

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：11201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15064

研究課題名(和文)モノソミー系統樹立と生存要因の解明～モノソミーカイコはなぜ生存できるのか?～

研究課題名(英文)Finding of silkworm monosomy-why the monosomy survive-

研究代表者

佐原 健 (Sahara, Ken)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：30241368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ゲノムDNAシーケンスとゲノムreal-time qPCRにより、限性系統カイコの後代で認められる成長不良の矮小個体の中に第2染色体モノソミー個体が1)存在すること、2)遺伝性があり系統樹立できた、3)両性共に存在すること、4)その系統では正常系統と形質により区別できること明らかにした。また、RNAseqによりF2における正常に対するモノソミーのmRNA発現頻度比較は、第2染色体が0.59、他の26常染色体の平均発現比は約1であった。このことから常染色体の遺伝子発現には、遺伝子量補償が存在しないと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We find monosomy silkworm individuals which are reproducible and have both female and males. By crossing two mutant strains with the monosomy individuals we developed monosomy strain that can be discriminated by the visible phenotypes. RNAseq revealed that the expression of 2nd chromosome genes in the monosomy progenies seems to be about half amount that in the normal. Hence we concluded dosage compensation for the autosome gene cannot be functioned in the silkworms.

研究分野：昆虫細胞遺伝学

キーワード：モノソミー カイコ 第2染色体 FISH

1. 研究開始当初の背景

「モノソミー」とは、2倍体で常染色体の一方が完全に欠失する現象で、動物のモノソミーは、ほとんどすべてが致死であると考えられている。ヒトの体細胞では常染色体の一部欠失であっても癌化リスクを非常に高めることが知られるなど、常染色体が1本欠失することは致命的である。動物で唯一知られる「生存するモノソミー」は、1921年に報告されたキロショウジョウバエであった。しかしながら、分子生物学が発達する以前のケーススタディーであり、その生存要因は全く解明されていない。

申請者らは、過去に黒縞遺伝子座を持つ限性黄血(p^S/p^Y)雌と姫蚕遺伝子座(p/p)を持つ雄を交配する実験を行った。その子孫の中にメンデル遺伝の例外型分離を示す血統を発見した。つまり、雌では正常型(姫蚕)と黒縞が、雄では正常型(黒縞)と姫蚕が約10:1ずつ出現した。黄血の遺伝子座は第2染色体上のY座に支配されることから、原因は第2染色体の分離異常と考えられた。この例外型は、雌は第2染色体が3本($p p^S p$)、雄は1本(p)であれば説明できる。しかも、 p 形質雄は成長速度が遅く、小型の蛹となった。成長速度の遅い小型雄は、キロショウジョウバエで発見された第4染色体モノソミー個体の特徴に一致する。こうした背景より、カイコにおいてモノソミー個体を得て、その生死の分子メカニズム解明研究を開始した。

2. 研究の目的

植物と比較して動物では異数性や倍数性は稀である。特に、常染色体の1本が欠ける「モノソミー」は、その染色体の遺伝子発現量が減少し、アンバランスとなるため生存できないと考えられている。

形質マーカー、定量PCRならびに染色体観察により、カイコモノソミー個体を同定する。この個体から系統を樹立し、遺伝子発現量の減少がもたらすと考えられている常染色体

モノソミーにおける生死の解明に迫る。

さらに、形質で区別可能となる交配による系統維持を可能とする。このモノソミーが染色体全長に渡っているのかどうかゲノムPCRによる評価系を樹立し、mRNA発現を正常個体と比較することで、常染色体における遺伝子量補正の有無を明らかにすることも目的とした。

3. 研究の方法

(1) 世代を超えたモノソミー遺伝性の細胞遺伝学的確定

過去に行った限性黄血(p^S/p^Y)雌と姫蚕遺伝子座(p/p)を持つ雄を交配する実験を大規模に行い、モノソミーと考えられる $+^p$ 形質を持つ個体を得る([50-mono]と命名)。[50-mono]と p^Y/p^Y ([p53])と交配して次世代を得る。この次世代で p^Y 形質をもつ[53-mono]個体がモノソミーと考えられる。この[53-mono]と[$p50$]($+^p/+^p$)を交配し、再び[50-mono]を得て次世代用の交配に使用する。[53-mono]と[50-mono]に対するFISHによりモノソミーが確定することで、モノソミーの遺伝性が実証される。なお、[p53]と[p50]は九州大学保存系統であり、NBRP(National Bioresource Project)を通じて購入した。

(2) PCRによるモノソミー判定系の確立

交配に使用する個体がモノソミーであることを証明することを目的として、[50-mono]と[53-mono]個体を用いて、第2染色体特異的プライマーによる定量ゲノムPCRを行い、幼虫ならびに交配後の成虫において第2染色体数を判定できる系を構築する。この系の確立により、モノソミー判定が行われた個体での系統維持が可能となる。

(3) 第2染色体に存在する遺伝子特異的プライマーの設計とmRNA定量PCR

カイコモノソミー個体において、第2染色体の遺伝子が量的補償を受けているかどうか

かを確認するために、これら遺伝子に対する特異的プライマーセットを設計・合成し、特異性の確認できた 14 セットをモノソミーと正常幼虫における第2染色体遺伝子の mRNA 発現量比較に用いた。

(4) モノソミー系統の樹立

[50-mono]と[53-mono]の p^+ と p^Y 形質を持つモノソミー性が判定した個体に対して、それぞれ p53 と p50 を交配する。前者の正常は(形蚕・黄血)、モノソミーは(姫蚕・黄血)[53-mono]、後者の正常は、(形蚕・黄血)、モノソミー[50-mono]は、(形蚕・非黄血)と形質上区別できる系統を樹立する。

(5) ゲノムシーケンスによる頻度比較

最初に候補としたモノソミー候補雄成虫から情報に従ってゲノム DNA を抽出した。頻度比較のため標準系統 p50 からも同様にゲノム DNA 抽出した。HiSeqX による 150bp ペアエンド配列決定により、それぞれ約 50Gb 分の配列を決定、50Kbp windows における頻度解析を行った。

(6) モノソミー後代の mRNA 頻度解析

ゲノム解析によるモノソミー性が確認された個体の次々世代は、 p^Y (姫蚕・黄血)と p^+ Y (形蚕・黄血)に分離、前者がモノソミー個体となる。これら前 5 個体と後 4 個体幼虫の頭部、精巣、翅原基、前部糸腺より抽出した同量の全 RNA を抽出した。Illumina HiSeq 2500 により mRNA 配列決定を行い、モノソミーと正常間で予測遺伝子の頻度データを比較した。

4. 研究成果

限性黄血系統雌と第2染色体正常雄の子供に現れる成長遅延と矮小化をメルクマールに選抜を行った結果、49 個体の第2染色体モノソミー候補雄を得た。これらのうち、27

個体において次世代の受精卵が得られた。第2染色体正常雄は幼虫形質マーカーを異にする2系統を使用しており、上記受精卵の一部から孵化させた次世代を検討したところ、想定通り幼虫形質がほぼ p^+ (形蚕): p^S (黒縞)=1:1 に分離した。前者が、モノソミー[50-mono]候補、後者が正常である。双方から染色体標本作製を行い、FISH したところ、体細胞分裂中期において Chr2-BAC のシグナルを持つ染色体数が1と2となり(図1)、前者のモノソミー性の可能性が示唆された。

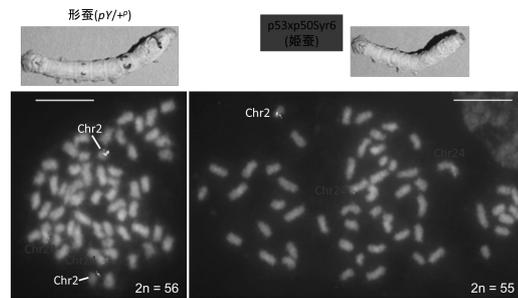


図1 正常とモノソミー候補の幼虫形質、個体サイズイメージならびにそれぞれの体細胞分裂中期へのBAC-FISH結果。

17 個体の第2染色体モノソミー候補雄について、カイコゲノム情報をもとに設計した第2染色体上を網羅的に増幅する STS プライマーセットを用いて、ゲノム定量 PCR を行った。このうち成長遅延が認められたものの体サイズの矮小化の著しくなかった1個体は、第2染色体を2本持つと判断された。16個体は、第2染色体の一部が2本分、残りが1本分の定量性を示す部分欠失の第2染色体を持つ個体であった。残る1個体は、定量に用いた27プライマー全てで第2染色体モノソミー[50-mono]と判定された。

さらに、同様の20交配の子孫と他系統雄との10交配の子孫におけるゲノム定量 PCR を行った結果、それぞれ1個体ずつがモノソミー[50-mono]と[53-mono]と診断された。よって、2年間にわたる交配実験から成長遅延と矮小化をメルクマールとして、交配可能だった57個体中3個体をモノソミー候補とした。モノソミー候補はいずれも雄で、以降、発見順に Syr6、Sy50_48、Syr185 と

した。

Syr6 の第 2 染色体が 1 本のモノソミー個体であることを確認するため、正常系統 p50 との頻度解析を行ったところ、それぞれ比較可能な配列は約 46Gb であった。Syr6 のデータに対する p50 のデータは、全ての比較可能な配列の頻度分布を視覚化すると、第 2 染色体部位のみが 0.5 前後で、他はほぼ 1 となった。さらに、第 2 染色体のみの解析を行うと、全長 164windows のうち染色体両端の 50kb2 か所と内部の 1ヶ所に 1 以上となる windows がある他は、全て 0.5 前後となっていた。このことから、Syr6 の第 2 染色体は、1 本の蓋然性が高くモノソミーであると判断された (図 2)。

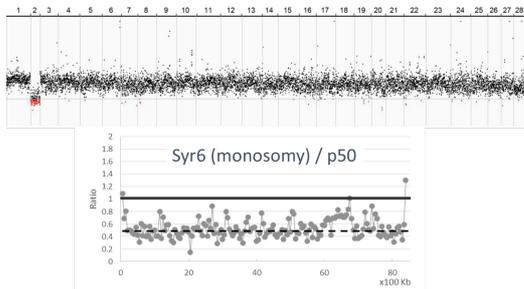


図 2 ゲノム比較による頻度解析結果 (上: 全染色体、下: 第 2 染色体)

Syr6 と Sy50_48 では、次世代 (F₁) が獲得できた。Syr6 と p50 の子供 Syr6-2 では、前述の通りモノソミー (形蚕) と正常個体 (黒縞カイコ) を形質で判断できる。これらの第 2 染色体上に設定した 33 プライマーを用いて、増幅 DNA 頻度を real-time qPCR により比較した。その結果、雌雄のモノソミー個体の増幅産物は、いずれも正常雌雄の増幅産

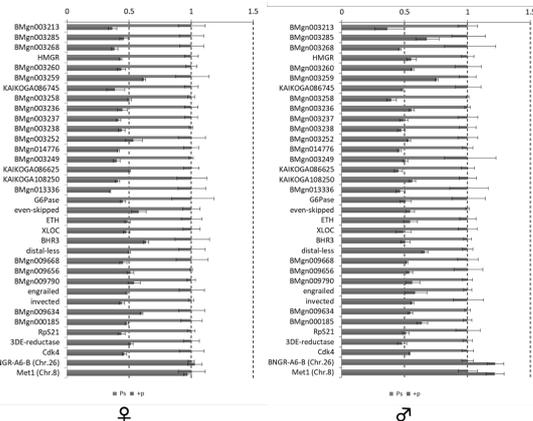


図 3 正常に対しモノソミー幼虫の第 2 染色体遺伝子同副産物は約半分。

物の約半分であった (図 3)。これらの結果と雄親がモノソミーであったことから、モノソミー性は雌雄に遺伝する事が確認できた。

これら個体の第 2 染色体の一部遺伝子の mRNA 発現を real time PCR にて調査したところ、発現量の大きいハウスキーパーな遺伝子に関しては、モノソミーで正常の半分程度であったが、発現量の小さい遺伝子は個体差が大きかった。そこで、Syr6-2 に p53 を交配し、モノソミーの F₂ を得た。F₁ 同様、モノソミー個体 (姫蚕黄血) は、正常 (形蚕黄血) に比べ成長遅延と矮小化が認められた。双方の雄幼虫器官から抽出した RNA の配列決定を行い、その予測遺伝子の cDNA 配列頻度を比較した。その結果、第 2 染色体と Z 染色体で、モノソミーの発現量が正常に比べ平均 10% 以上低下した。特に第 2 染色体で解析可能であった遺伝子では、モノソミーが正常の平均 0.59 となった (図 4)。

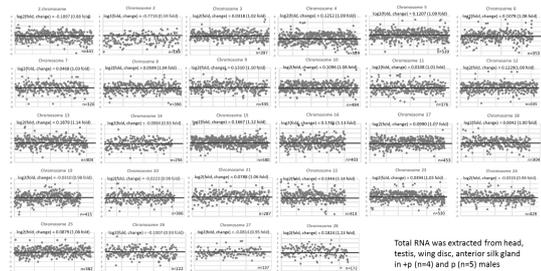


図 4 RNAseq による正常とモノソミーの遺伝子発現頻度比較。最上段左端が Z、左から 2 番目が第 2 染色体の結果。

以上、本研究で目的としたカイコモノソミーを発見し、系統樹立できた。さらに、第 2 染色体遺伝子発現には量的補償が認められず、成長遅延と矮小化の要因の可能性が高い。

目的とした形質によりモノソミー性が判別可能な系統は樹立できたが、雌には異常卵形成による高頻度の不妊性が認められた。第 2 染色体には、卵殻形成に関わる遺伝子クラスターが存在していることから、量的補償のないことと卵殻形成と不妊性の関係の解明に興味を持たれる。また、低いながら妊性がある個体も存在するので、第 2 染色体のない null 変異の胚発生などの解析も今後、興味を持たれる。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

1. 金児 雄・比留間潔(2016) 幼若ホルモン生合成の制御機構. 蚕糸・昆虫バイオテクノロジー. 85: 117-125. 査読無

[学会発表](計5件)

1. 佐原 健・松本祐希名・吉戸敦生・安河内祐二. モノソミーカイコの後代. 日本蚕糸学会第88回大会. 2018年3月19-20日. 名古屋大学大学院生命農学研究科
2. 金児 雄・奈良岡瑠美・高木圭子・比留間潔: 体節特異的に起こる Verson's gland の細胞死の分子機構. 第 61 回日本応用動物昆虫学会. 2017年3月27-29日. 東京農工大学
3. 金児 雄・高木圭子・比留間潔: Verson's gland の蛹コミットメントにおける Broad-complex の制御機構. 日本蚕糸学会第87回大会. 2017年3月21-22日. 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
4. 吉戸敦生・金児 雄・佐原 健 カイコは第2染色体1本でも生きていけるのか? 日本蚕糸学会第87回大会. 2017年3月21-22日. 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
5. 佐原 健・吉戸敦生. 限性黄繭系統Syの染色体構成. 日本蚕糸学会第87回大会. 2017年3月21-22日. 農林水産技術会議事務局 筑波産学連携支援センター

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐原 健 (Sahara, Ken)
岩手大学・農学部・教授
研究者番号: 30241368

(2)研究分担者

金児 雄 (Kaneko, Yu)
弘前大学・農学生命科学部・助教
研究者番号: 90633610