

## *decapentaplegic* 遺伝子の異所的発現によって起こる カブラハバチ初期胚の異常

山本 大介・李 載旼・畠山 正統・大石 陸生

Daisuke S. YAMAMOTO<sup>1)</sup>, Jae Min LEE<sup>2)</sup>, Masatsugu HATAKEYAMA<sup>3)</sup> and Kugao OISHI<sup>1,4)</sup>: Morphological Abnormality Caused by Ectopic Expression of *decapentaplegic* Gene Homologue during Embryogenesis in *Athalia rosae ruficornis* (Hymenoptera)\*

<sup>1)</sup> Division of Biology, Graduate School of Science and Technology, Kobe University, Nada, Kobe, Hyogo 657–8501, Japan

<sup>2)</sup> Research Center for Environmental Genomics, Kobe University, Nada, Kobe, Hyogo 657–8501, Japan

<sup>3)</sup> Developmental Mechanisms Laboratory, Developmental Biology Department, Institute of Insect and Animal Sciences, National Institute of Agrobiological Sciences, Owashi, Tsukuba, Ibaraki 305–8634, Japan

<sup>4)</sup> Department of Biology, Faculty of Science, Kobe University, Nada, Kobe, Hyogo 657–8501, Japan

E-mail: oishi@biol.sci.kobe-u.ac.jp (KO)

膜翅目昆虫カブラハバチ *Athalia rosae ruficornis* は人為的に単為発生を開始させることができる、昆虫で唯一卵細胞質内精子注入法 (ICSI 法) により体外人工授精ができる (Sawa and Oishi, 1989)、FISH 法により遺伝子を染色体上に位置づけることができるなど実験を行う上で優れた特長を持っているが、発生のメカニズムはほとんど分かっていない。

Decapentaplegic (Dpp) タンパク質は TGF- $\beta$  スーパーファミリーに属し、生体内でシグナル因子として働き、主要かつ多様なシグナル伝達に関与している (Podos and Ferguson, 1999; Raftery and Sutherland, 1999)。*decapentaplegic* (*dpp*) はキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* では初期胚の背側で発現し背腹軸の決定に関わっている (St. Johnston *et al.*, 1990; Wharton *et al.*, 1993)。また成虫の翅脈形成、眼形成、付属肢形成、生殖器官形成などさまざまな段階にも関与することが知られている (Ingham and Fietz, 1995; Goto and Hayashi, 1997; Pignoni and Zipursky, 1997; Sanchez *et al.*, 2001)。

昆虫においては双翅目のショウジョウバエ科 4 種と鞘翅目のコクヌストモドキ *Tribolium castaneum* (Sanchez-Salazar *et al.*, 1996) で *dpp* の cDNA の全長がクローニングされている。

われわれは先に、カブラハバチで新たに *dpp* ホモログ cDNA の全長をクローニングした (山本ら, 2001)。この遺伝子から推測されるタンパク質のアミノ酸配列は他種昆虫の *dpp* アミノ酸配列と高い相同性があった。胚発生、幼虫、蛹、成虫の mRNA を用いノーザン解析を行ったところ、カブラハバチ *dpp* はすべての発生段階を通じて発現していることが分かった。これはキイロショウジョウバエで報告されているものと同様の結果である。カブラハバチ *dpp* がキイロショウジョウバエと同様の機能を持つかどうか調べるために、*dpp* を卵に顕微注入し発現させ、どのような影響がでるか調べた。

*dpp* cDNA 配列の上流にキイロショウジョウバエの熱ショックタンパク質遺伝子 (*hsp 70*) のプロモーターを付加した配列を組み込んだプラスミド DNA を作製し、カブラハバチ成熟未受精卵の腹側に顕微注入した。発生開始後 12 時間に 30 °C 24 時間の条件で熱ショックを与え、*dpp* を異所的に強制発現させ、その後形成される胚の形態を観察した。その結果、注入した卵のうち約 12 % の胚で、胚帯の伸長や胚反転の不完全、胚の正中面に対する軸のねじれ、付属肢の形態異常が観察された (Table 1)。顕微注入後、熱ショックを与えない対照実験では、同様の異常な形態は約 3 % の胚で観察された (Table 1)。異常な胚の出現する割合に大きく差が見られることから、これらの異常は注入した *dpp* の働きによるものだと考えられる。以上のことからカブラハバチの *dpp* ホモログは形態形成に関与するシグナル因子としての機能を持っており、今回の条件下では初期胚の体節や付属肢形成の時

\* Abstract of paper read at the 37th Annual Meeting of Arthropodan Embryological Society of Japan, June 1–2, 2001 (Nihonmatsu, Fukushima).

Table 1 Abnormal embryos produced by microinjection of plasmid DNA carrying the *dpp* gene homologue in *Athalia rosae ruficornis*.

Heat treatment (30°C, 24 h)	Number of eggs injected (%)	Number of embryo developing after 48 h (%)	Number of normal embryos (%)	Number of abnormal embryos (%)
+	459 (100)	291 (63.4)	235 (51.2)	56 (12.2)
-	398 (100)	268 (67.3)	258 (64.8)	10 (2.5)

期に、注入したプラスミド DNA から発現した *dpp* による影響があらわれ、その結果、正常な調節機構が乱されていると考えられる。

今後は whole-mount *in situ* hybridization 法により正常胚での *dpp* の発現パターンおよび *dpp* を顕微注入した胚での発現パターンの違いを調べ、異常な形態との関係を明らかにしたい。

#### 引用文献

- Goto, S. and S. Hayashi (1997) *Development*, **124**, 125–132.  
 Ingham, P.W. and M.J. Fietz (1995) *Curr. Biol.*, **5**, 432–440.  
 Pignoni, F. and S.L. Zipursky (1997) *Development*, **124**, 271–278.  
 Podos, S.D. and E.L. Ferguson (1999) *Trends Genet.*, **15**, 396–402.  
 Raftery, L.A. and D.J. Sutherland (1999) *Dev. Biol.*, **210**, 241–268.  
 Sanchez, L., N. Gorfinkiel and I. Guerrero (2001) *Development*, **128**, 1033–1043.  
 Sanchez-Salazar, J., M.T. Pletcher, R.L. Bennett, S.J. Brown, T.J. Dandamudi, R.E. Denell and J.S. Doctor (1996) *Dev. Genes Evol.*, **206**, 237–246.  
 Sawa, M. and K. Oishi (1989) *Zool. Sci.*, **6**, 549–556.  
 St. Johnston, R.D., F.M. Hoffmann, R.K. Blackman, D. Segal, R. Grimaila, R.W. Padgett, H.A. Irick and W.M. Gelbart (1990) *Genes Dev.*, **4**, 1114–1127.  
 Wharton, K.A., R.P. Ray, and W.M. Gelbart (1993) *Development*, **117**, 807–822.  
 山本大介・李 載岐・島山正統・大石陸生 (2001) *Proc. Arthropod. Embryol. Soc. Jpn.*, **36**, 27–28.