

フクロムシの体づくりに関わる遺伝子群の発現パターンに関する研究

生物資源科学部 応用生物科学科

2年 山上 涼

指導教員 生物資源科学部 応用生物科学科

教授 岡野 桂樹

目的と背景

私は1年生からフジツボの発生についての自主研究を行っていた。フジツボには富士山型をした通常のフジツボ（アカフジツボ）とカニなどに寄生するフジツボ（フクロムシ）の大きく2つに分けられる。前回の自主研究ではフクロムシの発生初期からキプリス幼生までの発生の様子について観察できたが通常のフジツボでは得られたサンプルが少なく、原腸陥入の後期以降の発生の様子しか観察、比較することができなかった。今回の自主研究ではアカフジツボと寄生性フジツボの初期段階の胚発生の比較を目的として行う予定だった。しかし、アカフジツボを採取してくださっていた漁師菅原さんが急逝され、アカフジツボが得られなかった。そのため、当初予定していた発生の比較研究を断念し、フクロムシだけで研究できるテーマに変更した。

私は発生の比較以外にフクロムシの体（特に成体）が、アカフジツボと全く異なることを不思議に思っていた。発生過程でどのような遺伝子が発現しているのかについても疑問に思っていた。動物の体づくりではHOX遺伝子群などが重要なことは授業で習った。そこで、フクロムシで、発生や体づくりに重要な転写因子群（HOX遺伝子など）の発現を調べることにした。本研究では、1年生で自主研究を行っていたフクロムシの胚とノープリウス幼生期、キプリス幼生期に加え、植物の根のような構造を持つ寄生に特化した成体構造であるインテルナ（図1）における遺伝子の発現量を、定量PCRを用いて調べた。調べた遺伝子は *Engrailed*、*Antennapedia*、*Ultrabithorax*、*Distal-less*、*Extradenticle* および *Pax1/9* の6種である（表1）。

実験材料と方法

実験材料

本研究では千葉の館山市で採取されたイワガニに寄生しているフクロムシ *Sacculina yatsui* を用いた。フクロムシは御茶ノ水大学湾岸生物教育研究センターの吉田博士からいただいた。胚の取得方法は昨年度の自主研究と同じ方法を用いた。図1にヤツフクロムシの発生過程を示す。

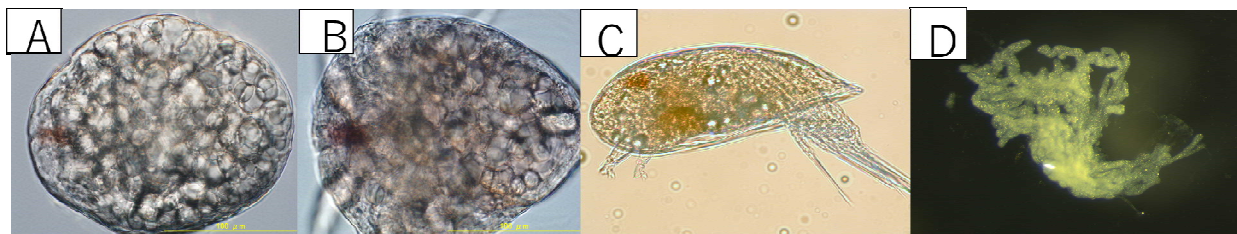


図1. ヤツフクロムシの発生過程

A: 胚（原腸陥入後、眼と脚が形成された時期） B: ノープリウス幼生 C: キプリス幼生 D: インテルナ（成体）

実験に使用した遺伝子（表1）

本実験で使用した遺伝子の一覧を表1に示す。また、各遺伝子が関与するショウジョウバエの器官の対応図を図2に示す。

遺伝子名	遺伝子の種類	機能の例
<i>Engrailed</i>	セグメントポラリティ遺伝子群	擬体節の形成
<i>Extradenticle</i>	HOX遺伝子	脳や眼などの神経系の発現
<i>Pax1/9</i>	Paired box遺伝子	脊椎動物の脊椎や歯などの形成に関与
<i>Antennapedia3</i>	HOX遺伝子	中胸部の発現
<i>Distal-less</i>	HOX遺伝子	脚、触角等の付属器官の形成
<i>Ultrabithorax</i>	HOX遺伝子	後胸部の発現

表1. 本実験で使用した遺伝子一覧(青で示されているものがショウジョウバエでの機能、黄色で示されているのが脊椎動物での機能)

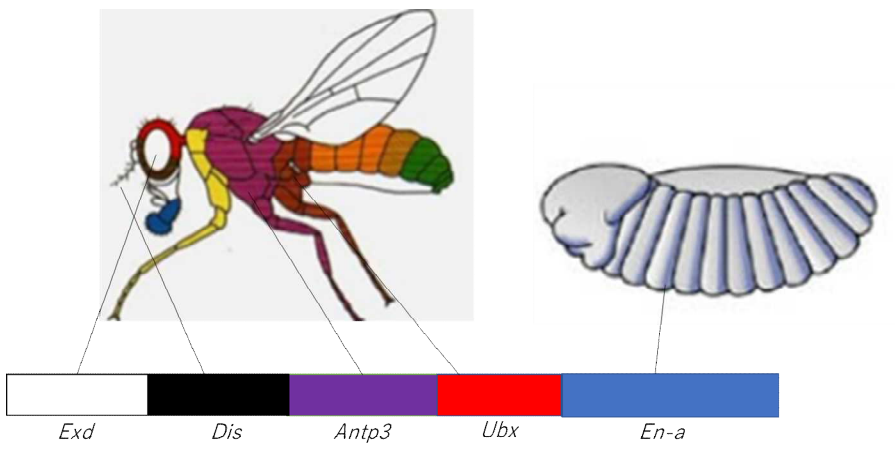


図2, 各遺伝子が関与する器官の対応図

遺伝子配列はヤツフクロムシのトランスクリプトームから得た。各遺伝子のショウジョウバエでのホモログの機能を挙げる。*Engrailed* (*En*)はセグメントポラリティ遺伝子群の1つで、擬態節を形成し胚発生の遺伝子発現を調節する。*Antennapedia* 遺伝子 (*Antp*)と *Ultrabithorax* 遺伝子 (*Ubx*)は代表的なホメオティック遺伝子群の仲間で、*Antp*は中胸部の位置情報を与え、*Ubx*は後胸部の位置情報を与える遺伝子である。*Distal-less* (*Dis*)は脚や触角といった付属器官の形成に必要である。*Extradenticle* (*Exd*)は脳や眼などの神経系の発現に関与する。これらはすべて配列中にHOXドメインを持つ。

Paired box (*Pax*) 1/9はN末端にpaired domainというDNA結合領域を持つ発生に重要な遺伝子のホモログである。哺乳類では、*Pax1*は骨格の形成に関与し、*Pax9*は歯の形成に関与するが、ヤツフクロムシでは*Pax1*、*Pax9*の両方に同程度ホモロジーがあり、どちらともいえないため、*Pax1/9* (*Pax group 1*)と称する。

RNAの抽出

RNA抽出にはNucleospin RNA plus (Takara)を用いた。液体窒素で固定し、 -80°C の冷凍庫に保存していたサンプルを取りだし、Buffer LBP 350 μl を滴下し、ホモジナイズをした。次にNucleo Spin gDNA removal column を2 mlコレクションチューブにセットし、そこにサンプル液を加えて遠心し、DNAを除去した。100 μl のBinding solution BSをチューブに加えNucleoSpin RNA plus columnにロードし、RNAをカラムに結合させた。Buffer WB1、Buffer WB2で洗浄後、 H_2O (RNase-free)でRNAを溶出させた。ナノドロップでRNA量を測定し、1 μg 相当分を新しいPCRチューブに入れ、cDNA合成に供した。

cDNAの作製

cDNA合成には、ReverTra Ace qPCR RT Master mix with gDNA remover (Toyobo)を用いた。genomeDNAを完全に除くため、DNase処理を行うキットを採用した。サンプル1 μg 分に H_2O を加え、それぞれ12 μl になる様に調製し、 65°C で5分処理しRNAの熱変性させた。次に、4X DN MM(gDNA remover入り)を4 μl ずつ加え全量が16 μl になるようにし、 37°C で5分処理しゲノムDNAを完全に除去した。さらに、それぞれのサンプルに5XRT Master mixを4 μl 加え 37°C で15分、 50°C で5分、 98°C で5分でRT反応を行った。easy dilutionを加え、ストック液の濃度が1 ng/ μl RNA相当になるようにしてqPCR用のテンプレート溶液とした。

プライマーの希釈

qPCR反応の手順を簡略化するため、それぞれの遺伝子のフォワードプライマーとリバースプライマーを1.2 μM になるように調製した混合プライマーを作製して使用した。各プライマーのリストを表2に示す。

200214 Primer sequences for qPCR analysis				
	Primer name	sequences (5' to 3')	origin	Pr.size
Pax1/9	F-SyPax1/9-qPCR1086	CCCAAACCTGAAGCTGTTCCAC	>Sy_lar_TR29107 c0_g1_i1 len=1	99
	R-SyPax1/9-qPCR1185	TGACGGAGGAAGTTTGTAGCGT	paired box Pax-1	
Extradenticle	F-SyExd-qPCRr823	GCCAATCACACCGAACGAGATC	Sy_ext_TR24524 c5_g1_i1	81
	R-SyExd-qPCRr904	CTGTTTGAGCTGCACCTGGATG	Exd extradenticle	
Antennapedia3	F-SyAntp3-qPCRr423	AACATACACCCGCTACCAGACC	>Sy_lar_TR39552 c4_g2_i1 len=1	149
	R-SyAntp3-qPCRr572	CACTTCATTCGCCGGTTTTGGA	Antp_3 Antennapedia-like	
Distal-less	F-SyDisL-qPCR1044	ACTCCTCCTTCTGCACTTCACC	>Sy_lar_TR11245 c0_g1_i1	98
	R-SyDisL-qPCR1142	ACAGAGACTCGGCTTGATGTCC	len=2331 Distal-less	
Engrailed	F-SyEng-qPCRr856	GAACGCCTCATGAACTCTGCC	>Sy_lar_TR23479 c0_g1_i1 len=1258	125
	R-Sy-Eng-qPCRr981	ATTGTCGGTCGCAACTTGGAC	Engrailed En-a engrailed-a	
Ultrabithorax	F-SyUbx3-qPCRr1411	CAACCACTACCTCACCAGACGT	>Sy_lar_TR39552 c4_g1_i1 len=1515	101
	R-SyUbx3-qPCRr1512	CACTTCATTCGCCGGTTTTGGA	Ubx_3 Ultrabithorax	

表2. 本実験で使用したプライマーのリスト

qPCR反応

qPCRにはThunderbird SYBR qPCR Mix (Toyobo)を使用した。96穴qPCR用プレート (Hard shell PCR plate, HSP9645, Bio-rad)を用い、12種類のcDNAで4種類のプライマーセットを2連で試した。CFX96 real-time PCR (C1000 thermal cycler, Bio-rad)装置を用いた。qPCRは 95°C で60秒熱変性後、 95°C で15秒、 60°C で15秒、 72°C で45秒のサイクルを40サイクル行った。

結果と考察

得られた結果を図3に示す。結果は2～6サンプルの平均値である。

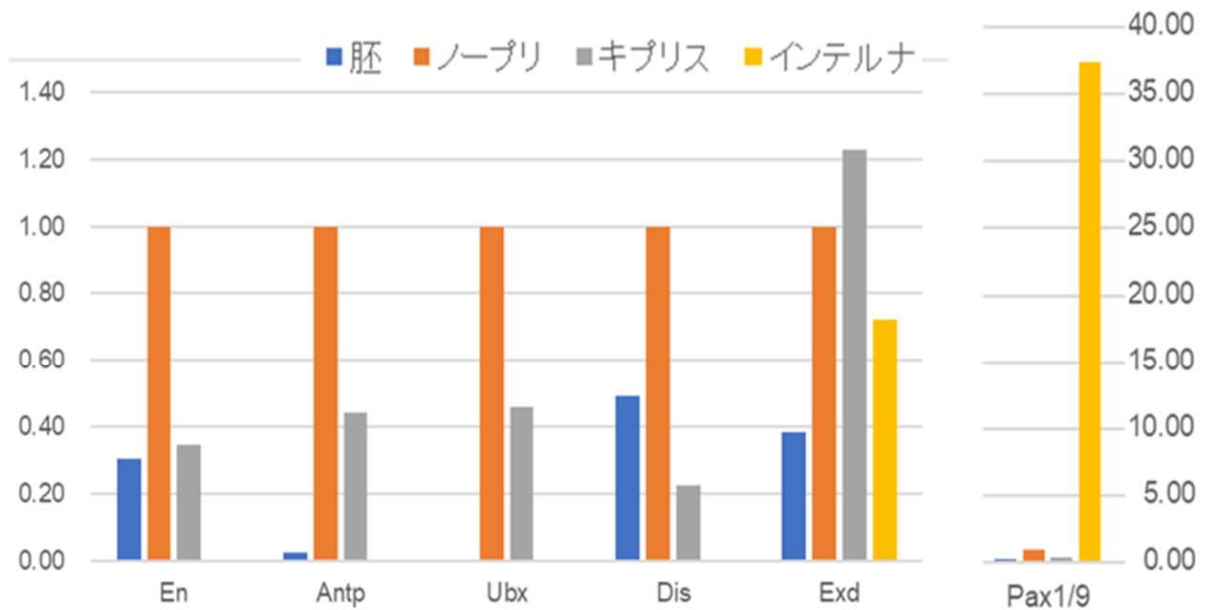


図3.定量PCRの結果

縦軸: $\Delta\Delta\text{CT}$ 法でノープリウス幼生の値を1とした時の相対的な遺伝子発現量(18Sで標準化)
青: 胚、オレンジ: ノープリウス幼生、灰色: キプリス幼生、黄色: 成体インテルナ

セグメントポラリティ遺伝子である *Engrailed (En)* は、胚発生が一番基本となるそれぞれの節の形を規定するタンパク質をコードする遺伝子であるが、予想通り、胚の時期からキプリス幼生期まで発現していることがわかった。一方、有名なホメオティック遺伝子である *Antennapedia (Antp)* と *Ultrabithorax (Ubx)* は予想に反して胚の時期ではほとんど発現せず、ノープリウス幼生期、キプリス幼生期で主に発現していた。 *Distal-less (Dis)* は脚や触角といった付属器官の形成に必要であるが、この遺伝子は胚からキプリス幼生期に至るどの時期にも発現していた。興味深いことにこれら体節や脚などに関係する遺伝子群は成体のインテルナでは全く発現していなかった。この事実は植物の根のような枝分かれした菌糸状の構造が節足動物の基本的な構造である体節構造を持たない、またどの体節構造にも属さない組織である可能性を示唆する。一方、 *Extradenticle (Exd)* 遺伝子は、脳や眼などの神経系の発現に関与するといわれているが、この事実は、幼生期だけでなく、インテルナにも神経系が存在する岡野研究室の研究結果と一致する。驚くのは *Pax1/9* であり、この遺伝子は幼生期でも発現しているが、その40倍近くの発現量がインテルナに発現していた。したがって、 *Pax1/9* がインテルナの不思議な構造を理解する上できわめて重要な転写因子である可能性がわかった。

この自主研究で、ショウジョウバエやマウスで有名な遺伝子群がフジツボの体づくりの際にも重要な働きを持つことがわかり、動物の体づくりの基本がどの生物にも当てはまること、その遺伝子群をうまく使って、それぞれのユニークな体ができていることがわかった。