

氏名	フジモト アキ 藤本 章晃
本籍（国籍）	秋田県
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第 732 号
学位授与年月日	平成 31 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物生産科学
学位論文題目	毛翅目昆虫染色体における細胞遺伝学的研究（Cytogenetic study on trichopteran insects）
学位審査委員	主査 岩手大学教授 佐原 健 副査 澤井 健(岩手 教授), 金児 雄(弘前 准教授), 佐藤 智(山形 准教授)

## 論文の内容の要旨

毛翅目昆虫は、約 14,500 種で構成される完全変態昆虫の一種であり、シマトビケラ亜目、ナガレトビケラ亜目、エグリトビケラ亜目の 3 亜目に大別される。約 2 億年前に共通祖先から分岐した蛾と蝶で構成される鱗翅目昆虫と姉妹系統にある。両者は、生態的、形態的類似点が多い。染色体に関しても、雌ヘテロ型の性染色体システムと分散動原体型染色体構造を共有している。分散動原体型染色体構造を有する昆虫の染色体研究は、長年、染色体数を明らかにするカウント実験がほとんどであった。

近年、モデル鱗翅目昆虫カイコ (*Bombyx mori*) における bacterial artificial chromosome (BAC) -FISH (fluorescence *in situ* hybridization) 法の確立をうけ、BAC-FISH 法による染色体同定とカリオタイプングが実現した。これを皮切りに他種の鱗翅目昆虫とカイコにおける染色体対応関係の解析が行われ、鱗翅目昆虫間における染色体座上遺伝子の保存性が明らかになった。一方、毛翅目昆虫の染色体研究は、旧態依然とした状況が続いていた。本研究では、カウントに留まっていた毛翅目昆虫の染色体研究を鱗翅目昆虫での研究と同様のレベルとし、さらに、姉妹系統間の染色体進化の解明の基盤形成を目論んだ。

シマトビケラ亜目のヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) において、雌雄の生殖細胞より作製した染色体標本の観察を行い、染色体数は  $2n=25/26$  (♀/♂) と特定した。また、毛翅目昆虫で初となる BAC ライブラリーを構築した。本ライブラリーは、平均インサート長 65.38Kb のゲノム DNA を持つ 32,256 クローンで構成される。構築したライブラリーより抽出した BAC-DNA をプローブとして、毛翅目昆虫で初めての BAC-FISH に成功した。さらに、cDNA ライブラリーの構築とクローンのシークエンスによりカイコ遺伝子のオルソログを特定した。特異的な配列をもとに設計したプライマーを

用いて、これらオルソログを含む 87BAC のセレクションに成功した。これらの BAC プロブを用いて、毛翅目昆虫初となるカリオタイピングに成功した。また、BAC-FISH マッピング結果、鱗翅目昆虫とヒゲナガカワトビケラ間には、鱗翅目昆虫間のような染色体の対応関係は存在せず、大規模な染色体リアレンジメントが起こったことを明らかにした。

同属別種のチャバネヒゲナガカワトビケラ (*S. sauteri*) においても、ヒゲナガカワトビケラ BAC を用いた FISH マッピングが可能であることを示し、カリオタイピングも実現した。BAC-FISH マッピング比較により、2 種間には染色体の対応関係と大部分の遺伝子配置の保存性が確認された。この研究から遺伝子配置の変化が確認された染色体に対応する、ヒゲナガカワトビケラ染色体について詳細な調査を行ったところ、個体間においても多様性が存在した。また、遺伝子配置の異なるヘテロな染色体対も発見された。遺伝子配置の相違が種分化のみならず、環境適応に関与する可能性が考えられる。

エグリトビケラ亜目ホタルトビケラ (*Nothopsyche ruficollis*) における平均インサート長 57.98Kb のゲノム DNA を持つ 42,240 クローンからなる BAC ライブラリーを構築した。蛹より抽出した Total RNA を用いて RNAseq を行うことで発現する遺伝子配列を決定した。RNAseq データをクエリーにして、カイコゲノム情報への tblastX 検索を行い、カイコオルソログ候補とした。この方法によりオルソログ特定速度も数も 10 倍程度上昇した。これの配列からプライマーを作製し、カイコオルソログを含む BAC を選抜した。さらに、上記 87 ヒゲナガカワトビケラ BAC の持つ遺伝子のホタルトビケラオルソログ 65 個を特定した。雌の染色体数が  $2n=55$  と推測されるヒゲナガカワトビケラの第 4 染色体にマップされた遺伝子オルソログを含む 3 BAC プロブを用いて FISH マッピングを行った。その結果、2 種間には染色体の対応関係は確認されなかった。さらに、カイコ第 19 染色体の約 1.5Mb 内にマップされる遺伝子のホタルトビケラオルソログを含む 2 BAC プロブによるマッピングの結果、ホタルトビケラの 1 染色体の両端部位にマップが確認された。

## 論文審査の結果の要旨

毛翅目昆虫は、約 14,500 種で構成される完全変態昆虫の一種であり、約 2 億年前に共通祖先から分岐した蛾と蝶で構成される鱗翅目昆虫と姉妹系統にある。分散動原体型染色体構造を有する毛翅目昆虫について本研究では、細胞遺伝学的な解析を行った。得られた結果は以下の通りである。

1. シマトビケラ亜目のヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) において、毛翅目昆虫で初となる BAC ライブラリーを構築した。次に、本ライブラリーより抽出した BAC-DNA をプローブとして、毛翅目昆虫で初めての BAC-FISH に成功した。本種の cDNA ライブラリーの構築とクロンのシーケンスによりカイコ遺伝子のオルソログを特定した。さらに、特異的な配列

をもとに設計したプライマーを用いて、毛翅目昆虫初となるカリオタイプングに成功した。また、BAC-FISH マッピング結果、鱗翅目昆虫とヒゲナガカワトビケラ間には、鱗翅目昆虫間のような染色体の対応関係は存在せず、大規模な染色体リアレンジメントが起こったことを明らかにした。

2. 同属別種のチャバネヒゲナガカワトビケラ (*S. sauteri*) においても、ヒゲナガカワトビケラ BAC を用いた FISH マッピングが可能であることを示すとともにカリオタイプングを実現した。BAC-FISH マッピング比較により、2 種間には染色体の対応関係と大部分の遺伝子配置の保存性を明らかにした。両者の比較において見いだされた限定的な相違は、ヒゲナガカワトビケラ個体間においても染色体多様性の発見へとつながった。

3. ヒゲナガカワトビケラとは異なる亜目のホタルトビケラ (*Nothopsyche ruficollis*) においても BAC ライブラリーを構築した。本種では、RNAseq を行うことで発現する遺伝子配列を決定した。RNAseq データをクエリーにして、カイコゲノム情報への tblastX 検索を行い、カイコオルソログ候補とした。この方法によりオルソログ特定速度も数も上昇した。これの配列からプライマーを作製し、カイコオルソログを含む BAC を選抜した。さらに、87 ヒゲナガカワトビケラ BAC の持つ遺伝子のホタルトビケラオルソログ 65 個を特定した。雌の染色体数が  $2n=55$  と推測される本種の染色体に対して、ヒゲナガカワトビケラの第 4 染色体にマップされた遺伝子オルソログを含む 3 BAC プローブを用いて FISH マッピングを行った。その結果、2 種間には染色体の対応関係は確認されなかった。さらに、カイコ第 19 染色体の約 1.5Mb 内にマップされる遺伝子のホタルトビケラオルソログを含む 2 BAC プローブによるマッピングの結果、ホタルトビケラの 1 染色体の両端部位にマップが確認された。

以上、毛翅目昆虫において世界初となる分子学的な手法による細胞遺伝学的研究成果は、新たな研究分野を開拓したと高く評価できる。よって、本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士課程学位審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士（農学）の学位論文として十分に価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

主論文

Fujimoto, T., Okumura, A., Yoshido, A., Yasukochi, Y., Suzuki, G and 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.

参考論文

1. Yasukochi, Y., Yang, B., Fujimoto, T., Sahara, K., Matsuo, T and Ishikawa, Y. (2018): Conservation and lineage-specific rearrangements in the GOBP/PBP gene complex of distantly related ditrysian Lepidoptera. *PLoS ONE*, 13(2), e0192762.
2. Katsuma, S., Kiuchi, T., Kawamoto, M., Fujimoto, T. and Sahara, K. (2018): Unique sex determination system in the silkworm, *Bombyx mori*: current status and beyond. *Proceedings of the Japan Academy Series B*, 94(5), 205-216.