

F I S Hを用いた鱗翅目昆虫の染色体同定に関する研究

学位論文内容の要旨

鱗翅目昆虫には多くの農業害虫が含まれるが、カイコ (*Bombyx mori*) は生糸生産を目的として飼育（養蚕）が行われてきた益虫であり、古くから昆虫遺伝学の研究対象となってきた。2004年にカイコのドラフトゲノム配列（WGS）が日本と中国のグループにより報告されたことにより、分子遺伝的基盤が飛躍的に向上し、鱗翅目のモデル昆虫として害虫防除への応用など他鱗翅目昆虫の研究への波及効果が期待されるとともにトランスジェニック技術開発と相まって生産昆虫という特殊性を発展的に利用する「昆虫工場」としてのカイコの利用がはじまっている。これに対し、鱗翅目昆虫における細胞遺伝学的な研究基盤—染色体の同定—は 80 年の長さに渡り確立されることなく不可能とさえ考えられてきた。それは、分散型動原体（holocentric）を有し、比較的染色体数が多く（ $n=30$ 前後）、分裂中期において大きさに差異がない小型、球状で一次狭窄も認められないために、形態的特徴に乏しく、通常の方法を用いても染色体同定が不可能であったことが主な原因と考えられる。本研究では、カイコ染色体の同定を最終目的とし、FISH を用いた新たな染色体同定法の開発を進め、鱗翅目昆虫染色体の解析を行った。

GISH/Telomere-FISH による性染色体構成判別法の確立と性染色体進化の推定

GISH（genomic *in situ* hybridization）は複 2 倍体植物などのゲノム構成を知るために用いられる方法であるが、本研究ではこれを性染色体の同定に応用し、9 属 16 種の鱗翅目昆虫の W 染色体特定に成功した。Telomere-FISH（fluorescence *in situ* hybridization）は染色体末端に存在するテロメリックリピート（昆虫では(TTAGG) n ）を検出する方法である。これら 2 つの FISH 法を組み合わせることで、簡便な性染色体構成解析を行えることを見だし、GISH/Telomere-FISH 法を開発した。これを用いて、単純なものからより複雑な性染色体を持つ種に至る鱗翅目昆虫の性染色体構成の解析を行った。その結果、既知の結果とは異なる性染色体構成を持つ種が検出されるとともに性染色体構成未知種においてもその特定に成功した。さらに複雑な性染色体構成をもつヤマモリガ科の *Samia* およびドクガ科の *Orgyia* 属の種において性染色体進化についても検討することが可能となり、性染色体上の遺伝子もたらす種分化との関連性を直接検討するツールを提供できた。特に *Samia* 属では複雑な性染色体進化が推定され、生息地の異なる個体群間と性染色体進化ならびに種分化との関連性が示唆された。

GISH/Telomere-FISH 法は鱗翅目昆虫に限らず、W や Y 染色体が分子レベルで分化し、テロメリックリピートを染色体末端とする全ての生物に適用できる極めて有用な性染色体構成判別法である。

カイコ BAC-FISH 法の確立と W-BAC による W 染色体の同定

近年カイコにおいて構築された BAC (bacterial artificial chromosome) を用いた FISH (BAC-FISH) 確立を目指し、GISH シグナルを指標とした W 染色体由来の BAC (W-BAC) を用いた FISH を行った。BAC-FISH は様々な生物において行われているが、鱗翅目昆虫においては手法が確立していなかった。カイコにおいても性染色体や他の染色体を同定するために BAC-FISH を用いることが可能であり、ひいてはカイコ全染色体の同定が可能になるとの着想から本研究を開始した。カイコ雌特異的な STS プライマーを用いて、BAC ライブラリーから 11 個の W 染色体由来の BAC (W-BAC) を選抜し、そのクローンをプローブとして、カイコ BAC-FISH 法を確立した。この確証を得るためにカイコ W-常染色体転座系統を用いた。ゲノムならびに W-BAC プローブが W 部位に対し、非常に類似したハイブリダイゼーションシグナルをもたらしたことから、双方のプローブにおけるカイコ W 染色体同定が間違いなく正しいものであると結論づけるものとなった。さらに、カイコの W-BAC が他種鱗翅目昆虫の W 染色体同定にどの程度利用可能であるか、また、同時にカイコ W 染色体の構成配列との類似性を示す近縁種がどの程度検出されるのかを調べるために、他の鱗翅目昆虫染色体に対してカイコ W-BAC をプローブとした FISH を行った。その結果、カイコの祖先と考えられるクワコ以外にはこれら W-BAC プローブはクロスハイブリダイゼーションせず、鱗翅目昆虫ではゲノム進化速度の早いことが推測された。

BAC-FISH を用いたカイコ染色体一括認識

カイコ BAC クローンを分子地図の 1 つである RAPD 関連地図上に数個ずつ座位決定し、本研究中に確立したカイコ BAC-FISH 法を発展させて、減数分裂パキテン期の染色体と関連地図との統合を果たした。つまり、鱗翅目昆虫では不可能であった染色体の個別認識をカイコ BAC-FISH により実現するとともにこの方法を 1 つの核において全ての染色体を一括認識できるカリオタイピングにまで発展させ、最終目的としたカイコ染色体同定を達成した。また、BAC プローブは染色体特異的なシグナルをあたえることで、カイコの減数分裂パキテン期以外の体細胞分裂染色体においても、個別認識を可能とした。

本研究はカイコ RAPD 地図に対応した染色体上の BAC アンカーポイントを作製したこととなり、他の BAC をマップする際に利用できると同時に関連地図の起点と終点を染色体にて判別することが可能となった。カイコの、WGS プロジェクトにおいて、合計 9 倍のカバー率を持つドラフトゲノムが報告されている。日中のドラフトゲノムは近いうちに統合されるであろうが、ゲノム解読終結までにはなお時間と経費を要すると考えられる。その中で、BAC-FISH によるカイコ染色体の同定と BAC アンカーポイントの作製は、今後、ゲノム解読の最終段階で残るであろうギャップの双方に位置するコンティグ特定とスキューフォールドポイント作製ならびにフィンガープリントや BAC-end シークエンスなど一般的な分子手法が利用できないような領域の細部に迫ることが可能である。特に後者においては、引き伸ばされたクロマチンファイバーを用いて非常に細かいマッピング (fiber-FISH) などにカイコ BAC-FISH を応用することで解決がはかれると考えられる。

本研究で示した従来法では不可能とされたカイコでの BAC-FISH カリオタイピング法の成功というさらなる前進を加味して考えると従来の方法では染色体同定の手段が全くないという問題を抱える種を含む、あらゆる動物と植物双方の種にこの BAC-FISH 法が応用できると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 伴 戸 久 徳

副 査 教 授 佐 野 芳 雄

副 査 教 授 三 上 哲 夫

学 位 論 文 題 名

F I S Hを用いた鱗翅目昆虫の染色体同定に関する研究

鱗翅目昆虫には多くの農業害虫が含まれるが、カイコ(*Bombyx mori*)は、生絲生産を目的として飼育(養蚕)が行われる益虫であり、古くから昆虫遺伝学の研究対象となっている。2004年にカイコのゲノムドラフト配列(WGS)が日本と中国のグループにより報告されたことにより、分子遺伝学の研究基盤が飛躍的に向上し、鱗翅目のモデル昆虫として害虫防除への応用など他鱗翅目昆虫へ研究の波及効果が期待される。また、トランスジェニック技術開発と相まって生産昆虫という特殊性を発展的に利用する「昆虫工場」としてのカイコの応用が始まっている。本研究は、カイコ染色体同定を最終目的とし、FISH (fluorescence *in situ* hybridization) を用いた新たな染色体同定法の開発と、鱗翅目昆虫染色体の解析を進めている。

GISH/Telomere-FISHによる性染色体構成判別法の確立と性染色体進化の推定

本研究ではGISH (genomic *in situ* hybridization) を性染色体の同定に応用し、9属16種の鱗翅目昆虫のW染色体特定した。さらに染色体末端に存在するテロメアリピート(昆虫では(TTAGG)_n)を検出するtelomere-FISHと組み合わせることで、簡便に性染色体構成解析できる新手法を開発した。このGISH/Telomere-FISH法を用い、既知の結果とは異なる性染色体構成を持つ種が検出されるとともに長年かけて蓄積された鱗翅目昆虫の既知染色体構成すべてを別種において一気に網羅する結果となった。さらに、複雑な性染色体構成をもつ*Samia* および*Orgyia* 属の種において性染色体進化について検討するに至り、性染色体上の遺伝子もたらす種分化との関連性を直接検討するツールを提供した。特に、ヤママユガ科の*Samia* 属では複雑な性染色体進化が推定され、生息地の異なる個体群間と性染色体進化ならびに種分化との関連性が示唆された。本方法は、全ての生物に適応できる画期的な性染色体構成判別法である。

カイコBAC-FISH法の確立とW-BACによるW染色体の同定

連関地図に統合されたBACをプローブとしたBAC-FISHを用いることでカイコの全染色体同定が可能になるとの着想からBAC-FISH法の確立を行っている。本研究ではカイコ雌特異的なSTSプライマーを用いて、BACライブラリーから11個のW染色体由来のBAC(W-BAC)を選抜し、そのクローンをプローブとしたカイコBAC-FISH法が確立された。カイコW-常染色体転座系統を用いた場合に

も、ゲノムならびに W-BAC プローブが W 部位に対し、非常に類似したハイブリダイゼーションシグナルをもたらしたことから、双方のプローブにおけるカイコ W 染色体同定が正しいと結論づけている。さらに、カイコ W 染色体の構成配列との類似性を示す近縁種がどの程度検出されるのかを調べるために、他の鱗翅目昆虫染色体に対してカイコ W-BAC をプローブとした FISH を行っている。その結果、カイコの祖先と考えられるクワコ以外にはこれら W-BAC プローブはクロスハイブリダイゼーションせず、鱗翅目昆虫では脊椎動物に比べゲノム進化速度が早いと推測がなされた。

BAC-FISH を用いたカイコ染色体の一括認識

カイコ BAC クローンを分子地図の一つである RAPD 連関地図上すべてに数個ずつ座位決定し、本研究中に確立したカイコ BAC-FISH 法を進展させることで、減数分裂パキテン期の染色体と連関地図との統合を果たした。つまり、鱗翅目昆虫では不可能とさえ考えられてきた染色体の個別認識がカイコ BAC-FISH により実現された。さらに、1つの核において全ての染色体を一括認識できるカリオタイピングにまで発展させ、最終目的としたカイコ染色体同定を達成した。また、BAC プローブは染色体特異的なシグナルをもたらしたことから、カイコ体細胞分裂染色体での個別認識も可能とした。

本研究はカイコ RAPD 地図に対応した染色体上の BAC アンカーポイントを作製したこととなり、他の BAC をマップする際に利用できると同時に連関地図の起点と終点を染色体上で判別可能となった。本研究成果である BAC-FISH によるカイコ染色体の同定と BAC アンカーポイントの作成手法は、カイコゲノム解読の最終段階においてフィンガープリントや BAC-end シークエンスなど一般的な分子手法が直接利用できない領域に対し足場を形成することが期待される。

本論文は、GISH による鱗翅目昆虫の性染色体同定法を開発するとともに Telomere-FISH との組み合わせによる性染色体構成の新たな解析手法を確立して複雑な性染色体構成をもつ種の性染色体進化推定を可能とした。また、上記成果の GISH シグナルをメルクマールとして、カイコ BAC-FISH 法を確立し、分子連関地図へ対応付けした BAC プローブを用いた BAC-FISH によりカイコ染色体の同定とカリオタイピングに成功した。これらの結果は、*in situ* hybridization 法を用いて汎用性の高い染色体同定法を確立したものとして高く評価できる。

よって、審査員一同は、吉戸敦生が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。