

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：11201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658046

研究課題名(和文)カイコをモデルとした分散動原体型染色体における突然変異部位配列の特定

研究課題名(英文) Mapping of mutation point on holokinetic chromosome in Bombyx mori

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) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：NBRPを通じて分譲を受けたカイコ染色体突然変異3系統(r501、r52ならびにr53)を用いて、それぞれの転座染色体の構成と転座部位の特定に挑戦した。カイコBAC-FISHを用いて、それぞれの系統の染色体異常の詳細を明らかとした。r501系統では、染色体の付着方向を明確に示すとともに、r52とr53系統では染色体相互転座が染色体突然変異の原因であることを証明した。これらの転座部位を解明するために行ったBAC-FISHにより、一部転座部位をブリッジするクローンと特定した。現在転座点を示すために、カイコゲノムデータベースを参照したPCR法を開発している。

研究成果の概要(英文)：I have analyzed chromosome mutation in 3 Bombyx mori strains (r501, r52 and r53) provided through national bioresource project (NBRP). BAC-FISH (fluorescence in situ hybridization using bacterial artificial chromosomes) revealed the exact direction of the fusion between chromosomes 23 and 25. I defined reciprocal translocation is the cause for the mutation in r52 and r53 strains. The double strand breakage and further fusion for each mutation chromosomes were also analyzed by the BAC-FISH. These detected a bridge BAC responsible for a mutation chromosome. I am trying to reveal the mutation point by PCR as a reference of Bombyx mori genome databases.

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 染色体突然変異 相互転座 付着 カイコゲノム

1. 研究開始当初の背景

染色体の構造は、動原体が集中する単動原体型と分散する多動原体型に大別される。DNA 二重鎖切断 (染色体切断) は細胞の生命維持の危機であり、様々な修復機構により切断解消へと修復が試みられる。しかしながら、修復がなされなかった場合、分断染色体の辿る運命は両者で大きく異なる。前者におけるセントロメアを含まない分断染色体断片は、他染色体へ転座しない限り分裂サイクルのなかで排除される。断片染色体の救済は分断直後に起こる転座によってのみ行われる。一方、分散動原体型染色体の分断では、断片染色体は、世代を経ても断片染色体がゲノム内に維持されることが知られている (Fujiwara et al 2000 Zool Sci 17:743-750)。こうした断片染色体はテロメアを持たない部位が DNA 複製の際にラギング鎖先端部より徐々に消失していくと考えられることから、より安定的に保持されるためには転座が選択されると考えられる。このように分散動原体型染色体の転座には、単動原体染色体とは異なる作用機作が働くことが推測される。しかしながら、その分子メカニズムについては全く手つかずの状況であった。

2. 研究の目的

カイコは分散動原体型染色体を持つモデル鱗翅目昆虫であり、自然ならびに人為的に誘起された突然変異系統が多数維持されている。こうした突然変異の中で、形質遺伝学的手法により染色体転座が予測される 3 系統が保存されている。本研究では、これら 3 系統を用いて、カイコ BAC (bacterial artificial chromosome) -FISH (fluorescence in situ hybridization) により転座部位の位置関係を知り、カイコゲノム情報に基づき転座部位を特定する手法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

染色体突然変異が予測される r501, r52 ならびに r53 のカイコ系統は文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) の支援を受けて維持される系統である。これらの系統を九州大学大学院農学研究院遺伝子資源開発研究センターより NBRP を通じて分譲を受け使用した。これらの系統は表現型質の遺伝性により染色体変異の有無とその責任染色体が形質より判断できるようにデザインされている (図 1)。

r501 系統の染色体異常は第 23 と第 25 染色体の相互転座が原因である (Banno et al *Hereditas* 118, 259-263 1993)。第 23 と第 25 染色体の構成を表現形質から識別するため樽蚕 (*tub*) 形質と豊油 (*oy*) を用いた、 $T(23;25) Nd +/+ tub; oy/+ ♀ \times + tub/+ tub; oy/oy ♂$ の交配から、樽蚕 (*tub*) 形質と豊油 (*oy*) 形質の二重劣性を併せ持つ個体 (図 1a) と非樽蚕と非豊油個体である正常形質個体 (図 1b) の 2 種類の幼虫が 1:1 の比率で分離

する。前者の染色体構成は正常、後者が付着染色体を保有する染色体変異個体として区別できる。

r52 系統の異常染色体は、第 6 染色体と第 7 染色体が原因である (Sakaida et al *Hereditas* 125, 25-29 1996)。それぞれの染色体に座乗する二星紋 (EP^s) とかすり (q) 形質を用いた交配様式 $T(6;7) EP^s/+; q/+ ♀ \times +/+; q/q ♂$ より分離するかすり幼虫 (図 1c) は染色体構成に関して正常、第 7 体節に過剰な星状紋を認める二星紋幼虫 (図 1d 矢印) は染色体変異個体となる。この系統についても 2 種類の幼虫が 1:1 比で分離する。

r53 系統の異常染色体は、第 6 染色体と第 20 染色体が関与する (中村ら 九州蚕糸 25, 50 1994) ことから、 Np 重い形 (ENp) と霜降油 (*oh*) をマーカーとした交配様式 $T(6;20) ENp/+; oh/+ ♀ \times +/+; oh/oh ♂$ から分離する霜降油幼虫 (図 1e) は染色体構成に関して正常、半月紋 (図 1f 矢じり)、星状紋 (図 1f 矢印) が各 2 体節に現れる形質を持つ幼虫が染色体変異個体となり、それぞれ 1:1 の比で出現する。

なおこれら 3 系統の異常染色体ホモ個体は致死である。

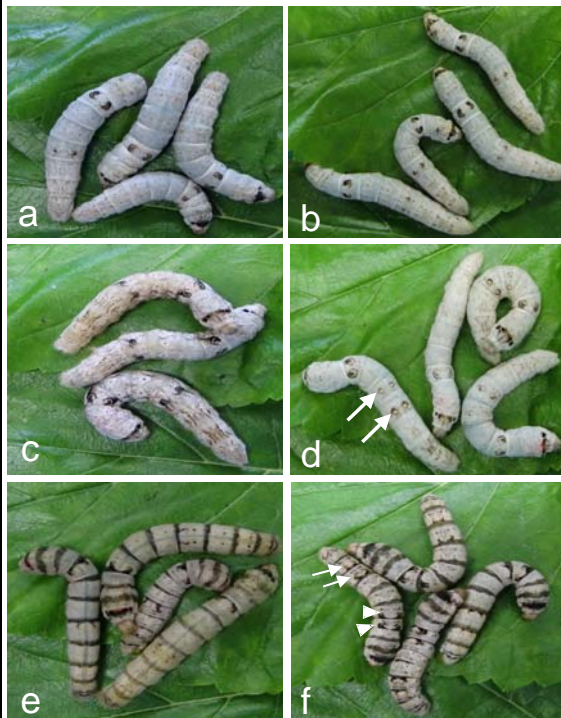


図 1. カイコ突然変異系統の形質とその推定染色体構成. (a) r501 系統の樽蚕/豊油蚕幼虫 (染色体正常個体), (b) r501 系統の非樽蚕/非豊油蚕幼虫 (染色体変異個体), (c) r52 系統のかすり幼虫 (染色体正常個体), (d) r52 系統の二星紋幼虫 (染色体変異個体), (e) r53 系統の霜降油幼虫 (染色体正常個体), (f) r53 系統の Np 重い形幼虫 (染色体変異個体). 矢印: 星状紋; 矢じり: 半月紋

これら 3 系統を常温にて桑葉育して、終齢幼虫の生殖細胞の減数分裂染色体ならびに翅芽細胞の体細胞分裂染色体標本を作製し

た。それぞれの染色体突然変異体に該当する染色体の座乗する BAC を選抜して、蛍光ラベルを施した。これら BAC プローブを FISH した染色体標本は蛍光顕微鏡 DM6000B (Leica) により特異蛍光を検出し、得られたデジタルデータを Adobe Photoshop によりプロセスして画像解析を行った。

4. 研究成果

カイコにおける染色体突然変異の研究は形質遺伝学を中心に発展していたが、染色体の個別認識が長年不可能であったため、染色体レベルでは、染色体数の相違の比較に留まっていた。また異常の認められる染色体の連関地図との対応づけも行われていなかった。r501 系統では、樽蚕・豊油幼虫 (正常染色体) では $2n=56$ 、非樽蚕・非豊油幼虫では $2n=55$ であることが報告 (Banno et al 1993) され、減数分裂において 3 価染色体対が認められることが明らかになっていた。本研究では、原因染色体上の BAC をプローブとして正常染色体幼虫では、減数分裂パキテン核において第 23 と第 25 染色体対が存在すること (図 2a) を示し、染色体異常系統では大型染色体対が第 23 と第 25 染色体の付着により形成された 3 価染色体対であることを明らかにした。これにより、染色体の付着方向がカイコゲノム情報と対応付けできた。現在、これらの BAC に含まれる予測される配列をもとに作製したプライマーによる PCR 断片の有無を確認中である。

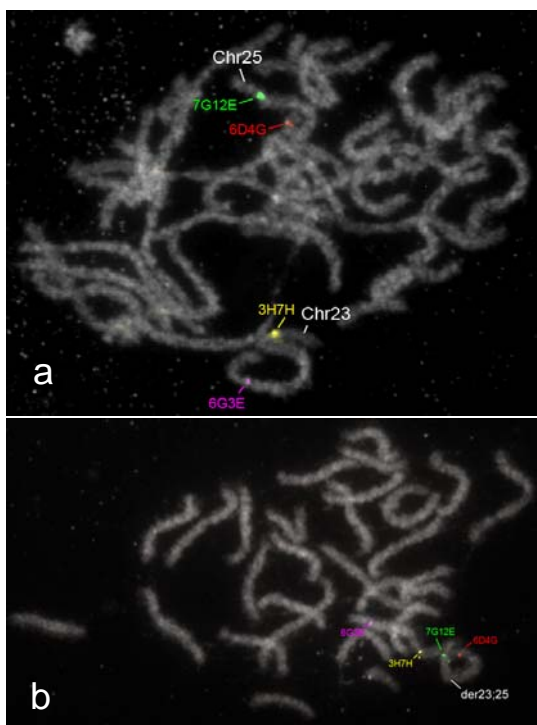


図 2. r501 系統減数分裂パキテン核における第 23 ならびに第 25 染色体の特定. 正常系統ではそれぞれの 2 価染色体対 (a) が、染色体突然変異系統は付着染色体により 3 価染色体対 (b) が形成される。

r52 系統については減数分裂時における染

色体数の異常分離数から相互転座が仮定されていた (Sakaida et al *Hereditas* 125, 25-29 1996)。そこで、正常個体と染色体突然変異個体の減数分裂パキテン期核に対して FISH を行った。その結果、後者にのみ対十字型の 4 価染色体対が認められた (図 3a, b)。体細胞分裂中期に対する BAC-FISH から、カイコゲノムデータベースで第 6 染色体の 0Mbp 部位側を含む染色体断片と第 7 染色体 16Mbp 側を含む断片が転座を起こしていることが明らかとなった。また、第 6 染色体の 18Mbp 部位側を含む染色体断片と第 7 染色体 0Mbp 側断片も転座していたことより相互転座である確証が得られた。

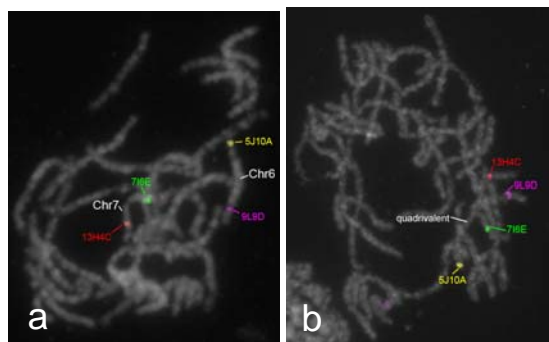


図 3. r52 系統減数分裂パキテン核における第 6 ならびに第 7 染色体の特定. 正常系統ではそれぞれの 2 価染色体対 (a) が、染色体突然変異系統は相互転座染色体により 4 価染色体対 (b) が形成される。

カイコゲノムデータベースの Kaikobase (<http://sgp.dna.affrc.go.jp/KAIKObase/>) と BAC マッピングデータ (Yasukochi et al *Genetics* 173, 1319-1328 2006) および HOX コンテイング情報 (Yasukochi et al *Dev. Genes Evol.* 214, 606-614 2004) をもとに相互転座部位をブリッジするクローンを特

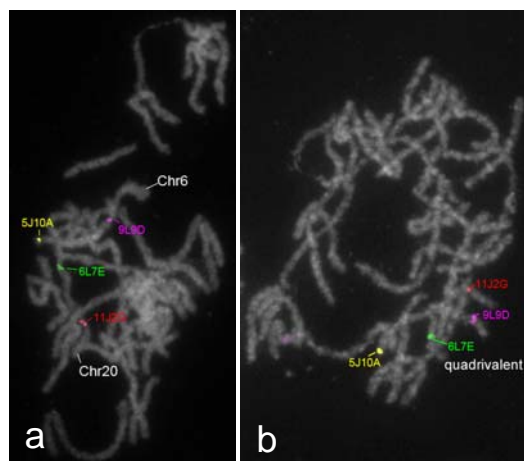


図 4. r53 系統減数分裂パキテン核における第 6 ならびに第 20 染色体の特定. 正常系統ではそれぞれの 2 価染色体対 (a) が、染色体突然変異系統は相互転座染色体により 4 価染色体対 (b) が形成される。

定した。第 6 染色体転座部位は現在、180Kbp

まで絞り込まれ、PCR産物の有無による転座点の特定へと進捗している。一方、第7染色体をブリッジするBACクローンは決定されていないが、約800Kbpまで絞り込んでいる。

r53系統については、染色体に関する情報は中村ら九州蚕糸25, 50(1994)に限定されていたものの、パキテン期核へのBAC-FISHで、染色体異常個体にのみr52と同様の4価染色体対が認められた(図4a, b)。体細胞分裂へのFISHにて相互転座であることが証明された。第6の0Mbp部分を含む染色体断片と第20の0Mbp部分を含む染色体断片ならびに第6の18Mbp部分を含む染色体断片と第20の14Mbp部分を含む染色体断片の相互転座が原因と判明した。

本系統についてもr52系統と同様な解析を進め、現在までに第6染色体では600Kbp、第20染色体では1.3Mbpに転座部位の絞り込みを行った。

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 鈴木一生・安河内祐二・伴野豊・佐原健 (2013): BAC-FISHを用いたカイコ染色体突然変異系統の解析. 東北蚕糸・昆虫利用研究 **38**, 4-7. 査読無

[学会発表] (計3件)

- ① 鈴木一生・安河内祐二・伴野豊・佐原健 (2014): カイコ染色体突然変異系統の細胞遺伝学的解析. 日本蚕糸学会第84回大会. 日本大学生物資源科学部(藤沢市) 2014.3.10-11
- ② 鈴木一生・伴野豊・佐原健 (2013): BAC-FISHによるカイコ染色体突然変異系統の解析. 日本昆虫学会東北支部第60回大会. 蔵王温泉ホテル樹林(山形市) 2013.7.27
- ③ 佐原健・吉戸敦生・安河内祐二 (2012): 鱗翅目昆虫における染色体同定. 日本昆虫学会東北支部第59回大会. 八幡平ハイッ (八幡平市) 2012.8.4

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