

令和元年6月16日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05050

研究課題名(和文)染色体異常を伴う突然変異形質の原因遺伝子解明

研究課題名(英文) Identification of genes responsible for mutants caused by chromosome aberration

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) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：特定の配列を染色体に視覚化するFISH法によりカイコ染色体突然変異に関する研究を行った。オオシモフリエダシヤクの工業暗化に関わる遺伝子との対応が疑われるu41系統に逆位を発見した。逆位部位を2つのBAC配列に絞り込んだ。染色体相互転座系統r52の相互転座領域に214 bpの欠失を発見した他、逆位と重複の可能性が強く示唆された。ヨーロッパアワノメイガに関して利用フェロモンが異なる2系統(Z系統とE系統)では、染色体逆位が染色体乗り換えの抑制要因とは言えないと結論した。

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、我々ヒトに比べて放射線に対して格段に強い。その要因の詳細を知ることには重要性がある。ところが、チョウ目昆虫の染色体に起こった変異について分子レベルでの研究は乏しい。そこで我々は、見た目と染色体に突然変異を起こしたカイコ系統の染色体部位特定を行い、変異部分の配列特定を試みた。その結果、工業暗化の原因と目される遺伝子をカイコで研究する方向性を得るとともに2つの染色体が相互に入れ替わった部位に関する知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：By means of gene/sequence visualizing FISH technique, we addressed to identify the genes/sequences that is responsible for mutant phenotypes and/or aberrant chromosomes in the silkworm. The black moth mutant (strain u41) has been considered to corresponding to the phenotype of industrial melanism (carbonaria) in peppered moth. We found the corresponding chromosome carries inversion and mapped the region into bridged BAC clones. A homeotic mutant silkworm, r52, has reciprocal translocation. We detected 214 bp deletion and other inversions and duplication in the target chromosome sites. Two races, Z and E, has been known in European corn borer which are attracted to different sex pheromones. Linkage analyses have strongly suggested suppression of crossing over within the sex chromosome. Our FISH results no large inversion occurred in the respective region of the Z chromosome.

研究分野：昆虫細胞遺伝学

キーワード：FISH カイコ 染色体変異 BAC 工業暗化 性フェロモン

1. 研究開始当初の背景

突然変異形質の原因遺伝子は、一般的にはマップベースクローニングにより同定される。つまり、変異体と正常体の交配による組み換え個体の配列をゲノム情報に照会し、責任領域を絞り込む。責任領域に含まれる遺伝子について変異体と正常体での相違を特定して候補遺伝子と同定する。候補遺伝子の導入やノックアウト個体を作製し、形質が復元するか確認を行う(例えば Ito et al 2008 PNAS)ことで、原因遺伝子を解明する。しかしながら、別々の染色体の複数箇所に2本鎖切断が起こり、お互いに乗り換わった「相互転座」に伴う突然変異個体では、組み換え個体の割合は極端に低くなる。また、同一の染色内の2カ所で2本鎖切断が起こり、元とは逆の向きに融合が起こった「逆位」に伴う突然変異個体では、逆位領域の組み換え個体が得られない。従って、組み換え個体を利用した絞り込み精度は、極端に下がる。故に、染色体異常を伴う突然変異形質の原因遺伝子をマップベースクローニングによって解明することは、ほとんど不可能である。

同一種内でおこる染色体リアレンジメントは、近傍での交叉を抑制するので、特定の遺伝子型の組み合わせが固定されやすくなり、古くから種分化や適応の大きなドライビングフォースと考えられている(Sturtevant 1917 PNAS)。一方、適応的でない突然変異は個体群から消失する。幸いにもカイコでは、こうした変異が人の手によって選抜・保存されている。しかも、目に見える突然変異形質がより選抜されやすいため、クラシカルな交配実験により、変異の起こった染色体が区別できる系統まで樹立されている。BAC-FISH (バクテリア人工染色体を用いた Fluorescence *in situ* hybridization) 技術を用いると、染色体組み換えに依存することなく、特定の配列の位置関係を視覚的に直接顕微鏡下で観察できる。

しかも、突然変異個体自身の染色体上の FISH シグナルをもとに原因遺伝子の責任領域を絞り込むことができる。故に、マップベースクローニングが不可能な、染色体異常を伴う突然変異形質の原因遺伝子を解明できると考えられる。つまり、正常染色体では1カ所に2つのドットシグナルが認められる BAC が相互転座部分を含んでいれば(ブリッジ BAC)、転座染色体では異なる2染色体にシグナルが認められるはずである(図1左)。この方法により、原因部分は、単一 BAC がカバーする領域に絞り込める。逆位におけるブリッジ BAC シグナルは、染色体逆位において同一染色体に2カ所に検出されると想定される(図1右)。これにより、組み換え価非依存的に原因遺伝子領域を絞り込めると想定された。

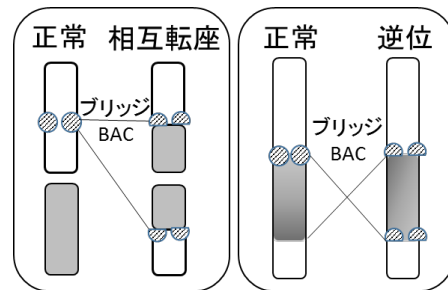


図1 染色体異常の原因部分を絞り込む BAC-FISH のイメージ。(左)転座部位をブリッジする BAC シグナルは、正常染色体では一カ所、2つの転座染色体でそれぞれ1カ所ずつ認められる。(右)逆位部分をブリッジする BAC シグナルは正常染色体では一カ所、逆位染色体では、同一染色体の2カ所に認められる。

2. 研究の目的

九州大学が保存するカイコ染色体相互転座系統の形質突然変異(r52 の二星紋: E^{DS})は、第6染色体に座乗する。申請者等は、これまでの研究で、相互転座が確実であることと、第6染色体の *HOX* 遺伝子群領域を含むことを明らかにした。本研究では、ブリッジ BAC を同定し(図1左)、原因となる領域のカイコ p50T ゲノム配列(Scaffold Build2)中のギャップを埋めて、転座箇所を絞り込む。

カイコ第17染色体に位置する黒蛾(Black moth: *Bm*)突然変異座はオオシモフリエダシヤクにおける工業暗化の原因遺伝子座として名づけられた *carbonaria* 変異の原因遺伝子と相同であると推測される。この突然変異の責任領域を FISH により絞り込み(図1右)、原因遺伝子を特定する。

害虫種のヨーロッパアワノメイガについては、Z系統由来 BAC を用いた FISH を行い、染色体上の逆位の決定的証拠を示す。併せて、逆位の範囲を特定するとともに、どちらの系統で逆位が生じたのかを明らかにする。これらの研究によりカイコで開発される技術が、原因遺伝子の特定と染色体変異に起因する種分化や適応研究へと発展できる。トウモロコシの大害虫として知られるヨーロッパアワノメイガは、種内に2種類の性フェロモンを利用する2系統が知られている。Z系統とE系統と呼ばれ、それぞれの雌は酢酸塩化合物のシス異性体(Z11-14:OAc)とトランス異性体(E11-14:OAc)の比率が97:3と1:99の配合の性フ

フェロモンを利用することで、同系統雄との交配を確実にしている(Lassance et al 2010 Nature)。種分化するためには、遺伝子浮動が絶たれることと、雌のフェロモン変更と雄の受容遺伝子突然変異が同時におこる必要がある。しかし、これらのメカニズムについては未解明である。嗅覚受容体遺伝子群を含む部位がZとE系統で逆位を生じており、組み換えが阻止されることで遺伝子浮動が絶たれる可能性を強く示唆する論文が発表された(Wadsworth & Dopman 2015 Heredity)。この推定が事実ならば、チョウ目昆虫では初の染色体逆位を伴う種分化関連遺伝子変異となる。本研究では、推測にとどまる逆位を染色体上の FISH シグナルにより直接証明し、近縁種のゲノム配列や FISH 比較を行う事で、逆位を起こした系統の進化由来を明らかにする。

3. 研究の方法

カイコ黒蛾系統を使用した逆位に伴う *Black moth* 遺伝子を含むと考えられる逆位の範囲を特定するために、BAC-FISH を行い、逆位範囲を特定する(図1参照)。また、この間のBAC コンテグを作製し、ブリッジバックを特定する。また、オオシモフリエダシャク工業暗化の原因と推定される *cortex* のカイコオルソログを特定し、翅原基伸長期と色素着色期の mRNA 発言を調査する。

r52 系統は、九州大学に系統保存されている。幼虫の形質マーカにより、正常染色体ホモと正常と異常染色体がヘテロの個体が識別できる。異常染色体ホモの個体は胚致死となるため、ヘテロ継代されている。先行研究から双方の突然変異は、*HOX* 遺伝子クラスター *Abd-A* から *Abd-B* に原因領域があると予測される。この領域に作製済みのBAC コンテグ情報(Yasukochi et al 2004)をもとに、BAC-FISH により可視化することで2つの相互転座染色体をブリッジするBAC(図1参照)を特定できる。これまでに絞り込んだ領域のBACに対応するカイコゲノム配列には、いずれもギャップが存在するため、シークエンスによりギャップを塞ぐ。ホモ致死となる突然変異胚子は孵化する2日程度前まで発育するので、ホモ個体の胚子の対象領域をゲノムPCRスクリーニングして、正常では増幅されない断片を検出することにより転座配列を特定する。使用する系統はナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)(カイコ)を通じて購入し、飼育して用いる。

ヨーロッパアワノメイガE系統の逆位は、現在までにマッピングしているZ系統のBAC code が32P24と44E03(Yasukochi et al 2011)の外側に存在すると考えられる。この部位の外側を中心に逆位の両端をブリッジするBACをFISHにより特定する(図1参照)。

4. 研究成果

カイコの黒蛾系統No937と黒蛾に類似する形質をもつu48系統で行った細胞遺伝学的な検討の結果、前者ではNo908とu41同様の部位に逆位が認められた。一方、u48系統は逆位が認められなかった(図2)。このことから、従来の推定通り、u48は黒蛾遺伝子とは異なる遺伝子座がこの突然変異の原因であると確定した。

u41系統を中心とした逆位の配列の絞り込み、逆位をブリッジするBACを特定した。逆位は、第17染色体の末端までは及んでいなかった。末端側の逆位点は、5H6Dでブリッジされ40Kbまで絞り込めた(図3)。内部側は、9D4Gでブリッジされ(図3)、53Kbまで絞り込み、さらに逆位点に4Kb程度と迫った可能性がある。

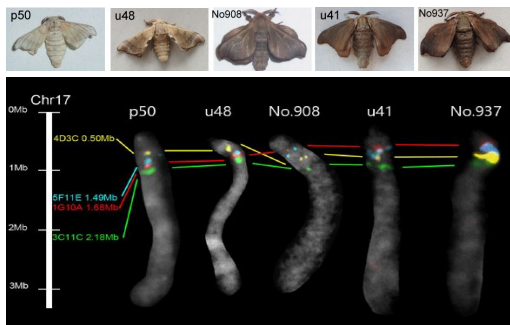


図2 カイコChr17へのBAC-FISHマッピング。黒蛾系統No908、u41ならびにNo937のマッピング順序は、正常系統p50と異なり、逆位が存在する。一方、u48は、正常と同じマッピング順であった。

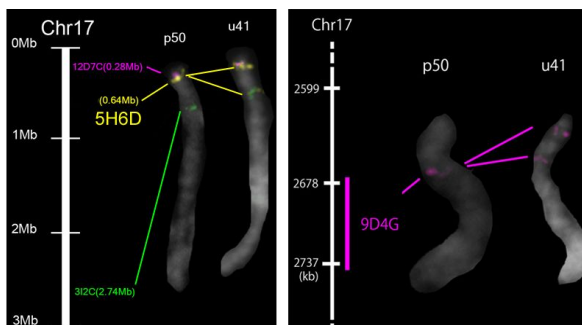


図3 u41黒蛾系統の逆位点の検出。Chr17の末端側0.64Mb付近を含む5D6Hならびに約2.7Mb付近を含む9D4Gはu41で2ヶ所にシグナルが認められ、逆移転を含む(図1参照)。

オオシモフリエダシヤクで工業暗化の原因と推定された *cortex* のカイコオルソログの mRNA 発現を u41 (黒蛾) p50 (正常) ならびに F₁ (黒蛾) で比較したところ、翅原基形成期には、正常系統で発現量が増加した。この結果は、オオシモフリエダシヤクにおける発表データの逆のパターンである。黒色化が開始される眼点着色初期には、u41 個体での mRNA 発現が高い傾向が認められたものの、F₁ 個体では正常よりも低くなった。明らかな着色が認められる着色開始後 2.5 日以降、羽化前日の 4 日までは u41 と F₁ の mRNA 発現が p50 よりも高く推移したが、*cortex* が着色を誘導する要因であると結論することは困難であった。

相互転座をもつカイコ系統 r52 において、ブリッジシグナルが認められる BAC クローン を特定し、このクローンと contig を形成する BAC の配列決定を行った。その結果、Kaikobase では未知となっていた第 6 染色体の配列が特定でき、この部位を含めて、原因となっている配列候補が絞り込まれた。

相互転座に関して、FISH 解析から特定できた第 6 染色体相互転座部位をブリッジする BAC クローン配列情報をもとに r52 系統の相互転座染色体ホモ個体 (胚致死) と正常染色体を少なくとも 1 組もつ個体との比較 PCR スクリーニングを行い原因配列部位の絞り込みを行った。ターゲット領域に 214bp の欠失が発見

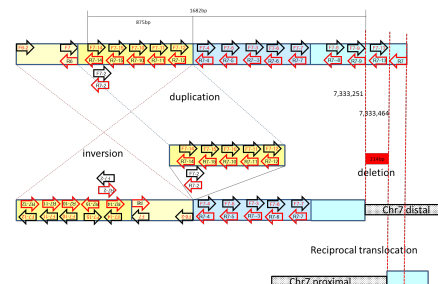
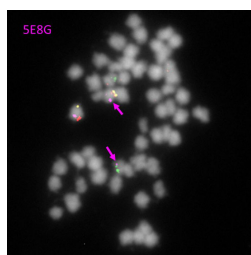


図 4 r52 系統のブリッジ BAC シグナルならびに相互転座部位の PCR 解析結果。Chr6 と 7 の転座部位付近に 214bp の欠失がある。また、重複ならびに逆位も認められた。

されたほか、逆位と重複の可能性が強く示唆された (図 4)。相互転座部位は、欠失領域付近であると考えられるものの、これら領域に構造遺伝子は存在しなかった。そこで、長鎖配列の決定が可能な PacBio などの次世代シーケンサーによる長鎖の配列決定を行った。配列は良好に得られており、今後 *in silico* 解析を行うことで、これまでのデータと併せて結論を得たい。

ヨーロッパアワノメイガに関して Z 染色体上のカイコ遺伝子オルソログを持つ BAC をプローブとして FISH マッピングを行い、カイコゲノム情報との対応関係を明確にした。また、ヨーロッパで利用するフェロモンの相違がはっきりとしている 2 つの系統 (Z 系統と E 系統) についてこれらを比較したところ、逆位が認められなかった (図 5)。これらのことから、本種の雌フェロモン比率の変化に応じた雄の受容変化は、染色体レベルでの変異ではないと結論した。



図 5 ヨーロッパアワノメイガの Z 系統と E 系統雌雄の Z 染色体における BAC-FISH マッピング。組換え価が 0 となる領域には逆位は認められない。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

1. Okumura A, Kobayashi M, Kitajima H, Yasukochi Y, Suzuki G, **Sahara K** (2019) Construction of a BAC library of *Endoclyta excrescens* as a tool for comparative gene mapping in Lepidoptera. *Entomological Science* 22: 167-172. doi: 10.1111/ens.12350 [査読有]
2. Fujimoto T, Okumura A, Yoshido A, **Yasukochi Y**, Suzuki G, **Sahara K** (2018) Construction of a BAC library and selection of BACs containing orthologs of *Bombyx mori* genes in *Stenopsyche marmorata* (Trichoptera: Stenopsychidae). *Journal of Insect Biotechnology and Sericology* 87(2): 61-69. doi: 10.11416/jibs.87.2_061 [査読有]
3. **Ito K**, Kidokoro K, Katsuma S, Sezutu H, Uchino K, Kobayashi I, Tamura T, Yamamoto K, Mita K, Shimada T, Kadono-Okuda K (2018) A single amino acid substitution in the *Bombyx*-specific mucin-like membrane protein causes resistance to *Bombyx mori* densovirus. *Scientific Reports* 8: 7430. doi: 10.1038/s41598-018-25388-7 [査読有]
4. **Ito K**, Fujii T, Yokoyama T, Kadono-Okuda K (2018) Decrease in the expression level of the gene encoding the putative *Bombyx mori* bidensovirus receptor during virus infection. *Archives of Virology* 163: 3327-3338. doi: 10.1007/s00705-018-4017-1 [査読有]
5. **Ito K**, Fujii T, Murakami M, Yokoyama T (2018) Linkage analysis and mapping of a gene responsible for the lethal 19 mutation in the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect*

- Biotechnology and Sericology* 87: 9-16. doi: 10.11416/jibs.87.1_09 [査読有]
6. Yasukochi Y, Yang B, Fujimoto T, **Sahara K**, Matsuo T, Ishikawa Y (2018) Conservation and lineage-specific rearrangements in the GOBP/PBP gene complex of distantly related ditrysian Lepidoptera. *PLoS ONE* 13(2): e0192762. doi: 10.1371/journal.pone.0192762 [査読有]
 7. Yuri K, **Sahara K** (2017): Relative humidity and maintenance of p50 silkworms reared on artificial diet. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology* 86: 43-47. doi: 10.11416/jibs.86.2_043 [査読有]
 8. Yamada Y, Asano S, Bando H, **Sahara K** (2017): Inheritance of cocoon color mutation and heterosis in *Antheraea yamamai*. *Journal of Wild Silkworm & Silk* 20: 57-61. doi/アドレス: なし [査読有]
 9. Kageyama D, Ohno M, Sasaki T, Yoshido A, Konagaya T, Jouraku A, Kuwazaki S, Kanamori H, Katayose Y, Narita S, Miyata M, Riegler M, **Sahara K** (2017): Feminizing *Wolbachia* endosymbiont disrupts maternal sex chromosome inheritance in a butterfly species. *Evolution Letters* 1(5): 232-244. doi: 10.1002/evl3.28 [査読有]
 10. Yoshido A, Marec F, **Sahara K** (2016): The fate of W chromosomes in hybrids between wild silkmoths, *Samia cynthia* ssp.: no role in sex determination and reproduction. *Heredity* 116: 424-433. doi: 10.1038/hdy.2015.110 [査読有]
 11. **Sahara K**, Yoshido A, Yasukochi Y (2016): A history of Chromosome identification in *Bombyx mori*. *Chromosome Science* 19: 3-9. doi: 10.11352/scr.19.3 [査読有]
 12. Saito Y, Zhang YX, Mori K, **Ito K**, Sato, Chittenden AR, Lin JZ, Chae Y, Sakagami T, **Sahara K**. (2016): Variation in nesting behavior of eight species of spider mites, *Stigmaeopsis* having sociality. *The Science of Nature* 103: 87. doi: 10.1007/s00114-016-1408-6 [査読有]
 13. **Ito K**, Yoshikawa M, Fujii T, Tabunoki H, Yokoyama T (2016) Melanin pigmentation gives rise to black spots on the wings of the silkworm *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology* 91-92: 100-106. doi: 10.1016/j.jinsphys.2016.07.004 [査読有]

[学会発表](計 23 件)

1. 藤本章晃・大野瑞紀・倉西良一・安河内祐二・佐原 健. 毛翅目昆虫ホタルトビケラの BAC ライブラリー構築. 日本蚕糸学会第 89 回大会. 2019 年 3 月 23 日
2. 大野瑞紀・川本宗孝・安河内祐二・佐原 健. RNA-seq データからカイコ単一遺伝子オルソログを検出するツールの開発. 日本蚕糸学会第 89 回大会. 2019 年 3 月 23 日.
3. 高橋優作・横山 岳・伊藤克彦. カイコ薄紙繭突然変異系統における繭形質の調査と原因遺伝子の探索. 日本蚕糸学会第 89 回大会. 2019 年 3 月 23 日.
4. 松本祐希名・横山 岳・伊藤克彦. カイコ 19 致死のポジショナルクローニング. 日本蚕糸学会第 89 回大会. 2019 年 3 月 23 日.
5. 津田 萌・横山 岳・伊藤克彦. カイコの成虫寿命を決定する遺伝子 *sli* の機能解析. 日本蚕糸学会第 89 回大会. 2019 年 3 月 23 日.
6. 伊藤克彦・横山 岳. 死蟻蚕の原因遺伝子の単離. 日本蚕糸学会第 89 回大会. 2019 年 3 月 23 日.
7. **Ito K**, Fujii T, Yokoyama T, and Kadono-Okuda K. Decrease in the expression level of *nsd-2* gene encoding the putative *Bombyx mori* bidensovirus receptor by virus infection. The 6th Asia-Pacific Congress of Sericulture and Insect Biotechnology (APSERI-2019). India. Mar 2. 2019.
8. 伊藤克彦. カイコ濃核病ウイルス抵抗性/感受性遺伝子産物からウイルス感染機構を考察する. 第 13 回昆虫病理研究会シンポジウム. 2018 年 9 月 21 日 (招待講演)
9. Ohno M, Yasukochi Y, Suzuki G, **Sahara K**. Construction of a BAC library and selection of single genes in *Colias erate*. International Symposium on Innovative Agriculture and Fishery (ISIAF2018) 2018
10. Fujimoto T, Yasukochi Y, Suzuki G, **Sahara K**. First BAC-FISH mapping of the caddisfly (*Stenopsyche marmorata*). International Symposium on Innovative Agriculture and Fishery (ISIAF2018) 2018
11. Fujimoto T, Kuranishi RB, Yasukochi Y, Suzuki G, **Sahara K**. BAC-FISH identifies the caddisfly chromosomes. 16th International Symposium on Trichoptera. 2018.
12. **Sahara K**, Matsumoto Y, Yoshido A, Kawamoto M, Yasukochi Y, Kaneko Y. A fate of sex chromosomes and its partners in sex-limited yellow cocoon (Sy) strain of *Bombyx mori*. 6th Asia-Pacific Chromosome Colloquium. 2018
13. Ohno M, Yasukochi Y, Suzuki G, Yoshido A, **Sahara K**. RNA-seq analysis facilitates BAC-FISH mapping. The 10th International Workshop on MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS OF THE LEPIDOPTERA. 2018

14. Ohno M, Yamauchi Y, Yasukouchi Y, Yoshido A, **Sahara K**. The Z chromosome comparison between Z- and E-races of *Ostrinia nubilalis*. 22nd International chromosome conference. 2018
15. **佐原 健**・松本祐希名・吉戸敦生・川本宗孝・**安河内祐二**・金児 雄 モノソミーカイコの発見. 東北昆虫学会第1回大会. 2018
16. 嵯峨新樹・藤本章晃・伴野 豊・**安河内祐二**・安藤俊哉・伊藤克彦・**佐原 健**. カイコ *Bm* 系統の原因遺伝子の探索. 日本蚕糸学会第88回大会. 2018年3月20日. 名古屋大学.
17. 高橋 優作・藤井 毅・横山 岳・伊藤 克彦. カイコ薄紙繭突然変異の繭形質の性状解析とポジショナルクローニング. 日本蚕糸学会第88回大会. 2018年3月20日. 名古屋大学.
18. 津田 萌・藤井 毅・横山 岳・伊藤克彦. カイコの成虫寿命を短くする遺伝子 *sli* の解析. 日本蚕糸学会第88回大会. 2018年3月20日. 名古屋大学.
19. Ponnuvel KM, **Ito K**, Terenius O, de Miranda J, Jayaprakash P, Mandal K. Genome sequence, characterization and quantification of a novel iflavirus infecting tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta*. The 4th Wild silkmoth Conference. January 22-24, 2018.
20. **Ito K**, Fujii T, Yokoyama T, Kadono-Okuda K. Expression profile of *nsd-2* gene encoding the putative *Bombyx mori* bidensovirus receptor after virus infection. Society for Invertebrate Pathology Annual Meeting-2017. August 16, 2017.
21. **安河内祐二**・上樂明也・桑崎誠剛・宮本和久・山本公子・加藤孟宏・**佐原 健**. コナガのBAC-FISH マッピングと ddRAD-seq 法による連鎖地図との統合. 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
22. **Ito K**, Yoshikawa M, Fujii T, Tabunoki H, Yokoyama Y. Characterization of the moth color mutation, Wild wing spot, in the silkworm *Bombyx mori*. XXV International Congress of Entomology. Sep 25-30. 2016. Orlando.
23. **Ken Sahara**. Sex chromosome evolution in Lepidoptera. Satellite symposium in XXV International Congress of Entomology. Rosen Plaza Hotel, Orlando, USA. Recent Advances in Entomology in Japan--Ecology and Reproductive Biology. September 25, 2016.

〔図書〕(計1件)

1. 吉戸敦生・**佐原 健** 2019 カイコの精巢を用いた染色体と細胞分裂の観察 (In カイコの実験単 監修：日本蚕糸学会), NTS, 303pp

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：安河内 祐二

ローマ字氏名：Yuji Yasukochi

所属研究機関名：国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構

部局名：生物機能利用部門

職名：上席研究員

研究者番号(8桁)：50355723

研究分担者氏名：伊藤 克彦

ローマ字氏名：Katsuhiko Ito

所属研究機関名：東京農工大学

部局名：農学研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁)：80725812

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。