

ヤエヤマサソリの分子発生生物学的研究： 実験系樹立へ向けた試み

山崎 一憲・秋山一小田 康子・小田 広樹

Kazunori YAMAZAKI¹⁾, Yasuko AKIYAMA-ODA^{1,2)} and Hiroki ODA¹⁾: Application of Molecular Developmental Biology to the Scorpion, *Liocheles australasiae* (Arachnida: Scorpiones, Ishnuridae)*

¹⁾ JT Biohistory Research Hall, 1–1 Murasaki-cho, Takatsuki, Osaka 569–1125, Japan

²⁾ Precursory Research for Embryonic Science and Technology (PRESTO), Japan Science and Technology Corporation (JST)

E-mail: yamazaki@brh.co.jp (KY)

節足動物における分子発生生物学的研究は、ショウジョウバエにおいて大きく発展し、ショウジョウバエに関しては形態形成に関わる遺伝子が数多く単離されその情報が豊富に蓄積している。一方他の節足動物においては、ショウジョウバエ以外の昆虫類や甲殻類に関しても分子発生生物学的研究が広く進められているものの、多足類や鋏角類ではこの分野の研究はあまり行われておらず知見は乏しい。節足動物の形態形成について全体像を捉えるためには、これら両者の情報を欠かすことはできないと思われる。特に、節足動物の祖先型を推測する上では、節足動物を構成する分類群でより原始的とされる鋏角類の知見は必要である。これまでに私たちの研究室では、鋏角類の蛛形綱クモ目に属するオオヒメグモを材料とし、その分子発生生物学的研究を行ってきた。そして、ショウジョウバエの胚発生に関わる遺伝子と相同な遺伝子を数多く単離し（例えば、*decapentaplegic*、*forkhead*、*engrailed*など）、その発現について解析ができていく（Akiyama-Oda and Oda, 2003）。オオヒメグモにおける形質が鋏角類共通の形質であるのか、あるいはクモ類特有の形質であるのかを判定するためには、他の鋏角類における研究が必要であり、特に、鋏角類において原始的であると考えられているサソリ類の知見は重要と思われる。しかしながら、サソリ類は卵胎生もしくは胎生によって繁殖していることから（Polis and Sissom, 1990）、外見から胚の発生状況を確認することができず、したがって正確な発生段階を追跡することが非常に困難と思われる。ところが筑波大学の牧岡研究室において長年研究材料として用いられてきたヤエヤマサソリでは、その研究から胚発生の起点が見いだされており、形態学的手法を中心とした胚発生に関する研究が行われてきた（Yamazaki *et al.*, 1998, 2001; 山崎・牧岡, 2002）。今後このヤエヤマサソリが、さらに分子発生生物学的研究材料として利用可能となれば、節足動物の進化に関する貴重な情報が得られるものと期待される。そこで今回、ヤエヤマサソリを用いた分子発生生物学的研究の実験系樹立を目指し、特に、多くの分類群において背腹軸形成に重要な役割をなし、オオヒメグモでもその存在と発現が確認されている *decapentaplegic* (*dpp*) 相同遺伝子の単離を試みた。

まず最初に、出生直後の1齢若虫を材料としてmRNAの抽出（QuickPrep™ Micro mRNA Purification Kit; Amersham Pharmacia Biotech）、cDNAを合成（SuperScript™ Choice System for cDNA Synthesis; Invitrogen™）した。そしてこのcDNAを鋳型とし、オオヒメグモ *dpp* (*At. dpp*) 増幅時に使用したプライマー（forward primer: 5'-GAYGTGGNTGGRAYGAYTGG-3', reverse primer: 5'-AGYTSNGTNGGNACRCARCA-3'）によりPCR増幅を行った。PCR反応は、第一段階: 95℃ 5分、55℃ 2分30秒、72℃ 30秒を1サイクル、第二段階: 95℃ 40秒、55℃ 30秒、72℃ 30秒を35サイクル行った後、72℃で5分反応させ4℃保存した。その結果、*dpp*に相同と思われるDNA断片（174 bp）を増幅することができた。そこで次に、先に合成したcDNAからcDNAライブラリー（ λ gt11 vector, random primer）を作成した。そして、PCR産物からプローブを作成（PCR DIG Probe Synthesis

* Abstract of paper read at the 38th Annual Meeting of Arthropodan Embryological Society of Japan, July 5–6, 2002 (Sugadaira, Nagano).

Kit; Roche) し、cDNA ライブラリーをスクリーニングして全長 cDNA を単離した。さらにシーケンスにより、その cDNA は 420 アミノ酸残基からなるポリペプチドをコードしていることを明らかにした。その C 末端アミノ酸配列を他の動物 (*Acropora millepora*, *Achaearanea tepidariorum*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio*, *Gryllus bimaculatus*, *Gallus gallus*, *Homo sapiens*, *Junonia coenia*, *Mus musculus*) の *dpp* 相同遺伝子および他の TGF- β スーパーファミリー遺伝子 (*screw*, *glass bottom boat*) と比較した結果、この遺伝子は *dpp* 相同遺伝子であることが強く示唆され、*La. dpp* と命名した。

さらにこの遺伝子の発現を調べるために whole-mount *in situ* ハイブリダイゼーションを試みた。しかしながら、現在までに RNA sizing や試料への Proteinase K 処理時間を変えるなどいくつかの条件下で試行しているものの、有意なシグナルは得られていない。

今回、鋏角類において原始的と考えられているサソリ類において初めて発生に関わる遺伝子 (*La. dpp*) を単離することができた。これは、節足動物全体を捉えるために、ヤエヤマサソリを材料とした分子発生生物学的研究を進めていくうえでの大きな進展であると思われる。今後ヤエヤマサソリを用いた分子発生生物学的研究がさらに発展するためには、whole-mount *in situ* ハイブリダイゼーションの好条件を見つけたし、発現解析を行えるようにする必要がある。

引用文献

- Akiyama-Oda, Y. and H. Oda (2003) *Development*, **130**. (in press).
- Polis, G.A. and W.D. Sissom (1990) In G.A. Polis (ed.), *The biology of Scorpions*, pp. 161–223. Stanford University Press, Stanford, California.
- Yamazaki, K., K. Yahata and T. Makioka (1998) *Proc. Arthropod. Embryol. Soc. Jpn.*, **33**, 17–20.
- Yamazaki, K., H. Yahata, N. Kobayashi and T. Makioka (2001) *J. Morphol.*, **247**, 39–50.
- 山崎一憲・牧岡俊樹 (2002) *Proc. Arthropod. Embryol. Soc. Jpn.*, **37**, 49–51.