

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06067

研究課題名(和文) トビケラ目昆虫における染色体進化の解明

研究課題名(英文) Study on chromosome evolution in caddisflies

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：農業害虫の多くを含むチョウ類に最も近縁な水生昆虫のトビケラについて染色体の進化解明を研究対象とした。蛍光色素ラベルにより特定のDNA配列を染色体上で視覚化できるFISH法を用いるため、既存1種に加え新規2種のトビケラ類のBACライブラリーを構築した。BAC-DNAを用いたFISHマッピングにより、3種の遺伝子配置を特定し、モデルチョウ目昆虫のカイコゲノム情報と比較した結果、進化的な上科ではカイコと染色体対応関係が認められる一方、祖先的な上科では認められなかった。よって、カイコを代表とするチョウ目昆虫染色体の祖先形は、トビケラ目昆虫の進化的な上科と共通すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カイコをはじめとするチョウ目昆虫の染色体は、切断が起きても分裂サイクルから排除されないため、様々な染色体変化があると予測されていた。しかし、チョウ目昆虫の大部分の染色体構成は、ほぼ一様である。こうした構成がどこからはじまったのかについて本研究では姉妹系統関係にあるトビケラ昆虫の進化的グループであると明らかにした。これによりチョウ類の害虫化に関連する遺伝子の探索の基盤が形成できた。

研究成果の概要(英文)：I addressed to understand chromosome evolution in caddisflies which are sister clade of moths and butterflies. I constructed BAC libraries from 2 new species and a FISH technique was used to visualize DNA sequences of 3 species of caddisflies. FISH mapping used BAC-DNA probes showed that chromosome correspondence between the silkworms and 2 caddisfly species which belong evolutionary advanced superfamily. Instead, a species in the other ancestral superfamily does not have chromosome correspondence to that in the silkworm. Hence, I assume that typical lepidopteran chromosome sequences had appeared in the common ancestor of the advanced clade in caddisflies.

研究分野：昆虫細胞遺伝学

キーワード：FISH カイコ トビケラ BAC 染色体 進化

1. 研究開始当初の背景

チョウ目昆虫の染色体は、動原体が染色体上に分散するため、ヒトの染色体で見られる一時狭窄の「くびれ」はない。また、分裂中期の凝集率が高く染色体の大きさもほぼ等しくなる。このため、長い間染色体の特定が出来ず、染色体進化の解析は不可能であった。研究代表者らは、BAC (bacterial artificial chromosome) ライブラリー由来のゲノムクローンを使って、チョウ目昆虫間の染色体進化を解析する FISH (fluoresces *in situ* hybridization) 法を開発した (Sahara et al 2003 Chromosoma; Yoshido et al 2005 Genetics)。カイコの BAC ライブラリーは、ごく近縁種にしかクロスハイブリダイズしなかったので、対象とする種毎に BAC ライブラリーを作製し、BAC-FISH 法を応用した (Sahara et al 2007 Genome; Yasukochi et al 2009 PLoS ONE)。その後、fosmid プローブを使った方法も開発し (Yoshido et al 2011 Insect Biochem Mol Biol)、上科レベルで研究対象を広げた結果、進化的なチョウ目昆虫において、染色体に大きなリアレンジメントがないことを提唱し、現在では広く受け入れられている (Nguyen et al 2013 PNAS; Sahara et al 2013 Insect Biochem Mol Biol; Yasukochi et al 2016 Heredity; Yasukochi et al 2018 PLoS ONE)。このコンセンサスは、欧米のグループによる分子連関解析やゲノム解析を用いた研究でも確かめられてきた。

ところが、ごく一部の種を除き、祖先的なチョウ目昆虫はごく小さく、染色体標本の作製も非常に難しい。研究代表者らもコウモリガ科での研究を進めいたが、ゲノムサイズが大きいため、進捗は芳しくない。もちろん、NGS によるシーケンス解析は可能だが、現状では染色体全体に相当する連結 (アセンブル) データを得ることが容易ではない。シーケンスの深度を上げることで、正確性を高めても、物理的マッピングによる検証ができない。よって、染色体進化研究には利用できていなかった。

トビケラ目昆虫の多くは、幼虫期を水中で過ごし、陸地へ出て交尾、水中に産卵する。最も近縁なチョウ目昆虫と同じ染色体構造を持つ。このため、染色体の同定も染色体進化の研究も全く手つかずである。もう一つの共通点として、トビケラ目昆虫はチョウ目昆虫と同様の雌ヘテロ型の性染色体システムをもつ。これまで研究された種では、すべて雌が Z0、雄が ZZ である。祖先的なチョウ目昆虫は、トビケラ目昆虫と同じく、雌 Z0、雄 ZZ で、ムモンハモグリ上科よりも進化的なグループで W 染色体が出現する (Sahara et al 2012 Chromosome Res; 佐原ら 2015 蚕系昆虫バイオテック)。カイコでは、W 染色体上にクラスター化して存在する *Fem* piRNA が、雄化遺伝子 *Masc* を分解することで、雌の性決定を行う (Katusma et al 2018 Proc Jpn Acad B)。重要な性決定を担う、W 染色体がどのような起源で進化し、性決定機能を担うようになったのか興味を持たれる。

トビケラ目昆虫は約 14,500 種が知られ、日本では、2 上科全てを網羅する 29 科 430 種が同定されている。中規模の種数をもつ昆虫目にも関わらずトビケラの染色体研究は、「カウント」に留まっていた。系統的には約 2 億年前にチョウ目昆虫との共通祖先から分岐したと考えられ、染色体構造もチョウ目昆虫と共通する。つまり、染色体が小さく差がない上に、動原体が分散するため一時狭窄による「くびれ」の特徴も認められず、さらには、染色体の染め分けも出来ないため染色体を区別する方法が無かった。研究代表者らは、2005 年にカイコを使ったチョウ目昆虫染色体同定 (Yoshido et al 2005) に成功して以来、トビケラ目昆虫を対象とした研究にも興味を持ってきたが、手つかずであった。これまでに行ってきたチョウ目昆虫の BAC-FISH 研究により、対象種の染色体同定 (カリオタイピング) が必ず行えること、相同遺伝子のマッピング比較で、染色体進化の解析が行えることが明らかになっている (図 1; Sahara et al

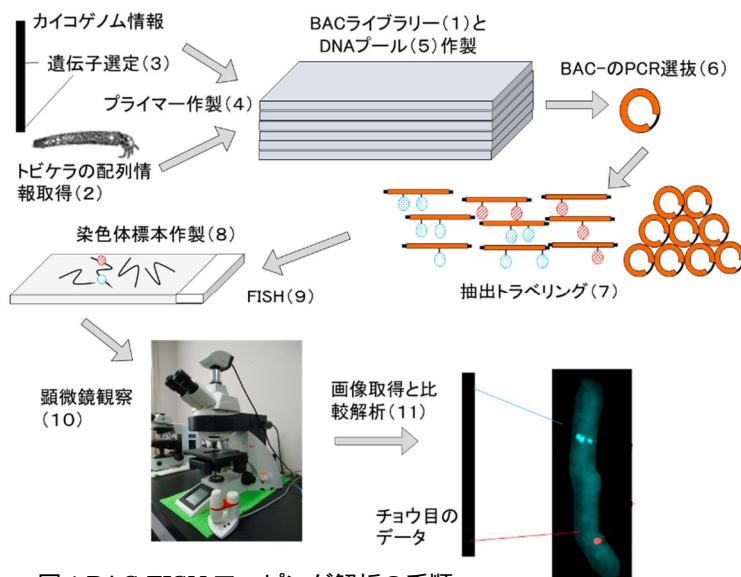


図 1 BAC-FISH マッピング解析の手順

2013; Yoshido et al 2014 など)。よって、同様の分散動原体型染色体構造をもつトビケラ目昆虫の染色体研究にも、同様の方法が使用できると確信した。一方で、BAC プローブは、対象種とごく近縁種(多くは同属別種)にしかハイブリダイズしない(使えない)ことも判明している。チョウ目昆虫の BAC ライブラリーは、トビケラ目昆虫には利用できない。そこで、BAC ライブラリー構築に不可欠なパルスフィールド電気泳動装置を導入するとともに、植物で BAC ライブラリー構築を行ってきた大阪教育大の鈴木剛博士との共同研究(基盤 B_23380030)を通じて、構築手法を研究代表者のラボに導入した。その後、ヒゲナガカワトビケラの BAC ライブラリーを構築(Fujimoto et al 2018)でき、研究推進の目処がついたため本研究を企画した。祖先的な上科に属するヒゲナガカワトビケラについては、BAC-FISH にも成功しており、十分な染色体標本数も確保できていたので、BAC-DNA の抽出やプローベラベリングなどに必要な消耗品費を確保できれば研究実施できる段階にあった。他方の進化的な上科に属する別種のトビケラ類を対象とする研究については、BAC 構築と RNAseq 用の蛹個体を一部採集済みで、幼虫からの染色体標本作製が可能であることを確認していた。対象とする相同遺伝子の配列情報は、随時新規配列を追加し、RNAseq 情報に対する blast x 解析のクエリーとする準備も進捗していた。

2. 研究の目的

本研究の第一の目的は、トビケラ目昆虫で染色体を個別に認識するカリオタイピングの実現である。研究代表者らの開発したチョウ目昆虫の BAC-FISH マッピング法の適応を目標とした。実現すればトビケラ目昆虫のカリオタイピングは、世界初となる新規な研究である。カリオタイピングと遺伝子マッピングは、ヒゲナガカワトビケラを対象として標準データを得る。第二の目的は、ヒゲナガカワトビケラとは別上科に属するトビケラ類での遺伝子マッピングを行うことである。これらの結果を標準データと比較解析し、トビケラ目昆虫における染色体の進化の概要を明らかにする。第三の目的は、これらトビケラ目昆虫種とチョウ目昆虫種の染色体対応関係の解明である。これは、第一と第二の目的を達成した上に成り立ち、研究進展が阻まれている祖先的なチョウ目昆虫種の染色体進化解析の基盤データとなる。第四の目的は、雄と雌が共通にもつ性染色体の Z 染色体に相同遺伝子マッピングを行い、トビケラ目昆虫間ならびにチョウ目昆虫との比較を可能とすることにある。Z 染色体にマッピングされた遺伝子の異同を比較することで、W がゲノム外の配列由来(図 2 仮説 1)なのか常染色体と祖先型 Z 染色体の融合由来のいずれであるのか(図 2 仮説 2)の解明を目指した。

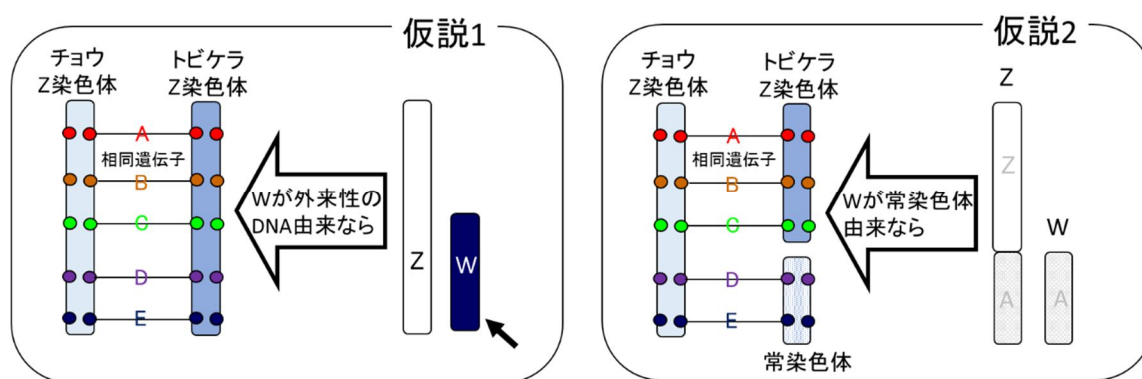


図 2 本研究の結果、トビケラ目とチョウ目の Z 遺伝子が共通であれば、W は外来性(仮説 1)となり、チョウ目の Z 遺伝子がトビケラ目の Z と常染色体に分かれれば W は常染色体由来(仮説 2)であると判断できる。仮説は、Lukhtanov (2000)提唱。

3. 研究の方法

盛岡市内を流れる中津川よりヒゲナガカワトビケラとニンギョウトビケラ幼虫を採集した。また、ホタルトビケラは分譲いただいた個体群を室内飼育して使用した。これら対象となるトビケラ類から染色体標本作製を行い、FISH に使用した。なお、染色多標本は冷凍保存が可能であり、実験に応じて冷凍保存標本を使用できた。

BAC ライブラリー作製には、蛹から抽出したゲノム DNA (gDNA) を低融点アガロースに包埋したプラグを用いた。プラグ内のゲノム DNA を *Hind*III で部分消化した後、パルスフィールド電気泳動装置 (BioRad Chef Mapper) により高分子 (HMW) gDNA を分画した。ゲル消化して取り出した HMW gDNA を pBeloBAC11 にライゲーションし、ElectroMAX

DH10B にエレクトロポレーション (Gene PulserII) により導入した。BAC ライブラリー評価は、以下の通り行った。ストックした白コロニーを無作為抽出し、BAC からプラスミッド DNA を QIAGEN Plasmid Midi Kit を用いて抽出した。約 400 ng のプラスミッド DNA を 5 時間以上、37 °C で *NotI* 処理することで、プラスミッド DNA をベクター DNA とインサート DNA に完全分離した後、1% Pulse Field Certified Agarose (BioRad)ゲルを用いて CHEF Mapp® XA システムでパルスフィールド電気泳動を行った。サイズマーカー DNA との移動度を片対数グラフに書き出し、インサートサイズ推定を実施した。

RNAseq は外注にて行った。配列解析に関しては、BmTOP (Ohno et al 2020) を用いて、単一遺伝子カイコホモログ検出を行った。検出された遺伝子配列より、BAC ライブラリーから対象とする遺伝子を含む BAC 選抜を実施した。PCR 選抜用プライマーペアは外注した。BAC ライブラリーよりプレート、行および列に対応する BAC-DNA プールを作製し、前述したプライマーペアにより目的の遺伝子配列を含む BAC コード番号を PCR 特定した。特定された BAC コードには 4 クローンを植菌しており、ここから、さらにシングルコロニー選抜により対象 BAC を選抜した。

選抜された BAC-DNA をプローブとしたトビケラ類の BAC-FISH は、チョウ目昆虫 FISH 法 (図 1) を改変して実施した。つまり、BAC-DNA プローブラベリングには、サーマルサイクラー使用したダイレクト蛍光ラベルを施し、オープンプレート、ハイブリダイゼーションオープンを使用して FISH を実施した。FISH を行った染色体観察には、Leica DM6000B 蛍光顕微鏡システムを用いた。染色体と FISH プローブシグナルデータは、デジタル化して保存し、Adobe Photoshop を用いてプロセスを行った。

4. 研究成果

本研究により新たに 2 種のトビケラ類 (ニンギョウトビケラとホタルトビケラ) BAC ライブラリーが構築できた。ニンギョウトビケラの BAC ライブラリーは総クローン数 79,872、推定総ゲノムサイズ 3,700 Mb (推定平均インサートサイズ 46.33 kb) であり、ホタルトビケラの BAC ライブラリーは総クローン数 42,240、推定総ゲノムサイズ 2,449 Mb (平均インサートサイズ 57.97 kb) であった (表 1)。

5 種のトビケラ (i5K Consortium 2013; Ferguson et al 2014; Weigand et al 2017; 2018; Luo et al 2018) における推定ゲノムサイズは、451 ~ 1,369 Mb である。最大サイズの種と比較すると、ニンギョウトビケラでは約 2.70 ゲノム分、ホタルトビケラで約 1.78 ゲノム分に相当する。ヒゲナガカワトビケラの BAC ライブラリー (Fujimoto et al 2018) は、総クローン数 32,256、推定総ゲノムサイズ 2,108 Mb (平均インサートサイズ 65.38 kb) であったため、新規トビケラ 2 種における BAC ライブラリーは、推定

表 1 新規構築された 2 種トビケラ類 BAC ライブラリーと既構築のヒゲナガカワトビケラ BAC ライブラリーとの比較

トビケラ種名	総クローン数	平均インサートサイズ(kb)	総ゲノムサイズ(Mb)
ホタルトビケラ	42,240	57.97	2,449
ニンギョウトビケラ	79,872	46.33	3,700
ヒゲナガカワトビケラ	32,256	65.38	2,108

総ゲノムサイズを比較すると、既存よりも大きいライブラリーとなった。これは、公開されているゲノムサイズがシマトビケラ上科は 451.5 Mb と他の上科と比較して小さく、エグリトビケラ上科は 1,000 Mb を超える種が 2 種登録されているため、FISH マッピングに用いる対象 BAC 選抜の効率を考慮して、ヒゲナガカワトビケラよりも大きな BAC ライブラリーを構築した結果である。一方、平均インサートサイズはそれぞれニンギョウトビケラで 19.05 kb、ホタルトビケラでも 7.41 kb、ヒゲナガカワトビケラの平均インサートサイズよりも小さかった。高分子 DNA 抽出に使用する個体数が、ヒゲナガカワトビケラでは蛹 3 個体だったのに対し、ホタルトビケラは蛹 20 個体程度、ニンギョウトビケラは蛹 30 個体から作製したため、粗雑物が多い可能性や虫体の磨砕が十分に行われていない可能性が考えられた。

ニンギョウトビケラにおける FISH マッピングでは、鱗翅目昆虫の基本染色体数 $n=31$ の Chr2, 11, 30 に対応する染色体に座乗する遺伝子オルソログを除き、複数オルソログのマッピングが実行できた。特異シグナルが認められた 97 のうちカイコ染色体との対応関係を示さなかったのは 8 プローブであった。なお、減数分裂の観察からニンギョウトビケラ染色体数は $n=22$ と考えられたため、29 対のなかのいくつかは同一染色体にマップされるはずである。シグナル座乗位置からいくつかの候補は考えられるので、22 対に収束するためのさらなる実験が必要である。

$n=28$ と考えられるホタルトビケラの BAC-FISH マッピングでは、鱗翅目昆虫の基本染色体数 $n=31$ のうち Z ならびに Chr27 に対応する染色体に座乗する遺伝子オルソログを除き、複数オルソログのマッピングが実行できた。特異シグナルが認められた 97 のうち 89 プローブがカイコ染色体との対応関係を示したことから、カイコタイプのゲノム構成であると判明した。

構築済みであったヒゲナガカワトビケラについて、BmTOP を用いて選抜したカイコホモログを含む BAC をプローブとしたヒゲナガカワトビケラパキテン染色体に対する FISH マ

ッピングを行った。本種は、チョウ目昆虫の多くとは異なる遺伝子配置を持つことが予測されたので、 $n=13$ と比較的小さい染色体数を生かし、リプロブ FISH カリオタイピングを実現した。本研究により、カリオタイプされた染色体を用いて、上記 BAC プローブをリプロブする FISH マッピング法を確立した。その結果、1 Mb 程度の小さなシンテニブロット領域が点在する可能性はあるものの、ヒゲナガカワトビケラ染色体は、チョウ目昆虫との間に対応関係がないと結論した。

これまでの cDNA 配列情報では、Z 染色体の精細なマッピングには不十分であったため、RNAseq 情報を追加取得して鱗翅目昆虫の W 染色体の起源調査を行った。ヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) と同属で近縁な *Stenopsyche tienmushanensis* のゲノム情報に基づいたヒゲナガカワトビケラとカイコ Z 染色体の比較研究を実施した。追加取得ならびに既存のヒゲナガカワトビケラ RNAseq データを解析し、1,395 カイコオルソログからカイコ Z 遺伝子 34 を選抜した。PCR 選抜によりこれらを含む 23 ヒゲナガカワトビケラ BAC が獲得できた。これら BAC-DNA をプローブとして FISH を行ったところ、17 が Z、6 が常染色体にマッピングされた。マッピングされたそれぞれの BAC に含まれるヒゲナガカワトビケラ遺伝子配列から *Stenopsyche tienmushanensis* コンティグを特定したと

ころ、Z マップ BAC は 15 (Z コンティグ)、常染色体マップ BAC は 6 コンティグ (A コンティグ) に集約された (図 3)。 *Stenopsyche tienmushanensis* の Z コンティグ遺伝子モデルにおいて比較可能なカイコオルソログのうち、カイコ Z 遺伝子率は 87.8% であった。これに対して、A コンティグの Z 遺伝子率は 19.6% と、ヒゲナガカワトビケラ/ *Stenopsyche tienmushanensis* で Z マップされるカイコオルソログはカイコでも Z 率が高く、常染色体マップされるカイコオルソログはカイコでも常染色体率が高い事が判明した。しかしながら、進化的チョウ目昆虫の W 染色体由来を特定するには至っていない。なお、本研究によって FISH による物理マッピングが染色体レベルに満たないゲノム情報の連結に有用であることが示された。

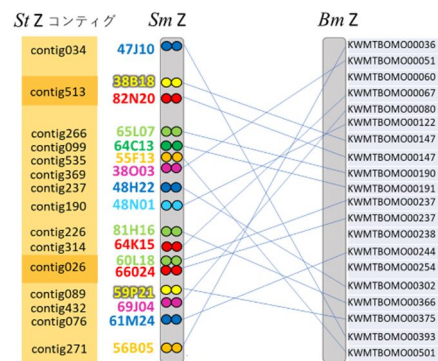


図 3 *Stenopsyche tienmushanensis* (St)のゲノム情報に基づいたヒゲナガカワトビケラ(Sm)とカイコ(Bm) Z 染色体の比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 藤本章晃、大野瑞紀、佐原 健	4. 巻 45
2. 論文標題 BAC-FISHを用いたトビケラ類ゲノムアセンブルの試行	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 東北蚕糸・昆虫利用研究報告	6. 最初と最後の頁 10-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Traut W, Schubert V, Dalikov´ M, Marec F, Sahara K	4. 巻 128
2. 論文標題 Activity and inactivity of moth sex chromosomes in somatic and meiotic cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chromosoma	6. 最初と最後の頁 533-545
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00412-019-00722-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ohno M, Fujimoto T, Naito Y, Joraku A, Yasukochi Y, Sahara K	4. 巻 55
2. 論文標題 BAC selection of the large white butterfly, <i>Pieris brassicae</i> (Lepidoptera: Pieridae) containing orthologs of the silkworm, <i>Bombyx mori</i> (Lepidoptera: Bombycidae)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Entomology and Zoology	6. 最初と最後の頁 159-174
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13355-019-00665-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 藤本 章晃・倉西 良一・安河内 祐二・佐原 健	4. 巻 44
2. 論文標題 ホタルトビケラおよびニンギョウトビケラのBACライブラリー構築	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 東北蚕糸・昆虫利用研究報告	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 藤本章晃・大野瑞紀・安河内祐二・佐原 健
2. 発表標題 ニンギョウトビケラとチョウ目昆虫の染色体コリニアリティー
3. 学会等名 令和3年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ohno M, Fujimoto M T, Suzuk Gi, Yasukochi Y, Sahara K
2. 発表標題 BAC library construction and BAC-FISH mapping in the eastern pale clouded yellow butterfly, <i>Colias erate</i>
3. 学会等名 International Symposium on "Environmental Response Mechanisms in Plants and Animals" (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤本章晃・大野瑞紀・安河内祐二・佐原 健
2. 発表標題 トビケラ目昆虫とチョウ目昆虫の染色体対応関係
3. 学会等名 令和2年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大野瑞紀・鈴木剛・安河内祐二・佐原 健
2. 発表標題 モンキチョウ染色体の網羅的なBAC-FISHマッピング
3. 学会等名 令和2年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------