

クマムシの生殖戦略-雄分化の謎に挑む-

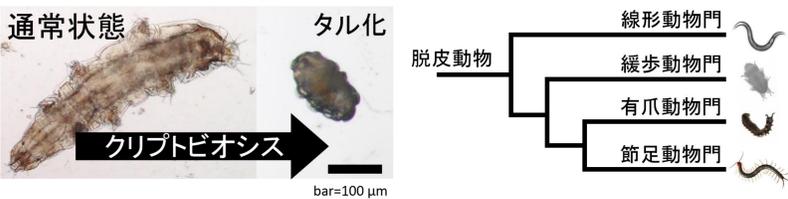
○杉浦健太¹、吉田祐貴²、小野田海道³、國枝武和⁴、鈴木忠^{5,6}、荒川和晴²、松本緑^{1,3,6}

1:慶應義塾大学大学院理工学研究科、2:慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科先端生命科学研究科
3:慶應義塾大学理工学部生命情報学科、4:東京大学大学院理学系研究科、5:慶應義塾大学医学部、6:慶應義塾大学自然科学研究教育センター



Intro1: クマムシとは

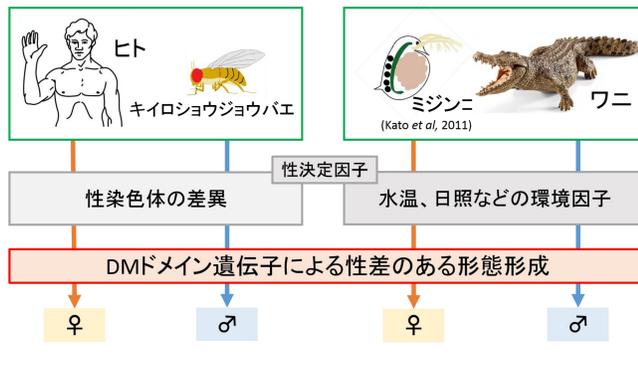
クマムシは乾燥した状態になった際の驚異的なストレス耐性が注目されている。一方で脱皮動物を代表する線形動物門と節足動物門の間種に属する緩歩動物門を形成しており、これらの生物学的進化を解き明かす上で重要な生物種である。



Intro2: 性決定とDMDメイン遺伝子

生物多様性を広げるためにゲノムを混合することのできる有性生殖は、進化を促進させる重要な因子である。有性生殖には必ず性決定が伴うが、これに関わる遺伝子は私たちヒトやワニ、ミジンコ、ハエなど多くの生物で広く保存されている。

この遺伝子は総称してDMDメイン遺伝子と呼ばれ、DMDメインという非常によく似た構造を持った遺伝子群である。クマムシでもDMDメイン遺伝子が性決定の鍵として進化の促進を担い、線形動物と節足動物を繋ぐ架け橋となっていると考えられる。



Intro3: クマムシに関する最新の研究

私たちはクマムシ研究に二種類のクマムシを用いている。二種ともワムシを餌とし、自然界ではコケの中に住んでいた。

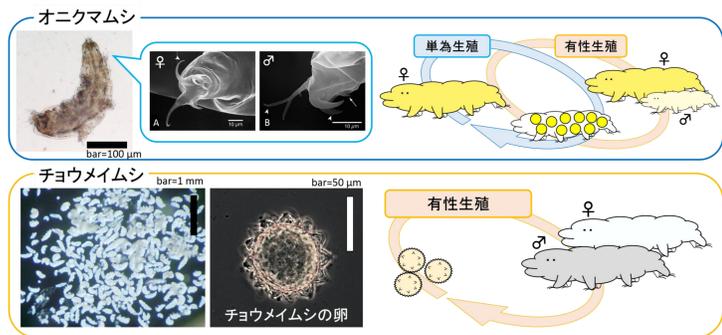
・オニクマムシ

オニクマムシはメスのみで産卵し増殖する単為生殖を行うクマムシである。しかし日吉で採集されたH-1系統から非常に低い確立でオスが誕生し、有性生殖へと生殖様式を転換していることが示唆された。オスはメスより身体が小さいが大きな爪を持つ。

・チョウメイムシ

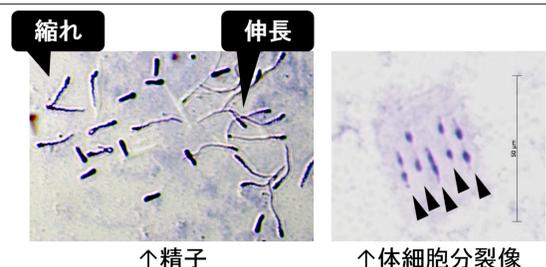
一個体のみで飼育すると卵を作らないが、二個体以上で飼育することで子孫を残せることから、雌雄の存在する有性生殖を行っている種であると考えられる。しかしながら雌雄の同定はされておらずその存在から証明する必要がある。

これら生殖様式の異なる二種を用いることでクマムシの性決定機構の解明に挑む。



Result1: 精子の存在と染色体像

- ・チョウメイムシにオスが存在するならば精子を持った個体がいるだろう。私たちは個体をスライドガラス上ですり潰し染色することで精子の存在を確認することができた。また精子には縮れ型と伸長型の二種類が存在することが分かり、貯精嚢の形状を示唆するものである。
- ・これにより、チョウメイムシは雌雄のある有性生殖を行う種であることが証明された。
- ・同様の手法で染色体像を確認することができた。体細胞分裂像からチョウメイムシの染色体型は $2n=10$ であることが分かった。
- ・性染色体の有無は確認できなかった。



Result2: オニクマムシのゲノム解析

生命の設計図であるゲノムを、次世代シーケンサーを用いて解読した。これによりオニクマムシを構成する遺伝情報を全て得ることができ、進化を解き明かす重要なデータを得ることができた。



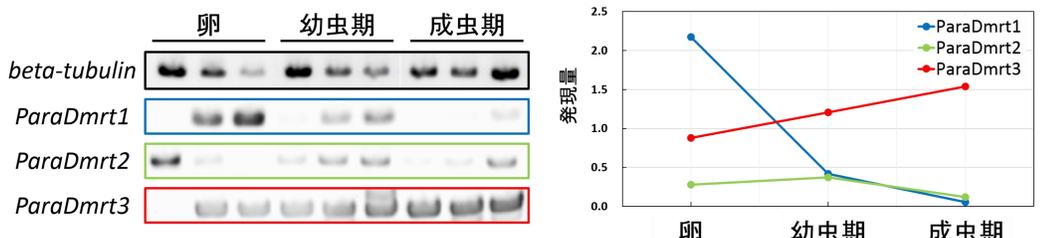
	スコア
全長	94,600,000 塩基
スキファールド数	38,746本
GC含量 (%)	41.61
CEGMA (%)	97.2
予測遺伝子数	20,841個

- ・全長は94.6 Mbであった。
- ・非常に多くのスキファールドが構成され、多くのコンタミネーションの存在が示唆される。
- ・真核生物に保存されている遺伝子 (=CEGMA)247個の内97.2%(240個)が保存されていた。
- ・別種クマムシのトランスクリプトームデータをゲノムにマッピングした結果、20841個の遺伝子を予測することができた。

Result3: DMDメイン遺伝子の発現と配列比較

解読したゲノム内に3つのDMDメイン遺伝子を発見した。MilDmrt1~3 (*Milnesium* sp. *DM domain related transcription factor*) と名付けた。またそれらと似ている遺伝子をチョウメイムシでも発見し、ParaDmrt1~3 と名付けた。

- ・RT-PCRを行い、ParaDmrt1~3の卵から成虫になるまでの発現量を調べた。
- ・ParaDmrt1は卵で高発現しており、ParaDmrt3は成長するにしたがって徐々に発現が高くなっていくことが示唆された。



- ・シヨウジョウバエのDMDメイン遺伝子である *doublesex*、線虫のDMDメイン遺伝子 *mab-3* と CLUSTAL-W を用いて配列を比較した。非常に相関性が高いことが分かった。

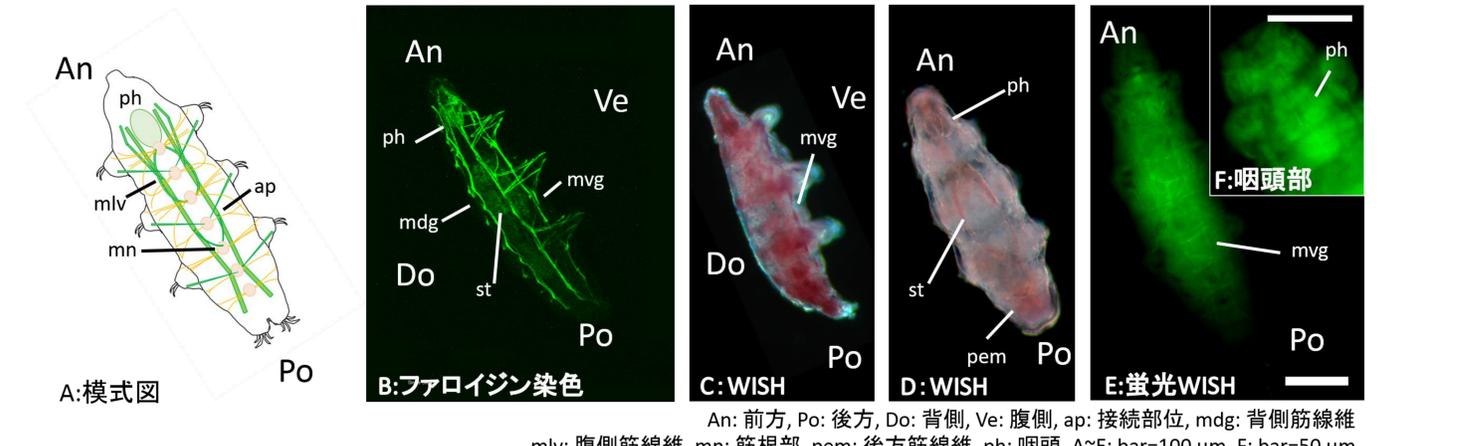
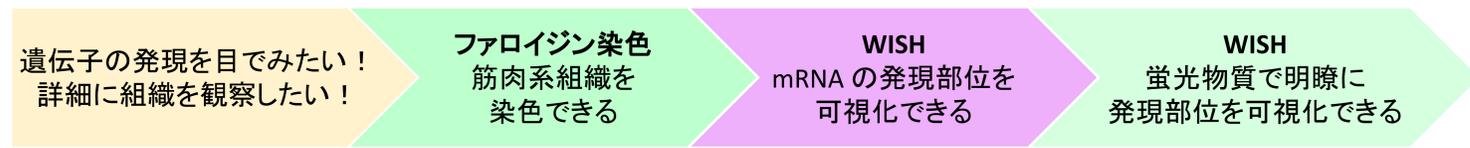
Sequence alignment of DMD main genes from various species:

```

Dm Doublesex      PRTEFNCARCRNHGLKIILKGHKR...YCFEAYCTCEKCRRL
Pr ParaDmrt1      YQRTPKCPCRCRNHNVSALKGHKR...YCRWDCICAKCTQ
Mi MilDmrt1       YQRTPKCPCRCRNHNVSALKGHKR...YCRWDCICAKCTQ
Hd nHd.2.3.1.g10557 YQRTPKCPCRCRNHNVSALKGHKR...YCRWDCICAKCTQ
Pr ParaDmrt2      MSPPG---FFVPHPTTEKGARKPKCARCRNHDAVSWLKGHKR...HCKYKDCICAKCNLIAERQVMAAQVALKRQQAHEH
Mi MilDmrt2       MSPPG---FFVPHPTTEKGARKPKCARCRNHDAVSWLKGHKR...HCKYKDCICAKCNLIAERQVMAAQVALKRQQAHEH
Hd nHd.2.3.1.g10020 MSPPATNFFVPHPTTEKGARKPKCARCRNHDMVTSVKGHKR...HCKYKDCICAKCNLIAERQVMAAQVALKRQQAHEH
Pr ParaDmrt3      RHLRTPKCARCRNHGVVSLKGHKR...FCFWRKDCICAKCNLIAERQVMAAQVALRRR
Mi MilDmrt3       RHLRTPKCARCRNHGVVSLKGHKR...FCFWRKDCICAKCNLIAERQVMAAQVALRRR
Hd nHd.2.3.1.g06330 RSLRTPKCARCRNHGVVSLKGHKR...FCFWRKDCICAKCNLIAERQVMAAQVALRRR
Ce MAB-3           KRVRDPCARCSAHGVLVLRGHKR...TCQCVTCTCTLVEHRRNLMAAQIKLRR
    
```

Legend: Mi: オニクマムシ, Pr: チョウメイムシ, Hd: ヤマクマムシ, Dm: キイロシヨウジョウバエ, Ce: 線虫
全てのDMDメイン遺伝子で保存されたアミノ酸配列は黒地白字、系統的に近縁なDMDメイン遺伝子で保存されたアミノ酸配列は各青字、緑字、赤字

Result4: ファロイジン染色とWhole mount *in situ* hybridization (WISH)



この技術を用いて DMDメイン遺伝子の発現を可視化して観察する!!!

Conclusions

- ・今回の研究ではチョウメイムシの有性生殖を証明できた。
- ・オニクマムシのゲノムを解読できた。
- ・種を超えて保存された3つのDMDメイン遺伝子を発見した。また RT-PCR によって発現量を確認し、特徴的な発現タイミングがあった。
- ・発現部位同定のための WISH 法開発に成功した。

Acknowledgments

クマムシに関する知見をご教示くださった慶應義塾大学 堀川大樹先生、ミジンコに関する知見をご教示くださった大阪大学 渡邊肇先生、加藤泰彦先生にこの場をお借りして謝辞を申し上げます。

