

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23380030

研究課題名(和文)ゲノム比較による鱗翅目昆虫染色体進化の解明

研究課題名(英文)Chromosome evolution in Lepidoptera analyzed by comparative FISH mapping

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) 14,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、コナガ、コウモリガ、ヒゲナガカワトビケラのESTライブラリーを作製し、カイコ単一遺伝子オルソログ情報を取得し、後2種のBACライブラリーを新規作製した。3種のカイコオルソログを含むBACクローンを選抜し、FISHマッピング系を構築した。

モデル鱗翅目昆虫カイコとの網羅的ゲノム比較により、コナガでは、シンテニー保存性が認められた。一方、毛翅目昆虫のヒゲナガカワトビケラでは鱗翅目昆虫とのゲノムワイドな染色体の対応関係は認められなかった。また、オオモンシロチョウとモンシロチョウ間では、染色体の対応関係が認められたが、これまで解析された鱗翅目昆虫のとのマクロシンテニーは認められなかった。

研究成果の概要(英文)：We obtained information of *Bombyx mori* single orthologs from *Plutella xylostella*, *Endoclyta excrescens* and *Stenopsyche marmorata* by means of EST analyses. BAC libraries in the latter two species were also constructed in the present study. The BAC-FISH experimental system in these species were successfully developed to analyze chromosome correspondence to the model Lepidoptera, the silkworm. Comprehensive genome comparison between *B. mori* and the target species revealed that conserved synteny of gene order is apparent in *P. xylostella*. While a trichopteran representative, *S. marmorata* showed only putative microsyntenic correspondence to the gene order of the silkworm. *Pieris* does not have conserved synteny in spite of well conserved correspondence between the two species.

研究分野：昆虫細胞遺伝学

キーワード：染色体進化 FISH オルソログ カイコゲノム

1. 研究開始当初の背景

(1) ゲノム解析手法の発展に伴い、昆虫の目(Order)レベルでドラフトゲノム公開が増えつつある。一方、属や科レベルでのゲノム比較解析は、限られると予測される。つまり、多数は目レベルで数種の比較に留まるだろう。よって、こうしたゲノム情報を同一目に属する多くの種において、効率的に活用するための研究基盤の確立が求められる。科を超えて染色体上の遺伝子配置が保存されるシンテニーが認められる鱗翅目昆虫は、こうした活用に適する。難防除害虫種における FISH(Fluorescence *in situ* hybridization)マッピングによりシンテニーの保存性が示されることで、モデル新翅目昆虫「カイコ」ゲノム情報の利用した害虫防除の開発が促進されると考えられる。

(2) しかしながら、第二の種数を誇る鱗翅目昆虫におけるシンテニーの保存性は上科レベルで、すべてに共通しているのか明らかではない。

(3) 昆虫における雌ヘテロ型性染色体システムを唯一共有する姉妹系統群の毛翅目昆虫においては、ゲノム情報も遺伝子マッピング情報も公開されていない。

2. 研究の目的

上記の背景のもと、(1)に関して難防除害虫の染色体マッピングを通じた比較ゲノム情報取得を目的とした。(2)について進化的にシンテニー保存性の可否を明らかにするため、祖先的鱗翅目昆虫における遺伝子マッピングを行うことを目的とした。また、染色体数が種ごとに大きく異なるシロチョウに関してモデル鱗翅目のゲノム情報との比較を行う事を目的とした。(3)について、最も近縁な別目である毛翅目昆虫における染色体の同定を行い、カイコオルソログをプローブとした網羅的な比較ゲノムマッピングを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 難防除害虫種のひとつであるコナガを対象に EST ライブラリーを作製し、カイコ単一遺伝子/EST オルソログを特定する。これらの情報に基づき作製した STS プライマーを用いて Clemson University Genomics Institute (Clemson, SC, USA)より購入した BAC ライブラリーより対象遺伝子等を含むクローンを選抜して、FISH プローブとした。BAC-FISH により染色体の対応関係と遺伝子配置をカイコゲノム情報と比較した。

(2) 祖先的な鱗翅目昆虫として、コウモリガを選択し、BAC ライブラリーを新たに作製した。EST ライブラリーより得られた情報に基づき(1)と同様にカイコオルソログを含む BAC を選抜、FISH により比較マッピングを行った。また、オオモンシロチョウは以前の科研(18380037)において作製した既存 BAC ライブラリーを用いて同様の比較を行った。オルソログ配列は前記科研で DOP-PCR 法により取得した情報に加え、NGS による配列情報を加えて行った。

(3) 毛翅目昆虫に関してはヒゲナガカワトビケラを対象とした。染色体情報が乏しいことから、標本作製適期および染色体数や性染色体構成など基本となるデータを取得した。EST ライブラリーよりカイコオルソログ情報を取得し、新規作成した BAC ライブラリーより、対象オルソログを含むクローンを STS プライマーにより選抜した。これらクローンをプローブとした FISH により、鱗翅目昆虫との染色体対応関係とシンテニー比較を行った。

4. 研究成果

(1) コナガにおける比較ゲノム解析

コナガのカイコ単一遺伝子オルソログ保有 BAC を 108 クローン特定した。76 の BAC プローブによる FISH マッピングにより単一シグナルが得られ、カイコとの染色体対応関係が明らかとなった。3 オルソログに染色体

リアレンジの可能性が認められた。分子連鎖解析によるコナガの遺伝子マッピング情報やドラフトゲノム情報が論文発表されたが、本研究と比較したところマッピングやアセンブリーの間違いと考えられるものがある。

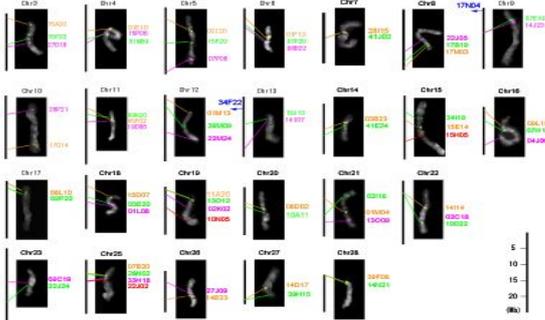


図1 コナガのBAC-FISHマッピング

(2) 上科レベルでの染色体対応関係の解析 シロチョウにおける比較ゲノム解析

オオモンシロチョウの FISH マッピングでは卵母細胞および精母細胞減数第一分裂前期のパキテン期に認められる 14 対の常染色体上に合計 42 カイコ単一遺伝子のオルソログを含む BAC のマッピングに成功した。14 常染色体のうち 12 染色体上に複数オルソログを 41 マップした結果、マイクロシンテニーが認められたのは 2 組(計 4 オルソログ)で、リアレンジメントが起こったにも関わらず同一染色体上に対応関係を残すオルソログが 1 組(2 個)認められた。少なくとも 35/41 の非相同染色体間のリアレンジメントがあったと推定される。オオモンシロチョウでは、他の鱗翅目昆虫で認められるシンテニーの崩壊が強く示唆された。さらに、DOP-PCR での非効率的なオルソログ特定の効率化を

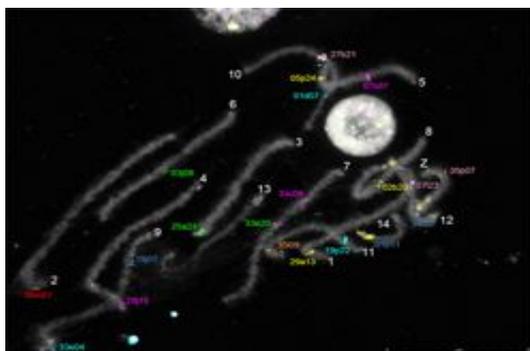


図2 オオモンシロチョウカリオタイプ

目指し、カリオタイプベースの BAC-FISH 物理地図(図2)に基づく NGS 解析を実施したところ 24 個の BAC からカイコオルソログが追加特定された。

同属別種の近縁種であるモンシロチョウとの対応関係を明らかにするため、オオモンシロチョウ (n=15) BAC によるモンシロチョウ (n=25) への FISH を行い、それぞれの染色体数 10 の違いは両者における融合/切断によると結論できた(図3)。

コウモリガにおける FISH マッピング

コウモリガは、北島博氏(森林総研)の協力を得て野外採集した個体を人工飼料飼育し、新規 BAC ライブラリーならびに染色体標本作製に供与した。作製した新規 BAC ライブラリーは 214 クローンの平均で 66.6Kb のインサート長を持つ、29,184 クローンをストックした。BAC エンドシークエンスによる解析から CG 含量は 35.9%と推定され、カイコゲノム(37.7%)と類似する値であった。

EST 解析から 301 のカイコ単一オルソログと推

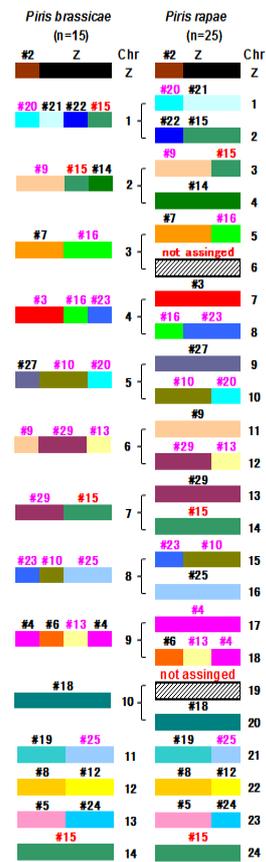


図3 モンシロチョウとオオモンシロチョウの染色体対応関係図

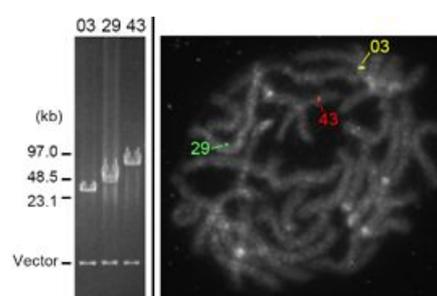


図4 コウモリガ BACFISH

wild silkmoths, *Samia cynthia* ssp. Chromosome Research 21, 149-164 (2013), 査読有, DOI: 10.1007/s10577-013-9344-1

Nguyen P, Sykorova M, Sichova J, Kuta V, Dalikova M, Capkova-Frydrychva R, Neven LG, **Sahara K**, Marec F: Neo-sex chromosomes and adaptive potential in tortricid pests. PNAS 110, 6931-6936 (2013), 査読有, doi:10.1073/pnas.1220372110

Suzuki G, Nishiuchi C, Tsuru A, Kako E, Li J, Yamamoto M, Mukai Y: Cellular localization of mitotic RAD21 with repetitive amino acid motifs in *Allium cepa* Gene 514, 75-81 (2013), 査読有, doi:10.1016/j.gene.2012.11.012

Kamimura M, Taetishi K, Tanaka-Okuyama M, Okabe T, Shibata F, **Sahara K**, **Yasukochi Y**: EST sequencing and fosmid library construction in a non-model moth, *Mamestra brassicae*, for comparative mapping. Genome 55, 775-781 (2012), 査読有, DOI: 10.1139/g2012-063

Yoshido A, **Sahara K**, Marec F, Matsuda Y: Step-by-step evolution of neo-sex chromosomes in geographical populations of wild silkmoths, *Samia cynthia* ssp. Heredity 106, 614-624 (2011), 査読有, doi:10.1038/hdy.2010.94

Yasukochi Y, Tanaka-Okuyama M, Kamimura M, Nakano R, Naito Y, Ishikawa Y, **Sahara K**: Isolation of BAC clones containing conserved genes from libraries of three distantly related moths: A useful resource for comparative genomics of Lepidoptera. Journal of Biomedicine and Biotechnology Article ID 165894 (2011), 査読有, <http://dx.doi.org/10.1155/2011/165894>

Yoshido A, **Yasukochi Y**, **Sahara K**: *Samia cynthia* versus *Bombyx mori*: Comparative gene mapping between a species with a low-number karyotype and the model. Insect Biochemistry and Molecular Biology 41, 370-377 (2011), 査読有, doi:10.1016/j.ibmb.2011.02.005

Yasukochi Y, Miura N, Nakano R, **Sahara K**, Ishikawa Y: Sex-linked pheromone receptor genes of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, are in tandem arrays. PLoS ONE 6(4), e18843 (2011), 査読有, DOI: 10.1371/journal.pone.0018843

Sahara K, Yoshido A, Traut: Sex chromosome evolution in moths and butterflies. Chromosome Research 20, 83-94 (2011), 査

読有, DOI: 10.1007/s10577-011-9262-z

Suzuki G, Ogaki Y, Hokimoto N, Xiao L, Kikuchi-Taura A, Harada C, Okayama R, Tsuru A, Onishi M, Saito N, D, GS, Lee SH, Ito T, Kanno A, Yamamoto M, Mukai Y: Random BAC FISH of monocot plants reveals differential distribution of repetitive DNA elements in small and large chromosome species. Plant Cell Reports 31, 621-628 (2011), 査読有, DOI: 10.1007/s00299-011-1178-8

[学会発表](計 10 件)

佐原 健・鈴木一生・安河内祐二・伴野 豊: 染色体異系統を用いてカイコ突然変異の原因遺伝子にせまる. 第 59 回応用動物昆虫学会. (20150326 ~ 20150328). 山形大学 (山形県)

藤本章晃・吉戸敦生・鈴木 剛・安河内祐二・**佐原 健**: 毛翅目昆虫ヒゲナガカワトビケラの BAC-FISH マッピング. 第 59 回応用動物昆虫学会. (20150326 ~ 2015 0328). 山形大学 (山形県)

大野瑞紀・柴田 洋・石川幸男・中野 亮・安河内祐二・**佐原 健**: ヨーロッパアワノメイガとカイコとの染色体比較から見えてくるもの. 第 59 回応用動物昆虫学会. (20150326 ~ 20150328). 山形大学 (山形県)

大野瑞紀・河合 綾・藤川-小島典子・柴田洋・**安河内祐二**・**佐原 健**: FISH による $n=28$ と $n=31$ の鱗翅目昆虫染色体対応関係の解析. 染色体学会第 65 回年会. (20141024 ~ 20141025). 倉敷市芸文館(岡山県)

松葉 篤・藤井美樹・**鈴木 剛**・山本真紀・向井康比己: ラン科植物 *Rhynchostylis* 属と *Neofinetia* 属の細胞遺伝学的解析のための BAC ライブラリー構築. 染色体学会第 65 回年会. (20141024 ~ 20141025). 倉敷市芸文館 (岡山県)

佐原 健・鈴木 宙・石井啓祐・山田恭裕・**安河内祐二**: $2n=55$ のカイコ個体. 日本蚕糸学会第 84 回大会. (20140310 ~ 20140311). 日本大学生物資源科学部 (神奈川県)

Suzuki G, Takada Y, Watanabe M: Incest avoidance applicable in hybrid seed production. International Symposium on Diversifying Biological Resources. -Toward Food Security and Sustainable Society- (招待講演). (20131123 ~ 20131124). University of Tsukuba (茨城県)

安河内祐二: アワノメイガとウスジロキノメイガの性フェロモン受容体遺伝子クラスターの構造解析. 日本蚕糸学会第 83 回大会. (20130318-20130319). 農林水産技術会議事務局筑波事務所 (茨城県)

吉戸敦生・**佐原 健**: シンジュ蚕 W 染色体はランダムに配分されることがある. 日本蚕糸学会第 83 回大会. (20130318-20130319). 農林水産技術会議事務局筑波事務所 (茨城県)

吉戸敦生・**安河内祐二**・**佐原 健**: シンジュサンにおける染色体の同定と性染色体進化の解明. 日本染色体学会 (2011.11.11). 神奈川大学平塚キャンパス (神奈川県)

[図書](計 2 件)

Yoshido A, **Sahara K**, Yasukochi Y: CRC press. Chapter 6: Silkmoths (Lepidoptera). In. Protocols for cytogenetic mapping of arthropod genomes. p219-256. 526pp (2014)

齋藤裕・**佐原 健**(共編): "海游舎" 系の博物誌. ムシたちが糸で織りなす多様な世界. 195pp (2012)

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

鈴木 剛 (SUZUKI, Go)
大阪教育大学・教育学部・教授
研究者番号: 10314444

(3) 連携研究者

安河内 祐二 (YASUKOCHI, Yuji)
独立行政法人農業生物資源研究所・その他
部局等・研究員
研究者番号: 50355723