

平成23年 6月17日現在

機関番号：94404

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570217

研究課題名（和文）オオヒメグモの尾葉形成を制御する遺伝子の網羅的探索

研究課題名（英文）Search for genes involved in the formation of the spider caudal lobe

研究代表者

小田 広樹（株式会社 生命誌研究館、主任研究員）

研究者番号：50396222

研究成果の概要（和文）：本研究は、節足動物の尾部領域の発生様式に多様性があることに注目し、その多様化の仕組みを理解することを目指した。実験材料として鋏角類のオオヒメグモを用い、胚染色によるスクリーニングとマイクロアレイによるスクリーニングを行うことで、尾部（クモでは尾葉と呼ぶ）の発生に関わる遺伝子を探索した。得られた候補遺伝子はRNA干渉による表現型スクリーニングによって絞り込み、尾葉形成に必要な遺伝子を同定した。同時に、頭部形成に関わる候補遺伝子も複数同定された。

研究成果の概要（英文）： There are considerable variations in the mode of caudal development among arthropods. This work aimed to understand the evolutionary mechanisms underlying these developmental variations. To this end, we searched for genes involved in the development of the caudal lobe in the chelicerate arthropod *Achaearanea tepidariorum* using in situ hybridization and oligonucleotide microarrays. Combined with RNA interference-based functional screening, we identified genes involved in the formation of the spider caudal lobe and head.

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：発生進化、節足動物、鋏角類、ボディープラン、体節形成、尾、パターン形成
RNA干渉

1. 研究開始当初の背景

（1）節足動物門昆虫類のキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) は極めて

優れたモデル生物であるが、胚発生の様式は他の節足動物と比べていくつかの点で特殊である。なかでも、体節形成の違いは歴然と

している。ハエの体節形成は長胚型 (long germ type) と呼ばれ、すべての体節が胚全体でほぼ同時に形成される。それに対して、クモなどのほとんどの節足動物の体節形成は短胚型 (short germ type) と呼ばれ、体の後半部分 (クモでは後体部) の体節が後方に向かって徐々に形成される。形態レベルで見られる長胚型と短胚型の体節形成の違いがどのような遺伝的な変化を反映したものなのかについてはほとんど理解が得られていなかった。

(2) クモの短胚型の体節形成において中心的な役割を果たす組織が尾葉である。長胚型の胚には尾葉に相当する組織が存在せず、この組織の発生を解析することは短胚型と長胚型の体節形成の違いを理解することへとつながる。しかし、クモの尾葉を研究することの意義はそれだけではない。私たちのこれまでの研究から、尾葉の発生が前後軸・背腹軸や中胚葉の発生と密接に関係していることが分かってきていた (図 1)。具体的には、Delta シグナルが尾葉形成に先立ち中胚葉と尾葉外胚葉の間の運命選択を支配し (文献 1)、その Delta シグナルの上流では *patched(ptc)* が機能し、その *ptc* は中胚葉運命を促進する役割をも持っていた (Akiyama-Oda and Oda, 2010)。クモでは Hedgehog (Hh) と *Ptc* が前後軸を特異化するシグナル経路を構成していた。さらに、*decapentaplegic (dpp)* や *short gastrulation (sog)* の解析から、尾葉では背腹軸の発生を抑制する機構が働いていることが推測された (文献 2)。これらのデータは、尾葉の発生において様々なシグナル経路が関わり合っていることを示すものであった。クモの尾葉をひとつの基軸にして解析を行うことで、ショウジョウバエとは大きく異なる節足動物のボディープランを形作るための仕組みを明らかにすることができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

生物が示す形態的、分子的多様性を包括的に理解し、体系化することは生物学の永遠のテーマである。後生動物は、形態形質として認識されるボディープランに基づいて 20 以上の動物門に分類されているが、同じ動物門の動物種の間でも対応する (相同と考えられる) 現象を分子レベルで調べると仕組みに大きな違いが見つかる。この最も有名な例のひとつが、節足動物門の体節形成である。つまり、動物進化の過程では、形態があまり変化しないまま (ボディープランが保たれたまま) 形態を生み出すための分子的仕組み (または、プロセス) が大きく変化するということである。このような同じ動物門内での大きな分子的な (遺伝的な) 変化の実体を的確

に把握することは、ゲノム情報を基盤に動物門の枠を超えて知識を統合していく上で極めて重要な役割を果たす。

本研究は、ゲノムに基づく知識統合に向けて大きく動き始めている現状を念頭において、節足動物門内で起こった尾部パターン形成の分子的仕組みの変化を、節足動物門鋏角類 オオヒメグモ (*Achaearanea tepidariorum*) を軸とする比較学によって解明することを目指す。私たちはすでに、このオオヒメグモを新たなモデル動物の候補として開拓し、「昆虫 vs クモ」及び「節足動物 vs 脊椎動物」の比較において、この動物種の有用性を示してきた (文献 1, 2)。胚発生初期に原口の周辺に特異化される尾葉は、クモの後体部の体節形成及びその他のパターン形成を担う重要な組織である。本研究では、オオヒメグモにおける尾葉の形成と維持、そして、尾葉内で起こる細胞及び分子レベルの動態の制御に関わる遺伝子を同定し、その作用機序を明らかにすることにより、節足動物門と他の動物門のボディープランの関係を理解するための研究基盤を築くことを目指した。

3. 研究の方法

(1) Whole-mount in situ hybridization によるスクリーニング

尾葉形成期または尾葉形成期直後の均一化 cDNA ライブラリー由来で、EST 解析のために精製された DNA 断片をテンプレートにして、DIG 標識プローブを作製した。それぞれのプローブに対して、1-2 個の胚盤期胚 (尾葉形成期直前) と 1-2 個の胚帯初期胚 (尾葉形成後) を用いて Whole-mount in situ hybridization による染色を行った。染色作業の効率化をはかるためにアロカ社製の in situ チップを用いた。

(2) オリゴヌクレオチドマイクロアレイ解析による候補遺伝子の探索

これまでの EST 解析によって得られたオオヒメグモ cDNA の塩基配列とこれまでに個々にクローニングした cDNA の塩基配列をもとに、ソフトウエア OligoArray 2.1 (Rouillard et al., *Nucleic Acids Research* **31**, 3057) を用いて 40mer のオリゴ DNA 配列 (プローブ配列) をデザインし、*in situ* 合成方式のマイクロアレイを作製した (フィルジェン社、受託作製)。尾葉形成期の正常胚と同じステージの *dpp*, *ptc* 二重 RNAi 胚から total RNA を精製し、異なる蛍光色素で標識した相補的 RNA を作製して、マイクロアレイに対して競合ハイブリダイゼーションを行った (フィルジェン社、

受託解析)。各スポットの蛍光量のデータは Loess法で正規化した。同様のマイクロアレイ解析は、胚盤期後期の正常胚と *hh* RNAi胚を用いても行った。

(3) Parental RNA干渉 (pRNAi) による遺伝子機能抑制実験

Akiyama-Oda and Oda (*Development* **133**, 2347)に従って行った。

(4) オオヒメグモ初期胚へのマイクロインジェクション

卵を50%ブリーチで処理してコリオンを除いた後、卵をスライドガラス上に貼った両面テープの上に並べ、ハロカーボンオイル700(シグマ)で覆った。インジェクション用のガラス針はナリシグ社製の牽引器(PN3)を使用して作製した。インジェクターには10mlのディスプレインジ(テルモ)を用いて、インジェクション時の空気圧は手で制御した。

(5) Embryonic RNA干渉 (eRNAi) による遺伝子機能抑制実験

オオヒメグモの初期胚の単一割球にマイクロインジェクションにより、標的遺伝子の二本鎖RNAをFITC-デキストランとともに導入した。注射した胚は目的の発生ステージで固定し、in situ hybridizationによる染色後、FITCを可視化して、表現型を解析した。

4. 研究成果

(1) Whole-mount in situ hybridization スクリーニングの結果

予定尾葉領域または尾葉に発現する遺伝子を探索するために、合計で1584種類のプローブによる染色を行った。65個のプローブで細胞種特異的、または領域特異的な発現パターンが検出され、そのうち21個のプローブで尾葉の発生に関連する発現パターンが観察された。

(2) マイクロアレイ解析 I (*dpp*, *ptc* 二重 RNAi 胚を用いて)

胚盤期後期の正常胚と *dpp*, *patched* 二重 RNAi 胚から得た total RNA を用いたマイクロアレイ解析 (12Kx2) では、143 個のスポット

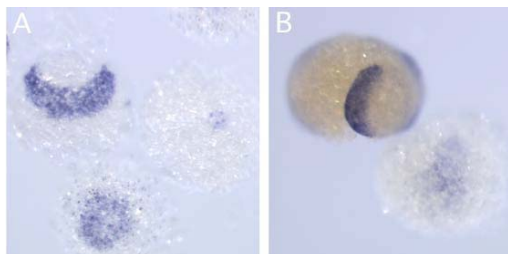


図1. マイクロアレイ解析Iにおいて尾葉または予定尾葉領域で特異的に発現することが判明した遺伝子の例。

において、蛍光量の比率が0.6以下であった。それらの中には、*Wnt5*などの既に胚盤の予定尾葉領域に特異的に発現することが分かっている遺伝子も含まれていた。このことは、実験が少なくともある程度期待通りに進んだことを意味した。さらに Whole-mount in situ hybridizationによる二次スクリーニングにより、予定尾葉領域を含む領域に特異的に発現する28個の遺伝子クローンに絞り込んだ(図1)。

さらに、pRNAiにより三次スクリーニングを行ったところ、ESTクローン At_eW_020_B15を元に作製した二本鎖RNAで尾葉の形成に顕著な異常が観察された。この異常が特異的なものかどうかを判定するために、複数の重複しない二本鎖RNAを使用してpRNAiを行ったところ、同様の異常が見られたことから特異性が確認できた。発現解析では、*hh* RNAi胚において At_eW_020_B15の発現領域が拡大することが明らかになった。これらの結果から、At_eW_020_B15が由来する遺伝子は Hhシグナルの支配を受けて、尾葉形成に働く重要な因子であることが示唆された。今後、この遺伝子の機能に関してより詳細な解析が必要である。

(3) マイクロアレイ解析 II (*hh* RNAi 胚を用いて)

ptc, *dpp* 二重 RNAi 胚で行ったマイクロアレイ解析と同じようなマイクロアレイ解析を *hh* RNAi 胚で行い、Hhシグナルの標的遺伝子の候補として15個程度の遺伝子が見出さ

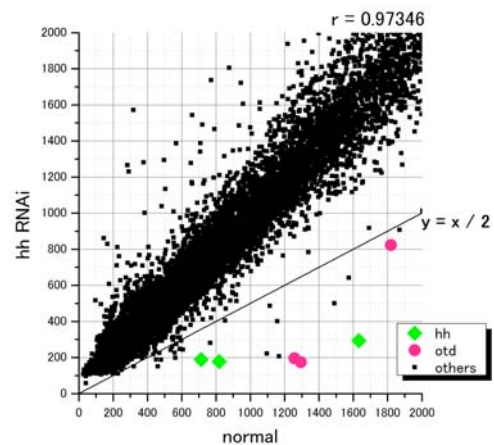


図2. マイクロアレイを用いた、ヘッジホッグシグナルの支配を受ける遺伝子の探索。マイクロアレイの各スポットについて[正常胚(normal)]と[ヘッジホッグRNAi胚(*hh* RNAi)]の蛍光強度をプロットした。ヘッジホッグ(*hh*)及びオルソデンティクル(*otd*)のスポットは◆と●で示している。

れた(図2)。その中には、ショウジョウバエのギャップ様遺伝子 *orthodenticle* (*otd*) とペアール遺伝子 *odd-paired* (*opa*) のホモログが含まれていた。ヘッジホッグシグナルの標的候補となったほぼすべての遺伝子について、pRNAi による表現型スクリーニングを行い、数個の遺伝子で発生異常を伴う表現型が得られたが、それらの表現型が遺伝子特異的な影響によるものかどうかは一部でまだ未確認である。

それでも、*otd* ホモログと *opa* ホモログの機能についてはpRNAi と eRNAi を用いた詳細な解析を進め、オオヒメグモの頭部領域の体節形成に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

今後、その他の候補遺伝子についても解析を進め、オオヒメグモの頭部及び尾部の体節形成の仕組みを遺伝子ネットワークの働きとして理解し、形態の保守的な進化と発生プログラムの多様化の関係を探究したい。

(4) 結論

本研究では、Whole-mount in situ hybridization による遺伝子探索とオリゴヌクレオチドマイクロアレイによる遺伝子探索を試みた。前者は時間と労力がかかり、計画通りには進まなかった。それに対して、後者は想像以上に高い検出感度と網羅性を持ち、オオヒメグモ初期胚における遺伝子探索に有用な実験手法であることが明らかになった。しかしながら、ゲノム解読が完了した既存のモデル生物とは違い、配列情報が乏しいオオヒメグモではゲノム全体を網羅する情報をマイクロアレイに搭載できなかったのは非常に残念である。

また、平行して行っている研究から、*otd* 及び *opa* が関わるオオヒメグモの頭部の体節形成が新しいタイプの体節形成であることが判明してきている。当初は尾葉に注目して本研究をスタートさせたが、頭部で起こっている体節形成との比較も、今後の重要な研究テーマになると考えられた。

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)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Akiyama-Oda, Y. and Oda, H. Cell migration that orients the dorsoventral axis is coordinated with anteroposterior patterning mediated by Hedgehog signaling in the early spider embryo, *Development* 137, 1263-1273(2010) 査読有り.
- ② Kanayama, M., Akiyama-Oda, Y. and Oda, H. Early embryonic development in the spider *Achaearanea tepidariorum*:

Microinjection verifies that cellularization is complete before the blastoderm stage, *Arthropod Structure and Development* 39, 436-445(2010) 査読有り.

[学会発表] (計4件)

- ① Akiyama-Oda, Y. and Oda, H. *hedgehog*- and *patched*-dependent mechanisms generate two orthogonal axes in a spider embryo. 2nd meeting of the European Society for Evolutionary Developmental Biology, 2008.7.31, Ghent, Belgium.
- ② Oda, H. *The spider Achaearanea tepidariorum is an emerging model for the study of cell and developmental biology*, The third meeting of insect genome, 2009.3.11, Kobe.
- ③ Oda, H., Kanayama, M. and Akiyama-Oda, Y. Contrasting mechanisms of axis formation in the phylum Arthropoda: Rapid versus slow development, 日本発生生物学会, 第43回大会 (Asia-Pacific Developmental Biology Network 共催), 2010.6.21, 京都.
- ④ 小田広樹、金山真紀、秋山-小田康子, 節足動物門における体節形成の進化: ビコイド対ヘッジホッグ, 日本進化学会、第12回大会, 2010.8.4, 東京.

[図書] (計1件)

- ① 小田広樹, *Emerging Model Organisms: クモ* (研究をささえるモデル生物、分担執筆), 化学同人, p.52 (2009).

[その他]

ホームページ等
<http://www.brh.co.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小田広樹 (ODA HIROKI)

株式会社 生命誌研究館・主任研究員

研究者番号: 50396222