

2 クモをモデルとした 実験発生生物学 ——ゲノムが拓く新たな知識の核

小田 広樹 *Hiroki Oda*

JT生命誌研究館 細胞・発生・進化研究室 室長

クモは発生生物学分野において古くから実験材料として使われていた。分子遺伝学の台頭で影を潜めたが、クモ胚が持つ魅力的な性質と技術の発展により近年再び注目されている。特に、ゲノム配列が決定されたオオヒメグモは、高度な実験技術で節足動物の祖先形質を探究できるモデル生物として存在感を高めている。

1 クモの発生生物学の歴史

クモを材料とした発生生物学の研究は100年以上も前から世界で数多く報告されてきたが、日本でも、岸上謙吉(1867-1929)をパイオニアとして、吉倉真(1911-2003)や関口晃一(1919-2012)らが世界的な功績を遺した。

クモの胚発生の研究を魅力的にしたのは、1952年に報告されたスウェーデンのオーケ・ホルム(Åke Holm)の研究成果である¹⁾。日本のクモ研究にも大きな影響力をもたらした。ドイツ語と一部英語で書かれた120ページ以上に及ぶ彼の論文には、クサグモを使った主に3種類の異なる胚操作の実験が記載されており、そのうちの2種類の実験では一つのクモの卵の中に2個体分のからだを発生させている。一つの胚操作は1891年にドイツのハンス・ドリーシュ(Hans Driesch)がウニ胚で報告した実験*のように、一つの胚を大きく左右に分断する操作であり、もう一つの胚操作

は1924年に同じくドイツのヒルデ・マンゴルド(Hilde Mangold)とハンス・シュペーマン(Hans Spemann)がイモリ胚で報告した実験*のように、胚の特定の小さな領域(クムルスとよばれる領域)を胚の反対側に移植する操作であった。ホルムの成果は、発生生物学の基本概念である調整能、形成体、誘導を節足動物において確認したものといえるが、これらの事象をどの動物でも簡単に示



オオヒメグモの雌成体と卵嚢

せるわけではないことを考えれば、その動物学における価値は高い。ホルムの実験は追試されてこなかったが筆者らは最近、類似の胚操作実験を別のクモ種で報告した²⁾。

ヨーロッパの実験発生生物学を日本に広めた中心人物が丘英通(1902-1982)である。彼はドイツでの留学から帰国すると、当時学生の間口とともにクモ卵を使って実験研究を始めた。クモの初期卵を遠心処理すると重複胚が生じることを報告している。丘はカブトガニの実験研究を始め、後に間口はそれを引き継いだ。間口とその弟子らによって、ホルムのクモの実験と同様の結果が同じ鋏角類のカブトガニで得られることとなった³⁾⁴⁾。ホルムや間口らの、実験に基づく比較発生生物学は最先端研究の一翼を担ったが、分子遺伝学の台頭とともに人々の関心から遠ざかった。

2 Evo-Devoの隆盛

キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の遺伝学の成功は動物の発生の仕組みを理解するための新しい努力の在り方を示すこととなった。クリスティアーネ・ニュスライン-ホルハルト (Christiane Nüsslein-Volhard) とエリック・ヴィンシャウス (Eric F. Wieschaus) は、幼虫の表皮の突起パターンに影響が出る突然変異体を徹底的に飽和するまでスクリーニングした⁵⁾。それにより、体節決定に働く遺伝子成分を網羅的に同定することに成功し、さらに、体節決定が階層的な多段階プロセスであることを明らかにすることができた。この研究を契機に発生生物学における遺伝学の有用性に注目が集まった。

しかし思いもよらず、同定した遺伝子の働きが系統的に離れた他の動物種でも保存されているケースが多く見つかったことから、モデル生物で築いた知識を基に多様な生物種を比較研究する流れを生んだ。進化-発生学 (Evo-Devo) の始まりである。頭尾の軸に沿って体節の性質を決める

Hox 遺伝子クラスター*や、からだの背腹の軸を決めるシグナルがショウジョウバエと脊椎動物で相次いで発見され、両者の間で保存されていることが示された。1996年に笹井芳樹とエドワード・デ・ロバーティス (Edward M. De Robertis) が発表した左右相称動物の仮想的共通祖先、ウルバイラテリア (Urbilateria) の提案⁶⁾はEvo-Devo研究が生んだ最初の大きな成果の一つであった。

保存性の理解が広がると、Evo-Devo研究の関心は動物種間の相違へとシフトした。系統的に近くても発生の仕組みに意外に違いがあることが指摘された。ショウジョウバエの体節決定過程の最上階層を構成する母性転写因子遺伝子ビコイド (*bicoid*) がHox 遺伝子クラスターのHox3から派生した遺伝子で、双翅目でのみ存在するものであるとの衝撃的な報告もあった⁷⁾。モデル生物ショウジョウバエが初期胚発生の仕組みを祖先の状態から大きく変えた生き物であることが明確になるとともに、新たなモデル種の開拓に研究者の努力が向かった。遺伝学を適用できた甲虫コクヌストモドキ (*Tribolium castaneum*) はその先陣を切っ

用語解説 Glossary

【ドリーシュのウニ胚の実験】

ドリーシュは2-4細胞期のウニ胚を割球ごとにバラバラにしても、それぞれの割球が完全な形をした幼生に育つことを示した。胚の部分には全体を組織できる調整能があることが示された。

【マンゴルドとシュペーマンのイモリ胚の実験】

マンゴルドとシュペーマンは2種類のイモリの原腸胚を用いて、一方の胚の原口背唇部を他方の胚の反対側に移植すると、その移植片が周りの細胞に働きかけて移植片を中心としたもう一つ別の胚が形成されることを示した。

【Hox遺伝子クラスター】

ホメオボックスとよばれる共通のDNA結合領域を持つ遺伝子 (Hox遺伝子) がゲノムの特定の領域にクラスターを形成しており、そのクラスターのこと。それぞれのHox遺伝子はクラスター内での位置に対応したからだの領域で働くことが知られている。

【RNA干渉】

細胞内に導入された二本鎖RNAと相補的な配列を持つmRNAが分解される現象。

た。RNA干渉* (RNA interference, RNAi) の発見⁸⁾で遺伝子機能解析のハードルが下がると多様な動物種で実験研究が可能となった。その中でクモが再登場することになる。クモで分子発生学を最初に本格的に始めたのはドイツのウイム・ダーメン (Wim G.M. Damen) のグループで、徘徊性の大型種ネッタイドクシボグモ (*Cupiennius salei*) を用いた。筆者は本特集③の執筆者である秋山-小田康子とともに、遅れて2000年ごろにオオヒメグモ (*Parasteatoda tepidariorum*) の研究を始めた (図1)。それまでショウジョウバエを研究していたが、オオヒメグモの胚発生の美しさに魅了された。

3 クモ胚の特徴と研究対象としての魅力

クモとショウジョウバエの胚発生の比較には二つの注目点がある (図1)。一つは卵割様式、もう一つは相称性の発展である。一般に、昆虫やクモの卵は心黄卵で、卵割様式は表割と説明される。ショウジョウバエ卵の表割では、卵表層部で核が約6,000個まで増えた後に、それぞれの核を取り囲むように細胞質が細胞膜で区画化されて1層の細胞ができる。それに対し、クモ卵では細胞構造の確立がずっと早い (図1)。オオヒメグモでは遅くとも16核の時にそれぞれの核を取り巻く細胞質はすでに区画化されている⁹⁾。細胞質の区画化のタイミングの違いは胚発生の分子的仕組みに影響する。つまり、昆虫の多核性胞胚では、共有する細胞質を通じた転写因子の拡散による情報伝達でパターンを生み出すことができるが、クモ胚では細胞膜を介したシグナル分子による情報伝達が必要とされる。実際に、ショウジョウバエ胚のピコイドの働きに対応した働きを、オオヒメグモ胚ではヘッジホッグとよばれるシグナル分子が果たす¹⁰⁾。パターン形成がおこなわれる場の性質に関して、ショウジョウバエ胚とクモ胚のどちらが他の動物門の動物と比較可能かといえれば間違いなくクモ胚であろう。

多くの昆虫は非対称な形をした卵を産む。ショウジョウバエでは卵の形で、将来どちらが前で後ろか、どちらが背で腹かを予見できる (図1)。それに対し、クモが産む卵は対称な球形で、将来のからだの向きを予見できない。胚は、球相称から放射相称へ、さらに左右相称へと、相称性を破る2段階の事象を経て形を発展させる (図2)。相称性の発展は重複胚形成を誘導したホルムの実験とも関係する。移植実験に使われたクムルスは将来の後極に生じる細胞群で、その動きが胚の放射相称性を破る (図2, 矢印)。クムルスではDppとよばれるシグナル分子が生成され、そのシグナルは周りの細胞に背側の運命を取るよう働きかける¹¹⁾。このDppシグナルの影響は胚内で拡大するがSogとよばれる細胞外因子がそれに対抗して働くことで、腹側正中線を対称軸とした左右相称パターンが形成される。

節足動物門の中でクモの属する鋏角類は多足類や甲殻類よりも昆虫類から系統的に離れているた

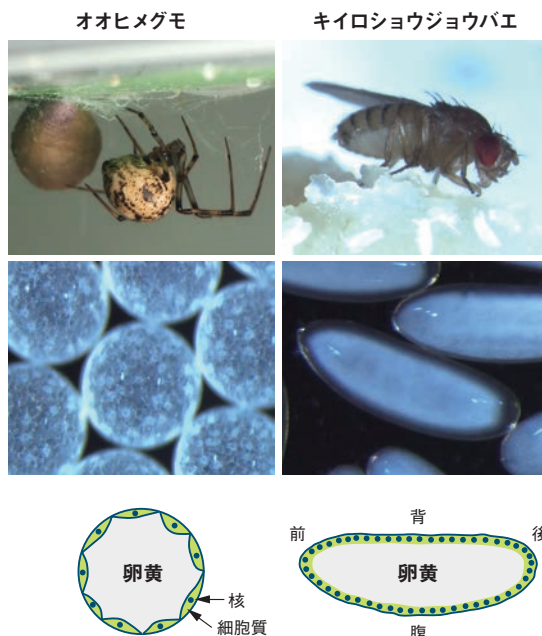


図1 オオヒメグモ (左) とキイロショウジョウバエ (右) の比較
上段: 雌成体, 中段: 卵殻を除去した卵, 下段: 卵の中の初期胚での細胞質の区画化を表した模式図。

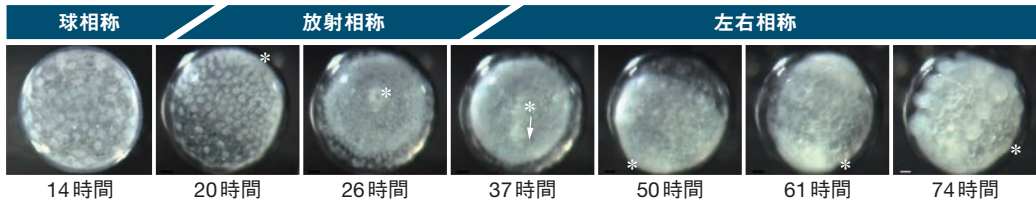


図2 オオヒメグモ胚における相称性の発展

数字は産卵後の時間を表す。星印は胚の後極を指す。矢印は放射相称性を破るクムルスの動き。
文献10) と文献11) のデータを用いて作成。スケールバー, 50 μm.

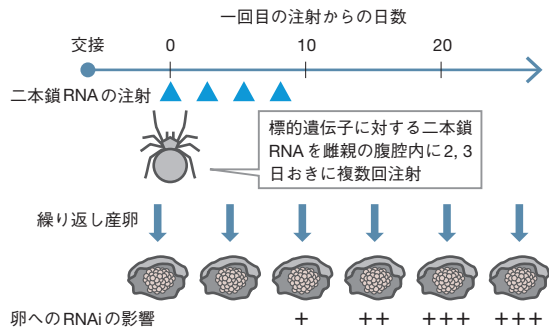
め、昆虫と脊椎動物を基軸とする比較研究において、節足動物門の内と外をつなぐ役割を持つ。DppとSogの働きは前述のウルバイラテリア仮説の根拠となっているが、ショウジョウバエでは母性転写因子ドーサルが胚の腹側の運命決定に優先的な役割を持つことが、ショウジョウバエと脊椎動物の比較を難しくしている。Dppシグナルに対抗するSogの活性が胚のパターン形成場の中心を決めると解釈すると、クモの状況は脊椎動物のコーディン(Sogの相同分子)が脊索や中枢神経系の発生に働く状況と比較しやすい²⁾。

なぜホルムがおこなったクモ胚を左右に分断する操作で重複胚ができたのか？細胞数が1,500を越えた発生段階のオオヒメグモ胚でもレーザー照射で同様の現象を再現できる²⁾。分断されたそれぞれの細胞集団がからだの軸を自己調節して作り直すことができることを意味する。その分子的仕組みの追究は、初期の多細胞動物がからだの相称性の軸をいかに自己組織化できたかを理解することにつながるかもしれない。

4 モデル生物オオヒメグモのゲノムプロジェクト

節足動物5,000種のゲノムをシーケンシングする国際プロジェクト(i5k)¹²⁾が2011年に発起し、オオヒメグモは最優先種にランクされた。この決定は2006年の論文¹¹⁾に端緒がある。オオヒ

(a) オオヒメグモにおけるRNA干渉(RNAi)実験の手順



(b) RNAiによって引き起こされる胚発生の異常

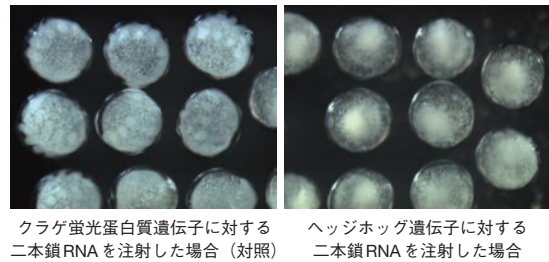


図3 オオヒメグモにおけるRNA干渉実験の概要

(a) 文献13) より改変 (CC BY 4.0: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)。
(b) 文献10) のデータを用いて作成。

メグモの雌成体の腹腔内に二本鎖RNAを導入することでその個体が産んだ卵でRNAiが利かせられることを示した(図3)。オオヒメグモの産卵特性とも相まって、容易に効率的に遺伝子機能の解析ができるようになった。ドイツのダーメンのグループはこの論文が出てすぐに研究材料をオオヒメグモにシフトした。結果、このクモの有用性、

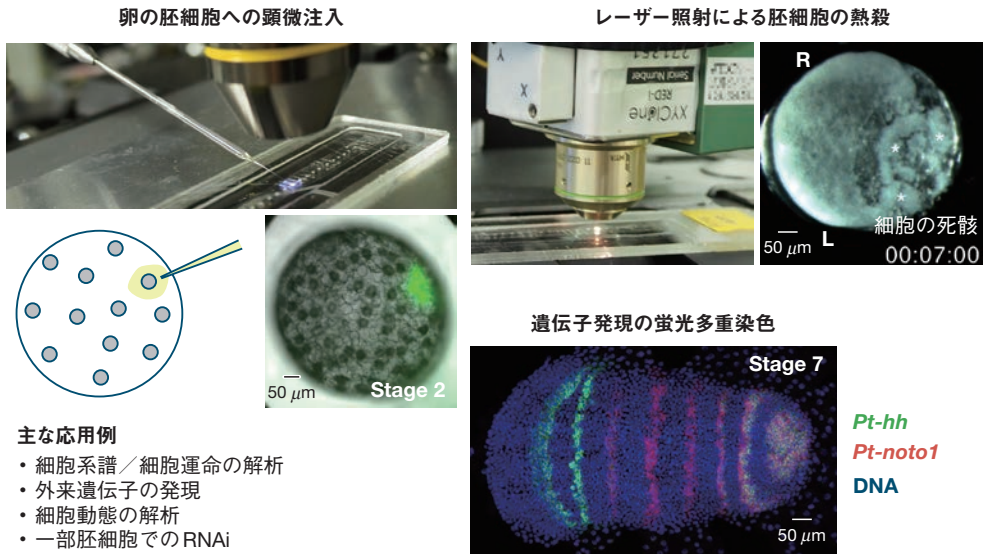


図4 オオヒメグモで利用できる実験技術の例

文献13)より改変 (CC BY 4.0: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)。

右上端と右下に示す胚の写真はそれぞれ文献2)と文献17)に由来 (CC BY 4.0: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)。

利便性が世界に知れ渡ることとなった。さらなる技術面の充実(図4)はオオヒメグモの利用価値を高め、実験のできる非昆虫のモデル節足動物として存在感を高めた¹³⁾。

5年に及ぶ世界の研究者コミュニティの協働を経て、2017年にゲノムプロジェクトの成果を発表することができた¹⁴⁾。ゲノムサイズが約1.4ギガ塩基対と大きく、反復配列が多かったことから解析は難航した。脊椎動物の進化で起こった全ゲノム重複と類似した大規模なゲノム重複が、クモとサソリの共通祖先で起こったことが示唆された。クモとサソリではHox遺伝子クラスターが同じように重複していた。

発生が速いこと、ゲノムが小さいこと、からだを構成する細胞が少ないこと、細胞の系譜が不変であること、などは実験生物のメリットとしてあげられてきた。しかしさまざまな動物種のゲノムが解読されると、そのような特徴が派生的である可能性も指摘されるようになった。だが、それらの特徴はオオヒメグモには当たらない。オオヒメグモのゲノムはショウジョウバエの約7倍のサイ

ズを持ち、遺伝子成分の極端な縮減を経た痕跡は見られない。ゲノムから見ても、オオヒメグモは祖先形質の探究に適している。

5 今後のクモの発生生物学研究の展開

ゲノム配列が決定されたことの最大の意義は、ゲノムを中心にクモ独自の知識を積み上げることができることであろう。たとえば、ゲノムブラウザーを使ってHox遺伝子クラスターの存在を容易に確認できる(図5)。さらに、次世代シーケンシングで発生段階ごとに取得した遺伝子発現データ¹⁵⁾を組み合わせると、胚発生の進行とともにクラスター内の転写活性化領域が順番に広がる様子を把握することができる。これまでの多くのEvo-Devo研究は既存のモデル生物の知識に頼ったアプローチを取ってきたが、オオヒメグモでは、たとえば、ゲノム規模の遺伝子発現解析と機能スクリーニングを組み合わせることで、純粋にこの動物と向き合ってこのクモの仕組みを発見



図5 オオヒメグモゲノムのHox遺伝子クラスター領域の可視化

Pt_spider Genome/Transcripts Database (<https://www.brh2.jp/>) を利用して作成。

できるようになった¹⁶⁾。クモの実験系は節足動物の比較発生生物学において新たな知識の核を創りうる。

クモの難点は遺伝学的手法の適用の難しさにある。卵に遺伝子操作を施したとしても胚を個別に生殖可能な成体まで育てることは不可能に近い。ゲノム編集技術*の適用が多くの生物種に広がる中、クモにはこの困難が立ちはだかる。それでも、もし親の体内の生殖細胞に対してゲノム編集をおこなうことができればその弱点を克服できるかもしれない。

最後に、クモ胚の球面上のシンプルな細胞構成はパターン形成の理論研究に適している。節足動

物の基本ボディパターンを自発的に生み出すバーチャルな多細胞体の探究は筆者らの研究の長期目標である。長い研究の歴史を踏まえ、クモが発生生物学の王道的実験材料として研究・教育に広く利用される日が来ることを信じてたい。

[文献]

- 1) Holm, Å. Experimentelle Untersuchungen über die Entwicklung und Entwicklungsphysiologie des Spinnenembryos. *Zool. BiDr Uppsala* **29**, 293–424 (1952).
- 2) Oda, H., Iwasaki-Yokozawa, S., Usui, T. & Akiyama-Oda, Y. Experimental duplication of bilaterian body axes in spider embryos: Holm's organizer and self-regulation of embryonic fields. *Dev. Genes Evol.* **230**, 49–63, doi:10.1007/s00427-019-00631-x (2020).
- 3) 関口晃一, 山道祥郎, 瀬下英汎, 杉田博昭, 伊藤富夫. IV章 発生 (カブトガニの生物学 増補版, 関口晃一 編) 123–236 (制作同人社, 1999).
- 4) Itow, T., Kenmochi, S. & Mochizuki, T. Induction of secondary embryos by intra- and interspecific grafts of center cells under the blastopore in horseshoe crabs. *Develop. Growth Differ.* **33**, 251–258 (1991).

用語解説 Glossary

【ゲノム編集技術】

ゲノム上の標的遺伝子を特異的に破壊したり、標的部位に外来遺伝子を挿入したりできる遺伝子改変技術。切断部位の配列を任意に指定できる人工DNA切断酵素を利用する。

- 5) Nüsslein-Volhard, C. & Wieschaus, E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**, 795–801 (1980).
- 6) De Robertis, E. M. & Sasai, Y. A common plan for dorsoventral patterning in Bilateria. *Nature* **380**, 37–40 (1996).
- 7) Stauber, M., Jäckle, H. & Schmidt-Ott, U. The anterior determinant bicoid of *Drosophila* is a derived Hox class 3 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 3786–3789 (1999).
- 8) Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806–811 (1998).
- 9) Kanayama, M., Akiyama-Oda, Y. & Oda, H. Early embryonic development in the spider *Achaearanea tepidariorum*: microinjection verifies that cellularization is complete before the blastoderm stage. *Arthropod Struct. Dev.* **39**, 436–445, doi:10.1016/j.asd.2010.05.009 (2010).
- 10) Akiyama-Oda, Y. & Oda, H. Cell migration that orients the dorsoventral axis is coordinated with anteroposterior patterning mediated by Hedgehog signaling in the early spider embryo. *Development* **137**, 1263–1273, doi:10.1242/dev.045625 (2010).
- 11) Akiyama-Oda, Y. & Oda, H. Axis specification in the spider embryo: *dpp* is required for radial-to-axial symmetry transformation and *sog* for ventral patterning. *Development* **133**, 2347–2357, doi:10.1242/dev.02400 (2006).
- 12) i5k: Sequencing Five Thousand Arthropod Genomes. <http://i5k.github.io>
- 13) Oda, H. & Akiyama-Oda, Y. The common house spider *Parasteatoda tepidariorum*. *Evodevo* **11**, 6, doi:10.1186/s13227-020-00152-z (2020).
- 14) Schwager, E. E., Sharma, P. P., Clarke, T., Leite, D. J., et al. The house spider genome reveals an ancient whole-genome duplication during arachnid evolution. *BMC Biol.* **15**, 62, doi: 10.1186/s12915-017-0399-x (2017).
- 15) Iwasaki-Yokozawa, S., Akiyama-Oda, Y. & Oda, H. Genome-scale embryonic developmental profile of gene expression in the common house spider *Parasteatoda tepidariorum*. *Data Brief* **19**, 865–867, doi:10.1016/j.dib.2018.05.106 (2018).
- 16) Akiyama-Oda, Y. & Oda, H. Hedgehog signaling controls segmentation dynamics and diversity via *msx1* in a spider embryo. *Sci. Adv.* **6**, eaba7261, doi:10.1126/sciadv.aba7261 (2020).
- 17) Hemmi, N., Akiyama-Oda, Y., Fujimoto, K. & Oda, H. A quantitative study of the diversity of stripe-forming processes in an arthropod cell-based field undergoing axis formation and growth. *Dev. Biol.* **437**, 84–104, doi:10.1016/j.ydbio.2018.03.001 (2018).



小田 広樹 *Hiroki Oda*

JT生命誌研究館 細胞・発生・進化研究室 室長
 博士(理学, 京都大学)。ERATO月田細胞軸プロジェクトグループリーダー, JT生命誌研究館研究員, 同主任研究員を経て現職。大阪大学大学院理学研究科招聘准教授併任。専門分野は, 発生進化学, 細胞進化学。