

学位論文要旨

Reexamination of the immunological rejection model on tail regression during anuran metamorphosis

(無尾両生類の変態での尾部退縮に関する拒絶反応説の再検討)

氏名 中井 裕也

アフリカツメガエルやネツタイツメガエルなどの無尾両生類の変態は、全身のほぼすべての器官や組織の作り替えを介して、水棲の幼生が陸棲のカエルへと変身する現象である。その中でも最も際立っているのは尾の退縮である。体長の2、3倍ある尾が数日で無くなる。その仕組みを説明するものとして3つの説が考えられている。第一の説として自殺説がある。これは、変態誘導ホルモンである甲状腺ホルモンが、尾の細胞に直接作用し、アポトーシスが誘導されるというものである。第二の説として他殺説がある。これは、甲状腺ホルモンが作用した尾の細胞が、細胞外基質分解酵素を大量に発現して、細胞外基質が融解し、細胞が付着する場所を失うことによってアポトーシスが誘導されるというものである。そして、第三の説として免疫学的拒絶反応説がある。この説では、幼生期には全身の表皮で発現している *Ouro1*、*Ouro2* 蛋白質が、尾の退縮が始まる直前から尾の表皮のみで発現するようになり、成体型となった免疫機構により *Ouro* 蛋白質が非自己として認識され、尾が拒絶されるという説である。今回、申請者はこの免疫学的拒絶反応説を検討するため、*ourol*、*ouro2* 遺伝子を破壊したノックアウトガエル、そして拒絶反応に重要な役割を果たす T 細胞が形成される器官である胸腺の形成に必要な転写因子 *Forkhead-box n1(Foxn1)* 遺伝子を変異させたノックアウトガエルをそれぞれ作成した。

免疫学的拒絶反応説におけるこれまで研究では、アフリカツメガエルを用いて進められてきた。しかし、四倍体でありノックアウトがしにくく、また成熟するのにかかる期間も長い。そのため本研究では、アフリカツメガエルの近縁種であり二倍体で、成熟するまでの期間が短いネツタイツメガエルを使用した。

まず、ネツタイツメガエルの発生過程における *ouro* mRNA や *Ouro* 蛋白質の発現パターンを調べて、アフリカツメガエルの発現パターンと同様であることを確認した。そして、TALEN 法により *ourol*、*ouro2*、そして *Foxn1* の各遺伝子を破壊したノックアウトガエルをそれぞれ作製した。

ノックアウトガエル作製方法としては、まず野生型の受精卵に各標的遺伝子を破壊するよう設計した TALEN mRNA を注入して F0 個体を作った。F0 個体では細胞ごとに様々な遺伝子変異を有するキメラ個体になっている。この F0 同士を交配させることで、各個体での全ての細胞が同じ遺伝子変異を共有する F1 の個体を得た。そして得られた F1

の遺伝子型を解析し、両方の対立遺伝子が **out-of-frame** もしくは開始コドンを含み数百塩基にわたる欠失変異が導入された F1 において標的遺伝子がノックアウトされたと判断した。

ourol 遺伝子をノックアウトした個体では、*ourol* mRNA の発現量が野生型と比べて激減しており、Ouro1 蛋白質は検出されなかった。さらに、Ouro2 蛋白質の発現量も減少し、かろうじて検出される程度であった。Ouro1 蛋白質と Ouro2 蛋白質は、これまでの研究で複合体を作ることが示唆されている。そのため、*ourol* 遺伝子のみをノックアウトしたにも関わらず Ouro2 蛋白質の発現量が減少していたのは、Ouro1 蛋白質が欠失したことで Ouro2 蛋白質の安定性が低下し、分解されたことが考えられる。

ouro2 遺伝子をノックアウトした個体では、*ouro2* mRNA の発現量が野生型と比べて激減しており、Ouro2 蛋白質は検出されなかった。同様に Ouro1 蛋白質の発現量も検出限界付近の発現であった。これは *ourol* ノックアウト個体で Ouro2 蛋白質の発現量に減少がみられた理由と同様に、Ouro2 蛋白質が欠失したことで Ouro1 蛋白質の安定性が崩れ、分解されたことが考えられる。

そして、これらの *ourol*、*ouro2* ノックアウト個体において、尾の退縮への影響を調べた。尾の退縮が始める発生段階から、尾の長さが体長の 1/10 になるまでにかかる期間を測定した。その結果、*ourol*、*ouro2* ノックアウト個体の尾は、どちらの場合でも野生型と同様の時間的経過で退縮した。つまり Ouro1 蛋白質、Ouro2 蛋白質が欠失した場合でも尾は正常に退縮することが明らかとなった。

胸腺上皮に発現し、胸腺の形成に必要とされる転写因子である *Foxn1* 遺伝子をノックアウトした個体では、胸腺が形成されず、脾臓における細胞傷害性 T 細胞の量が激減していることが確認された。さらに、*Foxn1* ノックアウト個体に、異系統のカエルの皮膚を移植したところ、この皮膚は生着し拒絶反応は見られなかった。つまり *Foxn1* ノックアウト個体では、非自己組織に対する拒絶反応機構が働かない免疫不全ガエルになっている。この個体において尾の退縮への影響を解析したところ、野生型と同様の時間的経過で尾は退縮していた。この結果から、非自己組織に対する拒絶反応機構が働かない場合でも、尾は正常に退縮することが明らかとなった。

したがって、Ouro1、2 蛋白質が欠失している幼生でも、非自己組織に対する拒絶反応が生じない幼生でも、尾は問題無く退縮することから、変態時の尾の退縮メカニズムの一つである「Ouro 蛋白質を抗原とする免疫学的拒絶反応説」は少なくともネッタイツメガエルでは起きていないことが考えられる。