

博士論文要約 (Summary)

平成 28 年 4 月入学
連合農学研究科 生物生産科学専攻
氏 名 藤本 章晃

タイトル	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)
第 I 章 緒言	
<p>毛翅目昆虫は、約 14,500 種で構成される完全変態昆虫の 1 種であり、シマトビケラ亜目 (Annulipalpia)、ナガレトビケラ亜目 (Spicipalpia)、エグリトビケラ亜目 (Integripalpia) の 3 亜目に大別される水生昆虫である。この種は、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関係にある。これらの 2 つの目は、染色体の特徴において共通性があり、昆虫綱においてマイナーな分散動原体型染色体構造と雌ヘテロ型の性染色体システムを有している。分散動原体型染色体構造をもつ種では、形態的な特徴や分染法などで各染色体を特定することが困難である。つまり、分裂時に紡錘系接合部位が染色体上に散在し、動原体の集中性を欠き、高度に染色体が凝集する。また、染色体の二重鎖切断による断片染色体が発生しても、理論上全ての染色体が分裂可能であると考えられる。こうした特異的な染色体構造から、毛翅目昆虫の染色体研究は、長年、染色体数のカウント実験と性染色体構成の確認のみに留まっていた。一方、鱗翅目昆虫においては、モデル鱗翅目昆虫カイコ (<i>Bombyx mori</i>) において、BAC-FISH 法により全染色体の同定が成し遂げられている。この方法は、鱗翅目昆虫のいくつかの種において適応され、それら染色体の対応関係が示されている。本研究では、毛翅目昆虫の染色体研究を鱗翅目昆虫と同様のレベルとし、姉妹系統間の染色体進化の解明を行うための分子細胞遺伝学的研究の基盤形成を目論んだ。</p>	
第 II 章 ヒゲナガカワトビケラの BAC ライブラリーと cDNA ライブラリー構築	
<p>毛翅目昆虫において最も祖先的な系統群であるとされているシマトビケラ亜目のヒゲナガカワトビケラ (<i>Stenopsyche marmorata</i>) において、雌雄の生殖細胞より作製した</p>	

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、蛹から抽出した高分子 DNA を用いて、毛翅目昆虫で初となる BAC ライブラリーの構築に成功した。本ライブラリーは、平均インサート長 65.38 Kb のゲノム DNA を持つ 32,256 クローンで構成され、総インサートサイズは約 2.1 Gb に相当する。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、ヒゲナガカワトビケラ雄成虫から獲得した Total RNA より cDNA ライブラリーの構築に成功し、598 個のヒゲナガカワトビケラの遺伝子配列を獲得した。さらに、カイコのゲノムデータベースに対する tBLASTx 検索の結果、カイコ単一遺伝子との対応関係が推測されるヒゲナガカワトビケラオルソログを 222 個特定した。特異的な配列をもとに設計した 136 セットのプライマー (STS primer: single tagged sequence primer) を用いて、PCR セレクションを行うことで、標的配列を有する BAC を 81 個獲得した。

第Ⅲ章 ヒゲナガカワトビケラの BAC-FISH マッピング

カイコとの染色体比較が可能なヒゲナガカワトビケラオルソログを含む 81 BACs から作製した BAC プローブを用いて、毛翅目昆虫初となる全染色体の特定に成功した。また、81 BACs を用いた BAC-FISH マッピング結果より、現在まで解析された鱗翅目昆虫とヒゲナガカワトビケラ間には、染色体対応関係が確認されたものは性染色体と一部の常染色体領域のみにとどまった。鱗翅目昆虫間の染色体数の増減の多くは、単純な融合と切断で説明することができる。しかしながら、ヒゲナガカワトビケラと鱗翅目昆虫種間のゲノムワイドな染色体対応関係は存在しなかったことから、毛翅目昆虫と鱗翅目昆虫は、共通祖先からの分岐後において大規模な染色体リアレンジメント起こった可能性が強く示唆された。なお、本章において、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た。

第Ⅳ章 ヒゲナガカワトビケラにおける個体間の染色体変異解析

クロスハイブリダイゼーション BAC-FISH マッピング比較により、ヒゲナガカワトビケラとチャバネヒゲナガカワトビケラの 2 種間には、鱗翅目昆虫間において確認さ

れるような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。この研究において、一部の染色体では遺伝子配置の変化が確認された。対象の染色体に関してヒゲナガカワトビケラの個体群内と地理的隔離のある個体群間で詳細な調査を行った。その結果、ヒゲナガカワトビケラの第 1 染色体および第 12 染色体は、個体間においても染色体変異が確認された。第 1 染色体は、盛岡市個体群において 2 パターンのマッピング結果が確認された。また、逆位を持つ染色体とのヘテロ染色体対も発見された。さらに、札幌市個体群では、盛岡市個体群で認められなかったマッピングパターンが存在した。第 12 染色体は、3 パターンのマッピング結果が盛岡個体群から確認され、札幌個体群は 3 パターンのうちの 1 パターンしか確認されなかった。これらの結果は、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を示唆すると考えられる。

第 V 章 ホタルトビケラの BAC-FISH 法の確立

エグリトビケラ亜目のホタルトビケラ (*Nothopsyche ruficollis*) の BAC ライブラリーを構築した。このライブラリーは、平均インサート長 57.98 Kb のゲノム DNA を持つ 42,240 クローンから構成され、総インサートサイズは約 2.4 Gb に相当する。蛹より抽出した Total RNA を用いてトランスクリプトーム (RNA-seq) 解析を行うことで、発現が認められる遺伝子配列を決定した。この RNA-seq 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。これらの配列からプライマーを設計し、カイコオルソログに対応するホタルトビケラオルソログを含む BAC を選抜した。さらに、上述のヒゲナガカワトビケラの FISH に使用した BAC が持つ遺伝子に対応する、ホタルトビケラオルソログ 67 個を特定した。雌の染色体数が $2n=55$ と推測されるホタルトビケラに、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 1.5 Mb 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。

第VI章 総合考察

毛翅目昆虫において初となる BAC ライブラリーの構築ならびに BAC-FISH 法の確立をヒゲナガカワトビケラとホタルトビケラにおいて達成した。ヒゲナガカワトビケラと鱗翅目昆虫との FISH マッピング結果より、性染色体のみ対応関係が示唆された。このことは、毛翅目昆虫と鱗翅目昆虫は共通祖先由来の性染色体を維持している可能性を示唆する。一方、常染色体間の対応関係が極めて限定的な染色体領域にとどまったことは、毛翅目昆虫と鱗翅目昆虫との分岐後に大きな染色体リアレンジメントが生じた可能性と、シマトビケラ亜目への分岐後に大きな変化が生じた可能性がある。限られた結果ではあるが、ホタルトビケラは鱗翅目昆虫との染色体対応関係が示唆されていることから、現状では、シマトビケラ亜目への分岐時に大きな変化が生じた可能性の方がやや有力である。毛翅目昆虫のさらなる染色体進化の解析のためには、ホタルトビケラにおける詳細な BAC-FISH マッピング、別亜目であるナガレトビケラ亜目の解析と各亜目における別クレードに属する種のさらなる解析が必要である。