

学 位 論 文 題 名

Studies on the mechanisms of hemoglobin transition
and erythropoiesis in the salamander,
Hynobius retardatus

(エゾサンショウウオにおけるヘモグロビン転換および
造血機構に関する研究)

学位論文内容の要旨

両生類におけるヘモグロビンの幼生型から成体型への転換は、脊椎動物における遺伝子発現調節機構のモデル実験系として、おもに無尾類を用いてよく研究されている。その転換は甲状腺ホルモンによって引き起こされることが、幼生型ヘモグロビンのみを持つ赤血球が、成体型ヘモグロビンのみを持つ赤血球に置き換えられることがこれまでに分かっている。

一方、エゾサンショウウオは、日本で唯一、幼形成熟（ネオテニー）の記録の残る有尾両生類であり、外部形態の変態とは独立に、体内の組織や生化学的物質が転換する可能性が考えられる。事実、無尾類と同様、本種でも変態期にヘモグロビンが幼生型から成体型に転換するが、その転換は、外部形態の変態を促す甲状腺ホルモンの作用には依存しない、独特のものであることが報告されている。そこで、本研究は、このエゾサンショウウオにおけるヘモグロビンの転換機構を明らかにする目的で行われた。

第1章では、赤血球に含まれるヘモグロビンの分子種、赤血球の密度、形態、浸透圧といった諸性質が、変態とともにどのように変化するかが観察された。その結果、幼生と成体の赤血球は、これらの性質において異なることが分かり、また、幼生型から成体型に転換する際には、中間的性質を持つ赤血球が多数現れることが観察された。特に、転換期の個体の赤血球は、異なる密度を持つ二つの赤血球の集団に分画されることはなく、幼生赤血球と成体赤血球の中間の密度を持つことが示された。

さらに、幼生型ヘモグロビン、成体型ヘモグロビンをそれぞれ特異的に認識する抗体を作製し、脾臓の連続組織切片や末梢血の塗抹標本を免疫染色した結果、ヘモグロビン転換の前後を通じて脾臓は造血活性を維持することや、転換期の個体では、同一の赤血球が両方のタイプのヘモグロビンを持つことが確かめられた。これらの結果は、エゾサンショウウオのヘモグロビン転換が、無尾類で報告されているような細胞集団の置き換え（「置き換えモデル」）によって生じるのではなく、同一の細胞系譜の中で、遺伝子発現の切り替え（「切り替えモデル」）によって生じることを示唆している。

第2章では、第1章で示唆されたエゾサンショウウオヘモグロビン転換の「切り替えモデル」を遺伝子発現レベルで検証するため、幼生型、及び成体型グロビンのcDNAクローンが単離され、これらの遺伝子の発現パターンが解析された。その結果、個体の発生に伴ってグロビンmRNAも幼生型から成体型に転換することが確認された。しかし、その

転換はきわめてゆっくりと進み、変態後1年以上を経た個体でも、少量の幼生型グロビンmRNAを持つことが分かった。ウエスタンブロットの結果、このmRNAの少なくとも一部は幼生型のグロビタンパクに翻訳されていた。また、薬剤によって変態を阻害された個体でも、通常飼育個体と同じタイミングで成体型グロビンmRNAを発現した。これらの結果は、エゾサンショウウオのヘモグロビン転換が甲状腺ホルモンの作用とは独立に生じることを重ねて示している。

一方、脾臓の組織切片を二重 *in situ* ハイブリダイゼーションした結果、転換期の個体の赤血球には、両方のタイプのグロビンmRNAが共存することが直接的に証明された。また、薬剤によって個体に脱血を誘導しても、無尾類の場合と異なり、変態完了前の個体ではヘモグロビンの転換が早まることはなかった。これらの結果から、エゾサンショウウオのヘモグロビン転換が多くの他の両生類とは異なり、「切り替えモデル」に従って生じることが示された。

第3章では、前2章の結果を受け、造血部位の同定が行われた。一般に脊椎動物の血球は胎仔型と成体型に分類され、胎仔型の赤血球には幼生型（胚型）、成体型の赤血球には成体型のヘモグロビンが含まれることが知られている。また、これらは由来する部位も異なるとされ、アフリカツメガエルの場合、胎仔型の赤血球は腹部血島に由来し、背側側板の細胞は成体型の赤血球に分化することが報告されている。ところが、エゾサンショウウオの場合、前述のように単一の赤血球中に両タイプのヘモグロビンが共存するため、胎仔型と成体型の2種類に赤血球を分別することは難しい。このような種における赤血球の由来を調べるため、エゾサンショウウオのGATA-1、及びGATA-3のcDNAクローンが単離され、グロビンやこれらの遺伝子の発現部位を探ることにより、造血部位の同定がなされた。その結果、背側側板の細胞は、腹部血島の細胞とともに、孵化前の時期から幼生型グロビンを発現し、赤血球としてその場所で分化することが分かった。一方、成体型血球細胞のマーカーであるGATA-3は、孵化前の時期に、もっぱら背側側板で発現していた。このことは、側板の細胞は、発生より後期における血球供給源でもあることを示唆している。このように、エゾサンショウウオは腹部血島と背側側板の2カ所の造血部位を持つという点で、無尾類やそれより高次の脊椎動物と同様の特徴を示した。一方、背側側板の細胞が早期に幼生型ヘモグロビンを持つ赤血球に分化する点で、無尾類や高次脊椎動物と異なる特徴を示した。ゼブラフィッシュなどの硬骨魚類では、血島に当たる造血部位は存在せず、胚型ヘモグロビンを持つ赤血球が胚体内の中間細胞塊に由来する。この点では、エゾサンショウウオの赤血球造血は魚類に類似していると言える。

これらの観察に基づいて、成体型ヘモグロビンのみを持つ「成体型赤血球」がエゾサンショウウオにも存在し、この赤血球は変態期に甲状腺ホルモンの作用によって増殖・分化を誘導される、というモデルが提唱された。薬剤によって変態を抑制しても、ヘモグロビン転換は通常個体と同じタイミングではじまるが、転換終了は少し遅れること、逆に甲状腺ホルモンを人為的に投与するとヘモグロビンの転換は早まること、また、薬剤によって一度脱血を誘導した後、変態完了後にヘモグロビンパターンを調べると、脱血誘導個体の方がヘモグロビン転換が速く進むこと、などはこのモデルを支持する。

本研究は、エゾサンショウウオのヘモグロビン転換が、単一の赤血球系譜中での遺伝子発現の切り替えによって生じることを世界にさきがけて示した。両生類の変態に伴う体内組織、器官の作り替えは、おもに幼生型細胞の細胞死と成体型細胞の選択的増殖・分化としてとらえられている。しかし、本種におけるヘモグロビン転換はこのモデルには当てはまらず、両生類の変態を研究する上で、新しい独特の系を提供するものと考えられる。

また、本研究によって、エゾサンショウウオの造血機構は、魚類と無尾類の中間的性質を示すことが示された。脊椎動物の初期発生における造血は一般に胚体外（または腹部）

血島ではじまるのに対し、魚類では胚体外での造血が認められない種が多く、両者の間にはギャップが存在する。本研究によって示されたエゾサンショウウオの造血部位はこのギャップを埋めるもので、本種における造血機構の研究は脊椎動物の造血の進化を考える上で、有益であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 下 正 兼

副 査 助 教 授 若 原 正 己

副 査 教 授 浦 野 明 央

学 位 論 文 題 名

Studies on the mechanisms of hemoglobin transition and erythropoiesis in the salamander, *Hynobius retardatus*

(エゾサンショウウオにおけるヘモグロビン転換および
造血機構に関する研究)

両生類におけるヘモグロビンの幼生型から成体型への転換は、脊椎動物における遺伝子発現調節機構のモデル実験系として、おもに無尾類を用いて研究されてきた。その転換は両生類の変態ホルモンである甲状腺ホルモンによって引き起こされることが、幼生型ヘモグロビンのみを持つ赤血球が、成体型ヘモグロビンのみを持つ赤血球に置き換えられることがこれまでに分かっている。一方、エゾサンショウウオは、幼形成熟（ネオテニー）の記録が残っている日本で唯一の有尾両生類であり、両生類の変態現象、脊椎動物の進化、生物多様性などの理解にとってきわめて貴重な動物種であるにもかかわらず、本種の研究はほとんど手つかずに残されてきた。

本論文は、エゾサンショウウオにおけるヘモグロビンと赤血球の幼生型から成体型への転換、及びその造血機構を、細胞生物学的・免疫組織化学的・分子生物学的手法を用いて解明したものである。

第1章では、赤血球に含まれるヘモグロビンの分子種、赤血球の密度、形態、浸透圧といった諸性質が、変態とともにどのように変化するかを詳細に観察している。その結果、赤血球が幼生型から成体型に転換する際には、二つの赤血球の集団に分画されることはなく、両者の中間的性質を持つ赤血球が現れることを示した。さらに、幼生型ヘモグロビン、成体型ヘモグロビンをそれぞれ特異的に認識する抗体を作製し、脾臓の連続組織切片や末梢血の塗抹標本を免疫染色した結果、転換期の個体では、同一の赤血球が両方のタイプのヘモグロビンを持つことを確かめた。これらの結果から、エゾサンショウウオのヘモグロビン転換が、無尾類で報告されているような細胞集団の置き換え（「置き換えモデル」）によって生じるのではなく、同一の細胞系譜の中での、遺伝子発現の切り替え（「切り替えモデル」）によって生じることを世界に先駆けて明らかにした。

第2章では、エゾサンショウウオヘモグロビン転換の「切り替えモデル」を遺伝子発現レベルで検証するため、幼生型、及び成体型グロビンのcDNAクローンを単離し、これらの遺伝子の発現パターンを解析している。脾臓の組織切片を二重 *in situ* ハイブリダイゼーションした結果、転換期の個体の赤血球には、両方のタイプのグロビンmRNAが共存していることを疑問の余地なく示した。また、薬剤によって個体に脱血を誘導しても、

無尾類の場合と異なり、変態完了前の個体ではヘモグロビンの転換が早まることはなかった。これらの結果は、エゾサンショウウオのヘモグロビン転換が多く他の両生類とは異なり、「切り替えモデル」に従って生じることを重ねて証明している。

第3章では、エゾサンショウウオの造血調節遺伝子であるGATA-1、及びGATA-3のcDNAクローンを単離し、グロビンやこれらの遺伝子の発現部位を、主として*in situ* ハイブリダイゼーション法で探ることにより、本種における造血部位の同定を行った。その結果、背側側板の細胞は、腹部血島の細胞とともに、孵化前の時期から幼生型グロビンを発現し、赤血球としてその場所で分化することが分かった。一方、成体型血球細胞の分化マーカーであるGATA-3は、孵化前の時期に、もっぱら背側側板で発現していた。このことは、側板の細胞は、発生により後期における血球供給源でもあることを示唆している。このように、エゾサンショウウオは腹部血島と背側側板の2カ所の造血部位を持つという点で、無尾類やそれより高次の脊椎動物と同様の特徴を示した。他方、背側側板の細胞が早期に幼生型ヘモグロビンを持つ赤血球に分化する点では、多くの魚類に類似していた。つまり、エゾサンショウウオの赤血球造血は、無尾類と魚類の中間的特徴を持っていることを明らかにした。

これを要するに、著者は、エゾサンショウウオのヘモグロビン転換が、単一の赤血球系譜中での遺伝子発現の切り替えによって生じること、その造血機構が、魚類と無尾両生類の中間型を示すことを世界にさきがけて明らかにし、両生類の変態と造血機構及び脊椎動物の進化を研究する上で、まったく新しい独特の実験系を提供するとともに、発生生物学・進化生物学の発展に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格があるものと認める。