

ヤマトヒメミミズのカドヘリン相同遺伝子の探索

日大生産工（院） ○森 和俊

日大生産工 野呂 知加子

1. 諸言

本研究は、様々な種で組織形成に重要な役割をもつ細胞接着分子カドヘリンの機能と進化的意義を解明するために、再生による無性生殖を行う環形動物ヤマトヒメミミズのカドヘリン相同遺伝子をクローニングすることを目的とする。

動物・植物などの複雑な多細胞生物では、受精卵が分裂し、特徴的な構造と機能をもつさまざまな種類の細胞へと分化する。各細胞は、共通する機能を持つ細胞同士で組織を形成し、形成された複数の組織が器官へと編成されて、特定の高次機能を果たすようになる。

これらの組織および器官の形成と維持には、細胞接着分子と呼ばれるタンパク質が重要な役割をもつ。カドヘリンは、細胞間接着を担う細胞接着分子の1つであり、名前の由来はカルシウム接着 (calcium adhering) である。この名の通り、カドヘリンの接着性は、細胞外の Ca^{2+} の存在に依存している。カドヘリンは、それぞれ1つの膜貫通ドメインと、比較的短く保存性の高いC末端側の細胞質ドメイン、そして5つの細胞外カドヘリンドメインより成っている。細胞外ドメインは、 Ca^{2+} の結合とカドヘリンを介する細胞間接着に必要である。細胞内ドメインには、 β カテニンを初めとするいくつかの分子が結合し、細胞骨格へとつながっている。 β カテニンは細胞内シグナル伝達にも関与し、遺伝子発現の制御も行っていることから、細胞接着分子は単

に組織の構造や形態を保つだけでなく、細胞の増殖や分化にも深く関与している。

本研究で用いるヤマトヒメミミズ (*Enchytraeus Japonensis*) は、東北農業試験場の畑で発見され、1993年に新種記載された最大全長は1~1.5cmほどの体節構造を持つ環形動物・貧毛類のヒメミミズである。ヒメミミズは、長さ0.2~2cm、太さ0.05~0.5mmほどの白いミミズで、土のなかには多数生息しており、土壌生態系にとっては非常に重要な生き物である。

ヤマトヒメミミズは、体を切断（自切）することにより個体数を増やす碎片分裂と、自切によってできた碎片が元の大きさまで戻っていく再生を行うことにより、無性生殖を行うユニークな環形動物である。このような無性生殖を行うヒメミミズは世界でもまだ8種類しか見つかっていない。ヤマトヒメミミズは、実験室のシャーレ中の寒天上で、通常は18-25℃で、オートミールをミキサーで粉末状に磨り潰したものを餌として飼育する。無性生殖をする際は、体長1cm（60~80体節）ほどに成長したミミズの体節内の特定の位置が収縮して体が引き千切られて、自ら10ヶ所くらいで切れて1mmくらいの短い断片に分裂（碎片分裂）して、3日ほどで頭（脳）と肛門が前後に再生し、2週間で元の大きさまで成長して数倍の個体数に増殖することを繰り返す。このミミズの無性生殖により誕生した子孫は皆同じゲノムを持ったクローンである。

Search of the cadherin homology gene of *Enchytraeus Japonensis*

Kazutoshi MORI and Chikako YOSHIDA-NORO

この無性生殖は、自然に自切をさせる以外にも電気刺激を与えたりして分裂を促したり、ハサミなどで人為的に細かく切り刻んでも、2体節以上含んでいれば、同じように各断片から完全な個体が再生することが出来る (Fig. 1)。

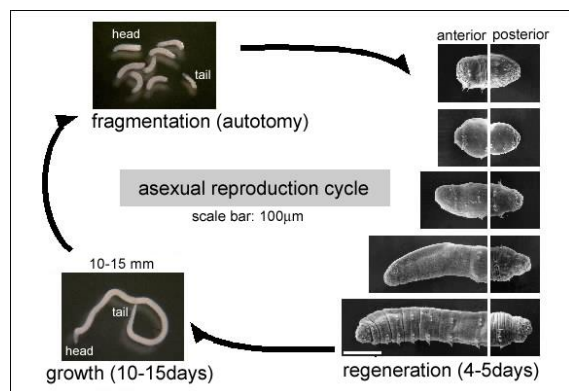


Fig. 1 ヤマトヒメミミズ無性生殖サイクル

このヤマトヒメミミズの再生に関わる幹細胞はネオブラストと呼ばれ、通常は1体節に1対腹側に存在することが明らかになっている。再生時には、切断面にネオブラスト由来の細胞が集まり、再生芽を形成する。一般に幹細胞は、ニッチと呼ばれるゆりかご状の組織のくぼみに接着して、通常は静止しているが、刺激が加わるとニッチから離脱して増殖を開始すると言われている。また、ニッチと幹細胞の接着にはカドヘリンが関与していることも知られている。そこで我々は、ヤマトヒメミミズの再生幹細胞ネオブラストのニッチとの接着や増殖制御にもカドヘリンが関与しているかどうかについて調べようと考えた。

文献よりヤマトヒメミミズのある遺伝子内にカドヘリンリピートに類似した配列があることがわかったので、それを元にプライマーを作成し、PCR法を用いてヤマトヒメミミズのカドヘリン相同遺伝子の単離を試みた。

2. 材料と方法

温度一定の状態の寒天培地の上で無性生殖

を繰り返している1cm以上のヤマトヒメミミズを100匹ほど使用して実験を行った。このミミズからDNAを抽出し、カドヘリンリピートに類似した配列から設計したプライマーを用いてPCR法により増幅した。電気泳動を行って目的とするバンドの単離を行った。単離したバンドを、TAベクターを用いてクローニングし、塩基配列を解析した。

3. 結果と考察

TOPO TA-cloning Kit を使用して pCR ii-TOPO ベクターに単離したDNAを組み込み、LB/Anp プレートに植菌することにより、プラスミドを増やした。そこから、プラスミドDNA精製を行い、増幅させることに成功した。今後の展開としては、精製したDNAを制限酵素 (BamH I) を使用して切断し、バンドを確認した後、塩基配列解析を行う予定である。ヤマトヒメミミズなどの環形動物門貧毛綱は、進化的に軟体動物門のイカ、タコ、貝類などに近い事がわかっているので、本講演会では、ヤマトヒメミミズとのゲノム配列との比較・進化的考察を合わせて報告する。

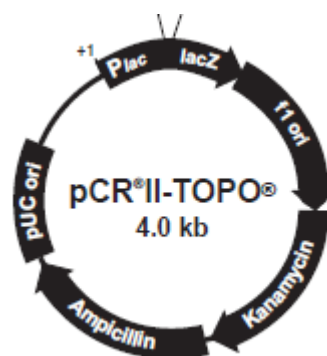


Fig.2 TOPO TA-cloning プラスミドベクター

【参考文献】

- 1) Chikako Yoshida-Noro *et al.*, Develop. Growth Differ. **52**, 43–55 (2010)
- 2) Allan Spradling *et al.*, NATURE VOL 414 1 NOVEMBER (2001)