of the actual circumstances of amphibians in danger of extermination and making a Web site to gather informations of amphibian malformations in Japan, and production of transgenic frogs to monitor the environmental pollution

Masahisa Nakamura, Department of Biology, School of Education, Waseda University, Professor

Key words: actual circumstances, amphibians, malformation, toxic-test, TNT, transgenesis, model animal

The research consists of 3 parts: 1) Investigation of the actual circumstances of amphibians, and collection of information of amphibian malformations in Japan through a Web site. 2) The test for the toxicity of substances extracted from the soil in the Yamada-Ryokuchi area in the city of Kita-Kyushu on the life of frogs. 3) Production of transgenic frogs to monitor the environmental pollution.

We successfully collected information of deformed amphibians through the Web site which might be caused by chemical compounds such as EDC and dioxins. Investigation was also carried out to see the actual circumstances of amphibians (frogs and newts) in selected areas in the districts of Kanto, Hokuriku, Tokai, Shin-etsu, Chugoku and Okinawa. The investigation showed that amphibians are living in the severe natural circumstances. Interestingly, 10 malformed frogs (*Rana catesbeiana*) were found in the Kanto are, and also the Tokai and Okinawa areas by this investigation.

The previous study revealed that amphibian malformations are inherited through generations. Thus, we examined whether TNT and B(a)P extracted from the soil in the Yamada-Ryokuchi area in the Kita-Kyushu city have the toxicity on the frog life. The results indicated that they are toxic to the frog life. However, the soil in the Yamada-Ryokuchi area had no toxicity to damage the genomic DNA.

Finally, we succeeded to produce transgenic frogs to monitor environmental pollution by injecting a DNA construct of the 5'-untranslated region (5'-UTR) of the frog FTZ-F1 gene, which is expressed in immature oocytes in the frog ovary, and a pEGFP vector into the eggs of *Xenopus laevis*. The expression of green fluorescence protein (GFP) was tissue-specific in the transgenic embryos. As far as our knowledge concerns, this is the first report showing that transgenesis was carried out successfully using the promoter region of a specific gene, and that the 5'-UTR of the FTZ-F1 gene functioned in the ovary of transgenic frogs..

In this study, we have successfully obtained many results, but this research was performed in two years. Based on the findings obtained in this study, we conclude that investigation of the actual circumstances of amphibians in danger of exterminationfor should be continued, otherwise we would not be able to elucidate why the number of amphibians are declining and why frogs are deformed.