

カブラハバチにおける *decapentaplegic* cDNA の構造解析

山本 大介・李 載旼・畠山 正統・大石 陸生

Daisuke S. YAMAMOTO¹⁾, Jae Min LEE²⁾, Masatsugu HATAKEYAMA³⁾ and Kugao OISHI^{1,3)}: Cloning and characterization of *decapentaplegic* cDNA in the sawfly, *Athalia rosae ruficornis* (Hymenoptera)*

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

²⁾ Bioengineering Department, National Institute of Bioscience and Human-Technology, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan

³⁾ Department of Biology, Faculty of Science, Kobe University, Nada, Kobe, Hyogo 657-8501, Japan

Decapentaplegic (DPP) タンパク質は TGF- β スーパーファミリーの一つであり、同じ TGF- β スーパーファミリーの一つである BMP-4 (Bone morphogenetic protein-4) タンパク質とも高い相同性がみられ、*decapentaplegic* (*dpp*) 遺伝子のホモログは生物種間で広く保存されている (Hogan *et al.*, 1994)。キイロショウジョウバエでは *dpp* は背腹軸の決定など形態形成に関する遺伝子であることが知られている (Podos and Ferguson, 1999)。現在、昆虫で *dpp* cDNA の全長がクローニングされているのは双翅目のショウジョウバエ科 4 種、鞘翅目のコクヌストモドキ *Tribolium castaneum* の計 5 種のみである。

膜翅目昆虫であるカブラハバチ *Athalia rosae ruficornis* は人為的に単為発生を開始させることができるため、すべての発生段階を通して同一ステージ (胚、幼虫、蛹、成虫) の雄を一度に大量に得ることができ (Sawa and Oishi, 1989)、時期特異的な遺伝子の発現の解析を行うためには都合がよい。そこで、われわれはカブラハバチにおける *dpp* の発現機構とその機能を調べるためにカブラハバチの *dpp* cDNA のクローニングを行った。

最初に、これまでに知られている昆虫の *dpp* で cDNA の全長がクローニングされているうちの 3 種と cDNA の 3' 末端のみクローニングされている 2 種の計 5 種のエクソン中でよく保存されている領域をもとにプライマーを設計し、カブラハバチのゲノム DNA を鋳型に PCR を行ったところ、330 bp の断片を得た。この断片の塩基配列について相同性検索を行ったところ、既知の昆虫の *dpp* と高い相同性があった。

つぎに、*dpp* mRNA が発現していると予想される発生開始後 24 時間 (細胞性胞胚期) の胚、約 7,000 個体から poly (A)⁺ RNA を抽出・精製し、アダプター結合二本鎖 cDNA ライブラリーを作製した。先に得られた 330 bp の断片をもとにしてプライマーを設計し、cDNA ライブラリーを鋳型に用いて RACE (Rapid amplification of cDNA ends) 法を行い、3' 末端に poly (A)⁺ 配列をもつ *dpp* cDNA (1,512 bp) の断片をクローニングした。クローニングしたカブラハバチの *dpp* cDNA には翻訳開始メチオニンから始まる 395 アミノ酸からなる単一のオープンリーディングフレームがあった。この DNA 断片には一般的な poly (A) 付加シグナルである AATAAA という配列はもたないが、コクヌストモドキの *dpp* について報告されている poly (A) 付加シグナルと同様の AATATA という配列 (Sanchez-Salazar *et al.*, 1996) が存在した。カブラハバチの *dpp* がコードするアミノ酸配列には今までに知られている DPP や BMP-4 と同様に、シグナル配列、プロドメイン配列、マチュアドメイン配列と呼ばれるアミノ酸領域 (Hogan *et al.*, 1994) をもっていた。さらに DPP の機能に必要とされるマチュアドメイン配列中の 7 個のシステイン残基の位置が保存されていた (Fig. 1)。

以上のことから今回クローニングした配列はカブラハバチ *dpp* であり、モルフォゲンとして働く DPP タンパク質としての機能をもっていると考えられる。今後は発生段階を通しての *dpp* の発現時期の解析およびカブラハバチにおける *dpp* の機能解析を行いたい。

* Abstract of paper read at the 36th Annual Meeting of Arthropodan Embryological Society of Japan, June 2-3, 2000 (Ome, Tokyo).

<i>A. rosae</i>	-----	
<i>D. melanogaster</i>	MRWLALLAVLATFTQTVRVAEEDISQRFIAAIAPVAHIPLASASGSGSGRSGRSVGASTSTALAKAFNPFSEPASFSDSKSHRSKTHKPKSKDA	100
<i>T. castaneum</i>	-----	
<i>D. rerio</i>	-----	
<i>X. laevis</i>	-----	
<i>H. sapiens</i>	-----	
	-----MHLSLLRLVLAAGVLLAGVCCA	25
	NRQFNEVHKPRTDQLENSKNSKQLVKNPNHNKMAVKEQSRSHHSHHSHQPKQASASTESHQSSSTESIFVEEPTLVLDREVASINVPANAKATIAE	200
	-----MRL	3
	-----MTPGNRMLMVILLCQVLLGESSYASLIPE	29
	-----MTPGNRMLMVILLCQVLLGGTNHASLIPE	29
	-----MTPGNRMLMVILLCQVLLGGASHLIPE	29

	AGAADTVEEEVGAGDR-----EQATAGVEASLLSLGFSKRPRPLG-PSHVPESLKKLYLRQS-----ASGMADIARPGTHARSNTVRSFAHVESKID	114
	QGPSTYSKEALIKDKLKP---DPSTLVEIEKSLSLFNMKRPPKIDRSKIITPEPMKKLYAEIMG-----HELDSVNIPKGLLTKSANTVRSFTHKDSKID	294
	NMLIYLIVACCWGKSLST---PQQLNEFKSTLLPLFGLKEQPKIEG-KVQVPEALKKIYNIQNN-----FEYDTASLPLGLYTKSANTIRSFTHVESPID	96
	EGKKKASALHL-----A---QSHLLRDFEATLLHMFGLQRRPRPSH-SAVVPQYLLDLRLYLSGELEEAGAHVSFDYPERSTSRASIVRGFHHEEHLEE	121
	TGKKKVAADIQ---GGRRSAQGHLLRDFEVTLLQMFGLGRPPQSK-DVVVPAYMRDLRLYLSAEEDDE-LHDSMEYPERPTSRANTVRSFHHEEHLEN	125
	TGKKKVAETQGHAGGRSGSHLLRDFEATLLQMFGLRRRPQSK-SAVIPDYMRDLRLYLSGEEEEEHSTGLTEYPERPASRANTVRSFHHEEHLEN	128

	EKF---QSPHFRFLSFDLSSVPLQETLHAAELSLSRVALTESDEEAEASR---YQRTLVHDIVLPG-VRGSRKPTLRVDSKLVDTKSNSSVPLDVHPAVE	208
	DRF---PHHFRFLHFDVKSTIPADEKLKAAELQLTRDALSQQVVASRSSANTRYQVLVYDITRVG-VRGSRPSYLLDTKTVRLNSTDTVSLDQPAVD	391
	EKF---VHPHFRFLKNFSSIPRHEKLTAAETKLTRETAKNTSHPFQR-----VLVHDILQPG-VKGLHGPITRVDSKVVDSRKNTVSDIVPAVA	185
	LQSDGSETPLRFVFNLSIPEDELISTADVRIYRQIDDAFSDPDQTDGHLHRIINIYEVLPKAP---REGQLITQLDTRLVRPNTSKWESFDVSPAVL	218
	LPS-TAENGFRFVFNLSIPENEVISSAELRLYREQIDHGPA-----WDEGFHRIINIYEVMPK---IAANGLMINRLDTRLIHHNVITQWESFDVSPATM	217
	IPG-TSENSAFRFLNLSIPENEVISSAELRLFREQVDQGD-----WERGFHRIINIYEVMPKPAEVPVGHILITRLDTRLVHHNVITRWETFDVSPAVL	222

	RWTQNPSONYGLLVEVMGAKRRK---NEHVRLRR-SAGEDEESWTANRPFLFTYTDGGRNEMSSAEQILERRARRATLR-KN-----RRKNGRENCRRH	297
	RWLASQPNRYGLLEVVRTVRSKPAHPHHVRLRR-SADEAHERWQHQPPLFTYTDGRIKARSTIROVSGGGGKGRNKRHARRPTRRKNHDTCCRH	490
	RWMQDPKTNHGLIIVYSTGAKSPPEKHLRLRR---DTAPPQYQHQPPLFTYTDGKNQRTGTETL-----KMRPKRQSSRR-HRKNLKDPCRRR	274
	RWTQEKRSNHGLAVEVVMKRNVPQGRHARVRSRSHPLPNEEWDHVRPLLVTFGHDGKSHPLT-----RRAKRSPK-----QRGRKRNRCRRH	303
	RWTRDKQINHLAIEVILNQTHTQGHVIRISRLLPQEDADWSQMRPLLTTFSHDGRGHALT-----RRSKRSPK-----QQRPRKKNKNCRRH	303
	RWTRKQPNYGLAIEVILNQTHTQGHVIRISRLSLPQSGNWAQLRPLLVTFGHDGRGHALT-----RRRAKRSRK-----HHSQARKKNKNCRRH	311

	PLYVDFSDVGNNDWIVAPPGYDAFYCHGDCPFPLADHLNSTNHAIVQTLVYSTNPNTVPKACCVPTALSSISMLYLDEENKVVLLKNYQDMAVLGGCGR	395
	SLYVDFSDVGNNDWIVAPLGYDAYYCHGKCPFLADHLNSTNHAIVQTLVNNMNPCKVPKACCVPTQLDSVAMLYLDQSTVVLKNYQEMTVVGGCGR	588
	QMYVDFSGVGNNDWIVAPLGYDAYYCGGCEYPIDPHMNTTNNHAIVQSLVNSMKPKEVPGCCVPTQLQMSMLYLDGSDGVLLKNYQEMVVGCCGR	372
	ALYVDFSDVGNNDWIVAPPGYQAYYCHGECPPFLADHLNSTNHAIVQTLVNSVN-TNIPKWCVPTELTAISMLYLDDETRVVLKNYQEMVVEGCGCR	400
	SLYVDFSDVGNNDWIVAPPGYQAFYCHGDCPFPLADHLNSTNHAIVQTLVNSVN-ASIPKACCVPTELTAISMLYLDYEDKVVLLKNYQEMVVEGCGCR	400
	SLYVDFSDVGNNDWIVAPPGYQAFYCHGDCPFPLADHLNSTNHAIVQTLVNSVN-SSIPKACCVPTELTAISMLYLDYEDKVVLLKNYQEMVVEGCGCR	408

Fig. 1 Alignments of the deduced amino acid sequences of *Athalia rosae ruficornis* Decapentaplegic (DPP) (tentative), *Drosophila melanogaster* DPP, *Tribolium castaneum* DPP, *Danio rerio* Bone morphogenetic protein 4 (BMP-4), *Xenopus laevis* BMP-4 and *Homo sapiens* BMP-4. Alignments were done using CLUSTAL W alignment software. Amino acid positions are numbered to the right. Asterisks indicate the seven cysteine residues at conserved locations.

引用文献

- Hogan, B.L.M., M. Blessing, G.E. Winnier, N. Suzuki and C.M. Jones (1994) *Development*, 120 S, 53-60.
- Podos, S.D. and E.L. Ferguson (1999) *Trends Genet.*, 15, 396-402.
- Sanchez-Salazar, J., M.T. Pletcher, R.L. Bennett, S.J. Brown, T.J. Dandamudi, R.E. Denell and J.S. Doctor (1996) *Dev. Genes Evol.*, 206, 237-246.
- Sawa, M. and K. Oishi (1989) *Zool. Sci.*, 6, 549-556.