

平成21年 6月 1日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18770064

研究課題名 (和文) 少体節化した体制を示す介形類における形態形成遺伝子の発現解析

研究課題名 (英文) Cloning and expression patterns of Hox-related genes in the ostracods

研究代表者

生田 享介 (KYOSUKE IKUTA)

大阪教育大学・教育学部・准教授

研究者番号：30299367

研究成果の概要：ウミホタルに代表される介形類は、他の甲殻類や節足動物に比べ体を構成する体節数が非常に少なく、頭・胸・腹の境界も不明であるため、そのような体の特徴を決めているHox遺伝子群をクローニングし遺伝子がどこで発現するか調べたところ、先行研究の胚期における付属肢形成過程の観察や*engrailed*遺伝子の発現パターンより示された解釈とは異なり、5番目の付属肢である第二小顎を二次的に欠失したという考えを支持する結果となった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,500,000	0	2,500,000
2007年度	600,000	0	600,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	180,000	3,880,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類

キーワード：甲殻類, 節足動物, 体節性, 進化, Hox 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

節足動物はその進化過程において、多数の同規的な体節性を示す祖先形から（現生甲殻類では、ムカデエビ類やカシラエビ類がそれに近いと考えられている）、体節数の減少と合体節化に伴い、ひと続きの「胴部」が胸部と腹部に分化し、同時に各部付属肢の機能分化あるいは欠失を生じ、現在のさまざまな分類群が進化したと考えられる。よって、体節や付属肢の分化機構を解明することは、節足動物諸群の示す著しい体制の多様性を生じ

させたしくみを理解することにつながる。

介形類Ostracodaは、甲殻亜門顎脚綱に含まれる一亜綱、もしくは他の顎脚綱諸群とは独立の一綱とされ、現生種は大きくポドコーパ上目（ポドコーパ目+プラティコーパ目）とミオドコーパ上目（ミオドコーパ目+ハロキプリス目）の2群に分類される。介形類のもつ総ての付属肢は7対しか認められず（プラティコーパ類では6対、ハロキプリス目のクラドコーパ類では5対とさらに少ない）、これまでの形態学および発生学的観点か

ら、その体節性に関して、1) 前方の5対が頭部付属肢+続く2対が胸部付属肢、とする他の節足動物と同様の考え、および、2) 前方の4対が頭部付属肢(第二小顎が欠失)+続く3対が胸部付属肢、とする異なる考え、との2つの説が存在し、いずれが妥当であるのか未だ決着はついていない。また、胸部付属肢が2または3対と少なく、これは進化過程で欠失したものとみなせる可能性もあり(上述のように実際に介形類の一部では減少している)、さらに腹部付属肢については他の顎脚類と同様に完全に欠いており、しかもこの「胴部」には、基本的に体節性を示す形態学的特徴はまったく存在しない。

このように介形類は、甲殻類の中でもっとも体節性を失った体制を示す群と言える。よって、節足動物の進化過程における少体節化と合体節化というイベントのよい研究対象となると考えられるが、そのような観点からの研究はこれまで皆無であった。

2. 研究の目的

多くの後生動物において形態形成遺伝子の解析にもとづく、いわゆる「形づくりの進化」といった発生生物学的な研究が進められている。中でも体の前後軸方向に各部の個性を決めているHox遺伝子群は、ショウジョウバエでは、*labial (lab)*, *proboscipedia (pb)*, *Hox3/zen*, *Deformed (Dfd)*, *Sex combs reduced (Scr)*, *fushitarazu (ftz)*, *Antennapedia (Antp)*, *Ultrabithorax (Ubx)*, *abdominal-A (abd-A)*, *Abdominal-B (Abd-B)*の10遺伝子が知られており、頭部・胸部・腹部といった合体節の形成に関わっている。他の節足動物でも同様の遺伝子群がクローニングされ、その発現パターンが調べられており、多様な形態を示す節足動物の体制の進化についてさまざまな重要な知見が得られている。

そこで本研究では、前述の介形類の不明瞭な体制を明らかにするため、ミオドコーパ上目のウミホタル*Vargula hilgendorffii*を材料としてHox遺伝子群のクローニングを行い、*in situ* ハイブリダイゼーション法によってその発現パターンを調べることにした。そして、これまでの他の甲殻類や節足動物における発現解析結果と比較することで、介形類の合体節性について明らかにし、その少体節化した体制の進化および系統分類学的な位置

づけを考察することを目的とした。

3. 研究の方法

ウミホタルは背甲内に産卵し、そこで同調的に胚発生が進行する。実体顕微鏡下で採取した胚を次のtotal RNA抽出およびホールマウント*in situ* ハイブリダイゼーション法のための固定試料として用いた。

目的の遺伝子をRT-PCR法でクローニングするために、まず数十個体の胚を材料にTRIzolを用いてtotal RNAを抽出した。これを鋳型として逆転写反応を行いcDNAを得た。Hox遺伝子群のホメオドメイン領域を増幅するため、保存性の高いアミノ酸配列をもとに設定したユニバーサルプライマーを用いてPCRを行い、得られたDNA断片をクローニングして塩基配列を決定した。これらの塩基配列から遺伝子特異的プライマーを設定し5' RACE法によりHox遺伝子群のクローニングを行った。

ホールマウント*in situ* ハイブリダイゼーション法により、得られた遺伝子の発現解析を行うため、胚帯形成期から付属肢形成期の胚を、EGTAを含む10%ホルマリンPBS溶液で固定しメタノール系列で脱水した。発現箇所を検出するために、クローニングした遺伝子の部分断片を鋳型として*in vitro*転写を行いDIGラベリングしてRNAプローブとした。ハイブリダイゼーションの行程は標準的なプロトコールに準じ、NBT/BCIPで発色したのち、SYTOXで核染色を施した。

4. 研究成果

(1) 遺伝子クローニング

ユニバーサルプライマーHoxF1, HoxF2, HoxR1, HoxR2を用いて、RT-PCRを行なった結果、ウミホタルHox遺伝子のホメオドメインの部分塩基配列、126bp~133bp長のDNA塩基配列の断片を192サンプル得ることができた。この塩基配列は41~43アミノ酸をコードしており、他の節足動物で報告されている*lab*, *pb*, *Dfd*, *Scr*, *ftz*, *Antp*, *Ubx*, *abd-A*, *Abd-B*, *cad*のホメオドメインと高い相同性を示した。しかし、*Hox3/zen*については相同性を示す断片は得られなかった。

ホメオドメイン領域をクローニングした遺伝子のうち、まず*Vh-Dfd*については、5'

RACEを行なった結果、ホメオドメインからさらに上流の塩基配列を含む、714bp長の部分塩基配列を得ることができた。5'側の非翻訳領域(5'-UTR)は54bp長で、55番目の塩基から220アミノ酸をコードしていた。*Vh-Dfd*のYPWM motif, variable region, およびホメオドメイン領域のアミノ酸配列を他の節足動物と比較したところ、ショウジョウバエ*Dm-Dfd*とのアイデンティティは82% (61/74)であった。*Vh-Dfd*のvariable regionは比較的長く、20アミノ酸をコードしていた。またホメオドメインについては、*Vh-Dfd*の33番目のアミノ酸であるリシン(K)は、他の分類群ではグルタミン酸(E)となっており、これはウミホタルに特異的なアミノ酸配列であるといえる。アルテミア*Af-Dfd*とダニの一種*AI-Dfd*では、この1アミノ酸の違いしか見られず、非常に相関性が高かった。

*Vh-Ubx*については、683bp長の部分塩基配列を得ることができた。5'-UTRは143bp長で、144番目の塩基から180アミノ酸をコードしていた。ワラジムシ*Ps-Ubx*やムカデの一種*Sm-Ubx*と非常に高い相関性を示し、そのアイデンティティは両者とも97% (57/59)であった。variable regionは10アミノ酸であった。*Vh-Ubx*のホメオドメインは、ワラジムシ*Ps-Ubx*、ショウジョウバエ*Dm-Ubx*、クモの一種*Cs-Ubx1*、ムカデの一種*Sm-Ubx*のホメオドメインとは完全に一致しており、非常に保存性が高いと考えられる。

*Vh-abd-A*は691bp長の部分塩基配列が得られ5'-UTRは166bp長で、167番目の塩基から175アミノ酸をコードしていた。variable regionは短く、9アミノ酸であった。ムカデの一種*Sm-abdA*と高い相関性を示し、そのアイデンティティは90% (52/58)であった。ホメオドメインの11, 36, 37, 41番目のアミノ酸であるチロシン(Y)、グルタミン(Q)、セリン(S)、セリン(S)は、多くの節足動物ではそれぞれ、フェニルアラニン(F)、ヒスチジン(H)、アラニン(A)、スレオニン(T)となっているものが多く、これは*Vh-abd-A*に特異的なアミノ酸配列であるといえる。

*Vh-Abd-B*については、これまでと同様に5'RACE法を行ったところ、1055bpと891bp長の2種類の異なる部分塩基配列が得られ、それぞれ*Vh-AbdB1*、*Vh-AbdB2*遺伝子とした。*Vh-AbdB1*の5'-UTRは281bp長で、282番目の

塩基から258アミノ酸をコードしており、*Vh-AbdB2*の5'-UTRは177bp長で、178番目の塩基238アミノ酸をコードしていた。*Vh-AbdB1*と*Vh-AbdB2*を比べたところ、83bp長の異なる塩基配列がホメオドメインより上流で見られた。しかし、その他の塩基配列は完全に一致していたため、この違いは選択的スプライシングの結果生じたものであると考えられる。*Vh-AbdB1*、*B2*のホメオドメインは、アルテミア*Af-AbdB*、ショウジョウバエ*Dm-AbdB*、クモの一種*Cs-AbdB*、ムカデの一種*Sm-AbdB*のホメオドメインと完全に一致し、非常に保存性が高いと考えられる。

これまでのHox遺伝子のクローニングと同時に、ParaHox遺伝子群に含まれる*cad*と相関性を示す991bp長の部分塩基配列を得ることができた。5'-UTRは157bp長で、158番目の塩基から278アミノ酸をコードしていた。*Vh-cad*のホメオドメインは、アルテミア*Af-cad*やアメリカザリガニ*Pc-cad*と非常に高い相関性を示し、そのアイデンティティはいずれとも94% (44/47)であった。またマウス*Mm-Cdx1*、*Mm-Cdx2*とも同等の類似性を示し、*Vh-cad*のホメオドメインもさまざまな分類群を通じて保存性が高いと考えられる。

(2) *in situ* ハイブリダイゼーション法による発現解析

これまでにクローニングした遺伝子のうち、*Vh-Dfd*および*Vh-Ubx*遺伝子について、ウミホタル40~70%胚サンプルを対象にホールマウント*in situ* ハイブリダイゼーション法を行った。

*Dfd*はショウジョウバエでは大顎および小顎で発現する。さらに幼虫では眼と触角の成虫原基の一部、上唇の成虫原基の基部での発現も見られている。その他の昆虫類でも、コクヌストモドキや、セイヨウミツバチなどで同様に、大顎と小顎での発現が知られている。一方、甲殻類ワラジムシの*Dfd*は、昆虫類の発現領域と比較すると、より狭い領域に制限されており、大顎および第一小顎の前方のみで観察されている。*Dfd*は節足動物において、鋏角類では前体の4体節で、多足類では大顎、第一小顎および第二小顎の3体節で発現するのに対し、上述のように昆虫類では大顎と小顎、甲殻類でも同様に大顎と第一小顎の2体

節でしか発現しておらず、発現領域の減少傾向が知られている。これは、高等な節足動物になるにつれて、他のHox遺伝子とのオーバーラップを減らし、*Dfd*がより独自性をもって働き、多様な形態形成に関与しているのではないかと考えられている。本研究のウミホタルにおいてもワラジムシと同様、大顎および第一小顎で発現が見られた。しかし、今回の観察では第一小顎の前方のみで発現しているのか、第一小顎全体で発現しているのかは判定できなかった。

*Ubx*は昆虫類では腹部で主に発現が見られている。ショウジョウバエでは、初期の胚で、腹部第1体節およびそれより後方の腹部体節で発現する。そして次第に、後胸部にも発現が広がってゆく。*Ubx*はまず初期の胚において、腹部に特異的に働き、その後胸部体節の特殊化や分化を限定するという、異なった時期に、2つの違った機能をもっているということが知られている。

甲殻類では鰓脚類アルテミアの*Ubx*の発現が胴部全体で見られている。しかし、軟甲類ワラジムシでは*Ubx*は胸部でのみ発現しており、頭部と胸部、胸部と腹部の境界を示している。同様に、軟甲類アメリカザリガニでは、胚期によって違いはあるが、胸部での発現が明らかにされている。よって、昆虫と甲殻類の*Ubx*の発現を比較すると、昆虫では腹部で発現しているのに対して、甲殻類では胸部で発現するという相違点が挙げられている。

介形類の体制について、特に頭部については、第一小顎の次の第5肢が第二小顎と相同であるのか、それとも第二小顎を二次的に欠失しており、第5肢は胸部付属肢に相当するのかが未だ明らかではない。ウミホタルの胚発生過程において、前方の5対の付属肢が同調的に形成されること (Wakayama, 2007) や各体節の後区画で発現し体節性を示す分子マーカーとして有名な *engrailed* 遺伝子の発現パターン (Ikuta, unpublished) からは、第二小顎を欠失したという解釈は支持されず、前方の5体節が頭部であるとみなされている。しかし、本研究で *Vh-Ubx* は、第5肢および将来の第6肢に相当する領域に発現が見られ、上述のように、他の節足動物では *Ubx* は胸部以降で発現が見られるため、*Vh-Ubx* の発現パターンからは第5肢は胸部付属肢であるとみなされる。このことから、見かけ上第一小顎までの4体節を頭部とみなすことがで

き、これは介形類では第二小顎が二次的に欠失したという考えを支持することになり、これまでの見解とは相反するものとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計1件)

小濱佳美・生田享介 介形類ウミホタル *Vargula hilgendorffii*におけるHox遺伝子のクローニングおよび発現解析. 日本動物学会近畿支部研究発表会. 2009年5月30日, 神戸大.

[その他]

ホームページ等

大阪教育大学リポジトリ

<http://ir.lib.osaka-kyoiku.ac.jp/dspace/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

生田 享介 (IKUTA KYOSUKE)

大阪教育大学・教育学部・准教授

研究者番号：30299367

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：