

Title	実験モデル生物としてのアフリカツメガエル
Sub Title	African clawed frog : a model organism for various studies
Author	島田, 香(Shimada, Kaori) 原, 佑介(Hara, Yūsuke) 黒田, 裕樹(Kuroda, Hiroki)
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2020
Jtitle	Keio SFC journal Vol.19, No.2 (2019.) ,p.228- 247
JaLC DOI	10.14991/003.00190002-0228
Abstract	アフリカツメガエル (学名 : <i>Xenopus laevis</i> ゼノパス レービス)は脊椎動物を代表する実験モデル生物のひとつである。脊椎動物において初となる体細胞クローンはアフリカツメガエルを用いて作成されており、その研究はノーベル医学生理学賞の授与対象にもなっている。それ以外にも発生生物学分野や再生医学分野、ならびにがん研究分野など、様々な研究において活躍している。本論文では、アフリカツメガエルが利用されるに至った歴史的な背景、飼育方法、様々な利用方法なども交え、アフリカツメガエルの実験モデル生物としての重要性を紹介する。
Notes	自由論題 総説・レビュー論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=0402-1902-0228

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

[総説・レビュー論文]

実験モデル生物としてのアフリカツメガエル

African Clawed Frog: A Model Organism for Various Studies

島田 香

慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科修士課程

Kaori Shimada

Master's Program, Graduate School of Media and Governance, Keio University

原 佑介

慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科特任講師

Yusuke Hara

Project Lecturer, Graduate School of Media and Governance, Keio University

黒田 裕樹

慶應義塾大学環境情報学部准教授

Hiroki Kuroda

Associate Professor, Faculty of Environment and Information Studies, Keio University

Abstract: アフリカツメガエル(学名:^{ゼノバス レービス}*Xenopus laevis*)は脊椎動物を代表する実験モデル生物のひとつである。脊椎動物において初となる体細胞クローンはアフリカツメガエルを用いて作成されており、その研究はノーベル医学生理学賞の授与対象にもなっている。それ以外にも発生生物学分野や再生医学分野、ならびにがん研究分野など、様々な研究において活躍している。本論文では、アフリカツメガエルが利用されるに至った歴史的な背景、飼育方法、様々な利用方法なども交え、アフリカツメガエルの実験モデル生物としての重要性を紹介する。

The African clawed frog (*Xenopus laevis*) is an experimental model that represents vertebrates. Studies in which the first somatic cell clone in vertebrates were made using this frog are eligible for the Nobel Prize in Medicine and Physiology. In addition to it, it has been used in a variety of research fields such as developmental biology, regenerative medicine, and cancer research. In this paper, we will talk about the attractiveness of the African clawed frog, including the historical background in which it came to be used and other ways of using it.

Keywords: アフリカツメガエル、ゼノパス・レービス、体細胞クローン、発生生物学、J系統
African clawed frog, *Xenopus laevis*, somatic cell clone, developmental biology, J strain

1 アフリカツメガエルとノーベル賞

体細胞クローンという言葉の意味について正確に捉えるところから話を始めたい。生物個体AとBが存在し、AとBのそれぞれの細胞核に含まれる遺伝子の塩基配列が相同であるとすれば、AとBはクローンの関係にあると言える。例えば、「一卵性双生児の関係にある生物個体CとD」ならびに「個体Eの一部の細胞を培養してできた個体F」はどちらもクローンの例だ。ただし、後者の場合は特に「体細胞クローン」と呼ばれる。つまり、既に分化した組織や器官の細胞を由来として、その細胞と全く同じ塩基配列をもつ新個体が誕生したとすれば、それが体細胞クローンと呼ばれることになる。成体の一部の領域を元に次世代が形成される自然界の例として、植物では、オニユリのムカゴ、ベンケイソウの不定芽、イチゴのランナーなどがある。一方、動物においては限定的ではあるが、ヒドラの出芽、切断されたプラナリア、などの例がある。体細胞クローンは実験的に創られたものを指すイメージが強いが、これらも広義における体細胞クローンと言えるだろう。しかし、我々が属している脊椎動物では、自然界において体細胞クローンとして次世代を残す生物は存在しない。

ただし、人類の科学技術の発展はそれを可能にしている。2012年のノーベル医学生理学賞(山中伸弥博士と英国のジョン・ガードン博士に授与)の対象となった研究がそれにあたる。山中博士がiPS (induced pluripotent stem)細胞の作成系を確立されたことが日本では大きく報じられたが¹⁾、ノーベル委員会から公表された受賞理由は「成熟した細胞もリプログラミング能力を有することの発見(for the discovery that mature cells can be reprogrammed to become pluripotent)」にある。ガードン博士はアフリカツメガエルの小腸の上皮細胞の核を取り出し、それを核が取り除かれた受精卵に移植することで、小腸の上皮細胞を有していたアフリカツメガエルと相同のゲノムの塩基配列を移植された受精卵が有し、さらに個体として成長することを示した(図1)²⁾。

これが、世界初の脊椎動物における体細胞クローンの作成にあたる。この発見がなければ、成体のそれぞれの細胞にも失われた様々な組織を還元させる潜在能力が維持されていることに気づくために、人類はさらに多くの時間を費やしていたことだろう。ところで、なぜガードン博士は体細胞クローンを作成するためにアフリカツメガエルを選択したのであろうか。それは、アフリカツメガエルが「実験モデル動物」として既に存在しており、彼が目的とする実験に最適のものであったからだ。

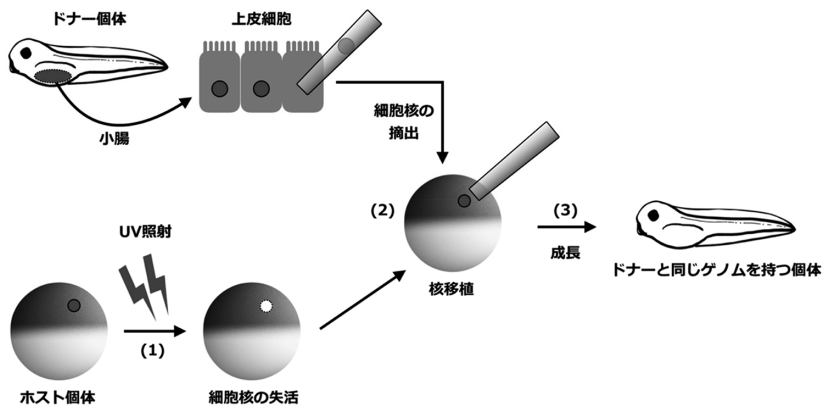


図1 世界初の脊椎動物を用いた体細胞クローンの作成

英国のガードン博士による研究。(1)紫外線照射により受精卵の核を失活させる。

(2)小腸の上皮細胞の核を移植する。(3)移植された核を有する卵はドナーと同じゲノム配列をもつカエルへと成長する。

実験モデル生物とは、多くの生物種(全ての生物種でもよい)において普遍的な生命現象を実験的に解き明かす際に、多くの科学者が共通して用いる生物のことである。対象となる生命現象を解き明かす上で、その生物を用いることで多くの例数が得られる、早く観察することができる、明瞭に観察することができる、飼育が容易であるなど、様々な利点を総合的に判断して選択される。また、多く利用されればされるほど、その生物に関する知見は蓄積されるため、それ自体も実験モデル生物としての価値を高めることになる。昨今では、実験モデル生物であれば、全ゲノムの塩基配列がわかっているこ

とも求められる。

本稿では、アフリカツメガエルが実験モデル生物として優れている点、どのような研究に応用されているのか、さらには今後の応用性などについて議論していく。

2 アフリカツメガエルの特徴

学名に含まれるゼノパス (*Xenopus*) とは「風変わりな足」を、レービス (*laevis*) とは「なめらかな」を意味するラテン語に由来している。実際、体の表面はぬるぬるとした粘液(無毒)で覆われており、うまく握らないと簡単に逃げられてしまう。体長はメスが12-15 cm程度、オスは8-12 cm程度である。後ろ肢の腹側3本の指には黒色の鋭い爪があるが毒は含まれていない(図2)。アフリカツメガエルの核相は複相(2n)であり、総染色体数は36本である(2n=36)。ただし、約1800万年前に比較的近い二種のアフリカツメガエルの祖先種同士が合体して、四倍体となり、その後の進化の過程の中で遺伝子の取捨選択・変化が加わったため、四倍体の名残を強く残した二倍体であると言える。それ故、異質四倍体と呼ばれる³⁾。2016年、アフリカツメガエルを用いて異質四倍体の生物としては初めて、ゲノムの全塩基配列の解読が完了したとする論文がNature誌に掲載された⁴⁾。ゲノムの倍化は、進化を考える上でも、今後の革新的な品種改良を行うためにも、極めて有用な要素となる。アフリカツメガエルのゲノムは、その指標を示してくれると言えるだろう。今後、アフリカツメガエルを用いたゲノム倍化に関する研究が大きく飛躍していくことは間違いない。

アフリカツメガエルの原産地は南アフリカ共和国である。現地のカエルも日本のカエルと同様に冬を体験したカエルが、春から夏にかけて産卵する。ただし、アフリカツメガエルは水温を20度前後に保てば、一年中、産卵することができる点で違う。卵が必要な時にホルモン(ヒト絨毛性ゴナドトロピン)を注射すると約12時間後に産卵を始める。これは未受精卵であり、ここにオスの精子を作用させることで体外受精が成立する。飼育条件が良ければ、一度、産卵したメスも2-4週間後に再び産卵させられる。一匹のメスが1回に3000個程度の卵を産むので、単純計算すれば年間数万個の卵を一匹のメスが提供し

てくれることになる。脊椎動物に属する実験モデル生物でも、この数は突出している。面白いことに、米国では上記の利点を妊娠判定に活用していた時代がある⁵⁾。妊娠した女性の尿には絨毛性ゴナドトロピンが含まれるため、カエルの飼育水に尿を追加すると、妊娠していればメスが卵を産むことになる、というシステムだ。

成体ではなく胚を用いて溶液を検定するFETAX (the frog embryo teratogenesis assay-*Xenopus*)という方法もある⁶⁾。現れた奇形の種類や量によって、水環境に含まれる汚染物質の存在をバイオモニタリングするという手法だ。米国のミズーリ州などでは、本格的に導入されているが、日本においても今後、水質試験手法のひとつとして導入されていくことが期待される。

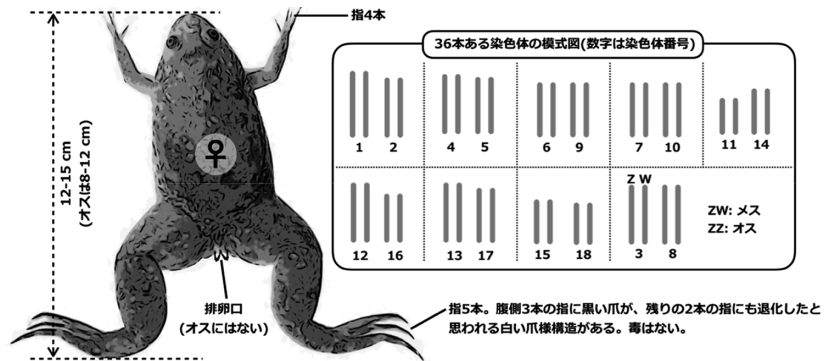


図2 アフリカツメガエルの特徴

総染色体構成は $2n=36$ であるが、約1800万年前に生じたゲノム倍化の影響をうけ、異質四倍体としての特徴をもつ。点線によって同祖型の染色体同士の組み合わせが分かるように表示した。3番染色体にはZ型とW型の2種類あり、ZZの場合にオス、ZWの場合にメスとなる。

3 実験モデル生物として選択された理由

一般のカエルと違い、アフリカツメガエルは幼生も成体も水中で成育する。つまり、飼育をする際にも陸地を準備する必要がない。これは、水槽ひとつあれば事足りることを意味する。また、水中に生息する小魚や昆虫なども捕食するが、大型魚やワニなどの大型動物の死骸も好んで食べる。つまり、動

かない対象物もエサとして利用できる。例えば、冷凍ミミズや生レバーなどはもちろんであるが、養殖魚に与える練り餌や浮き餌などでも良い。実際の飼育環境では、週に2-3回程度、数分で食べ切れる量の乾燥餌を与えることが多い。また、水質の大きな変化にも強い。例えば、金魚やメダカなどは水替えをする際に全体の半分以上の水を替えることは望ましくないとされる。一方、アフリカツメガエルの場合は、新しい水に総入れ替えをしても平然としている。この総入れ替えによって、飼育水中に病気の元となる菌やウィルスが発生しても、そのリスクを簡単に軽減することができる。これらを含め、アフリカツメガエルが実験モデル生物として飼育する上で優れていると見なされた理由を表1に箇条書きで示す。これらの背景から、後述する各種の研究において利用されたわけだが、それらの知見が蓄積されていることも、アフリカツメガエルが実験モデル生物として優れている理由となる。

また、アフリカツメガエルよりひとまわり小さく、西アフリカの熱帯雨林地域が原産となるネッタイツメガエル(学名: *Xenopus tropicalis*)も実験モデル生物として存在する。卵の直径はアフリカツメガエルが1.3 mm程度であることに對して、ネッタイツメガエルでは0.7 mm程度である。ネッタイツメガエルのゲノムの解読はアフリカツメガエルに先立って完了しており⁷⁾、アフリカツメガエルを用いて行う研究のほぼ全てをネッタイツメガエルを用いて再現できる。ゲノムはアフリカツメガエルのように異質四倍体ではない($2n=20$)。世代交代に必要な時間もアフリカツメガエルよりも短いため、次世代を必要とする研究などには向いている。実はアフリカツメガエルは遺伝学には適していないと言われていた過去がある。遺伝学の代表的な実験ストラテジーは、特定の遺伝子に変異が入ることによって正常型とは異なる表現型を示す個体を、その原因遺伝子と共に記載し、それらを掛け合わせるなどして、次の世代における影響を観察することにある。つまり、遺伝子を破壊する上でも、次世代を得る上でも、遺伝学には一定のスピード感が求められる。しかし、アフリカツメガエルを用いる場合にはそれが実現できなかったからだ。二倍体であるネッタイツメガエルを用いることによって、この欠点も補完することが可能になる⁸⁾。研究者は、自身の研究の目的や保有状況に従って、アフリカツメガエルとネッタイツメガエルを使い分けていると言える。これらのカ

エルを用いた研究成果を後述する中で、ネットアイツメガエルを用いたものも含まれることになるが、特に区別した記載はしない。

表1 アフリカツメガエルが実験モデル生物として優れている点

- ・ 陸地を準備する必要がなく、水槽のみで飼育が成立する
- ・ 水替えの際には水を総入れ替えることができる
- ・ 生き餌だけでなく、人工飼料なども食することができる
- ・ 実験モデル生物として取り扱い易い適度な大きさである
- ・ 飼育温度を一定に保つことで、通年にわたって産卵を促すことができる
- ・ 一度の産卵で約3000から5000個もの大量の卵を得ることができる
- ・ 発生速度が速い(一細胞期から泳ぐオタマジャクシに受精3日後に到達する)
- ・ 様々な胚操作が可能であり、その実験手法も確立されている
- ・ 顕微注入によって卵や胚の特定の部位に任意の物質を導入することができる
- ・ 全ゲノム配列の解読が完了している
- ・ 卵抽出液を用いると様々な細胞周期の状態を試験管内に再現することができる

4 発生生物学での利用

1つの細胞である受精卵が、細胞分裂と細胞運動を繰り返し、複雑な構造をした個体に変化する過程がどのようにして導かれるのかを明らかにする学問領域が発生生物学である。我々ヒトは脊椎動物(より正確には脊索動物門の中の脊椎動物亜門)に属している。脊椎動物には、我々が属する哺乳綱(一般名:哺乳類)の他に鳥綱、爬虫綱、両生綱、硬骨魚綱、軟骨魚綱、そして無顎綱が存在する。これらは、成体の段階では全く異なる形態を有しているが、受精卵から胚(発生の初期段階にあたる個体)となり、脊椎動物の基本構造ができるまでの過程(初期発生段階)に着目すれば、かなりの面で共通した機構が用いられている⁹⁾。それゆえ、この共通した構造がどのようにできあがるかを解き明かしたいという目的であれば、胚を研究対象にすることが望ましい。そして、脊椎動物の胚を研究対象にしたいならば、大量の卵が得られる、発生速度が速い、卵が観察しやすい(不透明の殻に包まれていない)、卵の取り扱いが容易である、といった要素を満たす生物を対象とした方が良いという考え方が自然と生まれる。その条件を満たす生物として、発生生物学者の絶大

な支持を得たのがアフリカツメガエルである。

アフリカツメガエルの初期発生期の各発生段階における特徴は、NieuwkoopとFaberらが詳細に記載しており¹⁰⁾、Xenbase (<http://www.xenbase.org>)というデータベースにおいて誰でも閲覧できる状態にある。各発生段階のそれぞれにおいて、興味深い形態変化や細胞運動、さらに特定の分子の発現などがあり、多くの報告が成されている。試しに*Xenopus*とdevelopment(発生)という単語を用いて最も一般的な文献検索サイトであるPubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)で検索を行うと2020年1月時点で15,000を超える科学論文の存在が確認できる。この膨大な情報をまとめるためには何らかの指標が必要であり、本稿では、おそらく多くの発生生物学者がアフリカツメガエルを用いる際に最初に連想する技術であろう「胚操作」と「顕微注入」という2つの要素に絞って、関連する研究成果の代表的なものを紹介する。

「胚操作」とは、胚の特定の領域を切り取り、そのまま活用したり、もしくは胚のどこかの領域に移植(胚移植)することである。その特定の領域の代表例がアニマルキャップ(AC)である。アフリカツメガエルの胞胚期(受精卵が

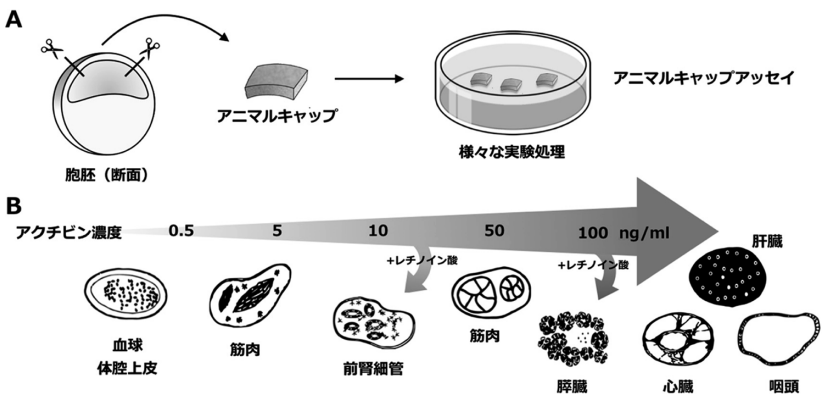


図3 アニマルキャップアッセイ

A) 胞胚期の動物極側の細胞群は分化の上で多能性を有しており、この領域(アニマルキャップ)だけを切り出して培養することができる。アニマルキャップに様々な処理をして、どのように変化するかを調べる手法をアニマルキャップアッセイと呼ぶ。B) アニマルキャップに中胚葉誘導物質であるアクチビンを作用させると(レチノイン酸などの物質を追加する場合もある)、濃度依存的に様々な組織・器官が誘導される。

分裂を繰り返して数千個程度の細胞数に至った状態の胚の動物極側(地球に喩えるならば北極側)の細胞層がそれにあたる(図3A)。アニマルキャップの細胞(AC細胞)の面白い点は、iPS細胞と同じ様に分化の上で多能性を有していることだ。AC細胞にアクチビンを代表とする様々な誘導剤を作用させることによって、心臓、腎臓、肝臓、網膜、脊索、等々の組織や臓器を作成することも可能である(図3B)¹¹⁾。今、iPS細胞などの幹細胞を用いて、ヒトの臓器や組織を作成する研究が盛んに行われているが、その研究にはAC細胞を用いて行われた研究成果が参考にされることが多い。

胚移植として、冒頭で述べたガードン博士による核移植の系もそのひとつとして含めることはできるであろうが、最も有名なものはオーガナイザーの移植実験である。アフリカツメガエルにおける研究成果ではないが、1924年にドイツの科学者であるハンス・シュペーマン博士と彼の指導学生であったヒルデ・マンゴールド氏は、イモリの原口付近の細胞群(原口背唇部)を、別の胚の原口の位置の反対側付近に移植することによって、双頭の胚が誘導されることを示した(図4A)¹²⁾。追加で生じた頭や胴尾のことを二次軸と呼ぶ。原口背唇部は、体の全体構造をオーガナイズできる領域という意味で、オーガナイザー(日本語では形成体)と呼ばれる。この発見によりシュペーマン博士には1935年にノーベル医学生理学賞が授与されている。尚、マンゴールド氏は1924年9月に自宅で生じたガス爆発の際に25歳の若さで逝去されており、ノーベル賞の対象にはなっていない。このオーガナイザーの移植実験はアフリカツメガエル胚を用いれば、より迅速に実施可能である¹³⁾。それ故、この領域を対象として調べた解析が数多く行われた(文献14にて総括)。例えば、Kellerらはオーガナイザー領域を2枚重ねあわせることによって、原腸陥入時に胚の内側で生じるために外からは観察することができない中胚葉が伸長していく様子を、試験管内で観察できる形で再現することに成功している¹⁵⁾。また、オーガナイザー領域にはコーディンと呼ばれるタンパク質が強く発現しており、卵の位置価の方向性を決定する働きを果たしている¹⁶⁾。脊椎動物は胚発生時に生じる原口が将来の肛門になることから後口動物に分類されるが、逆に原口が将来の口になる動物が前口動物であり、その代表格となる動物門が節足動物である。コーディンは分類学的に動物の中ではかなり離れた

位置にあるとされる節足動物にも存在することが確認されている。それゆえ、多くの動物門において胚の背側と腹側の方向性を決定する上でコーディンが用いられると考えられている¹⁷⁾。尚、オーガナイザーの移植実験により、二次的な神経構造が誘導されることは、鳥類や魚類の胚においても確認されている^{18), 19)}。

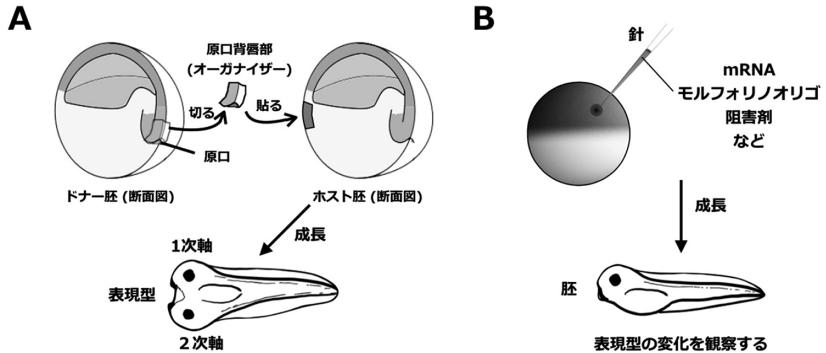


図4 アフリカツメガエルを用いて行える実験例

A) オーガナイザーの移植実験。原腸胚の原口上唇部を腹側領域に移植することによって、頭部から尾部構造までを含む二次軸が形成される。B) 顕微注入。極細のガラス針の内側に目的の物質が溶けた溶液を入れ、直接、卵や胚の特定の細胞に注入する。

「顕微注入」とはその名の通り顕微鏡下において何らかの物質を対象の中に注入することである。通常、極めて微細なガラス針に目的とする物質が溶けた液を充填し、専用の機械を用いて作業が行われる(図4B)。顕微注入は、多くの脊椎動物の卵や胚に対して行われるが、アフリカツメガエル胚では1細胞期の段階で既に将来背側もしくは腹側になる領域の特徴が色合いで確認できるため、方向を定めて顕微注入ができるという特徴がある。例えば、図4Aにおいて、オーガナイザーが二次軸を誘導できることを述べたが、ウイントというタンパク質を、それをコードした遺伝子の転写産物であるmRNAの形で、4細胞期や8細胞期の将来の腹側になる領域の細胞(割球)に顕微注入すると同じことが再現される²⁰⁾。これはウイントがオーガナイザーの働きを決定づける因子であるという印象を与えたが、少なくともアフリカツメガエルにおいて

はそうではない。なぜなら、将来のオーガナイザー予定領域にはウイントの発現は確認されていないためだ。その代わりにシャモアと呼ばれるウイントの下流で働く分子がオーガナイザーが形成される予定領域に発現し、かつウイントの場合と同じもしくはより完成度の高い二次軸を誘導することが分かっている^{21), 22)}。二次軸を誘導できる分子のみについて述べたが、任意の分子を目的の位置に注入できるため、様々な顕微注入を用いた研究が行われている。昨今、ゲノム上の目的の位置を編集できる技術としてクリスパー・キャス法が開発されている²³⁾。これはゲノム上の位置を指定するRNA (ガイドRNAと呼ばれる)と、その標的となる塩基配列を有すDNAを切断する酵素であるCas9 (キャスナイン)などを細胞の中に入れる必要があるが、顕微注入はそれを実現する最も簡易的な方法として用いられている。上述した通り、アフリカツメガエルのゲノムの解読は終わっており⁴⁾、顕微注入を用いたゲノム編集がアフリカツメガエルでも次々に実施されていくことになるであろう。

アフリカツメガエルを用いた発生学に関する研究は、上記の他にも様々な焦点に主眼を置いたものが存在するが、それぞれの分野の総説だけを紹介しておく(表2)。

表2 2008年以降に発表された発生学の特定分野に関する主な総説

卵成熟と受精	文献24, 25	性決定	文献44
中胚葉形成	文献26	変態現象	文献45-49
体軸形成	文献27, 28	再生現象	文献50-52
中枢神経系の形成	文献29	免疫系	文献53
各種の細胞運動現象	文献30-32	胸腺ホルモン	文献54
臓器形成(腎臓)	文献33-35	エフリンシグナル	文献55
臓器形成(消化管)	文献36	細胞周期	文献56
臓器形成(脾臓)	文献37, 38	細胞内骨格形成	文献57
臓器形成(心臓)	文献39	遺伝子組換え	文献58
枝芽形成	文献40, 41	GABA受容体	文献59
造血現象	文献42	メカノバイオロジー	文献60
生殖細胞の決定	文献43	イメージングの対象	文献61

5 医学基礎研究での利用

がん研究に対してアフリカツメガエルの貢献度は非常に大きい。がん細胞は自律的に細胞分裂を繰り返す、言わば悪玉の大將格とも言える細胞である。正常細胞であった頃は、生体が求めた時にのみ細胞分裂を行うはずであったのだが、細胞が分裂をするか否かを決定する機構が何らかの形で狂い、暴走してしまうことががん細胞化のひとつの要素である。それ故、細胞分裂の機構を理解することは、がんを理解する基礎研究と捉えられる。アフリカツメガエルががん研究において重宝される理由は、この細胞分裂に関する研究を進める上で欠かせない溶媒をアフリカツメガエル卵が提供するからである。

アフリカツメガエルの未受精卵を集めて遠心分離すると、卵黄の油成分から成る白い上層と卵の黒色成分から成る下層の間に半透明な液体の層ができる。これがツメガエル卵抽出液である。細胞分裂の過程には分裂を引き起こすM期とDNA複製を引き起こすS期という時期が含まれる。卵抽出液をそのまま用いるとM期の状態を試験管内に創り出せる(図5)⁶²⁾。一方、塩化カルシウムを追加した卵抽出液はS期の状態を創り出せる。またカルシウムイオンフォアを加えることによって、細胞分裂のサイクルが試験管内で何度も繰り返されることも知られている⁶²⁾。この溶液を用いて、染色体形成制御に関わるコンデンシン、セキュリン、そしてコヒーシンなどの発見に至った⁶³⁾。それ以外にも数多くの細胞分裂に関する研究成果が挙げられている⁶⁴⁾⁻⁶⁶⁾。がんの原因は、細胞分裂だけで説明できるものではなく、シグナル伝達や細胞死の制御、さらに免疫機構なども関わっている。これらの研究についてもアフリカツメガエルを用いて様々な研究成果が得られている(文献67にて総括)。

また、遺伝病のモデルとしてもアフリカツメガエルは重宝されている。遺伝病とは特定の遺伝子が欠損したり、塩基配列に変異が生じたことによって表れる病気のことである。ほとんどの遺伝子と、その遺伝子産物であるタンパク質の生理学的機能と反応系はヒトとアフリカツメガエルを含めた他の脊椎動物の間で高度に保存されている。この利点を利用したアフリカツメガエルにおける腎臓疾患モデル⁶⁸⁾や心臓疾患モデル⁶⁹⁾をはじめ、数多くのヒトの遺伝病を再現した研究がアフリカツメガエルを用いて行われている(文献70にて総括)。また、上述したようにアフリカツメガエルの全ゲノム配列の解読も

完了しており⁴⁾、今後、さらに遺伝病モデルとしてのアフリカツメガエルの利用は加速していくことが予想される。

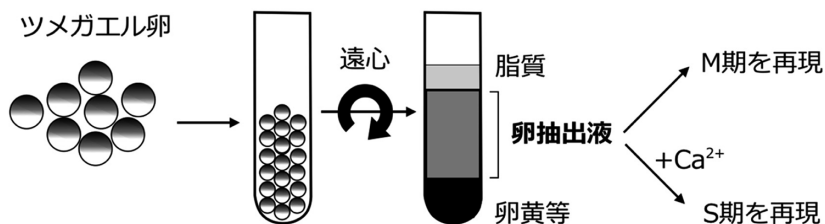


図5 卵抽出液を用いて細胞周期を自在に調節する方法

未受精卵をすりつぶした液を遠心分離した時の上清が卵抽出液となる。この溶液を用いて、無細胞系で細胞分裂に関する研究が多数行われている。

6 教育分野での利用

上記の研究は大学等の高等教育におけるものが主に想定されるが、初等・中等教育においてもアフリカツメガエルを教材として利用する価値がある。まず、アフリカツメガエルの養殖拠点は全国に数カ所あり、また需要のバランスに応じて計画的に匹数を調節することも容易にできることは、大きな利点と言えよう。また、上述した発生学の手順などは、遺伝子レベルでの操作を伴わない範囲のことであれば、小中学校の理科室で再現することも可能である。また、その実施の是非については様々な意見はあるが、解剖にも利用することができる。ヒトと相似した体の内部構造を観察することが目的であるとしよう。その際、マウスやラットなどの恒温動物を用いると、死亡した際の低体温化は子供達に殺生をした罪悪感を必要以上に植えつける傾向がある。一方、カエルは変温動物であるため、それを軽減できる傾向がある。この内容とも関連するが、倫理的な面でも、恒温動物よりも変温動物の方が、このような用途に使用することが受け入れられやすい。臓器の種類や形、そして配置などもヒトと似た傾向にある(図6)。カエルならば何でも良いわけではない。ウシガエル(学名: *Rana catesbeiana*)などを解剖する場合、腹側真皮層に走る大静脈を切断する際に血管の二カ所を結紮し、その間をハサミで切るという作業が求められる。それを怠ると静脈血が吹き出してしまうからだ。

アフリカツメガエルはなぜか静脈血の血圧がそれほど高くないため、結紮作業も省略できる。そもそも、ウシガエルはアメリカ東部、中部、ならびにカナダ南東部が原産となる生物であり、環境省が定める特定外来生物に相当する。許可無く生体を移動させるだけで法律に反することになり、教材として小中学校で用いるには、かなりの慎重さが求められる。一方、ツメガエルは少なくとも2020年の段階ではそれに相当しない。そして養殖することによって、安定した供給も可能である。魚類は変温動物であり安定供給も可能かもしれないが、さすがにヒトの内部構造と比較して臓器の位置や形について異なるところが大きい。総合的に考えて、解剖の教材として、アフリカツメガエルは日本国内において最も相応しい動物のひとつになるとと思われる。

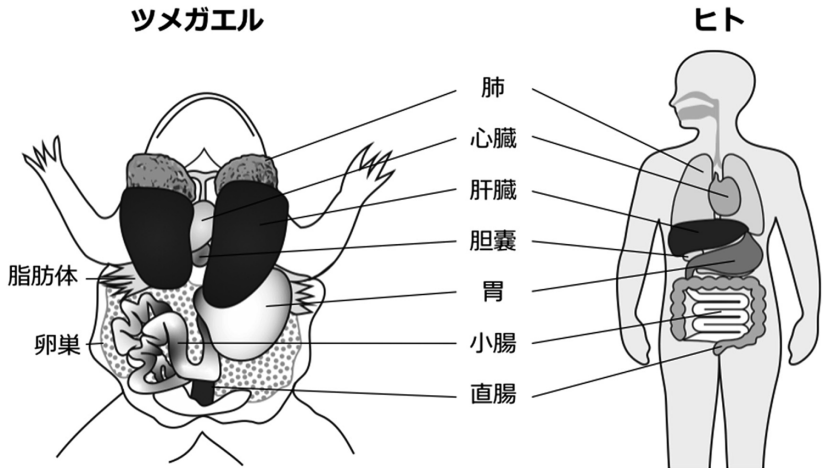


図6 アフリカツメガエルの腹腔内の様子

内臓の配置がヒトの場合と似ており、それぞれ肉眼で観察しやすい大きさをしている。特に、肺、心臓、胃、肝臓、脾臓、胆のう、消化管、輸卵管(メスの場合)、膀胱、脊椎などの構造が明確に観察できる。

7 外来種であること

アフリカツメガエルが外来種であることは使用する上で十分に留意する必要がある。北海道などの寒冷地において冬を越すことは不可能と考えられるが、本州以南においては、野外において生き残る可能性があり、実際、日本

国内において野生化したアフリカツメガエルは確認されている。使用した際には、成体はもちろん卵や胚、オタマジャクシが自然界に流出することがないように取り扱うことが求められる。

尚、2006年に両生類特有の感染症であるカエルツボカビ病の原因となるカエルツボカビ菌(学名：*Batrachochytrium dendrobatidis*)が日本国内のアフリカツメガエルにおいて確認されたことが話題になったことがある。しかし、日本では在来種において多数のカエルツボカビ系統の菌が発見されている^{71), 72)}。アフリカツメガエルが日本に輸入される遥か前の段階で、既にツボカビと日本在来のカエル達は共生関係を築いていたと言えるだろう。つまり、少なくとも日本国内において、アフリカツメガエルがカエルツボカビ菌の媒介者として、他の多くの両生類の絶滅を導く可能性は極めて低いといえる。尚、この結論は日本ツメガエル研究会による見解と相同のものである (<http://xcij.jp/news/tsubokabi.html>)。

8 日本にいるアフリカツメガエルの由来

日本においてアフリカツメガエルが飼育されていた記録として最も古いものは、1955年頃に神奈川県江ノ島水族館で飼育されていたというものだ⁷³⁾。ただし、江ノ島水族館では増殖の試みが行われた記録はなく、現在、日本で飼育されているものの祖先ではない。その後、いくつか日本にアフリカツメガエルが持ち込まれた記録はあるが、現在、広く用いられているものの祖先は1960年4月23日に当時アメリカのアイオワ州立大学の教授であったウィッチィ博士より、当時群馬大学の内分泌研究所(現在は生体調節研究所)の教授であった花岡謹一郎博士に届いた4対のアフリカツメガエルであると考えられている⁷⁴⁾。その後、花岡博士のもとで繁殖していたアフリカツメガエルの一部が浜松市に在住していた坂口章氏に手渡される。坂口氏は研究者ではないが様々な生物の飼育に長けたその道では知られる人物であり、浜松の地で数万匹単位にまでアフリカツメガエルの増殖に成功し、その結果、多くの研究機関にアフリカツメガエルが配布された。この功績をたたえ、日本動物学会は2015年に坂口章氏に感謝状を贈呈している。この坂口氏が繁殖したカエル達を坂口経由ツメガエルと呼ぶとすれば、現在、日本の養殖業者で飼育されて

いるアフリカツメガエルの殆どが坂口経由ツメガエルに由来すると思われる。

冒頭にも述べた通り、2016年にアフリカツメガエルの全ゲノム配列の解読が完了した⁴⁾。この解読の対象となったアフリカツメガエルの個体として選ばれたのがJ系統(JはJapanの頭文字)である。J系統は、いわゆる近交系と呼ばれる類の系統であり、その中でも特に純系に近い性質をもつ近交系として認識されている。作成は北海道大学に所属していた片桐千明博士と柄内新博士らによって行われた⁷⁵⁾。彼らは、早くからアフリカツメガエルにおける近交系の必要性に着目し、40年の歳月をかけて、何世代も近親での交配を繰り返していった。各世代ごとに、ライン(同種の親に由来する個体らの集まり)を独立して観察し、特に健康なラインに由来するものを選択して近親交配させる途方もない作業の結果、J系統という健康面で問題のない極めて優秀な近交系が樹立された。特筆すべき点は、一般的には異なる個体間で皮膚移植などを行うと拒絶反応が起こるが、J系統のカエル同士ではその際に拒絶反応が起こらない点だ⁷⁶⁾。それ故、成体での移植をとまなうような研究では欠かせないものになっている⁷⁷⁾。ただし、J系統はその管理の都合上、匹数には限りがある。一方、坂口経由ツメガエルは依然として膨大な匹数が存在しており、その増殖も厳密な管理を必要としない。今後、幼生期以降の移植を伴う研究や厳密な遺伝子レベルでの研究に用いる際にはJ系統を⁷⁷⁾、遺伝子の塩基配列の個体間の違いが影響しない研究や、FETAX法や教育利用などの用途には坂口由来ツメガエルを利用していく、などの使い分けをすることが望ましいと言えるだろう。

故・坂口章氏へのインタビュー記録に従うと、花岡謹一郎博士は生物学に造詣の深かった昭和天皇にもアフリカツメガエルを提供したそうである。この話については、第27回国際生物学賞(2011)の授賞式において、本論文の共著者となる黒田が、当時皇太子であった今上天皇と話を交える機会があり、少なくとも皇室においてアフリカツメガエルが飼育されていたことは確認されている。日本におけるアフリカツメガエルの浸透の度合いを象徴する内容と言えるだろう。

9 新しい時代におけるアフリカツメガエル

2019年5月1日より日本では元号が平成より令和に変わった。この新しい時代において、アフリカツメガエルは実験モデル生物としてどのように利用されていくのであろうか。基礎研究と応用研究に分けて説明していく。

基礎研究において、解明すべき生命現象は依然として数多く存在する。例えば、脊椎動物の胚には成長に応じて前後に伸びていく性質がある。カエルの場合、外界から栄養を摂取できるオタマジャクシになるまで、卵の中に備わった仕組みだけを用いて伸びていく。その第一段階は収斂伸長(convergent extension)という現象によって説明されている(文献78にて総括)。しかし、第二段階以降は殆ど解明されていない。2019年、慶應義塾大学に属する我々のグループは、神経伝達物質の一種であるガンマアミノ酪酸(GABA)が第二段階以降の伸長に関わっていることを、アフリカツメガエル胚を用いて証明している⁷⁹⁾。これを平成の最後を飾るアフリカツメガエルを用いた日本人による基礎研究のひとつとするならば、令和の先頭を飾るそれは、以下の東京工業大学のグループによる研究成果であろう。彼らは、アフリカツメガエルのヒレの構造が水中溶存酸素量を増加させることによって消失することを証明している⁸⁰⁾。この内容は陸上への生物進化の過程において酸素の影響が密接に関係することを示唆しており、極めて興味深い研究成果と言える。尚、奇しくもどちらも神奈川県に属する研究機関となる。これらはそれぞれ発生生物学における一例に過ぎないが、まだまだ基礎研究において、人類が理解しておきたい現象は山積みされており、そこに実験モデル生物としてアフリカツメガエルを適用できる場合も多々あるだろう。

応用研究もしくは応用研究につながる内容として、上述した通り、アフリカツメガエルは脊椎動物において唯一の異質四倍体として全ゲノム配列が解読された実験モデル生物である点が重要視されるべきである。ゲノムの倍化は生物体の体積を増加させる傾向があるが、必ずしもそうではない。アフリカツメガエルやネッタイツメガエルが属する*Xenopus*属は約30種類の種が存在する。その内、日本語名があるのは少数であるので、アフリカツメガエルは*Xenopus*を短縮して*X. laevis*として、ネッタイツメガエルもそれに倣い、*X. tropicalis*として、ここからは記載していく(ネッタイツメガエルは*Silurana*属に

属するという考え方もあるが、アフリカツメガエルの近縁種であることに違いはなく、便宜的にここでは*Xenopus*属として統一する)。*X. tropicalis*は一般的な二倍体(2n)であり、総染色体数が20であることから $2n=20$ として表される。*X. laevis*は二倍体(2n)であるが、異質四倍体(4x)であり、総染色体数が36であることから $2n=4x=36$ と表される。その他、*Xenopus*属に属する種として、*X. kobeli*や*X. eyssole*は $2n=12x=108$ (異質12倍体)という染色体構成を有しているにも関わらず、成体の大きさは*X. laevis*よりも明らかに小ぶりとなる⁸¹⁾。ゲノムの倍化が生物個体の体積の増加を必ずしも導くものではないことは、ツメガエルによって証明されているとも言えるだろう。では、どのように倍化が行われ、それはなぜ新しい種として成立し、いかにして既存種を淘汰し、競争に勝ち残ったのであろうか。この謎は、アフリカツメガエルを用いることによって(さらにはその近縁種と比較することによって)、かなり解き明かされていくことであろう。人類が行う品種改良において、ゲノムの倍化(近縁種との結合による異質倍数体化も含める)は代表的な人為的操作のひとつであり、これからも頻用されていくことであろう。その指標としてアフリカツメガエルは多くの有益な情報を提供してくれるに違いない。

謝辞

アフリカツメガエルの由来については浅島誠博士(現帝京大学特任教授、元東京大学副学長)に多くの情報をいただきました。J系統の樹立に関する記載では新潟大学の井筒ゆみ教授に多くの情報をいただきました。黒田裕樹研究室の福永佳菜子氏、浜中祐弥氏、八幡雅樹氏からは原稿に関して多くの助言をいただきました。皆様に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Takahashi, K. and Yamanaka, S. (2006) *Cell*. 126, pp. 663-676. PMID 16904174.
- 2) Gurdon, J.B. (1962) *J. Embryol. Exp. Morphol.* 10, pp. 622-640. PMID 13951335.
- 3) Elurbe, D.M., et al. (2017) *Genome Biol.* 18, p198. PMID 29065907.
- 4) Session A.M., et al. (2016) *Nature*. 538, pp. 336-343. PMID 27762356.
- 5) Elkan, E.R. (1938) *Br. Med. J.* 2, pp. 1253-1274. PMID 20781969.
- 6) Hoke, R.A. and Ankley, G.T. (2005) *Environ. Toxicol. Chem.* 24, pp. 2677-2690. PMID 16268171.

- 7) Hellsten, U., et al. (2010) *Science*. 328, pp. 633-636. PMID 20431018.
- 8) Grainger, R.M. (2012) *Methods Mol. Biol.* 917, pp. 3-15. PMID 22956079.
- 9) Richardson, M.K. (1998) *Science*. 281, p. 1289. PMID 9735045.
- 10) Nieuwkoop, P.D. and Faber, J. (1994) *Normal Table of Xenopus laevis (Daudin)*. Garland Publishing Inc, New York.
- 11) Asashima, M., et al. (2009) *Dev. Dyn.* 238, pp. 1309-1320. PMID 19441056.
- 12) Spemann, H. and Mangold, H. (2001) *Int. J. Dev. Biol.* 45, pp. 13-38. PMID 11291841.
- 13) Bouwmeester, T. (2001) *Int. J. Dev. Biol.*, 45, pp. 251-258. PMID 11291854.
- 14) De Robertis, E.M. (2009) *Mech. Dev.*, 126, pp. 925-941. PMID 19733655.
- 15) Keller, R. and Danilchik, M. (1988) *Development*, 103, pp. 193-209. PMID 3197629.
- 16) Sasai, Y., et al. (1994) *Cell*. 79, pp. 779-790. PMID 8001117.
- 17) De Robertis, E.M. and Kuroda, H. (2004) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, pp. 285-308. PMID 15473842.
- 18) Waddington, C.H. and Schmidt, G.A. (1933) *Wilhelm Roux Arch. Entwickl. Mech. Org.* 128, pp. 522-563. PMID 28353960.
- 19) Shih, J. and Fraser, S.E. (1996) *Development*. 122, pp. 1313-1322. PMID 8620858.
- 20) Christian, J.L., et al. (1991) *Development*. 111, pp. 1045-1055. PMID 1879349.
- 21) Ishibashi, H., et al. (2008) *Mech. Dev.* 125, pp. 58-66. PMID 18036787.
- 22) Haramoto, Y., et al. (2017) *Dev. Biol.* 426, pp. 374-383. PMID 27522305.
- 23) Cong, L., et al. (2013) *Science*. 339, pp. 819-823. PMID 23287718.
- 24) Sato, K. (2014) *Int. J. Mol. Sci.* 16, pp. 114-134. PMID 25546390.
- 25) Radford, H.E., et al. (2008) *Biochim. Biophys. Acta*. 1779, pp. 217-229. PMID 18316045.
- 26) Charnay, R.M., et al. (2017) *Semin. Cell Dev. Biol.* 66, pp. 12-24. PMID 28341363.
- 27) Carron, C. and Shi, D.L. (2016) *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 5, pp. 150-168. PMID 26544673.
- 28) Sakai, M. (2008) *Dev. Growth Differ.* 50, pp. 49-62. PMID 17999689.
- 29) Pradhan, G.N. and Chitambar, S.D. (2018) *J. Med. Virol.* 90, pp. 772-778. PMID 29244210.
- 30) Huang, Y. and Winklbauer, R. (2018) *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 7, p. 325. PMID 29944210.
- 31) Keller, R., Sutherland, A. (2020) *Curr. Top. Dev. Biol.* 136, pp. 271-317. PMID 31959291.
- 32) Winklbauer, R. (2012) *Subcell. Biochem.* 60, pp. 301-320. PMID 22674077.
- 33) Droz, S.T. and McLaughlin, K.A. (2017) *Results Probl. Cell Differ.* 60, pp. 77-107. PMID 28409343.
- 34) Liu, Z., et al. (2016) *Curr. Opin. Neurobiol.* 41, pp. 17-23. PMID 27475307.
- 35) Moody, S.A., et al. (2015) *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 178, pp. 16-24. PMID 26117063.
- 36) Womble, M., et al. (2016) *Semin. Cell Dev. Biol.* 51, pp. 92-105. PMID 26851628.
- 37) Kofent, J. and Spagnoli, F.M. (2016) *Semin. Cell Dev. Biol.* 51, pp. 106-116. PMID 26806634.
- 38) Pearl, E.J., et al. (2009) *Dev. Dyn.* 238, pp. 1271-1286. PMID 19334283.
- 39) Afouda, B.A. and Hoppler, S. (2009) *Trends Cardiovasc. Med.* 19, pp. 220-226. PMID 20382345.
- 40) Keenan, S.R. and Beck, C.W. (2016) *Dev. Dyn.* 245, pp. 233-243. PMID 26404044.
- 41) King, M.W., et al. (2012) *Anat. Rec. (Hoboken)*, 295, pp. 1552-1561. PMID 22933418.
- 42) Ciau-Uitz, A., et al. (2010) *Int. J. Dev. Biol.*, 54, pp. 1139-1149. PMID 20711991.
- 43) Aguero, T., et al. (2017) *Adv. Exp. Med. Biol.*, 953, pp. 383-440. PMID 27975276.
- 44) Yoshimoto, S. and Ito, M. (2011) *FEBS J.*, 278, pp. 1020-1026. PMID 21281450.

- 45) Yaoita, Y. (2019) *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 10, p. 143. PMID 30923513.
- 46) Buchholz, D.R. (2017) *Mol. Cell Endocrinol.* 459, pp. 64-70. PMID 28363743.
- 47) Wen, L. and Shi, Y.B. (2016) *Dev. Growth Differ.* 58, pp. 106-115. PMID 26219216.
- 48) Harland, R.M. and Grainger, R.M. (2011) *Trends Genet.* 12, pp. 507-515. PMID 21963197.
- 49) Pollet, N. (2010) *Front. Biosci. (Landmark Ed)*, 15, pp. 348-358. PMID 20036824.
- 50) Tseng, A.S. (2017) *Genesis.* 55, pp. 1-2. PMID 28095643.
- 51) Beck, C.W., et al. (2009) *Dev. Dyn.* 238, pp. 1226-1248. PMID 19280606.
- 52) Kintisch, E. (2008) *Science.* 321, pp. 1032-1034. PMID 18719260.
- 53) Grayfer, L. and Robert, J. (2016) *Dev. Comp. Immunol.* 58, pp. 60-67. PMID 26705159.
- 54) Silva, A.B., et al. (2009) *Front. Biosci. (Landmark Ed)*, 14, pp. 1990-2003. PMID 19273180.
- 55) Hwang, Y.S. and Daar, I.O. (2017) *Genesis.* 55, pp. 1-2. PMID 28095646.
- 56) Borsuk, E., et al. (2017) *Results Probl. Cell Differ.* 59, pp. 201-211. PMID 28247050.
- 57) Slater, P.G., et al. (2017) *Genesis.* 55, pp. 1-2. PMID 28095612.
- 58) Ogino, H. and Ochi, H. (2009) *Dev. Growth Differ.* 51, pp. 387-401. PMID 19382936.
- 59) Abdullah, J.M. and Zhang, J. (2013) *Mini Rev. Med. Chem.* 13, pp. 744-748. PMID 23373649.
- 60) Stooke-Vaughan, G.A., et al. (2017) *Genesis.* 55, pp. 1-2. PMID 28095623.
- 61) Santiago-Medina, M., et al. (2012) *Dev. Neurobiol.* 72, pp. 585-599. PMID 21465668.
- 62) Hoogenboom, W.S., et al. (2017) *Dev. Biol.* 428, pp. 300-309. PMID 28427716.
- 63) Yanagida, M. (2005) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 360, pp. 609-621. PMID 15897183.
- 64) Jevtić, P., et al. (2016) *Int. J. Dev. Biol.* 60, pp. 277-288. PMID 27759156.
- 65) Tokmakov, A.A., et al. (2016) *Int. J. Dev. Biol.* 60 pp. 289-296. PMID 27251073.
- 66) Raspelli, E., et al. (2017) *Genesis.* 55, pp. 1-2. PMID 28095613.
- 67) Hardwick, L.J.A. and Philpott, A. (2018) *Front Physiol.* 9, p.1660. PMID 30538639.
- 68) Blackburn, A.T.M. and Miller, R.K. (2019) *Dis. Model Mech.* 12, p. 4. PMID 30967415.
- 69) Garfinkel, A.M. and Khokha, M.K. (2017) *Curr. Pathobiol. Rep.* 5, pp. 187-196. PMID 29082114.
- 70) Nenni, M.J., et al. (2019) *Front. Physiol.* 10, p. 154. PMID 30863320.
- 71) Moriguchi, S., et al. (2015) *Dis. Aquat. Organ.* 113, pp. 177-185. PMID 25850395.
- 72) Goka, K., et al. (2009) *Mol. Ecol.* 18, pp. 4757-4774. PMID 19840263.
- 73) 高橋裕哉、斎藤松太郎(1967)『採集と飼育』29(1), pp. 16-25.
- 74) 岩沢久彰(1977)『両生爬虫類研究会誌』7, pp. 27-29.
- 75) Maéno et al. (1987) *Transplantation.* 44, pp. 308-314. PMID 2957832.
- 76) Izutsu, Y. and Yoshizato, K. (1993) *J. Exp. Zool.* 266, pp. 163-167. PMID 8501439.
- 77) Izutsu, Y. (2019) *Cold Spring Harb. Protoc.* pp. 1-5. PMID 30606753.
- 78) Shindo, A. (2018) *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 7, pp. 1-17. PMID 28906063.
- 79) Furukawa, T., et al. (2019) *Int. J. Dev. Biol.* 63, pp. 37-43. PMID 30919914.
- 80) Cordeiro, I.R., et al (2019) *Dev. Cell.* 50, pp. 155-166. PMID 31204171.
- 81) Evans, B.J., et al. (2015) *PLoS One.* 10, e0142823. PMID 26672747.

〔受付日 2019. 5. 31〕

〔採録日 2019. 8. 6〕