

研究種目：基盤研究(B)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18380037  
 研究課題名（和文） カイコゲノム情報を基盤とした鱗翅目昆虫性染色体の進化的研究  
 研究課題名（英文） Studies on sex chromosome evolution in Lepidoptera based on *Bombyx mori* genome information  
 研究代表者 佐原 健(SAHARA KEN)  
 北海道大学・大学院農学研究院・助教  
 研究番号:30241368

## 研究成果の概要：

チョウとガの仲間について遺伝子を染色体上に視覚化する手法によりカイコと比較したところ、現在繁栄しているグループでは性染色体のうちZ染色体は進化的に同一であることが示唆された。他方のW染色体は非常近縁な種間（同属間）ではこれを構成する配列に高い相同性が認められたが、他の属間では近縁であっても違いが認められた。なお、本研究では電気泳動により、遺伝子が性染色体に存在するか否かを特定できる簡便な手法も開発した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2007年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2008年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

## 研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：BAC-FISH、進化、性染色体、マッピング、鱗翅目昆虫、

## 1. 研究開始当初の背景

鱗翅目昆虫における遺伝学研究はカイコを中心に行われ、多くの成果が日本より世界へと発信されてきた。一方、染色体研究は100以上もその同定すらできない状態が続いてきた。申請者らは、先の基盤研究(B)の助成を受け実施したBACをプローブとしたFISH(BAC-FISH mapping)により鱗翅目昆虫におけるの染色体の同定とカリオタイプングをカイコを用いて世界に先駆け実現した(Yoshido et al (2005): Genetics)。染色体研究の蓄積が乏しい、鱗翅目昆虫では、分子連関地図の作製が散発的に行われているが、構造遺伝子を比較できるような連関地図は、その作

製の難しさからほとんど構築されていない。よって、性染色体に関してすら、幅広い種間で比較することは不可能である。一方で、カイコにおいてはゲノム解析が行われ、WGSドラフト情報が公開されている。カイコゲノム情報を活用して染色体進化を解明しようとする研究はこれまでに例がない。こうした状況を踏まえて、本研究ではBAC-FISHと別途開発した手法(GISH: Sahara et al (2003): Chromosoma)を応用して鱗翅目昆虫の性染色体進化研究を行うために企画されたものである。

## 2. 研究の目的

本研究では、Z染色体上におけるシnten

一情報と W 染色体におけるゲノム構成の網羅的な種間比較により鱗翅目昆虫性染色体の系統関係を明らかにすることを目的とした。

そのため本研究では、農業害虫の大部分を占める鱗翅目昆虫に関して、カイコを鱗翅目モデル昆虫としてホールゲノムショットガンシーケンス(WGS)データ、分子連関地図、BAC、FISH 技術に基づき性染色体のうち Z 染色体に関しては座乗する遺伝子のシンテニーから、ポストゲノム研究手法の確立を目指した。

また、簡便な Z 染色体座乗遺伝子の特定を行える方法を開発し、本研究に組み入れることも目的の一つとした。

### 3. 研究の方法

Z 染色体の比較研究においては、カイコ、シヨウジョウバエ、コクヌストモドキなどゲノム情報が公開されている昆虫種に共通する単一遺伝子のうちカイコ Z 座乗遺伝子のオオモンシロチョウオルソログを特定するために、DOP (degenerated oligonucleotide primer)を設計し、増幅される複数 PCR 産物から配列を決定した。決定された配列のうち、イントロンを含むならびに含まない STS(single tagged site)プライマーを作製した。前者は、簡便に Z 座乗を特定する方法として本研究で開発した、CSGE (conformation sensitive gel electrophoresis) 法に用いた。つまり、直接的に Z 座乗の有無を確認するために使用した。後者は、対象種のゲノムライブラリーより対象オルソログを含むクローンを特定するために用いた。こうして特定されたゲノムクローンは、蛍光色素が付加された核酸をニックトランスレーション法により取り込ませ、プローブを作製し FISH により直接染色体上にてその座乗を確認するために用いた。この研究には、クワコ、オオモンシロチョウ、タバコスズメガを用いた。

W 染色体の進化についてゲノム構成の網羅的な異同が明らかにできる種間 GISH を行った。GISH はゲノム DNA をプローブとして行う FISH であり、ゲノムプローブ作製には対象種のゲノムへ前述と同様の手法にてラベルを施した。この研究の対象種としては実行可能かつ、広範な鱗翅目昆虫族の網羅を念頭におき、近縁種間ではカイコクワコ、オオモンシロチョウーモンシロチョウ、エビガラスズメータバコスズメガ、ヒメシロモンドクガ *O. antiqua*、シンジュサンエリサンの W 染色体進化を調査した。なお、カイコでは W 染色体をペイントラベルとして認識できる W-BAC が特定されており、GISH へのゲノムプローブへ代用した。

FISH に用いる標本作製は、対象種の終齢幼虫もしくは蛹より摘出した生殖巣より作

製した減数分裂前期パキテン染色体を用いた。

### 4. 研究成果

鱗翅目昆虫における Z 座乗遺伝子特定のための CGSE 法開発として、カイコを用いて実験系を構築した。Z 座乗のカイコ *ftz-fl* 遺伝子の 4-5 イントロンには使用した 2 系統(re9, Tw1)間で 5 箇所の *inn/del*と一箇所の置換が認められた。図 1 に示すように双方の系統(a,b)では CGSE による PCR 産物多型は認められないものの、F<sub>1</sub> 個体(c,d)では雄(c)のみに多型が認められた。また、常染色体座乗のカイコ RpS8 遺伝子の第 1-2 イントロンにおける PCR 産物の多型性は F<sub>1</sub> 雌雄の双方で認められた(g,h)。よって、Z 座乗遺伝子の特定が適切なプライマーにより増幅される断片を電気泳動することにより可能であることが示された。

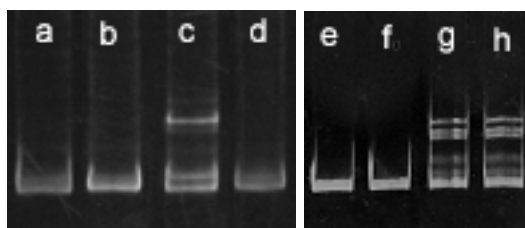


図 1 カイコにおける CSGE 多型解析。  
a-d: *ftz-fl* オルソログ. e-h: RpS8 オルソログ.

オオモンシロチョウで特定したカイコ *apterous* オルソログの第 7 イントロンを増幅する PCR 産物をこの実験系をオオモンシロチョウに適応したところ、野外個体群の雌雄各 12 個体のうち雌(図 2a)では多型が認められなかったのに対して、雄では 12 個体中 6 個体に多型が認められ(図 2b)、このオルソログが Z 座乗であることが明らかとなった。

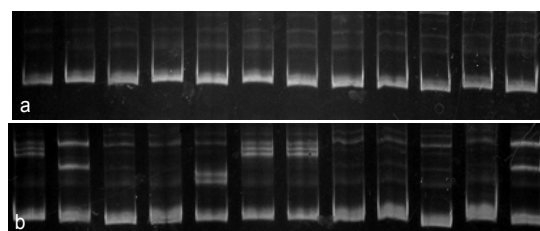


図 2 オオモンシロチョウにおける CSGE 多型解析。  
雌(a)には多型は認められないが雄(b)個体には多型があり、*apterous* が Z 座乗であると判断される。

BAC-FISH による Z 座乗遺伝子マッピングはクワコではカイコ BAC を直接用いて行い、供試したすべてのプローブはカイコと同様に Z 染色体上に配置した。オオモンシロチョウではカイコ *ftz-fl* (27J24), *apterous* (26C08), *kettin* (02A12) のオルソログを含む BAC プローブにて FISH を行い、*apterous* と *kettin* の間に遺伝子配置の逆転があった(図 3)。タバコスズメガでは Eph receptor

(15J11), titin (42G01), epidermal growth factor receptor(22D05), NADH dehydrogenase(34M13), P-glycoprotein(18A03)を含むBACにてFISHを行いNADH dehydrogenaseとP-glycoproteinの間にカイコとの遺伝子配置の逆転を認めた(図3)。しかしながらカイコでZ座乗の遺伝子はそれぞれの種でもZ座乗であった。

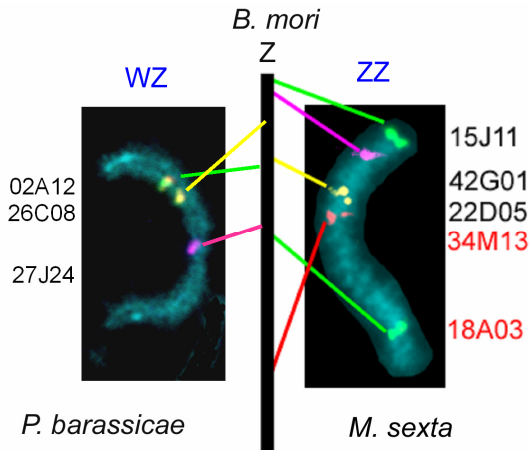


図3 BAC-FISHによるカイコZ座乗遺伝子のオオモンシロチョウとタバコスズメガにおける座位。

種間 GISH によりカイコクワコ間には W 染色体の構成配列が非常に類似していると推測された(図 4a)。常染色体との付着により生じたと考えられる neo-W/neo-Z の染色体構成を持つ、*Samia cynthia* や *Orgyia antiqua* の染色体について、近縁種のエリサンやヒメシロモンドクガのゲノムプローブがそれぞれの GISH と同様の W 上ペイントシグナルをもたらしたことも、これらの種間における W の構成因子の保存性を意味する(図 4b,c)。ところが、エビガラスズメの WZ に対する同種のゲノムプローブが完全なペイントシグナルをもたらすのに対して、タバコスズメガのプローブは点在するシグナルが観察された。この結果は、別属の鱗翅目個中間では W 構成因子の保存性がやや小さくなっていることを示唆する。

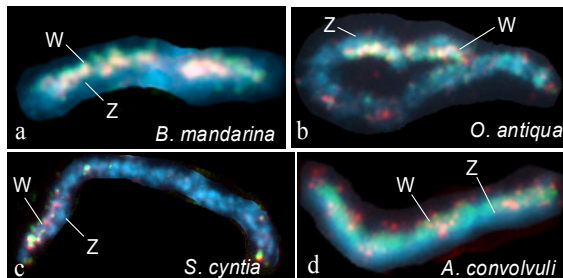


図4 クワコ(a)、*O. antiqua* (b)、シンジュサン(c)、エビガラスズメ(d)の性染色体に対する同種の GISH(緑色)と別種の GISH(赤色)。

##### 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 11 件)

1. Shibata F, Sahara K, Naito Y, Yasukochi Y (2009): Reprobing of multicolour FISH in preparations of lepidopteran chromosomes. *Zool Sci* 26: 187-190. 査読有り
2. Abe H, Fujii T, Tanaka N, Yokoyama T, Kakehashi H, Ajimura M, Mita K, Banno Y, Yasukochi Y, Oshiki T, Neno M, Ishikawa T, Shimada T (2008) Identification of the female-determining region of the W chromosome in *Bombyx mori*. *Genetica* 133, 269-282. 査読有り
3. Matsuda Y, Sahara K, Yasukochi Y, Yamashiki N (2007): Detection of gamma-tubulin in mitotic division of *Bombyx mori* (Lepidoptera) and *Chortophaga viridifasciata* (Orthoptera). *Zool Sci* 24, 781-786. 査読有り
4. Sahara K et al (2007): Conserved synteny of genes between chromosome 15 of *Bombyx mori* and a chromosome of *Manduca sexta* shown by five-color BAC-FISH. *Genome* 50, 1061-1065. 査読有り
5. Traut W, Sahara K, Marec F (2007): Sex chromosomes and sex determination in Lepidoptera. *Sexual Dev* 1, 332-346. 査読有り
6. Yoshido A, Yasukochi Y et al (2007): FISH analysis of the W chromosome in *Bombyx mandarina* and several other species of Lepidoptera by means of *B. mori* W-BAC probes. *J Insect Biotech Seric* 76, 1-7. 査読有り
7. Shiomi K, Fujiwara Y, Yasukochi Y, Kajiura Z, Nakagaki M, Yaginuma T (2007): The Pitx homeobox gene in *Bombyx mori*: regulation of DH-PBAN neuropeptide hormone gene expression. *Mol Cell Neurosci*. 34, 209-218. 査読有り
8. Yoshido A, Yamada Y, Sahara K (2006): The W chromosome detection in several lepidopteran species by genomic *in situ* hybridization (GISH). *J Insect Biotech Seric* 75, 147-151. 査読有り
9. Yasukochi Y et al (2006): A second generation integrated map of the silkworm reveals integrated synteny and conserved gene order between lepidopteran insects. *Genetics* 173, 1319-1328. 査読有り

10. Niimi T, **Sahara K** et al(2006): Molecular cloning and chromosomal localization of the *Bombyx Sex-lethal* gene. *Genome* 49, 263-268. 査読有

11. Traut W, Niimi T, Ikeo K, **Sahara K** (2006): Phylogeny of the sex determining gene *Sex-lethal* in insects. *Genome* 49, 254-262. 査読有り

[学会発表] (計 30 件)

1. **佐原健**ら (2009): 鱗翅目昆虫における遺伝子配置のBAC-FISH解析. 第53回日本応用動物昆虫学会大会, 北海道大学高等機能教育開発総合センター (札幌市) 2009.3.28-30

2. 吉戸敦生・**佐原健**・松田洋一(2009): シンジュ蚕地域個体群間の性染色体比較. 第53回日本応用動物昆虫学会大会, 北海道大学高等機能教育開発総合センター (札幌市) 2009.3.28-30

3. 吉戸敦生・**佐原健**・**安河内祐二**・松田洋一(2009): Fosmid-FISHによるシンジュ蚕地域個体群間の染色体比較. 平成21年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会, 東京農工大学農学部 (府中市) 2009.3.21-22

4. **安河内祐二**ら (2009): 比較ゲノム解析のための効率的なヨトウガcDNAのカタログ化. 平成21年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会, 東京農工大学農学部 (府中市) 2009.3.21-22

5. **佐原健**ら(2009): 鱗翅目昆虫における染色体BAC-FISH解析. 平成21年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会, 東京農工大学農学部 (府中市) 2009.3.21-22

6. **佐原健**ら(2008): 鱗翅目昆虫におけるシンテニー解析. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008), ポートピア神戸 (神戸市) 2008.12.9-12

7. 田中 (奥山) 牧子・柴田洋・吉戸敦生・河合絢・神村学・中野亮・石川幸男・**佐原健**・**安河内祐二**(2008): 鱗翅目昆虫のBACライブラリーを用いた比較ゲノム解析2. 日本動物学会第79回大会, 福岡大学七隈キャンパス (福岡市) 2008.9.5-7

8. **佐原健**ら(2008): カイコとタバコスズメガ

における遺伝子シンテニー. 第52回日本応用動物昆虫学会大会, 宇都宮大学峰キャンパス (宇都宮市) 2008.3.26-28

9. Naito Y, Asano S, Bando H, Yamada Y, **Yasukochi Y**, **Sahara K** (2008): Development of a method to detect the Z-linked genes in Lepidoptera. Asia-Pacific Congress of Sericulture and Insect Biotechnology (APSERI 2008), Noyori Memorial Hale, Nagoya University, Nagoya 2008.3.21-22 (ポスター)

10. **Yasukochi Y** et al(2008): Comparative genome analysis among *Bombyx mori*, *Manduca sexta* and *Ostrinia nubilalis*. Asia-Pacific Congress of Sericulture and Insect Biotechnology (APSERI2008), Noyori Memorial Hale, Nagoya University, Nagoya 2008.3.21-22 (ポスター)

11. Matsuhashi T, **Yasukochi Y**, **Sahara K** (2008): ZOO-FISH mapping in *Bombyx mandarina*. Asia-Pacific Congress of Sericulture and Insect Biotechnology (APSERI 2008), Noyori Memorial Hale, Nagoya University, Nagoya 2008.3.21-22 (ポスター)

12. **佐原健**ら(2008): カイコとタバコスズメガにおける染色体上遺伝子配置の共通性. 平成20年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会, 名古屋大学生命農学研究科 (名古屋市) 2008.3.20-21

13. 内藤洋太・**佐原健**・柴田洋・**安河内祐二** (2008): BAC-FISHを用いたオオモンシロチョウZ染色体マッピング. 平成20年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会, 名古屋大学生命農学研究科 (名古屋市) 2008.3.20-21

14. **安河内祐二**ら(2008): カイコとヨーロッパアワノメイガにおける染色体上遺伝子配置の共通性. 平成20年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会, 名古屋大学生命農学研究科 (名古屋市) 2008.3.20-21

15. **佐原健**ら(2008): カイコゲノム情報活用のための鱗翅目昆虫ゲノム比較解析. 2007年度日本応用動物昆虫学会・昆虫学会共催支部大会, 北海道大学総合博物館 (札幌市) 2008.2.8

16. 太田広人・西川宗伸・小野昌弘・内藤洋太・**佐原健**・朝岡潔・黒田章夫・**安河内祐二** (2007): カイコの食性異常遺伝子 *Nps* の解析. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会 合同大会 (BMB2007),

- パシフィコ横浜（横浜市）2007.12.11-15
17. 安河内祐二ら(2007): BAC-FISH 法を用いた鱗翅目昆虫の比較ゲノム解析. 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学大会 合同大会(BMB2007), パシフィコ横浜（横浜市）2007.12.11-15
18. 佐原健ら(2007): BAC-FISH によるカイコとタバコスズメガの染色体比較. 東北・北海道地区蚕糸・昆虫利用研究連絡会および日本蚕糸学会東北支部講演会, 岩手大学農学部（盛岡市）2007.11.30-12.1
19. 柴田洋・吉戸敦生・河合絢・安河内祐二・佐原健(2007): 鱗翅目昆虫における染色体シンテニー研究 2. カイコとタバコスズメガの染色体シンテニー. 第 58 回染色体学会年会・第 17 回染色体コロキウム 2007 年合同年会, 総合研究大学院大学（葉山町）2007.11.26-28
20. 佐原健ら(2007): 鱗翅目昆虫における染色体シンテニー研究 1. 染色体同定法の開発. 第 58 回染色体学会年会・第 17 回染色体コロキウム 2007 年合同年会, 総合研究大学院大学（葉山町）2007.11.26-28
21. 田中（奥山）牧子・柴田洋・吉戸敦生・佐原健・安河内祐二(2007): 鱗翅目昆虫のBACライブラリーを用いた比較ゲノム解析. 日本動物学会第78回大会, 弘前大学文京町キャンパス（弘前市）2007.9.20-22
22. Sahara K, Yoshido A, Marec F, Fuková I, Kamimura M, Yasukochi Y (2007): BAC-FISH mapping of synteny between chromosomes of *Bombyx mori* and *Manduca sexta*. The 16th International Chromosome Congress (ICC2007), RAI congress centre, Amsterdam, Netherlands 2007.8.25-29（ポスター）
23. 安河内祐二ら (2007): カイコと鱗翅目以外の昆虫とのゲノム比較. 平成 19 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会, 農林水産技術会議事務局筑波事務所（つくば市）2007.4.3-4
24. 松橋崇行・吉戸敦生・佐原健(2007): カイコBACプローブを用いたクワコへのZOO-FISH. 平成19年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会, 農林水産技術会議事務局筑波事務所（つくば市）2007.4.3-4
25. 佐原健ら(2007): タバコスズメガBAC-FISHによる家蚕との染色体シンテニー解析. 平成 19 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会, 農林水産技術会議事務局筑波事務所（つくば市）2007.4.3-4
26. 佐原健ら(2007): BAC-FISH を用いたカイコとタバコスズメガ間の染色体シンテニー. 第 51 回日本応用動物昆虫学会, 広島大学・東広島キャンパス（東広島市）2007.3.27-29
27. 佐原健ら(2007): BAC-FISH により鱗翅目昆虫染色体の相同性比較はできるのか? 応用動物昆虫学会北海道支部会, 北海道大学学術交流会館（札幌市）2007.1.30
28. 松橋崇行・吉戸敦生・佐原健(2007): BAC-FISHを用いたカイコ染色体解析. 応用動物昆虫学会北海道支部会, 北海道大学学術交流会館（札幌市）2007.1.30
29. 安河内祐二ら(2006): BAC-FISH 法を用いたカイコとタバコスズメガの比較ゲノム解析. 日本分子生物学会 2006 フォーラム, 名古屋国際会議場（名古屋市）2006.12.6-8
30. Sahara K, Shibata F, Kawai A, Yoshido A, Tanaka-Okuyama M, Yasukochi Y (2006): FISH identification of *Bombyx mori* chromosomes for comparative genome mapping in Lepidoptera. Asia-Pacific Congress of Sericulture and Insect Biotechnology, Sanju University, Koera 2006.10.10-14（基調講演）
- [図書]（計 1 件）
1. Yasukochi Y, Fujii H, Goldsmith MG (2008): Chapter 4: Silkworm in *Genome Mapping and Genomics in Arthropods*. (*Genome Mapping and Genomics in Animals, Vol 1*). Hunter W & Kole C eds, Springer-Verlag, Berlin pp43-57 (122p)
- [産業財産権]
- 出願状況（計 0 件）
- 取得状況（計 0 件）
- [その他]
- なし
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
- 佐原 健(SAHARA KEN)(30241368)・北海

道大学・大学院農学研究院・助教

(2)研究分担者

安河内 祐二 (YASUKOCHI YUJI)  
(50355723)・農業生物資源研究所・ゲノム研究・情報解析ユニット・主任研究員

(3)連携研究者

なし