

アブラゼミ (半翅目・同翅亜目) の卵黄蛋白質 (Vg) cDNA の クローニングとその構造解析

李 載旻・畠山 正統・大石 陸生

Jae Min LEE¹⁾, Masatsugu HATAKEYAMA²⁾ and Kugao OISHI^{1,2)}: Cloning of cDNA for vitellogenin of the cicada, *Graptopsaltria nigrofuscata* (Homoptera): Analysis of its primary structure*

¹⁾ Division of Bioscience, Graduate School of Science and Technology, Kobe University, Nada, Kobe, Hyogo 657-8501, Japan

²⁾ Department of Biology, Faculty of Science, Kobe University, Nada, Kobe, Hyogo 657-8501, Japan

多くの昆虫の主要卵黄蛋白質は vitellin (Vn) と呼ばれ、雌の脂肪体で合成され、体液中に放出され、卵母細胞に選択的に取り込まれたものである。取り込まれる前の卵黄蛋白質の前駆体を vitellogenin (Vg) と呼んでいる (Raikhel and Dhadialla, 1992)。Vg 遺伝子は、昆虫以外に、さまざまな卵生の無脊椎動物や脊椎動物でクローニングされ、最近の研究からその遺伝子構造はよく保存されており、同じ遺伝子スーパーファミリーに属していることが分かってきた (Chen *et al.*, 1997; Sappington and Raikhel, 1998; Hagedorn *et al.*, 1998)。

完全変態昆虫 6 種の Vg のアミノ酸配列を用いて近隣結合法により分子系統樹を作成したところ、形態学的特徴を用いた系統樹、および 18S rRNA 遺伝子を用いた系統樹とよく一致したことから、私たちは、Vg のアミノ酸配列は昆虫の系統樹作成のための分子マーカーとなり得る可能性を指摘した (Nose *et al.*, 1997)。これまで Vg のゲノム DNA あるいは cDNA の全長がクローニングされているのは、完全変態昆虫 6 種、不完全変態昆虫 1 種 (ホソヘリカメムシ、半翅目・異翅亜目; Hirai *et al.*, 1998) のみである。そこで、半翅目昆虫のアブラゼミ (同翅亜目) の Vg cDNA をクローニングし、構造解析を行い、これまでに報告されている 7 種の昆虫 Vg アミノ酸配列とあわせて系統樹を作成した。今回アブラゼミを材料としたのは、コチニールカイガラムシの一種 *Dactylopius confusus* (同翅亜目) の卵黄蛋白質は Vn ではないとの報告があり (Ziegler *et al.*, 1996)、同翅亜目全体が Vn 以外の卵黄蛋白質をもつ可能性があるため、この確認も意図してのものである。

アブラゼミ成虫雌脂肪体から抽出、精製した poly(A)⁺ RNA から cDNA ライブラリーを作成し、アブラゼミ主要卵黄蛋白質のひとつ (43 kDa) に対するポリクローナル抗体を用いてスクリーニングした。さらに 5' RACE (5' rapid amplification of cDNA ends) 法を用いて翻訳領域の全長を含むクローンを得た。ノーザンプロット解析の結果、アブラゼミの Vg mRNA は雌特異的に発現しており、また、化学的に決定した主要卵黄蛋白質 (200 kDa, 43 kDa) の N 末端アミノ酸配列が、推測されるアミノ酸配列と完全に一致したことから、得られたクローンはアブラゼミ Vg cDNA であると結論した。全長は 6205 bp で、16 アミノ酸残基のシグナルペプチドを含む 1987 アミノ酸残基をコードしていた。Vg の前駆体が切断される直前に保存されている RXXR 配列と、C 末端付近で見られる GLCG モチーフやその下流のシステインの位置が保存されており、これまでにクローニングされている Vg と非常に高い相同性があった。また、Chen *et al.* (1997) が示している昆虫、無脊椎動物、脊椎動物の Vg の全体でよく保存されている領域 I-V も存在した (Fig. 1)。

今回クローニングしたアブラゼミのものを含めて、完全変態昆虫 6 種、不完全変態昆虫 2 種の Vg アミノ酸配列全体を使って、近隣結合法を用いて分子系統樹を作成したところ、半翅目の 2 種が一つの群を、鱗翅目と双翅目、膜翅目と鞘翅目がそれぞれ一つの群を形成したが、これまでにいわれているような系統関係を反映するような系統樹ではなかった。一つの目あるいは一つの亜目で少なくとも 2 種以上の Vg アミノ酸配列を用いて解析する必要があるかもしれない。これまでに得られている昆虫の Vg アミノ酸配列の情報は新翅群のうち貧新翅群、

* Abstract of paper read at the 35th Annual Meeting of Arthropodan Embryological Society of Japan, June 4-5, 1999 (Okayama, Okayama).

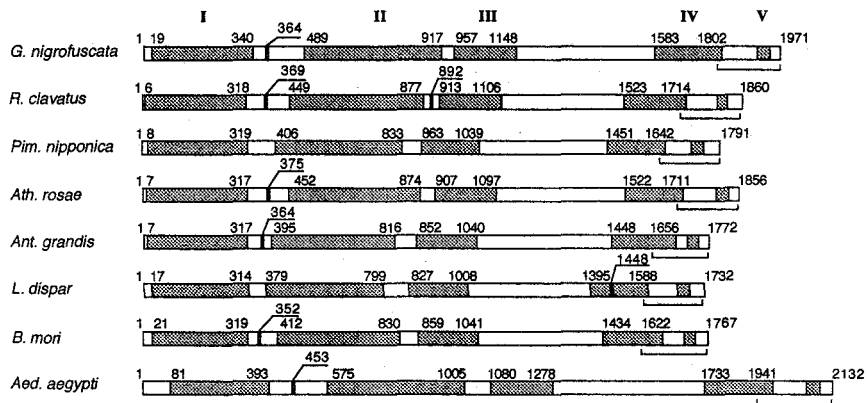


Fig. 1 Characteristics of the primary structure of Vgs of eight insect species. Numbers indicate amino acid positions from the N-terminal (less the signal peptide). Subdomains I-V (where amino acid sequences are particularly well conserved) are shown as hatched boxes. Numbers raised and underlined are the amino acid positions following conserved RXXR motifs where the post-translational cleavage(s) occurs. Horizontal clamps at the C-termini indicate regions where up to 10 cysteine residues are present at conserved locations.

準新翅群のものである。今後、さらに新翅群の多新翅群と、旧翅群のいくつかの種を選んで Vg cDNA をクローニングし、Vg アミノ酸配列が昆虫の系統関係を反映しているかを検討する予定である。

引用文献

- Chen, J.S., T.W. Sappington and A.S. Raikhel (1997) *J. Mol. Evol.*, **44**, 440-451.
 Hagedorn, H.H., D.R. Maddison and Z. Tu (1998) *Adv. Insect Physiol.*, **27**, 335-384.
 Hirai, M., D. Watanabe, A. Kiyota and Y. Chinzei (1998) *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **28**, 537-547.
 Nose, Y., J.M. Lee, T. Ueno, M. Hatakeyama and K. Oishi (1997) *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **27**, 1047-1056.
 Raikhel, A.S. and T.S. Dhadialla (1992) *Annu. Rev. Entomol.*, **37**, 217-251.
 Sappington, T.W. and A.S. Raikhel (1998) *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **28**, 277-300.
 Ziegler, R., D.L. Engler, F. Bartnek, R. van Antwerpen, H.A. Bluestein, J.C. Gilkey and G.M. Yepiz-Plascencia (1996) *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **31**, 273-287.