

毛翅目昆虫染色体における
細胞遺伝学的研究

岩手大学大学院
連合農学研究科
藤本 章晃

謝辞

本研究を遂行するにあたりご指導いただき、さらに本論文のご校閲を賜りました岩手大学農学部応用昆虫学研究室教授佐原 健博士に心よりお礼申し上げます。

また、本論文のご校閲とご助言を賜りました岩手大学農学部動物生殖工学研究室教授澤井 健博士、弘前大学農学生命科学部昆虫生理学研究室准教授金児 雄博士、山形大学農学部動物生態学研究室准教授佐藤 智博士に深謝いたします。

本研究の柱の一つであるトビケラ目昆虫 BAC ライブラリー構築に関するご指導ならびにご協力を賜りました大阪教育大学植物分子遺伝学研究室教授鈴木 剛博士ならびに同研究室卒業生の奥村 梓氏に心より感謝申し上げます。また、BAC セレクションに関するご指導ならびにご協力を賜りました国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構昆虫ゲノム研究ユニット安河内祐二博士、cDNA ライブラリー構築に関するご指導ならびにご協力を賜りましたチェコ科学アカデミー生物研究センター吉戸敦生博士、ホタルトビケラを採集・分譲いただきました千葉県立中央博物館生態学・環境研究科倉西良一博士、トビケラ目昆虫 BAC 作製に必要なエレクトロポレーションの実験機器の利用を快く了承してくださいました岩手大学農学部植物育種学研究室教授高畑義人博士ならびに同研究室の準教授畠山勝徳博士、RNA-seq データ解析にご協力いただきました岩手大学大学院連合農学研究科博士課程の大野瑞紀氏に心より感謝申し上げます。なお、同じ時間を岩手大学農学部応用昆虫学昆虫室にて共有してきた卒業生、大学院生、学生の皆様に感謝いたします。

最後に、岩手大学 9 年間もの長きに渡り、学生生活をご支援いただいた両親と家族に衷心より感謝いたします。

毛翅目昆虫染色体における細胞遺伝学的研究

目次

第Ⅰ章 緒言	1
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	5
第1節 BAC ライブラリーの構築	5
第2節 cDNA ライブラリーの構築と BAC セレクション	21
第Ⅲ章 ヒゲナガカワトビケラの BAC-FISH マッピング	31
第1節 染色体カリオタイピング	31
第2節 BAC-FISH マッピング	47
第3節 チャバネヒゲナガカワトビケラへのクロスハイブリダイゼーションマッピング	53
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	58
第1節 第1染色体における染色体変異解析	58
第2節 第12染色体における染色体変異解析	63
第Ⅴ章 ホタルトビケラの BAC-FISH 法の確立	68
第1節 ホタルトビケラ BAC ライブラリーの構築	68
第2節 ホタルトビケラ BAC セレクション	74
第3節 ホタルトビケラ BAC-FISH マッピング	80
第Ⅵ章 総合考察	85
第Ⅶ章 摘要	90
第Ⅷ章 参考文献	92

第 I 章 緒言

種数という観点で最も繁栄している真核生物は節足動物である。その割合は、地球上の全種数の約 78.5%に相当し、このうちの 80%が昆虫綱で、種数は 100 万種を超える (Zhang 2013)。昆虫綱がこれほどまでに多様性に富んだ分類群になりえたのは、分散移動能力としての翅の獲得、発達段階ごとに大きく形態を変化することができる変態の獲得が大きいと推測される。実際、有翅昆虫類は昆虫綱のうち 99%に相当し、完全変態昆虫の分類群が約 80%を占める (Zhang 2013)。このような多様性に富んだ昆虫綱の起源、高次系統関係、進化を解明するために、1K Insect Transcriptome Evolution (1KITE) Consortium が 100 種を超える昆虫種の約 1,500 遺伝子の配列比較を行った (Misof et al 2014)。その結果、昆虫の起源は、4 億 8,000 万年前の内顎目からの分化に遡り、陸生植物の起源である 5 億 1,000 万年前にきわめて近いことが明らかとされた。有翅昆虫類は、4 億年以上前に分化しており、最も早く陸上生物において翅を獲得したと推測される。また、完全変態昆虫の起源は、約 3 億 5,000 万年前と推定された。

完全変態昆虫の一種である毛翅目昆虫 (Trichoptera) と鱗翅目昆虫 (Lepidoptera) は、約 2 億年前に共通祖先から分岐したと推定され、形態、生態的に多くの類似点を有する。毛翅目昆虫は 49 科、約 14,500 種で構成される水生昆虫で、その種数は、昆虫綱において 7 番目に大きい。鱗翅目昆虫は陸生昆虫で、種数は約 17 万種で構成される昆虫綱において第 2 位の種数を誇る分類群である。姉妹系統関係にある両者は、染色体の特徴に共通性がある。染色体構造においては、分散動原体型染色体構造 (Suomalainen 1969) を共有する。大部分の昆虫種における染色体構造は、細胞分裂時に紡錘糸が付着する部位である動原体が集中することから、単動原体型と呼ばれる。これに対し、分散動原体型では分裂時における紡錘糸接合部位が染色体上に散在し、動原体の集中性を欠き、染色体の切断などで断片染色体が発生しても、理論上全ての染色体が遺伝可能とされている。また、WZ/ZZ もしくは Z/ZZ などの雌ヘテロ型の性決定システムを共有している。大部分の昆虫種は、雄ヘテロ型の性染色体システムを持ち、全ての種において雌ヘテロ型であるグループは、毛翅目昆虫と鱗翅目昆虫からなる飾翅上目 (Amphiesmenoptera) のみである (Blackmon and Demuth 2015)。鱗翅目昆虫は、Tischeriidae (ムモンハモグリガ科) を除く祖先的な monotritya (単門亜目) では、W 染色体を持たない ZO 型の性染色体システムしか確認されていない。これに対し進化的な ditryia (二門亜目) においては、W 染色体が獲得され、WZ 型、W や Z が複数存在する WnZn 型、さらには W 染色体を二次的に欠落したと推測される ZO 型の性染色体システムが認められる (Marec and Novák 1998; Traut et al 2007; Marec et al 2010; Sahara et al 2012; Šichová et al 2015; 2016)。他方、毛翅目昆虫の性染色体構成は、種数が限定的であるが、解析されたすべての種で ZO 型のみが認められる (Traut and Marec 1996; Marec and Novák 1998; Lukhtanov 2000)。

毛翅目昆虫は、シマトビケラ亜目 (Annulipalpia)、エグリトビケラ亜目 (Integripalpia)、

ナガレトビケラ亜目 (Spicipalpia) の 3 亜目に分類され、エグリトビケラ亜目のエグリトビケラ科 (Limnephilidae) の一種において、染色体数が雄 $2n=40$ 、雌 $2n=39$ であることが最初に報告された (Klingstedt 1931)。その後、まとまった種数の染色体数カウント情報から、科を代表する染色体数 (基本数) が推測された (Kiauta 1971)。造網型の巣を形成するシマトビケラ亜目のシマトビケラ科 (Hydropsychidae) が $n=15$ 、イワトビケラ科 (Polycentropodidae) とヒゲナガカワトビケラ科 (Stenopsychidae) が共に $n=13$ である。ナガレトビケラ亜目のナガレトビケラ科 (Rhyacophilidae) は $n=23$ 、ヒメトビケラ科 (Hydroptilidae) が $n=14$ と科ごとに染色体数が大きく異なる。エグリトビケラ亜目のエグリトビケラ科においては、17 種の染色体数がカウントされ、染色体数は $n=6-30$ と多様な染色体数が確認されたが、その内 10 種が $n=30$ であったことから、この染色体数が基本数とされている。その他の科においてはニンギョウトビケラ科 (Goeridae)、トビケラ科 (Phryganeidae)、ホソバトビケラ科 (Molannidae)、ヒゲナガトビケラ科 (Leptoceridae) においてそれぞれ、 $n=22$ 、28、27 および 25 と比較的大きい染色体数が確認されることから、エグリトビケラ亜目は、毛翅目昆虫内において比較的染色体数が多い分類群といえる。一方、鱗翅目昆虫の染色体数は、約 1,000 種の中で、 $n=29-31$ の種が半数以上であり、 $n=31$ の種が全体の 25 % 程度であったことから、この数が基本数と推測された (Robinson 1971)。さらなる解析の結果、この基本数が支持されている (Ahola et al 2014; Yasukochi et al 2016)。

毛翅目昆虫と鱗翅目昆虫における染色体研究は、染色体数のカウント実験がほとんどであった。これは、単動原体型染色体に観察される一次狭窄が認められず、分裂期中期において染色体が高度に凝集し、サイズに差異の無い球体に近い形状を取るなどの形態的特徴、分染法などを適応できないことなどが大きな原因であった。毛翅目昆虫はもとより、モデル鱗翅目昆虫のカイコ (*Bombyx mori*) ですら、長年、全染色体を同定 (カリオタイプング) することができなかった。近年のカイコにおける分子遺伝学的な研究は、randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) (Yasukochi 1998)、simple sequence repeat (SSR) (Miao et al 2005) による分子連関地図の作成ならびに大腸菌に 100 Kb 程度の DNA 断片を組み込んだプラスミドを形質転換させ安定的にクローニングすることができる bacterial artificial chromosome (BAC) ライブラリーの作製 (Wu et al 1999) などが行われた。また、鱗翅目昆虫において最も初期にドラフトゲノム (Mita et al 2004; Xia et al 2004) が公表された。さらには、BAC の末端配列から作製された single nucleotide polymorphism (SNP) (Yamamoto et al 2008) による分子連関地図や Full-length cDNA 情報 (Suetugu et al 2013) が KAIKObase (<http://sgp.dna.affrc.go.jp/KAIKObase/>) に統合され、鱗翅目昆虫においてゲノム情報が最も充実している (The International Silkworm Genome Consortium 2008)。最近、絹を生産するもしくは繭を形成する鱗翅目昆虫のゲノムデータベースである SilkBase (<http://silkbases.ab.a.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/index.cgi/>) も整備され、カイコゲノム情報のアップデートデータとともに近縁種間におけるゲノム比較が可能となった。

染色体の研究手法として、DNA 断片を蛍光色素で標識したプローブを染色体上に直接ハ

イブリダイズさせ、目的とする DNA 配列の場所を特定する Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法が 1980 年代初頭に開発された (Langer-Safer et al 1982)。カイコにおいても 1990 年代に可能となった (Okazaki et al 1993; Banno et al 1997) FISH 法がさらに発展し、BAC をプローブとして用いる FISH (BAC-FISH) 法の成功に至った (Sahara et al 2003)。この BAC-FISH 法を基盤技術とした染色体マッピングによって、鱗翅目昆虫初となるカリオタイプがカイコにおいて成し遂げられた (Yoshido et al 2005)。さらに、カイコ BAC ライブラリーとゲノム情報との対応付けがなされたことで (Yasukochi et al 2006)、より詳細なゲノム情報と染色体の対応関係が解き明かされた。

カイコにおいて開発された細胞遺伝学的な手法は、他の鱗翅目昆虫に対して適用され、進化的なスズメガ科のタバコスズメガ (*Manduca sexta*) (Yasukouchi et al 2009)、ヤガ科のオオタバコガ (*Helicoverpa armigera*) (Sahara et al 2013)、メイガ科のヨーロッパアワノメイガ (*Ostrinia nubilalis*) (Yasukochi et al 2016)、さらには、祖先的なコナガ科のコナガ (*Plutella xylostella*) (加藤 2013) とカイコの比較解析へと伸展した。また、40 Kb 程度の DNA 断片を組み込んだプラスミドを形質転換させ、安定的にクローニングすることができる fosmid をプローブとした FISH マッピングが、ヤママユガ科のエリサン (*Samia cynthia ricini*) (Yoshido et al 2011b)、ヤガ科のヨトウガ (*Mamestra brassicae*) (Sahara et al 2013) において達成された。

鱗翅目昆虫における染色体構造と性染色体システムの進化の解明は、姉妹系統関係にある毛翅目昆虫の染色体研究の発展なくしては達成し得ない。しかしながら、現状、毛翅目昆虫においては、染色体同定もカリオタイプリングも行われてない。また、分子遺伝学的研究も極めて乏しく、毛翅目昆虫のゲノム情報は、lepbase (<http://lepbase.org/>) に 2 種の登録があるのみである。これらゲノム情報は、Scaffold サイズが著しく小さく、関連地図にも染色体にも対応づけられていないため鱗翅目昆虫とのゲノム比較は不可能である。そこで筆者は、毛翅目昆虫において細胞遺伝学的な研究方法を確立し、鱗翅目昆虫と毛翅目昆虫の分化と染色体進化ならびに鱗翅目昆虫における W 染色体獲得とその機能を明らかにする研究基盤の形成を目的として本研究を行った。

本研究の第 II 章において、日本において広く分布する普通種で、大型かつ種同定が最も容易な種の一つである、シマトビケラ亜目のヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) を対象として、毛翅目昆虫で初となる BAC ライブラリーの構築を行った。また、BAC クローンを特徴付ける遺伝子同定のために cDNA ライブラリーを作製し配列決定を行った。決定された配列よりカイコオルソログを同定して、それらをもつ BAC を 81 クローン選抜した。第 III 章においては、ヒゲナガカワトビケラ幼虫と蛹より染色体標本作製し、同定した BAC をプローブとした毛翅目昆虫で初となる FISH に成功した。さらに、鱗翅目昆虫におけるリブロービング手法 (Shibata et al 2009) をヒゲナガカワトビケラに応用して、各染色体に特異的なシグナルを示す BAC を選抜した。これら BAC プローブにより毛翅目昆虫で初めてカリオタイプリングを達成した。さらに、ヒゲナガカワトビケラ染色体へのカイコ

オルソログを含む BAC-FISH マッピングにより鱗翅目昆虫との染色体対応関係を解析した。また、ヒゲナガカワトビケラの同属別種であるチャバネヒゲナガカワトビケラ (*S. sauteri*) に対する、ヒゲナガカワトビケラ BAC プローブを用いた FISH に成功した。このクロスハイブリダイゼーション法による、FISH マッピング結果をヒゲナガカワトビケラの結果と比較した。さらに、第IV章では、種間変異についてヒゲナガカワトビケラ種内での比較を行った。その結果、地理的変異ならびに同一集団内における染色体変異を発見した。第V章では、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。本種では、RNA-seq 情報によるカイコオルソログ特定を行うことで、従来を大きく上回るオルソログ候補を得る方法確立した。本種の染色体に対して、ヒゲナガカワトビケラで同一染色体にマップされた遺伝子のオルソログを持つホタルトビケラ BAC とカイコでの同一染色体オルソログを持つホタルトビケラ BAC を用いた BAC-FISH マッピングを行った。以上の研究成果をもとに、第VI章において本研究の毛翅目昆虫の系統や分類における細胞遺伝学研究の貢献、飾翅上目における染色体進化研究や W 染色体の由来や獲得メカニズムに関して総合考察を行った。

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

序論

日本の毛翅目昆虫は、29 科 111 属 556 種が記録され (<http://tobikera.eco.coocan.jp>)、さらなる種数の増加が見込まれている。その中で、代表的な普通種の 1 種であるヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) は、河川水辺の国勢調査によって日本全国の主要河川で生息が確認され (<http://mizukoku.nilim.go.jp/ksnkankyo/index.html>)、系統関係における再整理がなされている (Saito et al 2018)。本種は、河川における底層動物群の優占種となることが多く、サイズも最大級であり、幼虫での種同定が可能である (津田・赤木 1962)。普通種における遺伝学的研究基盤を整備することは、毛翅目昆虫における科学研究全般に大きく寄与すると考えられる。この章では、ヒゲナガカワトビケラを用いて、第 1 節において、特定のゲノム領域を安定してクローニングできる BAC ライブラリーの構築、第 2 節において、網羅的な遺伝子配列の獲得のために cDNA ライブラリーの構築を行った。また、第 3 節において、カイコ単一遺伝子のヒゲナガカワトビケラオルソログを特定するとともにそれらを含む BAC クローンの選抜を行った。

第 1 節 BAC ライブラリーの構築

ヒゲナガカワトビケラにおけるゲノム情報は存在しないため、新規にゲノム情報基盤を構築する必要がある。本節では、特定のゲノム断片を安定してクローニングできる BAC ライブラリー構築を目論んだ。

材料および方法

1. 供試昆虫

本研究に用いたヒゲナガカワトビケラは 2013 年 5~6 月に盛岡市上ノ橋付近の中津川にて幼虫と蛹を採集した。幼虫は終齢幼虫を使用し、体長は 40 mm 程度であった。上記採集地には、形態が類似したチャバネヒゲナガカワトビケラ (*S. sauteri*) も生息しているため、津田・赤木 (1962) に従い、分類指標である幼虫前肢基節の突起を確認し、基部側が長く、額頭楕正中線に沿った細長い斑紋がある個体をヒゲナガカワトビケラとした。

2. HMW DNA の単離

ヒゲナガカワトビケラの幼虫 1 個体もしくは蛹 3 個体を用いて行った。氷上に設置した乳鉢を液体窒素で十分に予冷し、液体窒素下で砕いて白い粉末状になるまで乳棒で磨砕した。磨砕した試料は氷冷した NI buffer (Table 1) が 50 ml 入ったビーカーに懸濁し、15 分間

室温で放置した。氷冷した NI buffer を 100 ml 加え、よく懸濁した後、0.1 M EDTA (pH 8.0) に浸して、オートクレーブした MIRACLOTH (Millipore) を用いてろ過した。懸濁液を 3 本の 50 ml チューブに分注し、遠心した ($600\times g$, 10 min, 4°C)。デカントで上清を除き、チューブ一本につき NI buffer 10 ml で再懸濁して一本にまとめた。再度遠心 ($600\times g$, 10 min, 4°C) を行い、デカントで上清を除き、沈殿の量に応じて NI buffer を加え、先切りチップを用いてピペティングにて再懸濁した。 45°C のウォーターバスで 1~2 分インキュベートし、 45°C に保温しておいた 1.5% low melting point agarose (Table 2) を懸濁液と等量加え、ウォーターバス内で先切りチップでよく混合した。これをプラグモールド (Bio-Rad) に流し込み、ラップで包んで氷上で 30 分放置して、プラグを固めた。50 ml チューブ内で高分子核 DNA 抽出用 Lysis buffer stock (Table 3) 30 ml と Proteinase K (20 mg/ml) 150 μl を混合して Lysis buffer を作製し、ゲルプラグを押し出すように入れ、 50°C で 24 時間、酵素処理を行った。この処理中に数回軽く転倒混合を行った。新しい Lysis buffer 30 ml (150 μl Proteinase K (20 mg/ml) 含有) にプラグを移し、再び 50°C で 24 時間放置した。Lysis buffer を捨て、TE50 (10 mM Tris (pH 8.0), 50 mM EDTA (pH 8.0)) を 30 ml 加え、 4°C で 2 時間静置する処理を 5 回繰り返すことで、プラグの置換を行った。5 回目の TE50 を捨てたら 0.1 M PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride, 329-98-6, 和光純薬) 含有 100% EtOH を 600 μl 加え、 50°C のウォーターバスで 2 時間インキュベートして Proteinase K を失活させた。処理後に液を捨て、再度 TE50 を加えて 4°C で 2 時間静置する処理を計 5 回繰り返し、使用するまで 4°C で保存した。

3. 完全消化実験

(A) TE 置換

15 ml チューブ 2 本 (完全消化用と無処理用) に TE (10 mM Tris (pH 8.0), 5 mM EDTA (pH 8.0)) を 10 ml ずつ分注し、滅菌シャーレ内にプラグを 1 つ取り出し、表面を TE でリンスしたものを、2 等分して各チューブに入れ、 4°C で 1.5 時間放置した。TE を取り変えて、再度 4°C でさらに 1.5 時間放置した。また、これらの操作中に各 2~3 回ほど転倒混合を行った。

(B) *Hind*III による制限酵素処理

1.5 ml チューブに滅菌水 200 μl 、 $10\times\text{M}$ buffer (TaKaRa) 30 μl 、0.1% BSA (TaKaRa) 30 μl 、*Hind*III (15 U/ μl , TaKaRa) 2 μl を加え、氷上でピペティングした。滅菌スパチュラで完全消化用のプラグをチューブの中に入れ、タッピングで軽く混ぜてフラッシュし、 37°C で 20 時間以上酵素処理を行った。酵素処理中に適時タッピングによる攪拌を行った。

(C) パルスフィールドゲル電気泳動

λ -*Hind*III (3403, TaKaRa) と λ -ladder (N0341, New England BioLabs) をマーカーにして、CHEF-MAPPER (Bio-Rad) によるパルスフィールドゲル電気泳動を行った。泳動条件は、

14°C、5.1 V/cm、30 sec→50 sec、24 hr、linear、120°Angle とし、1% Pulse Field Certified Agarose (1620137, Bio-Rad) を用いて 0.5×TBE 中で行った。泳動終了後、エチジウムブロマイドで 30 分染色し、1 時間放置して染色液を浸透させ、UV 照射下で写真撮影を行った。

4. 部分消化の条件検討

(A) TE 置換

15 ml チューブ 1 本 (部分消化用) に TE を 10 ml 用意して、滅菌シャーレ内にプラグを 2 個取り出し、滅菌済みスパチュラのヘラ部分で格子状に 12 等分 (3×4) した。もう片方は 2 等分し、半分を 6 等分 (3×2) にし、TE で表面をリンスした後、15 ml チューブに移した。半分にしたプラグの残りは、取り出した TE50 に戻して保存した。合計 18 断片のプラグをチューブに入れ、4°C で 2 時間静置した。TE を取り変えてチューブを寝かせて 4°C で再度 2 時間放置した。これらの操作中に各 2~3 回ほど転倒混合を行い、再度 TE を取り変えて、4°C で over night の処理を行った。

(B) *Hind*III による制限酵素処理 (部分消化)

1.2×M buffer with BSA (Table 4) を溶媒に、9 段階の濃度 (0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 U/ml) の *Hind*III 反応液を 1.5 ml チューブに 62.5 µl ずつ作製した。TE 置換した 18 個の 1/12 プラグを滅菌シャーレに取り出し、チューブ毎のプラグ片の大きさに差がないように 2 個ずつ入れ、フラッシュを行い、ゲル片を溶媒に落とした。4°C で 5 時間放置し、プラグに制限酵素を浸透させた。1 M MgCl₂ を各 0.75 µl 加え、氷上で 1 時間放置して、プラグに浸透させた。37°C で 15 分間制限酵素処理を行い、終わり次第すぐに氷上に移して 0.5 M EDTA (pH 8.0) を 375 µl ずつ加えて酵素反応を止めた。

(C) パルスフィールドゲル電気泳動

泳動ゲルの well にプラグを 2 個ずつ、左から右に *Hind*III 処理濃度が濃くなるように、各プラグを滅菌スパチュラとチップで差し込んだ。また、プラグが穴から出ないように、1% low melting Agarose (Sea Plaque GTG, Lonza) にて穴を埋めた。パルスフィールドゲル電気泳動とその泳動条件は完全消化と同様とした。24 時間後、エチジウムブロマイドで 30 分染色し、1 時間放置して染色液を浸透させた。その後、UV 照射下で写真を撮影し、97~145.5 Kb の領域に DNA スメアが集中する条件を決定した。

5. 本番消化 (ゲルからの核酸抽出)

(A) TE 置換

15 ml チューブ 1 本に TE を 10 ml 用意してから、滅菌シャーレ内にプラグを 3.5 個取り出し、全てのプラグを滅菌ブレードで格子状に 12 等分 (3×4) した。合計 42 断片のプラグを TE でリンスした後、チューブに入れ、部分消化条件検討時と同様に TE 置換を行った。

(B) *Hind*III による制限酵素処理（部分消化）

1.2×M buffer with BSA を溶媒に、条件検討で決定した最適濃度条件とその前後の 4 段階の *Hind*III 濃度の酵素反応液を 1.5 ml チューブ 21 本に 62.5 µl ずつ作製し、そのうちの 1 本は未消化用とした。TE 置換した 42 個の 1/12 プラグを滅菌シャーレに取り出し、チューブ 1 本につきプラグ片を 2 個ずつ入れ、フラッシュでゲル片を溶液中に沈め、タッピングした。4°C で 5 時間放置して、プラグに酵素反応液を浸透させた。1 M MgCl₂ を各 0.75 µl 加え、氷上で 1 時間放置してプラグに浸透させた。37°C で 15 分間制限酵素処理を行い、終わり次第、氷上に移して 0.5 M EDTA (pH8.0) を 375 µl ずつ加えて反応を止めた。

(C) パルスフィールドゲル電気泳動

泳動ゲルにプラグを約 10 個ずつ 4 レーン、左から右に処理濃度が濃くなるように各プラグを空気が入らないように詰め込んだ。別のレーンに未消化の 1/12 プラグを 2 個挿入し、プラグを入れた穴と空の穴を、1 % low melting Agarose (Sea Plaque GTG, Lonza) で埋め、λ-*Hind*III (TaKaRa) と λ-ladder (New England BioLabs) をマーカーにして CHEF-MAPPER (Bio-Rad) によりパルスフィールドゲル電気泳動を行った。泳動は 2 段階に分けて行った。第 1 段階は、14°C、6 V/cm、90 sec 一定、4 hr、linear、120°Angle の条件で、1 % low melting Agarose (Sea Plaque GTG, Lonza) を 0.5×TBE 中で泳動した。泳動終了後すぐに、第 2 段階の 14°C、6 V/cm、6 sec 一定、12 hr、linear、120°Angle の条件で合計 16 時間泳動を行った。

6. ゲノム断片のゲル抽出

電気泳動後のアガロースゲルにラップをかけ、酵素処理を行ったプラグを挿入した 4 レーンを切り抜き、残りの部分をエチジウムブロマイドで 30 分染色し、1 時間放置して染色液を浸透させた。その後、UV 照射下で写真を撮影し 97~145.5 Kb に相当する部分を定規で確認した。先に切り抜いたゲル断片より 97~145.5 Kb に対応する部分を 5 mm ずつ 2 つの分画に分けて切り出し、各分画を 2 mm 角に刻んで 15 ml チューブにそれぞれ入れた。それぞれの分画は、分画 1 (97~125 Kb)、分画 2 (125~145.5 Kb) とした。それぞれのゲル断片の重さを測定した後、氷冷した Agarase I buffer (Table 5) を 12 ml ずつ加えてゲル片を混ぜ、4°C で 30 分静置して置換した。その後、Agarase I buffer を交換し、再度 4°C で 30 分静置した。これらの処理中に 2 回程度転倒混合した。その後、分画毎にラップの上にゲル片を広げ、きれいなキムワイプで余分な buffer を全て吸い取り、各分画名をラベルした新しい 15 ml チューブにそれぞれゲル片を入れた。70°C のウォーターバスで 15 分間温めて完全に溶解させ、チューブを 40°C のウォーターバスに移し、ゲル 1 g あたり 10 U/µl の β-Agarase I (M0392S, New England BioLabs) を 1 µl それぞれ加えた。チップの先で混ぜるように穏やかによく混合し、40°C 2 時間の酵素処理によりアガロースを分解した。処理中は 30 分ごとにタッピングで優しく混合し、酵素が底に沈殿しないようにした。その後、氷上に 10 分間静置し、先

切りチップでそれぞれの分画名をラベルした新しい 1.5 ml チューブにゲルを吸い込まないように全量に移した。遠心 (13,000 rpm, 5 min, 4°C) により溶け残ったゲルを沈殿させ、得られた上清を 45°C の Heating plate (HP-4530, アズワン) に敷いた清潔なラップの上に先切りチップでアプライし、もとのゲル 1 g あたり 10 U/μl の β -Agarase I (New England BioLabs) を追加で 0.5 μl 加えた。チップの先で混ぜるように穏やかによく混合し、そのままカバーをして、液量が 1/5 程度になるまで濃縮した。STE buffer (Table 6) に浮かべたセルロースフィルター (VSWP02500, Millipore) 上に溶液を移し、1 時間透析を行った。最終的に液量が 50~100 μl 程度になるまで濃縮と透析を繰り返し、1.5 ml チューブに移して Quantus FLUOROMETER (Promega) により DNA 量を測定した後、4°C で保存した。

7. ベクタープラスミドの調整

*Hind*III による部分消化したヒゲナガカワトビケラのゲノム DNA を挿入するベクタープラスミドには、pBeloBAC11 (Kim et al 1996 に従い作製) を用いた。プラスミドの抽出は、QIAGEN Plasmid Midi Kit (12245, QIAGEN K.K.) を用いて行った。抽出は、QIAGEN のプロトコールに従って以下のとおり行った。200 ml のバッフル付き三角フラスコにて LB 液体培地 50 ml あるいは 100 ml にて pBeloBAC11 を含んだ菌体を 37°C、14~18 時間振盪培養した。菌体を遠心分離 (6,000 rpm, 10 min, 4°C) にて集菌し、菌体を 4 ml の RNase A 入り P1 buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 μg/ml RNase A (pH 8.0)) に懸濁し、4 ml の P2 buffer (200 mM NaOH, 1% SDS) を加え 5~7 回転倒攪拌し、溶液が十分に混合されているのを確認し、4 ml の P3 buffer (3 M 酢酸カリウム (pH 5.5)) を加えて、溶液が透明に変化するまで 5~7 回強く転倒攪拌し、遠心分離 (15,000 rpm, 30min, 4°C) 後、上清を回収した。4 ml の QBT buffer (Table 7) で平衡化した QIAGEN-tip100 カラムに、QIAfilter-Cartridge を用いて濾過した上清を通した。10 ml の QC buffer (Table 8) でカラムを 2 回洗浄後、68°C に温めた QF buffer (Table 9) 1 ml を 5 回通して DNA を溶出した。溶出した DNA 溶液に 0.1 倍量の 3 M 酢酸ナトリウムと 0.7 倍量のイソプロパノールを加え、よく混合した上で遠心 (15,000 rpm, 30 min, 4°C) を行い、上清を捨てた。70% EtOH を 5 ml 加えリンスして遠心 (15,000 rpm, 15 min, 4°C) 後、上清を捨て、ペレットを乾燥させ、400 μl の TE を加えた。Bio Shaker BR-23FH (TAITEC) により 37°C で 2 時間振盪もしくは 4°C でペレットが TE に溶解するように傾け 12 時間以上静置して溶解させ、DNA 溶液を 1.5 ml チューブに移し、0.1 倍量の 3 M 酢酸ナトリウムと 2.5 倍量の 100% EtOH を加え、遠心 (15,000 rpm, 10 min, 4°C) を行った。上清を除去後、70 % EtOH を 1 ml 加えリンス後、遠心 (15,000 rpm, 10 min, 4°C) を行った。上清を除去した後、ペレットを風乾させ、ペレットの量に合わせて 20~120 μl の TE に溶解して Quantus FLUOROMETER (Promega) により DNA 量を測定した。

ベクターとして利用するためにプラスミド DNA 1 μg を Table 10 に記載した条件で *Hind*III 処理を 37°C で 5 時間行い、TE を 150 μl 加えてトータル 300 μl とした。等量のイソアミルアルコール入りフェノールクロロホルム (TE 飽和フェノール : クロロホルム : イソアミル

アルコール=25 : 24 : 1) を加えてよく転倒混合し、遠心 (12,000 rpm, 5 min, RT) 後、上清を新しいチューブに移した。そこに、等量のイソアミルアルコール入りクロロホルム (クロロホルム : イソアミルアルコール=24 : 1) を加えてよく転倒混合し、遠心 (12,000 rpm, 5 min, RT) の後、上清を新しいチューブに移した。共沈剤としてグリコーゲン水溶液 (20 mg/ml) (M8K2290, 半井化学薬品) を 1 μ l 加え、3 M 酢酸ナトリウム 30 μ l を加えて軽く混合した。100% EtOH を 750 μ l 加えてよく転倒混合し、冷凍庫で over night 処理した。翌日、遠心 (15,000 rpm, 20 min, 4°C) 後に上清を捨て、800 μ l の 70% EtOH でリンスして再度遠心 (15,000 rpm, 20 min, 4°C) し、上清を捨て、15 分風乾して EtOH を完全に取り除き、最終的にベクター DNA を 10 μ l の TE に溶解した。

セルフライゲーションを防ぐために、ベクター DNA 溶液に Calf intestine Alkaline Phosphatase (CIAP) (2250A, TaKaRa) を用いた酵素処理を 37°C で 30 分間行った (Table 11)。処理後すぐに、0.8% Agarose ゲルを用いて 50 V で電気泳動を行った。エチジウムブロマイドで 15 分間染色、UV 照射下で写真撮影を行い、制限酵素処理と切り出し範囲の確認を行った。ゲル抽出は Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて行った。バンドが確認できた領域をメスで切り出し、細かく刻んで 1.5 ml チューブに入れて重量を測定し、アガロースゲル 10 mg につき 10 μ l の Membrane Binding Solution (4.5 M guanidine isothiocyanate, 0.5 M potassium acetate (pH5.0)) を加えてタッピングを行い、62°C で 10 分間インキュベートすることで完全に溶解した。溶液を Collection Tube に SV Column を差し込んだものに移し、室温で 1 分インキュベート後、遠心 (15,000 rpm, 1 min, RT) した。Collection Tube の液を捨て、Membrane Wash Solution (80% EtOH, 10 mM potassium acetate (pH 5.0), 16.7 μ M EDTA (pH 8.0)) 700 μ l を SV Column に入れて遠心 (15,000 rpm, 1 min, RT)、液を捨て Membrane Wash Solution 500 μ l を SV Column に入れて遠心 (15,000 rpm, 5 min, RT) してカラムを洗浄した。最終的にカラムを 1.5 ml チューブに移し、22 μ l の Nuclease-Free Water を SV Column に入れて 1 分間インキュベートし、遠心 (15,000 rpm, 1 min, RT) によりベクター DNA を溶出した。ベクター DNA 溶液は使用するまで -20°C で冷凍保存した。

8. ライゲーション

ベクターとインサート DNA のモル比が 10 : 1 となるように、全量 50 μ l の系で 1.5 ml チューブに T4 ligase (Promega, 3 U/ μ l) 1 μ l とその buffer 5 μ l、ベクター (pBeloBAC11)、インサート DNA を上記のモル比になるように先切りチップを用いて混合し、4°C で 20 時間インキュベートした。ライゲーション液は滅菌シャーレで 0.5×TE に浮かべたセルロースフィルター (VSWP02500, Millipore) 上で 2 時間透析を行い、最終的に 30~40 μ l となった溶液を 4°C で保存した。

9. エレクトロポレーションによる大腸菌形質転換

ライゲーション液 1 μ l または 2 μ l に対してコンピテントセル (ElectroMAX DH10B Cells,

Invitrogen) を 18 μ l 混合し、4°C に冷やしたキューベット (Gene Pulser Cuvette 0.1 cm electrode, BIO-RAD) に入れ、GENE PULSER II (BIO-RAD) を用いて 3 条件で 1.5 または 1.25 KV、25 μ F、100 Ω の条件でエレクトロポレーションした (A: 分画 1, 1.5 KV, 25 μ F, 100 Ω ; B: 分画 1, 1.25 KV, 25 μ F, 100 Ω ; C: 分画 2, 1.25 KV, 25 μ F, 100 Ω)。エレクトロポレーション後すぐに SOC 培地 (Table 12) を 1 ml 優しく加え、ゆっくりとピペッティングし、各懸濁液を 1.5 ml チューブに移し、Bio Shaker BR-23FH (TAITEC) にて 37°C で 1 時間振盪培養後、遠心 (5,000 rpm, 5 min, RT) して菌体を沈めた。上清をデカントで捨てて 100 μ l 程度とし、ゆっくりとピペッティング攪拌の後、100 μ l の X-Gal (9031, 和光純薬) と 50 μ l の IPTG (9030, 和光純薬) が塗布された、クロラムフェニコール (12.5 μ g/ml) 入りの LB 寒天培地 (Table 13) に滅菌したコンラージ棒で塗布した。その後、37°C のインキュベーターで約 24 時間培養し、青白コロニーを確認して、パラフィルムを巻いてグリセロールストックに使用するまで 4°C で保存した。

10. BAC ライブラリーと BAC-DNA プールの作製

クロラムフェニコール (10 μ g/ml) 入りのグリセロールストック用 LB 液体培地 (8 % グリセロール含有) (Table 14) を 384 well プレート全ての well に 50 μ l 分注し、滅菌した爪楊枝でシャーレからシングルコロニーをつつき、各 well に 1 コロニーずつ植菌した。全ての well に植菌したら、37°C で over night 培養した。培養後、BAC DNA プールを作製するために、コピープレートを 2 枚作製し、1 枚を恒久保存プレート、1 枚を X プール、コピー元のプレートを Y プール作製用とした。各プレートは、使用するまで -80°C で保存した。DNA プールは、各軸の well から 5 μ l ずつ菌体が十分に培養された LB を集菌し、16 または 24 well に相当する BAC が含まれている混合液を作製した。この混合液を LB でスケールアップして、BAC-DNA 抽出を行うことで、各軸の BAC-DNA プールを作製した。

11. BAC ライブラリーの評価

クリーンベンチ内で 50 ml チューブに LB 液体培地を 50 ml、クロラムフェニコール (25 mg/ml) を 25 μ l 入れてよく振り混ぜ、3 ml ずつ 16 本の試験管に分注した。爪楊枝を用いて形質転換体の菌をかきとり、試験管内の LB 液体培地に植菌した。これを 16 サンプル分繰り返して、37°C で 16 時間振盪培養した。培養後 1.5 ml チューブに菌液を 1.5 ml 移して遠心 (5,000 rpm, 5 min, RT) した。上を捨て、残りの菌液を試験管から 1.5 ml チューブに移し、再び遠心 (5,000 rpm, 5 min, RT) して集菌した。遠心後、上清を捨て、1.5ml チューブに残った LB 培地を完全に除いてからリゾチーム TEG (0.5 % Lysozyme, 25 mM Tris (pH8.0), 10 mM EDTA (pH8.0), 50 mM glucose) を 100 μ l ずつ加えて先切りチップで菌を攪拌し、室温に 5 分間、その後氷上に 5 分間置いた。NaOH/SDS (0.2 N NaOH, 1 % SDS) を 200 μ l ずつ加えて穏やかに転倒混和し、氷上に 5 分間置いた。5 分後 3 M 酢酸ナトリウムを 133 μ l 加えてタッピングにより混ぜ、氷上に 15 分間置いた後、遠心した (13,000 rpm, 10 min, 4°C)。遠心後、

上澄みを新しい 1.5 ml チューブに移し、室温に戻したイソプロパノールを等量加えて転倒混和して、室温で 15 分間放置した後、遠心 (13,000 rpm, 20 min, 4°C) した。上清を捨て、70% EtOH を 500 μ l ずつ加えてチューブの内壁と沈殿をよく洗い遠心 (13,000 rpm, 2min, 4°C) した。上清を完全に除いて TE を 50 μ l ずつ加え、時々タッピングしながら 65°C のドライバスに 5 分間置いて沈殿を溶かした。その後、RNase A (10 mg/ml) を 1 μ l ずつ加えて軽く混ぜ、37°C のウォーターバスで 30 分間インキュベートした。TE を 150 μ l 加えてイソアミルアルコール入りフェノールクロロホルム (TE 飽和フェノール : クロロホルム : イソアミルアルコール = 25 : 24 : 1) を等量ずつ加えて激しく混和し、遠心 (15,000 rpm, 5 min, RT) した。上層のみを新しい 1.5 ml チューブに移し、10 分の 1 量の 4 M 酢酸アンモニウムと 2.5 倍量の氷冷した 100% EtOH を加えてタッピングにより混ぜ、-30°C の冷凍庫に 20 分間置き、遠心 (13,000 rpm, 20 min, 4°C) した。上清を捨て、70% EtOH を 500 μ l ずつ加えてチューブの内壁と沈殿をよく洗い、遠心 (13,000 rpm, 5 min, 4°C) した。上清をよく除いてから沈殿を風乾させ、沈殿が透明になったら 1×TE を 20 μ l ずつ加え、時々タッピングしながら 65°C のドライバスに 5 分間置いて沈殿を溶かし、フラッシュしてから新しい 1.5 ml チューブに 5 μ l 分注し、滅菌水を 11.8 μ l、10×NE buffer 3 (NEW ENGLAND BioLabs) を 2 μ l、100×BSA (NEW ENGLAND BioLabs) を 0.2 μ l、Not I (NEW ENGLAND BioLabs) を 1 μ l 入れて、37°C のウォーターバスで 5 時間酵素反応を行った。反応液に 10×loading buffer (TaKaRa) を 2 μ l を加え、1 % PFC Agarose gel にアプライし、パルスフィールドゲル電気泳動を行った。泳動条件は、5~400 kb を分画するような Autoalgorithm モードを用い、マーカーや染色撮影については、*Hind*III の完全消化時と同じように行った。泳動終了後、エチジウムブロマイドで 30 分染色し、1 時間放置して染色液を浸透させた。その後、UV 照射下で写真を撮影しその後 UV 照射下で写真を撮影した。各 BAC のインサートサイズの計算は各マーカーを基準とした片対数グラフで行った。

Table 1 Composition of Nuclei Isolation buffer (NI buffer)

NI buffer stock	
1 M Tris (pH 9.5) (和光純薬 207-06275)	10 ml
0.5 M EDTA (pH 8.0) (DOJINDO 345-01865)	40 ml
1 M KCl (和光純薬 163-03545)	80 ml
Sucrose (和光純薬 196-00015)	171.15 g
adjust the volume to 1 L with distilled water	
NI buffer	
NI buffer stock	50 ml
1 M Spermidine (和光純薬 191-13831)	200 μ l
1 M Spermine (和光純薬 198-09811)	50 μ l
2-mercapto ethanol (SIGMA M-7154)	50 μ l

Table 2 Composition of 1.5% low melting point agarose

1 M Tris (pH 9.5) (和光純薬 207-06275)	12 μ l
0.5 M EDTA (pH 8.0) (DOJINDO 345-01865)	24 μ l
distilled water	1164 μ l
InCert Agarose (FMC) (Lonza 50121)	18 mg

Table 3 Composition of Lysis buffer stock for HMW-DNA

Sarkocyl (IBI 06535)	5 g
0.5 M EDTA (pH 8.0) (DOJINDO 345-01865)	200 ml
adjust the volume to 1 L with distilled water	

Table 4 Composition of 1.2×M buffer with BSA

1 M Tris (pH 7.5) (和光純薬 207-06275)	60 μ l
1 M DTT (Roche 604927)	6 μ l
5 M NaCl (和光純薬 191-01665)	60 μ l
0.1% BSA (TaKaRa 1600)	600 μ l
adjust the volume to 5 ml with distilled water	

Table 5 Composition of Agarase I buffer

1 M Tris (pH 7.5) (和光純薬 207-06275)	0.5 ml
0.5 M EDTA (pH 8.0) (DOJINDO 345-01865)	0.5 ml
5 M NaCl (和光純薬 191-01665)	1 ml
adjust the volume to 50 ml with distilled water	

Table 6 Composition of STE buffer

1 M Tris (pH 8.0) (和光純薬 207-06275)	3 ml
0.5 M EDTA (pH 8.0) (DOJINDO 345-01865)	0.6 ml
5 M NaCl (和光純薬 191-01665)	6 ml
adjust the volume to 300 ml with distilled water	

Table 7 Composition of QBT buffer (equilibration buffer)

NaCl (和光純薬 191-01665)	43.83 g
MOPS (DOJINDO 341-08241)	10.46 g
distilled water	800 ml
adjust the pH to 7.0 with NaOH	
isopropanol (和光純薬 166-04836)	150 ml
10 % Triton X-100 solution (v/v) (Alfa Aesar A16046)	15 ml
adjust the volume to 1 L with distilled water	

Table 8 Composition of QC buffer (washing buffer)

NaCl (和光純薬 191-01665)	58.44 g
MOPS (DOJINDO 341-08241)	10.46 g
distilled water	800 ml
adjust the pH to 7.0 with NaOH	
Isopropanol (和光純薬 166-04836)	150 ml
adjust the volume to 1 L with distilled water	

Table 9 Composition of QF buffer (elution buffer)

NaCl (和光純薬 191-01665)	73.05 g
Tris base (和光純薬 207-06275)	6.06 g
distilled water	800 ml
adjust the pH to 8.5 with NaOH	
isopropanol (和光純薬 166-04836)	150 ml
adjust the volume to 1 L with distilled water	

Table 10 *Hind*III digestion mix for vector plasmid

Vector plasmid (pBeloBAC11) DNA	1 µg
10×M buffer (TaKaRa 1060A)	15 µl
<i>Hind</i> III (15 U/µl) (TaKaRa 1060A)	2 µl
adjust the volume to 150 µl with distilled water	
Digestion by 37°C for 5h	

Table 11 5' end dephosphorylation by CIAP

Vector DNA	1 µg
1 M Tris (pH 8.0) (和光純薬 207-06275)	2.5 µl
CIAP (30 U/µl) (TaKaRa 2250A)	1 µl
adjust the volume to 50 µl with distilled water	
Processed by 37°C for 30 min	

Table 12 Composition of SOB and SOC medium

SOB	
Bacto tryptone (BD 211705)	2 g
Bacto yeast extract (BD 212750)	0.5 g
NaCl (和光純薬 191-01665)	0.05 g
1 M KCl (和光純薬 163-03545)	0.25 ml
adjust the volume to 100 ml with distilled water	
SOC	
SOB	1 ml
1 M Glucose (和光純薬 049-31165)	20 µl
1 M MgCl ₂ (和光純薬 135-00165)	10 µl
1 M MgSO ₄ (関東化学 58042-17)	10 µl
prepare right before use it	

Table 13 Composition of LB agar plate (including chloramphenicol solution)

Bacto tryptone (BD 211705)	2 g
Bacto yeast extract (BD 212750)	1 g
NaCl (和光純薬 191-01665)	2 g
Agar (和光純薬 010-15815)	3 g
adjust the volume to 200 ml with distilled water and autoclave	
add 125 µl of chloramphenicol solution (20 mg/ml) below at 60°C and dispense to 20 dishes.	
after fixed, keep at 4°C until use	

Table 14 Composition of LB medium (including chloramphenicol solution)

Bacto tryptone (BD 211705)	10 g
Bacto yeast extract (BD 212750)	5 g
NaCl (和光純薬 191-01665)	10 g
adjust the volume to 1 L with distilled water and autoclave	
add 0.5 ml of chloramphenicol solution (20 mg/ml) below at 60°C and keep at 4°C	
until use (for Glycerol stock: add 80 ml Glycerol)	

結果

ヒゲナガカワトビケラの HMW DNA の単離は、幼虫を用いて行った場合、作製したプラグは上層に非常に細かい茶色の粒が存在し、下層に茶色の塊が沈殿した。このプラグの質と量の確認で、上層には DNA がほとんど含まれていないことが判明したため、下層を用いて完全消化実験を行ったが、十分な消化が行われていなかった。したがって、ヒゲナガカワトビケラ幼虫における BAC 作製は断念し、蛹を用いて BAC 作製を行った。

蛹を用いたプラグにおいて上記のような問題はなく、DNA 抽出と精製、pBeloBAC11 とのライゲーションに成功した。エレクトロポレーション条件の違いによる平均インサートサイズを計測するために、各条件から 32 クローンの BAC-DNA を抽出し、インサートサイズを測定した。条件 A では、3 つが複数のクローンから抽出された DNA である可能性が疑われたため、これらの結果を除外し、29 クローンにおける平均インサートサイズを測定した。平均インサートサイズは、条件 A が 67.42 Kb、B が 71.54 Kb、C が 55.66 Kb で各条件から獲得されたクローン数は 27,664、5,522、9,279 であった (Figure 1, Table 15)。獲得した合計 42,465 のヒゲナガカワトビケラ BAC はクローンのうち、32,256 クローンをストックし、約 2.1 Gb に相当するヒゲナガカワトビケラ BAC ライブラリーを構築した (Table 15)。

考察

本節の研究において、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。蛹において HMW DNA 抽出が成功した要因としては、幼虫と比べて柔らかく、脂肪体が多いため、昆虫体の磨砕がしっかりと行える点と、幼虫と異なり腸の内容物が無いことが推測される (Wu et al 2009)。また、使用する個体数を 1 個体から 3 個体に変更し、より多くの HMW DNA を抽出したことも重要であったかもしれない。

分画 1 よりも大きな DNA 断片を含むはずの分画 2 を用いた条件 C の方が、A、B よりも平均インサートサイズが小さかった (Figure 1, Table 15)。これは、HMW DNA の単離において、他の生物と比較して固形物である茶色い粒が多く残っていたことが原因であると推測される。DNA だけが単離されている場合、プラグに色がつくことはないため、HMW DNA に多くの夾雑物が含まれていた可能性が高い。これが、制限酵素処理や電気泳動において均一な反応を阻害したため、分画 2 の DNA 領域には、物理的な切断末端をもつ DNA が多く、コンカタマーなどの形で滞在した推定サイズよりも短い両末端が制限処理された断片が含まれ、平均インサートサイズの低下を招いたと推測できる。

作製した BAC ライブラリーの総インサートサイズ約 2.1 Gb は、lepbase に登録されている毛翅目昆虫種 *Limnephilus lunatus* のゲノムサイズと比較して約 1.62 ゲノム分に、*Glyptotaelius pellucidus* との比較では、約 3.37 ゲノムに相当した。また、モデル鱗翅目

昆虫カイコ (*Bombyx mori*) との比較においては、約 4.36 ゲノムに相当するため、ヒゲナガカワトビケラのほぼ全ゲノム相当をもつ BAC ライブラリーを構築できたと結論した。作製した BAC ライブラリーから抽出した、任意の BAC-DNA を用いた BAC-FISH を行ったところ、特異的と考えられるシグナルが認められた (data not shown) ため、染色体同定の第一歩が達成できたと考えられる。

Table 15 Basic information about the *Stenopsyche marmorata* BAC library

experimental condition	white colonies	average insert size (Kb)
A	27,664	67.42
B	5,522	71.54
C	9,279	55.66
total	42,465	65.38
stocked	32,256	

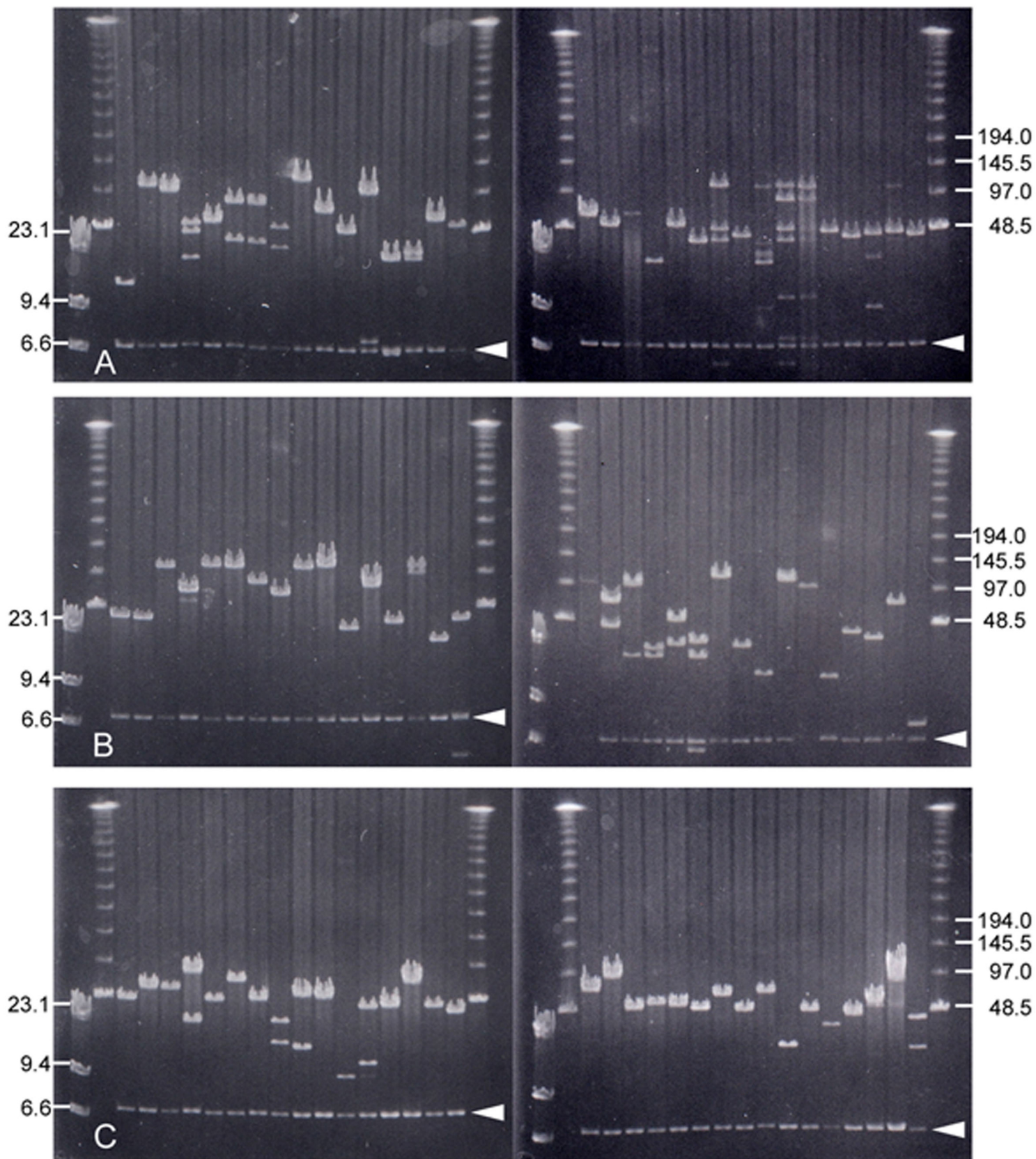


Figure 1 Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of *Stenopsyche marmorata* BAC-DNA digested with *Not* I

Molecular size markers (Kb) are shown to the left and right of the gel photos. Arrowheads indicate the pBeloBAC11 vector DNA (7.4 Kb).

第2節 cDNA ライブラリーの構築と BAC セレクション

ヒゲナガカワトビケラにおける遺伝子情報は、ミトコンドリア遺伝子の配列情報と、silk protein に関与する遺伝子情報がいくつか登録される (Ohkawa et al 2013; Bai et al 2015) に留まり、gene model の構築や EST ライブラリーなどは存在しなかった。そこで、本研究ではヒゲナガカワトビケラの網羅的な遺伝子配列を獲得するために、cDNA ライブラリーを構築した。獲得した cDNA 配列とカイコ単一遺伝子の対応付けを行い、ヒゲナガカワトビケラオルソログを特定した。さらに、第1節で構築した BAC ライブラリーから、これらオルソログを有する BAC クローンの選抜を行った。

材料および方法

1. 供試昆虫

2007年7月25日札幌市南区豊滝の盤の沢川にて採集した成虫のヒゲナガカワトビケラ雄個体の全体を用いた。

2. Total RNA 抽出

抽出は、TRIzol reagent (Invitrogen) のプロトコールに従って行った。10 ml のガラステフロンホモジナイザーを用いて、TRIzol reagent 5 ml 内で虫体組織をホモジナイズし、TRIzol reagent 1 ml に対し、0.2 ml のクロロホルムを加え、ボルテックスにて攪拌後、常温で5分静置した。遠心分離 (13,000 rpm, 15 min, 4°C) 後、上層を新しい 1.5 ml チューブに移し、TRIzol reagent 1 ml に対し 0.5 ml のイソプロパノール (Wako) を加え、よく攪拌後、10分間静置した。遠心 (13,000 rpm, 15 min, 4°C) 後、上清を除去した。80% EtOH を 1 ml 加え、遠心 (13,000 rpm, 5 min, 4°C) し、RNA 沈殿物を風乾後、適量の RNase Free 蒸留水に溶解した。

3. DNase I 処理

抽出した Total RNA は DNase I (TaKaRa) により DNase 処理を行った。反応溶液は Table 16 の組成で行い、37°C で 30 分処理した後に、80°C、2 分で酵素を失活させ、0.1 倍量の 3 M 酢酸ナトリウムと 2.5 倍量の 100% EtOH を加え、遠心 (15,000 rpm, 15 min, 4°C)、上清を除去後、70% EtOH を加え、遠心 (15,000 rpm, 5 min, 4°C) した。RNA 沈殿物を風乾後、適量の RNase Free 蒸留水に溶解した。

4. mRNA 精製

Total RNA から mRNA の精製は、FastTrack MAG mRNA Isolation Kits (Invitrogen) のプロトコールに従って行った。FastTrack MAG Beads をよく混ぜ、1.5 ml チューブに 1 本あたり 2. の RNA 溶解液を 50 µl 移し、1.5 ml チューブを magnetic particle separator (MPS) に設

置した後、数分静置した。上清を除去後、Wash Buffer W7 をチューブ 1 本当たり 200 μ l 加え、MPS から 1.5 ml チューブを外し、ビーズをピペッティングにより懸濁した。再度、1.5 ml チューブを MPS に設置した後、数分静置し、上清を除去した。Wash Buffer W7 をチューブ 1 本当たり 200 μ l 加え、MPS から 1.5 ml チューブを外し、ビーズをピペッティングにより懸濁した。MPS に 1.5 ml チューブを設置し、数分静置した後、上清を取り除いた。1.5 ml チューブ 1 本あたり、Total RNA 200 μ l (約 30~50 μ g) と 65~70°C に温めておいた Binding buffer B6 を 200 μ l 加えた。MPS から 1.5 ml チューブを外し、ビーズをピペッティングにより、懸濁した後、65~70°C で 5 分インキュベーションした後、ロータを用いて常温で 10 分転倒攪拌した。1.5 ml チューブを MPS に設置した後、数分静置した。上清を除去し、Wash Buffer W7 をチューブ 1 本当たり 200 μ l 加え、MPS から 1.5 ml チューブを外し、ビーズをピペッティングにより懸濁することで、ビーズの洗浄を行った。MPS に 1.5 ml チューブを設置し、数分静置した後、上清を除去した。1.5 ml チューブに 1 本あたり 20 μ l の RNase free 蒸留水を加え、MPS から 1.5 ml チューブを外し、ビーズをピペッティングにより懸濁した後、37°C で 5 分インキュベーションした。MPS に 1.5 ml チューブを設置し数分静置した後、上清を新しいチューブに回収した。再度、1.5 ml チューブに 1 本あたり 20 μ l の RNase free 蒸留水を加え、MPS から 1.5 ml チューブを外し、ビーズをピペッティングにより懸濁した後、37°C で 5 分インキュベーションした。MPS にエッペンチューブを設置し数分静置した後、上清を新しいチューブに回収した。回収した 2 つの溶液を合わせて mRNA サンプルとして、濃度測定を行い、EtOH 沈殿によって濃縮を行った。

5. cDNA ライブラリーの作製

cDNA ライブラリーの作製は、CloneMiner II cDNA Library Construction Kit (Invitrogen) に従って行った。

(A) First strand 合成反応

精製した mRNA を DEPC treated water で濃度 200 ng/ μ l になるように調整し、mRNA 10 μ l に 1 μ l の Biotin attB2 Oligo (dt) primer を加え、反応液を 70°C、7 分ヒートショックした後、15 分から 30 分かけて 45°C にした。45°C にした反応液に 5 \times First strand Buffer 4 μ l、0.1 M DTT 2 μ l、10 mM (each) dNTPs 1 μ l の混合溶液を加え、45°C で 2 分静置した。2 μ l の SuperScript III RT (200 U/ μ l) を迅速に反応液に加え、ピペッティングにより緩やかに混ぜ、45°C 20 分、50°C 20 分、55°C 20 分の条件で反応を行った。

(B) Second Stand 合成反応

合成反応は Table 17 の組成で 16°C、2 時間反応させた。反応液に T4 DNA Polymerase 2 μ l を加え、16°C で 5 分反応させ、0.5 M EDTA (pH8.0) 10 μ l を加えて反応を止めた。イソアミルアルコール入りフェノールクロロホルム (TE 飽和フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール=25 : 24 : 1) を 160 μ l 加えて攪拌し、遠心 (15,000 rpm, 5 min, RT) した。上清を新しい 1.5 ml チューブに移し、等量のイソアミルアルコール入りクロロホルム (ク

ロロホルム：イソアミルアルコール=24：1)を加え、攪拌後遠心(15,000 rpm, 5 min, RT)、上清を新しい1.5 ml チューブに移して、Glycogen(20 µg/µl) 1 µl、3 M 酢酸ナトリウム 16 µl、100 % EtOH を 400 µl 加え、遠心(15,000 rpm, 20 min, 4°C)した。上清を除去後、70 % EtOH を 150 µl 加え、遠心(15,000 rpm, 5 min, 4°C)した。室温で 10 分程度風乾した後、DEPC-treated water を 22 µl 加え、cDNA を溶解した。

(C) attB Adapter のライゲーション

(B) で合成した cDNA に、5× Adapter Buffer 10 µl、attB1 Adapter (1 µg/µl) 4 µl、0.1 M DTT 8 µl、T4 DNA Ligase (1 U/µl) 6 µl を加え、よく混合した後、16°C で 16~24 時間反応させ、70°C で 10 分のヒートショックで酵素反応を止めた。

(D) カラムクロマトグラフィーによる cDNA サイズフラクション

cDNA size fractionation columns に TEN buffer(10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 M EDTA, 25 mM NaCl) を 3.2 ml 加えて、洗浄することにより最適化を行い、(C) の反応液 50 µl に 100 µl の TEN buffer を加え、しっかりと混合した。そのサンプルを最適化したカラムに加え、液体が落ちるまで静置し、さらに 100 µl の TEN buffer を加え、静置した。新しいチューブをカラムの下に設置し、240 µl の TEN buffer を加え、カラムを通った液体(cDNA)を回収した。回収した液体に Glycogen (20 µg/µl) 1 µl、3 M 酢酸ナトリウム 25 µl、100% EtOH を 690 µl 加え、遠心(15,000 rpm, 20 min, 4°C)し、上清を除去後、70 % EtOH を 150 µl 加え、遠心(15,000 rpm, 5 min, 4°C)した。室温で 10 分程度風乾した後、TE buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA) を 5 µl 加え、cDNA (attB flanked cDNA) を溶解した。

(E) BP recombination 反応

(D) で作製した attB flanked cDNA 5 µl に pDONRTM 222 (150 ng/µl) を 2 µl、BP ClonaseTM II enzyme mix を 3 µl 加え、25°C で 16~20 時間反応を行った。2 µl の proteinase K (20 mg/ml) を加えた。37°C で 15 分反応させた後、75°C で 10 分のヒートショックを行うことで反応を止めた。反応液に、Glycogen (20 µg/µl) 1 µl、3 M NaOAc 10 µl、100% EtOH を 300 µl 加え、遠心(15,000 rpm, 20 min, 4°C)した。上清を除去後、70% EtOH を 150 µl 加え、遠心(15,000 rpm, 5 min, 4°C)し、室温で 10 分程度風乾した後、TE buffer を 9 µl 加え、cDNA を溶解した。

(F) ElectroMaxTM DH10BTM への Transformation

(E) で調整した cDNA 1.5 µl に 50 µl ElectroMaxTM DH10BTM を加え、ピペッティングでよく混合した。上記の大腸菌と cDNA を氷上で冷やしたエレクトロポレーションの 0.1 cm キュベット (BioRad) に静かに注入し、反応液を 2.5 KV、200 Ω、25 µF の条件でエレクトロポレーションした。1 ml の SOC medium を反応液が入ったキュベットにいれ、ピペット

で試験管に移した。37°C で 1 時間培養し、培養液に同量の sterile freezing media (60% SOC medium: 40% glycerol) を加え、グリセロールストックにした。50 µg/ml kanamycin 含有の LB プレートに、上記グリセロールストック適量をプレーティングし、37°C で一晩培養した。

(G) cDNA の配列決定

(E) で作製した形質転換体をまいたプレートからコロニーをつつき、50 µg/ml kanamycin 含有の LB 培地で培養し、先述した方法 (第 II 章第 1 節 11. BAC ライブラリーの評価) と同様に DNA を抽出した。抽出した DNA は ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) で配列を決定した。

6. カイコ単一遺伝子のヒゲナガカワトビケラオルソログ特定

獲得したヒゲナガカワトビケラの配列データをクエリーにして、カイコのゲノムデータベースである KAIKObase (<http://sgp.dna.affrc.go.jp/KAIKObase>) および Silkbase (<http://silkbases.ab.a.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/index.cgi>) に対して tBLASTx による検索を行うことで、カイコ単一遺伝子に対応するヒゲナガカワトビケラオルソログの特定を行った。

7. BAC セレクション

特定したオルソログの配列データを元に、プライマーを設計し、作製済みの BAC DNA プール (プレートプール, X プール, Y プール) に対して PCR セレクションを行った。特定した BAC は、クロラムフェニコール含有 LB プレート (Table 13) に菌体をまき、シングルコロニーセレクションを行い、陽性反応があったものを該当 BAC とした。

8. セレクション BAC のインサートサイズ

標的オルソログを含んでいる BAC から無作為抽出による、インサートサイズの測定を行い、BAC ライブラリーの平均インサートサイズと相違がないか確認した。インサートサイズの測定は、第 II 章第 1 節の 11. BAC ライブラリーの評価と同様に行った。

Table 16 Composition of DNase I mixture

10× DNase I buffer	5 µl
RNase Inhibitor	0.5 µl
DNase I	2 µl
sample total RNA	42.5 µl
Total volume	50 µl

Table 17 Composition of second strand synthesis reaction

DEPC-treated water	91 µl
5× Second Strand Buffer	30 µl
10 mM (each) dNTPs	3 µl
<i>E. coli</i> DNA Ligase (10 U/µl)	1 µl
<i>E. coli</i> DNA Polymerase I (10 U/µl)	4 µl
<i>E. coli</i> RNase H (2 U/µl)	1 µl
First strand product	20 µl

結果

784 クローンから抽出したプラスミドをサンガーシーケンスした結果、598 のヒゲナガカワトビケラの遺伝子配列を獲得した (DDBJ acc# HX994512-HX995014, LC381309-LC381387, LC384837-LC384852) (Table 18)。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 個獲得した。136 セットのプライマーを設計し、PCR セレクションに使用し、79 プライマーセットで BAC クローンを選抜した (Table 19)。今回獲得された BAC は、81 クローンで 79 個のオルソログを含み、鱗翅目昆虫の基盤染色体 ($n=31$) を網羅した (Table 18)。このうち、46 クローンにおける平均インサートサイズは 82.06 Kb で、最少は 22.5 Kb、最大は 184 Kb であった。

考察

本節の研究において、毛翅目昆虫における初の cDNA ライブラリー構築に成功した。獲得したヒゲナガカワトビケラ cDNA 配列は、カイコのゲノムデータベースとの比較が円滑に行われたことと、獲得されたオルソログ数から、十分な品質であったと結論付けた。染色体同定とそれに引き続き鱗翅目昆虫との網羅的な染色体比較を行うために、鱗翅目昆虫の基盤染色体数 ($n=31$) に対応するヒゲナガカワトビケラオルソログを含む BAC の獲得に成功した。鱗翅目昆虫における各染色体に対応するオルソログを獲得できたため、本研究では、更なる選抜を行わなかったが、100 以上のオルソログをさらに選抜する準備は行った。

選抜した BAC の平均インサートサイズは、平均 82.06 Kb で、選抜を行わず平均インサートサイズを求めた BAC ライブラリーの平均サイズよりも、16.68 Kb も大きかった。これは、インサートサイズが大きいものほどオルソログを含む可能性が高くなり、オルソログを含んでいないインサートサイズが小さいものが除外されるためだと推測される。実際、オルソログを含んでいる BAC の最小値は 22.5 Kb に対して、ライブラリーでは 8 Kb であった。

本節において獲得した BAC を用いることで、BAC-FISH マッピングによる毛翅目昆虫の染色体カリオタイピング、姉妹系統間における染色体比較が可能となることから、毛翅目昆虫における染色体研究の基盤形成がなされたと言える。

Table 18 Characteristics of the selected *Stenopsyche marmorata* BACs and *Bombyx mori* orthologs carried by them

DDBJ accession #	BAC code	insert size (Kb)	<i>B. mori</i> chromosome*	KAIKObase		Silkbase	
				<i>B. mori</i> orthologue	location (bp)	GeneID: KWTBOMO	location (bp)
LC381309	64C13	100.0	Z	AK379027	6,611,934..6,623,391	00191	6,126,863..6,147,892
LC381310	57M19	nd**	Z	NM_001043382.1	8,533,563..8,553,627	00238	8,035,471..8,055,380
LC381311	05J09	nd	2	unidentified	6,547,749..6,556,280	00876	5,384,271..5,401,943
LC381312	81A19	nd	3	NM_001048238.1	3,690,571..3,692,889	01148	3,354,342..3,356,687
LC381313	65J17	54.0	3	BGIBMGA00900	9,720,106..9,701,984	01328	8,033,514..8,023,000
LC381314	74D11	nd	4	AK388536	571,624..560,278	01630	585,771..572,788
LC381315	63I03	95.5	4	BGIBMGA00616	5,621,591..5,654,163	01820	5,621,222..5,653,832
LC381316	65C08	nd	4	NM_001134255.1	6,506,599..6,558,774	01860	6,603,762..6,626,093
LC381317	56I20	113.0	4	NM_001043661.1	10,813,131..10,815,998	02006	9,808,363..9,812,757
LC381318	43H13	nd	4	NM_001043911.1	13,061,963..13,066,027	02081	11,651,397..1,1647,379
LC381319	60G04	51.0	5	BGIBMGA00259	5,494,261..5,501,925	02525	4,834,652..4,865,390
LC381320	63I06,	nd	5	NM_001046699.1	8,319,619..8,325,553	02638	7,682,768..7,688,472
LC381321	44L05	nd	6	BGIBMGA01364	1,633,752..1,626,061	03196	1,208,732..1,203,714
LC381322	70B18	78.0	7	NM_001043446.1	8,643,028..8,632,391	03987	7,588,510..7,577,888
LC381323	26D04	100.0	7	BGIBMGA01027	10,337,470..10,355,662	04027	9,179,451..9,286,022
LC381324	38L02	154.5	7	NM_001098327.1	14,448,339..14,445,589	04144	12,407,347..12,388,240
LC381325	07N23	nd	8	NM_001046942.1	8,172,400..8,173,980	04457	7,004,715..7,006,160
LC381327	53G06	66.0	8	AK382309	11,723,115..11,718,448	04604	1,0623,766..10,619,096
LC381328	41E21	nd	8	BGIBMGA00549	11,768,458..11,784,494	04611	10,667,447..10,685,733
LC381326	56L04	nd	8	AK386306	15,351,712..15,371,972	04710	13,064,220..13,085,098
LC381329	66H01	130.0	8	AK385623	17,164,196..17,181,897	04768	14,492,053..14,474,590
LC381330	43I22,	nd	9	AK378870	1,248,924..1,230,092	04904	1,310,449..1,288,622
LC381331	81H06	nd	9	NM_001047044.1	9,508,310..9,500,529	05092	7,773,873..7,766,088
LC381332	66P21	70.5	9	AK382411	15,602,218..15,615,637	05297	13,281,968..13,295,293
LC381333	38D13	54.0	10	NM_001043764.1	8,685,325..8,679,748	5675	7,868,767..7,863,095
LC381334	83B02	59.7	10	BGIBMGA00683	9,112,516..9,094,831	05693	8,303,521..8,282,243
LC381335	43G07	102.0	11	AK383215	330,233..395,524	06100	340,565..405,889
LC381336	74D17	nd	11(29)	AK384105	5,778,613..5,759,910	06354	5,424,687..5,407,309
LC381337	65M23	nd	11(29)	AK378298	6,764,889..6,761,027	06404	6,484,960..6,480,249
LC381338	58F07	93.5	11(29)	NM_001043706.1	10,600,102..10,583,121	06524	9,792,719..9,776,551
LC381339	43O23	nd	11(29)	NM_001046779.1	12,708,934..12,708,229	06633	11,940,681..11,940,181
LC381340	40B04	108.7	12	BGIBMGA01043	3,469,208..3,462,430	07083	3,257,347..3,250,407
LC381341	65A08	nd	12	FS761847	4,293,723..4,267,809	07094	4,087,153..4,080,218
LC381342	64F12	83.5	13	NM_001046756.1	893,544..903,244	07588	961,852..967,529
LC381343	62E07	101.0	13	AK386724	2,202,107..2,225,159	07620	1,815,810..1,832,924
LC381344	63E05	22.5	13	BGIBMGA00088	5,634,810..5,647,466	07724	5,346,792..5,364,426
LC381345	56C04	64.5	13	NM_001112752.1	10,927,160..10,917,999	07943	10,632,074..10,620,359
LC381346	65A23	92.2	14	BGIBMGA00949	1,800,999..1,805,777	08192	1,513,840..1,532,293
LC381347	61M07	125.0	15	NM_001043673.1	2,912,132..2,916,752	08699	2,869,116..2,873,720

LC381348	68G24	nd	15	NM_001043676.1	9,127,595..9,130,339	08983	9,198,022..9,200,991
LC381349	47J20	51.0	15	AK385784	13,440,221..13,424,589	09174	12,637,715..12,626,732
LC381350	68N10	nd	15	BGIBMGA00339	13,952,971..13,961,637	09200	13,157,114..13,166,356
LC381351	75J17	94.0	16	NM_001098296.1	4,033,955..4,020,319	09553	4,106,035..4,089,144
LC381352	60F18	55.0	17	NM_001044191.1	4,290,839..4,298,832	10208	5,005,638..5,013,552
LC381353	67M12	90.5	17	BGIBMGA00393	18,219,796..18,217,829	10635	16,678,685..16,650,354
LC381354	52E13	55.0	18	AK384406	3,335,273..3,333,112	10791	3,006,847..3,004,945
LC381355	51I20	nd	18	NM_001043387.1	12,671,134..12,665,771	11083	12,390,846..12,385,248
LC381356	44C17	110.0	18	NM_001098359.1	13,075,746..13,065,697	11096	12,805,715..12,793,570
LC381357	44J07	57.0	19	AK384051	5,823,114..5,820,749	11486	6,758,026..6,754,884
LC381358	11J14	nd	19	NM_001170394.1	12,812,041..12,802,449	11731	12,854,223..12,844,940
LC381359	75K23	98.5	20	NM_001043670.1	5,002,210..4,998,502	11985	4,780,188..4,776,159
LC381360	67D07	nd	21	BGIBMGA00154	11,014,449..11,038,935	12602	9,080,990..9,136,064
LC381361	65E17	nd	21	AK385011	17,293,274..17,285,909	12770	14,078,053..14,074,572
LC381362	40P12	nd	22	NM_001043610.1	4,689,299..4,684,662	12902	3,854,601..3,849,823
LC381363	52H05	nd	22	BGIBMGA00037	9,666,151..9,654,878	13128	8,929,270..8,900,009
LC381364	66C17	nd	22	BGIBMGA00471	16,518,633..16,512,868	13287	12,912,860..12,907,034
LC381365	52M10	nd	23	BGIBMGA01095	3,075,341..3,074,130	13605	2,588,103..2,583,333
LC381366	40N14	184.0	23	AK378894	4,228,005..4,263,481	13628	3,411,392..3,418,559
LC381367	83B04	nd	23	AK384024	15,189,112..15,198,321	13925	13,792,928..13,829,973
LC381368	51H17	37.5	23	AK383230	16,097,208..16,092,549	13963	14,742,377..14,740,825
LC381369	46J08	52.0	23(30)	NM_001046958.1	19,202,693..19,194,588	14098	17,869,692..17,860,167
LC381370	65M05	103.0	23(30)	AK382720	20,600,903..20,589,044	14146	19,238,795..19,227,024
LC381371	76D08	33.4	23(30)	NM_001171915.1	20,887,167..20,894,029	14160	19,518,680..19,525,754
LC381372	77M23	66.0	23(30)	NM_001043790.1	21,055,045..21,060,438	14169	19,689,420..19,694,897
LC381373	71L17	40.5	24(31)	NM_001172723.1	6,345,720..6,330,624	14417	5,665,433..5,659,891
LC381374	70F06	nd	24(31)	AK384334	8,229,869..8,223,300	14479	7,557,508..7,554,940
LC381375	56D05	74.0	24	NM_001044115.3	13,271,275..13,257,577	14600	11,091,510..11,078,134
LC381376	79N22	nd	24	BGIBMGA01214	17,184,560..17,214,882	14826	15,875,187..15,890,342
LC381377	70H22	nd	24	NM_001046871.1	17,462,853..17,471,473	14845	16,237,551..16,245,822
LC381379	78B16	63.9	25	BGIBMGA00485	4,239,809..4,248,631	15060	3,786,362..3,777,698
LC381380	51H09	56.5	25	NM_001043379.1	8,544,709..8,533,314	15224	7,129,623..7,119,011
LC381381	38I12	nd	25	AK385514	9,939,571..9,931,495	15293	8,486,842..8,478,876
LC381378	40C02	111.0	25	BGIBMGA00513	10,820,044..10,832,614	15333	9,436,115..9,418,886
LC381382	43G12	nd	26	BGIBMGA01076	770,935..749,672	15497	808,275..731,166
LC381383	40C01	101.0	26	AK382127	2,338,357..2,331,175	15547	2,283,709..2,276,786
LC381384	37E10	59.5	27	NM_001043844.1	10,599,890..10,592,929	16492	7,719,059..7,708,186
LC381385	38D20	111.2	27	NM_001043411.1	12,584,732..12,582,179	16087	8,751,393..8,749,005
LC381386	64P23	nd	28	NM_001126252.1	9,944..11,074	16159	106,026..107,250
LC381387	70E02	69.0	28	BGIBMGA01388	3,929,608..3,921,595	16288	4,056,361..4,041,861

* number in parentheses indicate corresponded to chromosome numbers of lepidopteran species that karyotype numbers are n=31 (see Sahara et al 2013)

** not determined

Table 19 *Stenopsyche marmorata* accession numbers of ESTs and primer pairs used for BAC selection

DDBJ accession #	BAC code	forward primer	reverse primer	Product size (bp)
LC381309	64C13	AGAAAGTATCGGTCACAAT	TCTAAGGGGTCGCTGGAA	236
LC381310	57M19	GCACACATCTCGTTTAT	CAGTACAAAGACGACAGC	335
LC381311	05J09	CAGTACAGCACAAAGAAGGA	ATAGCAATAAAGACCAAAAA	351
LC381312	81A19	TCTCAGTCGCTTCTCA	ATGGGATTAGTGTGTT	166
LC381313	65J17	GACGGACCAACGCTACA	TGCTTCGGGAGGATAAT	144
LC381314	74D11	AGCAGTTCTATCTCCATC	CAAATCCATCAATCCTT	272
LC381315	63I03	GCAAAACACAAAGAAAG	ATCCCTCAATACAGCAT	239
LC381316	65C08	AATCCAGGTAATCCAAC	CTGCTTCCACTTCACCT	299
LC381317	56I20	TCAAGCAGAGAGAAAGA	TCAATCAGGAGCGAACACG	133
LC381318	43H13	CTTCTCGCATTTCTCATC	TCTTGTCCTCGCTGGTG	284
LC381319	60G04	CGGCAACTCTGGTAATGA	AGTTGGTTTGCCTGCTC	168
LC381320	63I06, 63P18	TCGCAGTGTGGTTGGT	AAGACGAGAGAAGTTGAG	175
LC381321	44L05	TGCTTTATGGACTGCTGT	ACTTTGGTTTGCTTTCTT	512
LC381322	70B18	GATTGAATGCTGCCGAAAC	ACTACACCATACACTCCTG	219
LC381323	26D04	GGATTATGAAGACGAGTG	CAGCAGAAGGACAAACAG	443
LC381324	38L02	GCCGACATAAACCTCTA	GTGTGAATGCTCCCAAGTA	453
LC381325	07N23	TCCTTCAAGCCCTCCTAA	GCCAATCTTTTCCCTCAT	107
LC381327	53G06	GAAGCCCGTCCGAGACT	CCGAGCGTGTATAAAA	165
LC381328	41E21	TTCGGAGATAGCGTTTA	CTCTGAATGGATGACA	362
LC381326	56L04	GTGTTTCTCCAGGTTGA	TCCACTTCCCGACTAT	244
LC381329	66H01	GAGAAAACCCCAAGG	GATTCCACAGCGTAGTC	148
LC381330	43I22, 43L09	AAGAGATGTGCTGAAGC	TGACGAGTGGAATAAACCC	263
LC381331	81H06	GCTCCGCTGCTTATGCTG	CACTTTGACTTTTCTTTG	237
LC381332	66P21	CATCTCTGCTCAACAAA	ATCATCTTCTGTGTCGTC	151
LC381333	38D13	TTCCACAACAGCATCACAT	GTAATCTTTCTCCAATCG	305
LC381334	83B02	GCCTTTTATTGAGACATTT	ACAGAACCGACCGATTTA	283
LC381335	43G07	TGGATGTATTGTGATTGTGC	AAGATTGAACGATGGATT	247
LC381336	74D17	CAGGGATTGAAGTGATT	AAGTGGATATTGAGGAA	273
LC381337	65M23	TAATAGTTGGTTCTCTTGA	CGGTTTGGTTCTCTTTC	776
LC381338	58F07	TCGGTTTGGAAAGAAGATA	CAGATGTTGTTTGAAGTTT	190
LC381339	43O23	CAAAATACCCCGACAGAG	TCACGAAAGAAGAACAGC	173
LC381340	40B04	TGCCTTTGTACCTTCAC	ACATCCTTCCATCGTTTG	733
LC381341	65A08	GCACACAGCGGAAGAACT	GTAACGGGACACGGAAAG	167
LC381342	64F12	ATCAATGAATGGCGTAA	GGTTTGTGTGCTCTCTT	279
LC381343	62E07	TTATGAAACAACAAGGACA	TGGCACTGAACCTGAACACC	180
LC381344	63E05	AAACAAATGGACACATAA	TGAGGAAGATGATAAGCA	296
LC381345	56C04	AAGTGGCGTCGTCATAA	AAGTGGTACTGGTGAT	464
LC381346	65A23	CGAAAGTATTAGAAGGAA	ATGACGAAGGAGTGAGAT	266

LC381347	61M07	CGGAACAAACACAGTCAC	GGCATAACGAGGTAAGA	327
LC381348	68G24	GCACCTTTAGCCGTAGT	GTGCTTGGATGTTTCA	347
LC381349	47J20	TGTTTATTGGGATGCTT	AGGACACGGTTTCTTCA	243
LC381350	68N10	CAACGACGAGAAACAAAC	GCAACATACAAAGTGA	373
LC381351	75J17	CAACAAGAAAGGAATCA	CACATCGACTGCTAAA	185
LC381352	60F18	GAGTTTGATTGCTGACA	AGAGATGAAGGATTTGG	266
LC381353	67M12	GTCACCTCCGCCACCAG	GCATCGCTCAATAAACG	275
LC381354	52E13	CATAAAATAAGGGAAGAT	CACATAAGAGTTGAAGCA	339
LC381355	51I20	TGGAGGGGTCAAGATT	TTAGTTCGGCAGATTT	101
LC381356	44C17	ACTGTCGGTATGTTGAGAAA	GCTGAGTTGGTAGAGGATGT	138
LC381357	44J07	TACGATACCAAGAACGAC	CGCAGAGTAATGAAACC	813
LC381358	11J14	ATTCAATTGGCATCTCC	AGCCTTTTGTCAGTTG	284
LC381359	75K23	GTAAAAGGAGGGATGCT	GTCGGGATGTAATAGT	418
LC381360	67D07	CCTGCTCTTCTTTGCTC	CTCTATCGGGCTTGGTTA	208
LC381361	65E17	CCTTCCTCCACTTGCTC	TCTGCCGTATCTTGTC	244
LC381362	40P12	CGATTCTATGCCCTTGTC	GGGATTACGATGAGTG	318
LC381363	52H05	CTGAGCAACGAGAGAAA	CGAGGAACCAATGACAA	545
LC381364	66C17	ATTCCGCTCGTGCTATC	ACTCCTGCCCTTGCTTT	358
LC381365	52M10	CCGAGAGTTACGAGATG	GCAGCCTTGATGAGTGG	167
LC381366	40N14	TCACGCAGAGGCATT	TTCACATCGCTCACAA	315
LC381367	83B04	ACGAAAGTCATCACGAAGC	TCATTGGGAAGAAGAAGTT	419
LC381368	51H17	GCATTCACTCGTCAC	CGGTTCCGGCTTCTATCAA	138
LC381369	46J08	TACACAGGATGGAGAT	GATAATGGTTCGCACAGT	615
LC381370	65M05	TAGGAGAAAGGTGAAGGAG	TAAAAACAGGATGAGCAG	357
LC381371	76D08	GGAGGAGCAGGTTTACT	GGGTTGCAATGTCTT	257
LC381372	77M23	CCACTGACGGTTACTTGT	TCCTCTTACGGATTCTAC	ca. 900
LC381373	71L17	AATCTCATCTTTGCGTTTG	AATACTTTTCTTCGTGIG	181
LC381374	70F06	ACGGTGGTCATTTTGT	CTGCTCTTGCGGTTTTA	290
LC381375	56D05	AAGCGTTGAGATTGGAAA	TCAGAAAGATGGACAGTT	254
LC381376	79N22	TTATCCATCGCTTTCCA	CGCTCTGTTTCTCTTGT	343
LC381377	70H22	CTTGCTATCTCGTGCTA	GAAATCTTGTGGACCTA	ca. 1100
LC381379	78B16	GGGTGATGCTACGATAAA	ATTGCGGATACAGACTAA	230
LC381380	51H09	GCTCATTTGCCGTATCAC	GACTTGGGCTTCTGGA	258
LC381381	38I12	GCAGTTTATTCCATCAA	GTTCTTCTTCGGTAGCC	242
LC381378	40C02	TTTAGGATTGAGAACTGA	AAGCATTATCGGGAAGAC	371
LC381382	43G12	CAACCAAGGGAAAATGAG	CGACGGCAAGACAGAAAA	126
LC381383	40C01	GGTATTCGTATCACTCC	CTCCGTTCACTCTCTGT	300
LC381384	37E10	CATCTGGCATCCGACAT	TGAGGTGAAAGCAAAAG	306
LC381385	38D20	ATCTCGCCGTCAAACAT	TGGTCTTCATTCTGGTG	492
LC381386	64P23	ATACGCTACAGGAAACATA	TAAAACCAAGCAAAACG	494
LC381387	70E02	GAAACCTAGAACACGAAG	GCCATCCGATACAAGAAGT	219

第Ⅲ章 ヒゲナガカワトビケラの BAC-FISH マッピング

序論

分散動原体型染色体構造を有している生物 (Melters et al 2012) の中で初となるカリオタイプリングはカイコ (*Bombyx mori*) において達成された (Yoshido et al 2005)。これは、鱗翅目昆虫に適用された BAC-FISH 法の成果であり、その後の研究進展は、異種間における染色体比較 (Yoshido et al 2011b; Yasukochi et al 2016)、近縁種間におけるクロスハイブリダイゼーションを用いた染色体比較 (Yasukochi et al 2009; Sahara et al 2013)、性染色体進化解析 (Nguyen et al 2013; Yoshido et al 2013; 2016; Šíchová et al 2015; 2016)、染色体異常の同定 (Ito et al 2016)、機能遺伝子のマッピング (Yasukochi et al 2004; 2011; 2018; Yoshido et al 2011a) および共生微生物との共進化解析 (Kageyama et al 2017) など多岐にわたる。鱗翅目昆虫における FISH 法を毛翅目昆虫にも適用することで、毛翅目昆虫における染色体研究を分子細胞遺伝学的な解析が可能なレベルに押し上げ、姉妹系統間の染色体進化解明に寄与することを目論んだ。この章では、第Ⅱ章において獲得した BAC を用いて、ヒゲナガカワトビケラにおける BAC-FISH を確立するとともに遺伝子マッピングを行った。第 1 節において、ヒゲナガカワトビケラにおけるカリオタイプリングを行い、第 2 節で、BAC-FISH マッピングによるヒゲナガカワトビケラとモデル鱗翅目昆虫カイコとの染色体比較を行なった。第 3 節は、ヒゲナガカワトビケラの同属別種であるチャバネヒゲナガカワトビケラを対象に、クロスハイブリダイゼーションを用いた BAC-FISH マッピングを行い、2 種間の染色体比較を行った。

第 1 節 染色体カリオタイプリング

多動原体型染色体を持つ生物のカリオタイプリングは、FISH 法を用いて鱗翅目昆虫のみに留まっている。これまでにカリオタイプリングが達成された種も、カイコ (*B. mori*)、タバコスズメガ (*Manduca sexta*)、エリサン (*Samia cynthia ricini*) の 3 種のみである。本研究では、多動原体型染色体を持つ生物グループで第 2 となり、毛翅目昆虫では初となるカリオタイプリングに挑戦した。

材料および方法

1. 供試昆虫

本節の研究に用いたヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) は、2012 年 6 月 11 日に盛岡市玉山区栗木田官代沢、2013 年 5~6 月に盛岡市上ノ橋付近の中津川にて採集した幼虫と蛹である。

2. 染色体標本作製

雄は化蛹直後の体色が薄い青緑色の個体、雌は終齢幼虫が蛹になる直前の体長が短縮化して各体節が太く、やや緑色化している時期の個体をそれぞれ選択して染色体標本作製した。スジコナマダラメイガ (*Epehestia kuehniella*) 生理食塩水 (Table 20) 中において体腔中より精巣または卵巣を抽出し、低調液 (75 mM KCl) 中で1時間低調処理を行い、カルノア液 (エタノール：クロロホルム：酢酸=6：3：1) にて10分間固定した。固定した細胞は、Traut (1976) に準じ、60%酢酸中で溶解させながら 45°C の HOT PLATE HP-4530 (12401-001, AS ONE) 上に置いたスライドガラス (1-6724-01 5116 ホワイト, アズワン株式会社) に広げ、風乾して染色体標本作製した。なお、スライドガラスは前処理として 1% HCl/100% EtOH 溶液に常温で30分以上処理した後、キムワイプで拭きとり HOT PLATE HP-4530 上で乾燥させて用いた。作製した染色体標本は、位相差顕微鏡 (OLYMPUS BX51, OLYMPUS) 下で染色体標本を観察することで評価を行った。最後に 70%、80%ならびに 100 %のアルコールシリーズにて洗浄、風乾した後、-20°C にて使用時まで保管した。染色体標本作製に使用後の個体は、-80°C に冷凍保存した。

3. ゲノム抽出、精製ならびにコンペティター作製

ゲノム DNA (gDNA) 抽出には、上記冷凍個体を用いた。乳鉢と乳棒を用いてヒゲナガカワトビケラの幼虫または蛹を液体窒素中にて粉碎し、1 g 当たり 20 ml の Lysis Buffer (Table 21) に溶解し、20 mg/ml の Proteinase K (160-14001, 和光純薬) を最終濃度 100 µg/ml になるように加え、HYBRIDIZATON INCUBATOR HB-80 (TAITEC) の中に設置した mini チューブローター (FISHER SCIENTIFIC) を用いて 37°C で over night の攪拌を行った。Lysis Buffer と同量の TE 飽和フェノールを加え HYBRIDIZATON INCUBATOR HB-80 の中に設置した mini チューブローターを用いて 25°C で 10 分攪拌後、遠心分離 (8,000 rpm, 10 min, RT) し、上清を回収した。分離層にタンパク質の層が多く見られるときは再度 TE 飽和フェノール処理を繰り返した。上清と同量のイソアミルアルコール入りフェノールクロロホルム (TE 飽和フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール=25：24：1) を加え、同様に 25°C で 10 分攪拌した後、遠心分離 (8,000 rpm, 10 min, RT) し、上清を回収した。TE 飽和フェノール処理時と同様に分離層にタンパク質の層が多い場合は、処理を繰り返した。上清と同量のイソアミルアルコール入りクロロホルム (クロロホルム：イソアミルアルコール=24：1) を加え、25°C で 10 分攪拌した後、遠心 (8,000 rpm, 10 min, RT) し、上清を回収した。回収した上清に 1/10 倍量の 3 M 酢酸ナトリウム、0.7 倍量のイソプロパノールを加え、転倒攪拌後、遠心分離 (14,000 rpm, 30 min, 7°C) を行った。上清をデカントによって除去し、70 % EtOH を加え遠心 (14,000 rpm, 15 min, 7°C) によりペレットをリンスした。風乾後、TE を加えて 30 分攪拌し、TE の 1/1000 量の 10 mg/ml RNase (R5503, Sigma-Aldrich, 20 分間煮沸処理済み) を加えて、37°C で 2 時間静置した後に、Proteinase K (20 mg/ml) を

同量加え、50°C で 2 時間静置した。TE と同量の TE 飽和フェノールを加え、HYBRIDIZATON INCUBATOR HB-80 の中に設置した mini チューブローターを用いて 25°C で 10 分撹拌した後、遠心分離 (8,000 rpm, 10 min, RT) し、上清を回収した。上清と同量のイソアミルアルコール入りフェノールクロロホルム (TE 飽和フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール=25：24：1) を加え、同様に 25°C で 10 分撹拌した後、遠心分離 (8,000 rpm, 10 min, RT) し、上清を回収した。上清と同量のイソアミルアルコール入りクロロホルム (クロロホルム：イソアミルアルコール=24：1) を加え、25°C で 10 分撹拌した後、遠心 (8,000 rpm, 10 min, RT) し、上清を回収した。回収した上清に 1/10 倍量の 3M NaOAc、2.5 倍量の 100%EtOH を加え、転倒混合後、遠心 (14,000 rpm, 15 min, 7°C) した。上清をデカントで除去し、DNA ペレットを 70 % EtOH にてリンスして、さらに遠心 (14,000 rpm, 10 min, 7°C) を行った。70 % EtOH を完全に除去し、風乾したペレットの大きさに合わせて TE を加え、冷蔵庫で over night 静置して完全に溶解させた。溶解後、Quantus FLUOROMETER (Promega) により DNA 量と濃度を測定した後、使用まで -20°C にて保存した。また、後述する FISH のコンペティターとして用いるために、一部の gDNA を超音波破碎装置 VP-15S (TAITEC) を Duty cycle 50 %, Tune 4.5 にセットして、3 秒間破碎後、1 分間氷で冷やした。これを 5 セット行うことで gDNA を破碎した。また、十分に破碎されているかを確認するために、 λ -HindIII digest をマーカーとして用いて、1%アガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイドに 20 分間浸透し、UV 照射下で写真を撮影することで、gDNA が 1 Kb 程度に破碎されていることを確認した。

4. BAC-DNA の抽出と精製

第 II 章において選抜した BAC をクロラムフェニコール添加 LB 培地 (Table 13) 2 ml に植菌し、Bio Shaker BR-23FH (TAITEC) を用いて 37°C で 2~3 時間振盪培養後、200 ml バッフル付き三角フラスコにて 100 ml にスケールアップし、Bio Shaker BR-23FH を用いて、37°C で 14~16 時間、再度振盪培養を行った。また、グリセロールストックがあるものに対しては、200 ml バッフル付き三角フラスコにクロラムフェニコール添加 LB 培地 100 ml にグリセロールストックを 30 μ l 加えた後、37°C で 14~16 時間 Bio Shaker BR-23FH を用いて振盪培養を行った。LB 培地が白濁し、十分に菌体が増えているのを確認後、遠心分離 (6,000 rpm, 10 min, 4°C) で集菌し、QIAGEN Plasmid Midi Kit (12245, QIAGEN K.K.) または Genopure Plasmid Midi kit (03 143 414 001, Roche) のプロトコールに従い BAC-DNA の抽出と精製した。また、一部をグリセロールストックとするため、1 ml の 8 %グリセロール含有クロラムフェニコール (20 μ g/ml) 添加 LB 培地に植菌し、over night 培養後、-20°C にて保存した。

QIAGEN Plasmid Midi Kit を用いた場合は、第 II 章 1 節の 7. ベクタープラスミドの調整にて記述したとおり行った。

Genopure Plasmid Midi kit を用いた場合には、5 ml の RNaseA (120 μ g/ml) 含有 Suspension Buffer に集菌した菌を完全に懸濁し、5 ml の Lysis Buffer を加え 5~7 回強く転倒撹拌後、5 ml

の Neutralization Buffer を加え 5~7 回転倒攪拌し、遠心分離 (10,000 rpm, 30 min, 4°C) 後、上清を回収した。この上清は、2.5 ml の Equilibration Buffer で平衡化した NucleoBond AX 100 Columns に通した。通した上清を集め、同じ NucleoBond AX 100 Columns に再び上清を通した。4 ml の Wash Buffer をカラムに 3 回通し洗浄後、50°C に温めた Elution Buffer を 2.5 ml ×2 回カラムに通して DNA を溶出した。溶出した DNA 溶液に 0.7 倍量のイソプロパノールを加え、遠心分離 (10,000 rpm, 30min, 7°C) を行い、上清を捨て、70% EtOH を 5 ml 加えリンスして遠心分離 (10,000 rpm, 15 min, 7°C) 後、上清を捨て、ペレットを乾燥させ、完全に EtOH を除去した後に 400 µl の TE を加え Bio Shaker BR-23FH を用いて、37°C で 2 時間振盪または、冷蔵庫 (4°C) でペレットが TE に溶解するように傾け静置して over night 溶解させた。この DNA 溶液を 1.5 ml チューブに移し、0.1 倍量の 3 M 酢酸ナトリウムと 2.5 倍量の 100% EtOH を加え、遠心 (14,000 rpm, 10 min, 7°C) を行った。上清を除去後、70 % EtOH を 1 ml 加えリンス後、遠心分離 (14,000 rpm, 10 min, 7°C) を行い、上清を除去した後、ペレットを風乾させ、完全に EtOH を除去した後に 30~50 µl の TE に溶解して Quantus FLUOROMETER により DNA 量と濃度を測定した後、プローブ作製に用い、残りは使用するまで -20°C で保存した。

5. ラベリング

Nick Translation Kit (32-801300, Abbott) のプロトコールに従ってラベリングした。Kit を使用しない場合には、*E. coil* DNA polymerase I (5 U/µl, 2130A, TaKaRa) と RNase free Recombinant DNase I (5 U/µl, 2270A, TaKaRa) を用いて Enzyme Mix を自作してラベリングを行った。標識は Orange-dUTP (02N33-050, Abbott) , Green-dUTP (02N32-050, Abbott) , Red-dUTP (02N34-050, Abbott) および Cy5-dUTP (PA55022, GE-healthcare) を用いたダイレクタラベルで行った。これら dUTP は 10×dNTP mix (Table 22) に調整して用いた。

(A) Nick Translation Kit (32-801300, Abbott)

BAC-DNA 500 ng あたり反応液量は 25 µl (Table 23) でラベリングを行った。10×dNTP Mix は high (Table 22) を使用した。反応液を調整した後、サーマルサイクラー (PCR Thermal Cycler Dice, TaKaRa もしくは PCR System 9700, GeneAmp®) を用いて 15°C で 5 時間反応後、10 分間 70°C 処理して反応を停止させた。

(B) 自作 Enzyme Mix

RNase free Recombinant DNase I (5 U/µl, 2130A, TaKaRa) を DNase I dilution buffer (Table 24) を氷上で穏やかに混合し、DNase I を 0.1 倍に希釈する。希釈済み DNase I と *E. coil* DNA polymerase I (5 U/µl, 2270A, TaKaRa) を氷上で Enzyme Mix buffer (Table 25) と穏やかに 5~10 回ピペッティング混合し、Enzyme Mix とした (Table 26)。これらは使用時まで -20°C で保管した。BAC-DNA 500 ng あたり、25 µl の反応液量 (Table 27) でラベリングを行った。10

×dNTP Mix は normal (Table 22) を使用した。反応液を調整した後、サーマルサイクラー (PCR Thermal Cycler Dice もしくは TaKaRa; PCR System 9700, GeneAmp®) を用いて 15°C で 5 時間反応後、10 分間 70°C 処理して反応を停止させた。

6. FISH

(A) プレパラートの処理と染色体の変性

-20°C に保存された染色体標本 (プレパラート) を 70%、80%、100% EtOH にそれぞれ 30 秒通して完全に風乾させた。その後、Denature buffer (Table 27) 200 µl をアプライし、24×50 mm のカバーガラス (24501, MATSUNAMI) を被せて 72°C の Heating plate (HP-4530 アズワン) 上で 3 分 30 秒染色体を変性させた。反応終了後、速やかにカバーガラスをスナップにてはずし、コプリンジャーに入れた -20°C の 70% EtOH に浸けて急冷し、常温の 80%、100% EtOH にそれぞれ 30 秒ずつ通して完全に風乾した。

(B) プローブ DNA の変性

スライド 1 枚につき、ダイレクトラベルしたプローブ DNA は各 250 ng ずつ用いた。コンペティターとして超音波破碎した各昆虫体のゲノム DNA 2~10 µg と 25 µg Deoxyribonucleic acid, single stranded, from salmon testes (D9156-1ML, SIGMA-ALDRICH) を混合し、全体溶液量の 0.1 倍量の 3 M 酢酸ナトリウムを加えて混合した。2.5 倍量の 100 % EtOH を加え、遠心 (15,000 rpm, 20min, 4°C) にてエタノール沈殿を行い、上清を除去した。ペレットに 70% EtOH を 200 µl 加えリンスして、遠心 (14,000 rpm, 10 min, 4°C) 後、上清を除去した。ペレットを 37°C にて 5 分間風乾した。5 µl のホルムアミド (F7503, SIGMA-ALDRICH) を加え、室温で 30 分間 Micro Mixer E-36 (TAITEC) を用いて振盪懸濁した。ペレットの溶解を確認後、5 µl の 20% dextran sulfate (SIGMA-ALDRICH) を加え、30 分間 Micro Mixer E-36 (TAITEC) を用いて振盪混合した。このプローブ溶液を 90°C で 5 分間処理して熱変性させ、5 分間以上水中にて急冷した。プローブ溶液は使用前に遠心 (14,000 rpm, 2 min, 4°C) し、沈殿を除いて以下の通り使用した。

(C) Hybridization

変性させたプレパラートに上記プローブ溶液をアプライし、24×32 mm のカバーガラスを被せた。カバーガラスの周囲をペーパーボンド (KOKUYO) で固定し、2×SSC もしくは滅菌水で湿度を保った密閉容器に入れ、37°C で 72 時間程度ハイブリダイズを行った。2×SSC は 20×SSC を滅菌水で希釈して調整した (Table 29)。

(D) Post hybridization wash とプレパラートのカウンター染色

ハイブリダイズしたプレパレーションから、ペーパーボンドをはがしてカバーガラスをはずし、常温の 1% Triton-X/0.1×SSC 溶液にて数分間洗浄後、ウォーターバスで 62°C に温

めた 1% Triton-X/0.1×SSC 溶液で 5 分間処理した。その後、常温の 2×SSC 溶液に数分通した後、20 μ l の DAPI 含有 Anti-fade (Table 30) をスライドにアプライした。24×32mm のカバーガラスを被せて余分な液体を押しだした後、透明なマニキュアでカバーガラスを固定した。

(E) リプローブ

同一のスライドに再度 FISH を行うリプローブは、Shibata et al (2009) の鱗翅目昆虫におけるリプローブ法を改変して行った。2×SSC に数分間通してカバーガラスのマニキュアとカバーガラスをはがした後、4%パラホルムアルデヒドで 10 分間ポストフィックスを行った。その後、上記 (A) ～ (D) と同様の処理を行った。また、リプローブ 3 回目以降あるいは、染まりの悪いプレパラートに関しては、2×SSC に数分間通してマニキュアとカバーガラスをはがした後、70°C のリプローブ液 (1 % TritonX-100/0.1×SSC/50% formamide) で 10 分間処理し、滅菌水でリンス後、4%パラホルムアルデヒドで 10 分間ポストフィックスを行った。2×SSC で リンスを行った後、(A) ～ (D) と同様の処理を行った。

(F) 顕鏡と画像解析

FISH を行ったプレパラートは、蛍光顕微鏡 DM6000B (Leica) を用いてフィルターセット A4 (DAPI 用)、N3 (Orange-dUTP 用)、L5 (Green-dUTP 用)、SP2 (Red-dUTP 用)、Y5 (Cy5-dUTP 用) にて特異蛍光を検出し観察した。画像は、白黒 CCD カメラ (DFC350 FX, Leica) と RS Image (LAS AF ver.1.8.0) により、DAPI 蛍光、Cy5 蛍光、Orange 蛍光、Green 蛍光、Red 蛍光をそれぞれデジタル化して保存した。保存した画像は、Adobe photoshop CS6 により画像解析を行った。Red 蛍光と Orange 蛍光の波長が近いと、本研究の一部の画像では Red のシグナルが Orange にリークしている場合があった。

Table 20 Composition of *Ephestia kuehniella* Ringer solution

NaCl (和光純薬 191-01665)	9 g
KCl (和光純薬 163-03545)	0.42 g
NaHCO ₃ (和光純薬 031-00435)	0.2 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O (和光純薬 031-00435)	0.33 g
Sterilized miliQ water	1 L

Table 21 Composition of Lysis buffer

1 M Tris-HCl (pH 8.0)	1 ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	2 ml
10 % SDS	5 ml
adjust the volume to 50 ml with distilled water	

Table 22 Composition of dNTP Mix

10×dNTP Mix for labelling (high)	
2.5 mM dATP	5 µl
2.5 mM dCTP	5 µl
2.5 mM dGTP	5 µl
2.5 mM dTTP	1.8 µl
fluorochrome-dUTP	8 µl
adjust the volume to 50 µl with distilled water	
10×dNTP Mix for labelling (normal)	
2.5 mM dATP	5 µl
2.5 mM dCTP	5 µl
2.5 mM dGTP	5 µl
2.5 mM dTTP	3.4 µl
fluorochrome-dUTP	4 µl
adjust the volume to 50 µl with distilled water	

Table 23 Composition of labeling reaction mix for Nick Translation Kit (Abbott)

Direct labeling (Abbott)	
Template DNA	500 ng
10× dNTP Mix (high)*	2.5 µl
10× Nick Translation buffer	2.5 µl
Enzyme Mix	5 µl
adjust the volume to 25 µl with distilled water	

*see Table 22

Table 24 Composition of DNase I dilution buffer

1 M Tris (pH7.5) (和光純薬 207-06275)	2 ml
5 M NaCl (和光純薬 191-01665)	1 ml
10 mM CaCl ₂ (和光純薬 031-00435)	1 ml
Glycerol (和光純薬 075-00616)	50 ml
adjust the volume to 100 ml with distilled water	

Table 25 Composition of Enzyme Mix buffer

Glycerol (和光純薬 075-00616)	5 ml
1 M Tris (pH 7.5) (和光純薬 207-06275)	500 µl
1 M MgCl ₂ (和光純薬 135-00165)	100 µl
1 mM DTT (Roche 604927)	1 ml
BSA (5 mg/ml) (TaKaRa 1600)	1 ml
Distilled water	280 µl

Table 26 Composition of Enzyme Mix

DNase I (0.5 U/µl) (TaKaRa 2270A)	1.2 µl
DNA polymerase I (5 U/µl) (TaKaRa 2130A)	20 µl
Enzyme Mix buffer (Table 24)	78.8 µl

Table 27 Composition of labeling reaction for own dispensed enzyme mix

Direct labeling (self-supplied)	
Template DNA	500 ng
dNTP mix*	2.5 µl
10×Nick Translation buffer	2.5 µl
Enzyme Mix (Table 25)	2.5 µl
adjust the volume to 25 µl with distilled water	

*see Table 22

Table 28 Composition of denature buffer

Formamide (和光純薬 068-00426)	140 µl
20×SSC (Table 28)	20 µl
Distilled water	40 µl

Table 29 Composition of 20×SSC (pH7.0)

NaCl (和光純薬 191-01665)	175.3 g
sodium citrate (和光純薬 191-01785)	88.2 g
adjust the volume to 1 L with distilled water	

Table 30 Composition of Anti-fade with DAPI

DABCO (SIGMA D2522-25G)	0.233 g
1 M Tris (pH 8.0) (和光純薬 207-06275)	200 µl
D.W.	800 µl
DAPI (1 mg/ml) (SIGMA D9542)	10 µl
Glycerol (和光純薬 075-00616)	9 ml

結果

作製した染色体標本には、卵原細胞ならびに精原細胞の有糸分裂中期像が観察された。ヒゲナガカワトビケラにおける雌の体細胞染色体数は $2n=25$ 、雄の体細胞染色体数は $2n=26$ であった (Figure 2)。ヒゲナガカワトビケラ雌の減数分裂前期パキテン期の染色体を観察した結果、他の多動原体型染色体構造を有する種と同様に染色体を区別できるような形態的な差は乏しかった。しかしながら、他の ZO 染色体システムを持つ種と同様、Z 染色体と特定できる univalent が観察された (data not shown, Figure 4d 参照)。

カイコ同一染色体座乗の遺伝子に対応するヒゲナガカワトビケラオルソログを持つ BAC-FISH マッピングを行ったところ、カイコ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対応関係が存在しないことが示唆された (data not shown)。そこで、カイコで開発されたリプローブ法 (Shibata et al 2009) を適応して、ヒゲナガカワトビケラ雌の同一パキテン核に合計 8 回の FISH を繰り返した (Figure 3a-h)。その結果、Z 染色体と 1 つの常染色体対を除いた 11 対の常染色体にそれぞれシグナルが認められる BAC を特定した (Table 31, Figure 3i)。性染色体を形態的な特徴で識別できる雌の染色体標本に対して、それらの BAC プローブシグナルをアンカーとして仮のカリオタイピングを行った上で、新たに BAC-FISH を行い、未同定常染色体と Z にマップされる BAC を特定し、これらから選抜した 16 BAC (Table 32) を用いて 3 回 FISH を繰り返した (Figure 4a-c)。これらの画像を統合して、毛翅目昆虫初のカリオタイピングが完成した (Figure 4d)

考察

ヒゲナガカワトビケラの体細胞染色体数は、雌で $2n=25$ 雄で $2n=26$ であり、雌の染色体数が 1 本少ないというこれまで研究された毛翅目昆虫 (Makino and Kichijo 1934; Marec and Novák 1998; Lukhtanov 2000) と同様であった。これは、毛翅目昆虫の性染色体システムが ZO/ZZ (雌/雄) であるとの結論 (Traut and Marec 1996) と齟齬のない結果である。さらに、雌減数分裂前期のパキテン核において、1 つの univalent が認められたこと (Figure 4d) から雌 ZO 性染色体構成が支持された。

本研究では目論み通り、鱗翅目昆虫の BAC-FISH 法を毛翅目昆虫のパキテン核に適用できた。ほとんどの鱗翅目昆虫において認められるような染色体の対応関係 (Yasukochi et al 2006; 2009; 2016; Pringle et al 2007; Van't Hof et al 2008; 2013; Beldade et al 2009; Yoshido et al 2011b; Baxter et al 2011; Heliconius Genome Consortium 2012; Sahara et al 2013; You et al 2013) があれば、第 II 章第 2 節で選抜したカイコオルソログがカイコと同様にマッピングできた。しかしながら、従来使用してきた *in silico* マッピングに準じた染色体の同定は不可能であった。そのため、本研究では、新たなカリオタイピング手順として、多数回に亘るリプローピングを目指して、Shibata et al (2009) の方法の改良を行った。その結果、これまでカイコ以

外ではタバコスズメガ (Yasukochi et al 2009) でそれぞれ 1 回ずつの成功に留まっていたリプローブ回数を 7 回まで可能とした (Figure 3)。こうした技術的イノベーションにより、本研究においてヒゲナガカワトビケラの全染染色体に特定できたアンカーBAC (Table 32) をプローブとして、3 回の FISH を繰り返すことで、毛翅目昆虫において初のカリオタイプニングに成功した (Figure 4)。

これにより、カリオタイプを行った上でカイコオルソログをもつ BAC をプローブとした FISH によるチョウ目昆虫とヒゲナガカワトビケラの染色体比較マッピング研究 (本章第 2 節) へと進展できる。ヒゲナガカワトビケラは鱗翅目昆虫に比べ、リプローブを行える回数が多く、染色体数も比較的少ないことから最初の比較ゲノムマッピングに最適な種の一つである。

Table 31 *Stenopsyche marmorata* BACs were used for Figure 3

DDBJ accession	BAC code	<i>Bombyx mori</i> Linkage group	<i>Bombyx mori</i> gene code	labeled dye
LC381317	56I20	4	AY769270	Orange
LC381338	58F07	11	AF325211	Red
LC381316	65C08	4	NM_001134255.1	Cy5
LC381336	74D17	11(29)	AK384105	Green
LC381347	61M07	15	AY769275	Red
LC381343	62E07	13	AK386724	Orange
LC381350	68N10	15	BGIBMGA003396	Green
LC381333	38D13	10	NM_001043764.1	Cy5
LC381313	65J17	3	BGIBMGA009007	Red
LC381312	81A19	3	DQ311399	Green
LC381325	07N23	8	NM_001046942.1	Red
-	37A15	24	AF513368	Orange
LC381375	56D05	24	DQ443196	Green
LC381326	56L04	8	AK386306	Cy5
LC381366	40N14	23	AK378894	Orange
LC381362	40P12	22	AY297158	Green
LC381369	46J08	23	DQ443272	Red
LC381364	66C17	22	BMgn004711	Cy5
LC381311	05J09	2	unidentified	Orange
LC381310	57M19	Z	NM_001043382.1	Green
LC381368	51H17	23	AK383230	Cy5
LC381361	65E17	21	AK385011	Red
LC381370	65M05	23(30)	AK382720	Orange
LC381371	76D08	23(30)	NM_001171915.1	Green
LC381358	11J14	19	NM_001170394.1	Cy5

Table 32 *Stenopsyche marmorata* BACs were used for Figure 4

	<i>Stenopsyche marmorata</i> chromosome	DDBJ accession	BAC code	<i>Bombyx mori</i> Linkage group	<i>Bombyx mori</i> gene code	labeled dye
Used BACs for the first FISH	6	-	37A15	24	AF513368	Orange
	12	LC381366	40N14	23	AK378894	Orange
	2	LC381369	46J08	23	DQ443272	Orange
	1	LC381327	53G06	8	AK382309	Green
	2	LC381375	56D05	24	DQ443196	Green
	10	LC381347	61M07	15	AY769275	Red
	9	LC381316	65C08	4	AB451529	Cy5
	6	LC381336	74D17	11	AK384105	Orange
Used BACs for the second FISH	8	LC381362	40P12	22	AY297158	Green
	11	LC381317	56I20	4	AY769270	Orange
	4	LC381338	58F07	11	AF325211	Red
	3	LC381343	62E07	13	AK386724	Orange
	7	LC381364	66C17	22	BMgn004711	Cy5
	3	LC381312	81A19	3	DQ311399	Orange
Used BACs for the third FISH	5	LC381385	38D20	5	AK381997	Orange
	Z	LC381309	64C13	Z	AK379027	Cy5

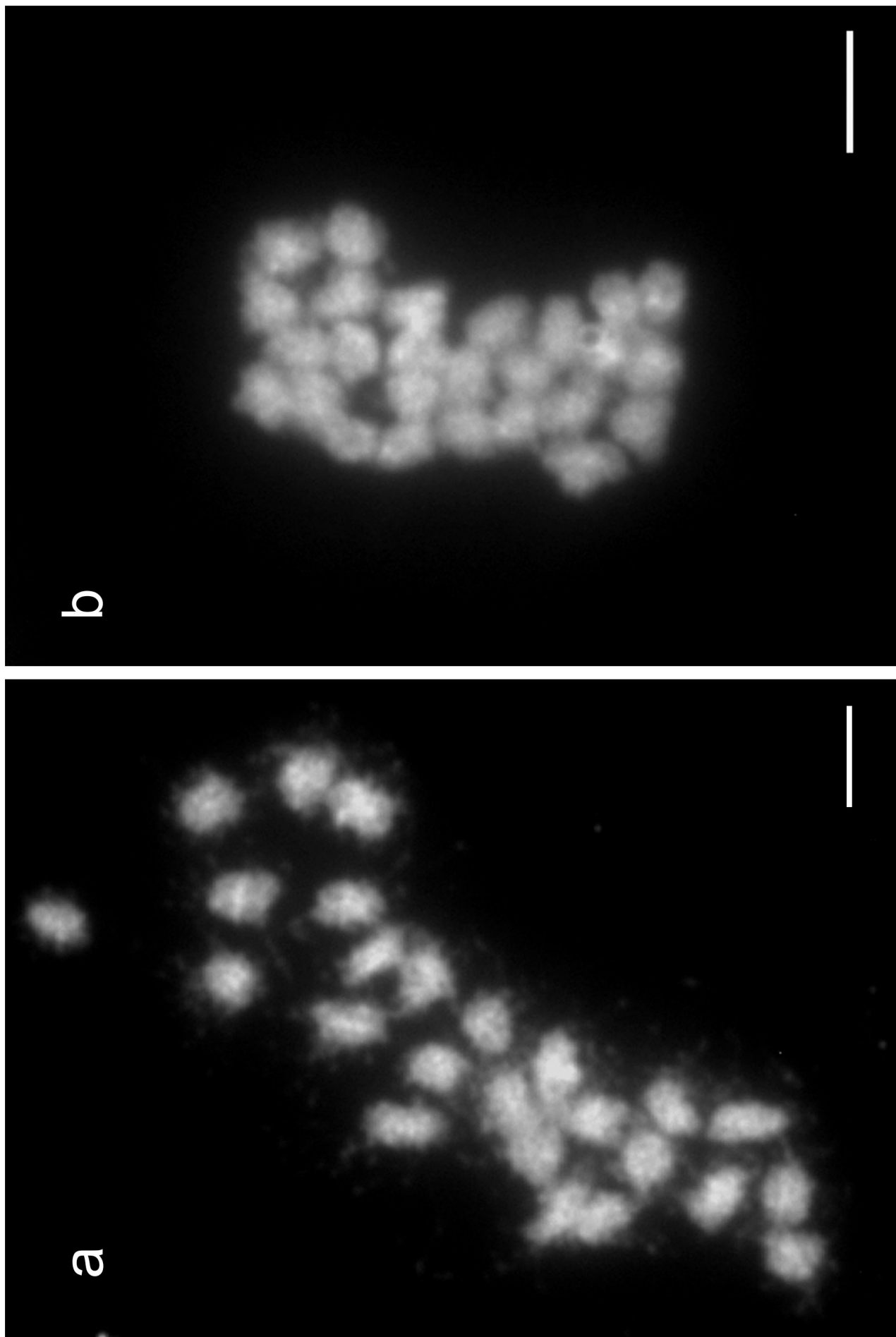


Figure 2 A mitotic complement of *Stenopsysche marmorata* spermatogonia and oogonia

DAPI stained (grey) chromosomes count $2n=25/26$ (female/male). a: spermatogonia. b: oogonia. Scale bars 5 µm.

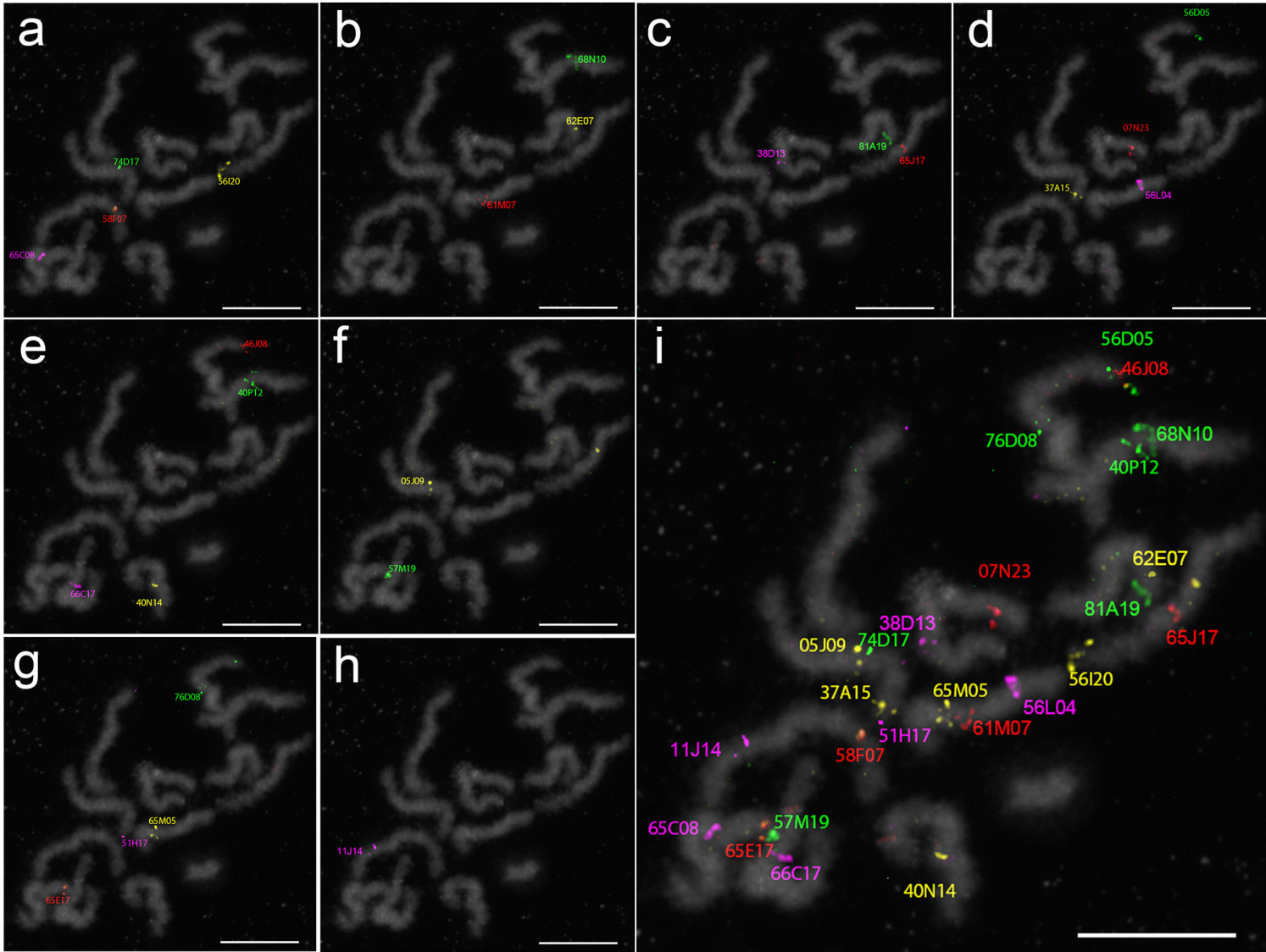


Figure 3 All chromosome identification of *Stenopsyche marmorata* by 8 times BAC-FISH. BAC-FISH and subsequent reprobes were done in an oocyte pachytene complement.

All chromosomes were stained DAPI (gray pseudocolored) and 1~4 BAC probe signals (pseudocolored) were appeared on each chromosome. BAC-codes were described neighboring to each BAC signal. See Table 31 for details of BAC information. Scale bars 10 μm. a: The first BAC-FISH with 4 BAC probes. b-h: Subsequent reprobes were done with 1-4 BAC probes. i: The merged image of a-h.

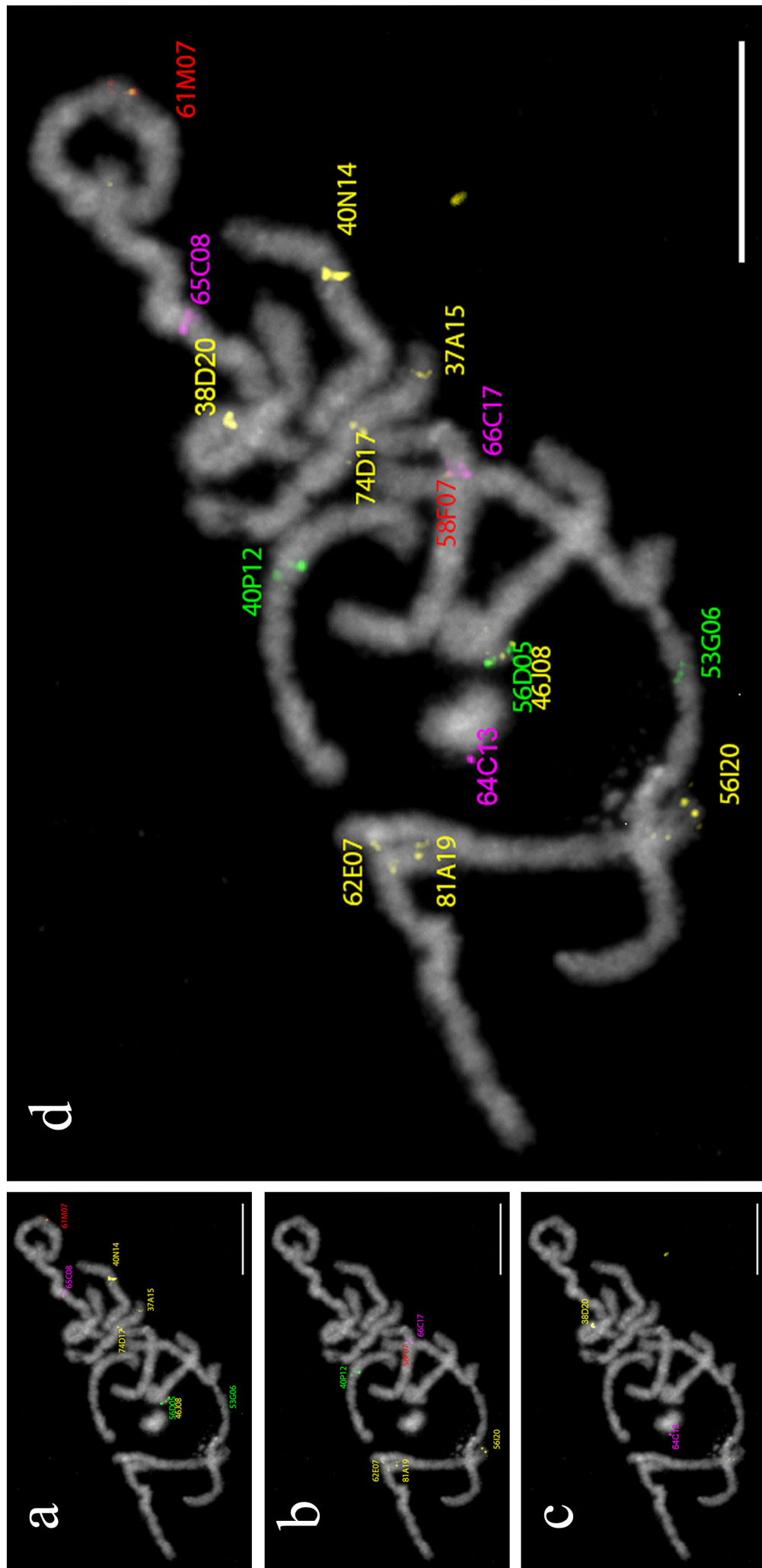


Figure 4 Karyotype of *Stenopsyche marmorata* by three step BAC-FISH. BAC-FISH and subsequent reprobings were done in an oocyte pachytene complement.

All chromosomes were stained DAPI (gray pseudo colored) and 1 or 2 BAC probe signals (pseudocolored) were appeared on each chromosome. BAC codes were described neighboring to each BAC signal. See Table 32 for details of BAC information. Scale bars 10 μm. a: The first BAC-FISH with 8 BAC probes. b: The second BAC-FISH (reprobe) with 2 BAC probes. c: The third BAC-FISH (reprobe) with 2 BAC probes. d: The merged image of a-c.

第2節 BAC-FISH マッピング

本章の第1節において、ヒゲナガカワトビケラのカリオタイピングに成功した。その研究過程で、鱗翅目昆虫種間に認められるようなゲノムワイドな染色体対応関係が、鱗翅目昆虫とヒゲナガカワトビケラ間には存在しない可能性が示唆された。しかしながら、特定の染色体間や染色体の一部の対応関係（いわゆるマイクロシンテニー）が認められる可能性は大いにある。そこで、本節において第Ⅱ章でセクションしたすべての BAC を FISH マッピングすることで、鱗翅目昆虫との網羅的な染色体比較を行った。

材料と方法

1. カリオタイピング済み染色体標本の作製

第1節で特定した、各染色体にシグナルを示す BAC を用いて、ヒゲナガカワトビケラのカリオタイピングを行った。FISH は第1節で示した方法と同様に行った。

2. リプローブによる新規 BAC のマッピング

カリオタイピングされた染色体標本に、マップされる染色体が不明な BAC プローブを用いたリプロービングを行うことで、セクションした全 BAC のマップされる染色体を特定した。

3. BAC-FISH マッピング

同一の染色体にマップされる BAC を用いて、FISH マッピングを行うことで、マップされる染色体座上位置の特定を行った。また、同一染色体に 5 BAC プローブ以上がマップされる場合は、リプロービングを行い、全 BAC の染色体座上位置関係を特定した。

4. 画像解析

同一染色体に 5 BAC プローブ以上マップされたものは、同色によるシグナルの誤認識を防ぐために、用いた標識 dUTP (赤、黄、緑、マゼンタ) とは異なる疑似カラーを用いた (Adobe photoshop CS6)。使用した疑似カラーは、シアン、イエローオレンジ (明)、RGB ブルー、パステルマゼンタ、イエローグリーン (明)、マゼンタレッド (明) である。

結果

選抜された 81 BAC クローンに加えて、カイコ Z 遺伝子オルソログを含む 6 BACs を特定した (Table 33)。これらのうち、同一のオルソログを含む他の BAC が存在した 63I06 と 43L09 を除く、85 BAC クローンをを用いて FISH マッピングを行った。41E21 と 43G12 は、2 つの染色体にシグナルが認められた (data not shown)。また、44L05 は、特定の染色体にシグナルを示さず、すべての染色体に散在するシグナルが認められた (data not shown)。これらの 3 BACs は、特異的なシグナル位置を特定できないため、解析から除外した。その他、76 BAC プローブは特定の染色体に特異的なシグナルを示した。よって、82 BACs による FISH マッピング結果から、鱗翅目昆虫との染色体対応関係を比較した (Figure 5, Table 33)。使用したプローブには、カイコ第六染色体の遺伝子オルソログを含む BAC が含まれない。カイコ第二、第十四、第十六、第二十および第二十六染色体の遺伝子オルソログを含む BAC は各 1 BAC であった。カイコ遺伝子オルソログの座乗染色体を鱗翅目昆虫染色体の基本数である $n=31$ に当てはめて考えると、さらに、鱗翅目昆虫の第十一染色体の遺伝子オルソログを持つ BAC も 1 つしかないことになる。

BAC-FISH マッピングにより、カイコとの染色体対応関係が示唆された領域は、ヒゲナガカワトビケラ第 1 染色体 (Chr1) の 07N23 (赤) と 53G06 (緑) のシグナル間 (Figure 5: Chr1) とカイコ第八染色体の 7.0 Mb と 10.02 Mb、第 2 染色体 (Chr2) の 70B18 (パステルマゼンタ) と 26D04 (シアン) のシグナル間 (Figure 5: Chr2) とカイコ第七染色体 7.58 Mb と 9.18 Mb、第 3 染色体 (Chr3) の 64F12 (マゼンタ) と 62E07 (緑) のシグナル間 (Figure 5: Chr3) とカイコ第十三染色体の 0.96 Mb と 1.82 Mb ならびに第 5 染色体 (Chr5) の 63E05 (赤) と 56C04 (緑) のシグナル間 (Figure 5: Chr5) とカイコ第十三染色体の 5.35Mb と 10.92Mb の領域であった。ただし、ヒゲナガカワトビケラ Chr5 の近接する領域は、約 5.58 Mb のスペンが物理的に存在し得ないことから、対応関係は存在しないと結論付けた。

カイコ性染色体 (Z 染色体) に座乗する遺伝子オルソログをもつ 8 BACs をプローブとした FISH の結果、7 プローブは、ヒゲナガカワトビケラ Z 染色体にマップされた。カイコ Z 染色体の約 8.04 Mb に位置する *IDGF* のオルソログを含む 57M19 は、ヒゲナガカワトビケラの第 9 染色体にマッピングされた (Figure 5: Chr9, 緑シグナル)。

上記の染色体以外に、カイコ第九、第十一、第十五、第十七、第十九、第二十一、第二十二、第二十三および第二十五染色体の遺伝子オルソログを含む複数 BAC プローブが、ヒゲナガカワトビケラの同一染色体にマップされた (Figure 5)。しかしながら、連続したオルソログを含む BAC の一部が異なる染色体にマップされるものや、異なる染色体に対応するオルソログを持つ BAC がシグナル間にマッピングされたため (Table 33 参照)、コリニアリティーの存在は否定された。

考察

本研究では、これまでの成果に基づき毛翅目昆虫と鱗翅目昆虫における初の染色体比較が達成された (Figure 5)。カイコ第十三染色体の 2 遺伝子オルソログは、シンテニーブロックとしてヒゲナガカワトビケラ Chr3 にマップされたが、シンテニーブロックとは考えられない形での 2 オルソログが Chr5 にマップされた。また、カイコ第八および第七の別の遺伝子オルソログに対応するヒゲナガ BAC プローブ (56L04、66H01 および 38L02) も Chr10、Chr6 および Chr1 にマップされた (Figure 5)。つまり、いくらかの領域にはカイコとヒゲナガカワトビケラ間に対応するブロックが存在するものの染色体全体に対応関係が認められる常染色体は無いと結論できる。一方、カイコ Z 染色体の遺伝子オルソログに対応する 8 つの BAC プローブは、1 つを除きすべてヒゲナガカワトビケラ Z 染色体にマップされた (Figure 5: Z, Table 33)。Fraïsse et al (2017) によって、3 種の鱗翅目昆虫 (*Cameraria ohridella*, *Nemophora degeerella*, *Triodia sylvina*) におけるゲノムシーケンス比較が行われ、雌雄間のシーケンス深度から Z 染色体座上遺伝子が推測されている。解析された種で最も祖先的な *T. sylvina* とカイコとの比較で、カイコ Z 染色体に座上する遺伝子の約 72 % (93/129) が *T. sylvina* の Z 染色体に座上し、残りの 28 % (36/129) は常染色体に対応すると推測されている。また、*T. sylvina* において Z 染色体に座上すると推測された遺伝子のうち、約 64 % (93/138) がカイコの Z 染色体に対応し、残り 36 % (45/138) は常染色体に対応する遺伝子とされた。本研究の解析では、カイコの Z 染色体に座上している遺伝子のうち約 12.5 % (1/8) がヒゲナガカワトビケラの常染色体に対応し、ヒゲナガカワトビケラの Z 染色体に座上しているオルソログは 100 % (7/7) カイコの Z 染色体に対応した (Figure 5)。より祖先的なヒゲナガカワトビケラの方が、*T. sylvina* よりもマクロなカイコ Z 染色体との対応関係が示されたことになるが、解析遺伝子数に差があり、更なる検証が必要である。

本節の研究からヒゲナガカワトビケラと鱗翅目昆虫種には、鱗翅目昆虫種間で認められるゲノムワイドな染色体対応関係は存在しないことが明確になった。しかし、カイコの第六染色体に座乗する遺伝子オルソログに関しては、全くマップしていないか、単独に留まっているため、さらなる詳細を追求するならば追加の研究が必要である。また、マイクロシンテニックな領域については、DNA 配列を比較検証することで詳細を明らかにする必要がある。

Table 33 Mapping chromosome and order of *Stenopysche marmorata* BACs, labeled dyes, pseudocolor for the BAC (see Figure 5) probe signals and chromosome and position of the BAC-containing orthologs orthologs in *Bombyx mori*

BAC code	<i>S. marmorata</i> Chromosome	signal order on <i>S. marmorata</i> chromosome	labeled dye*	pseudo-color**	<i>B. mori</i> chromosome	KAIKObase position	Silkbase position
38L02	1	1	O	Y	7	14,448,339..14,445,589	12,407,347..12,388,240
38D13	1	2	C5	M	10	8,685,325..8,679,748	7,868,767..7,863,095
07N23	1	4	R	R	8	8,172,400..8,173,980	7,004,715..7,006,160
53G06	1	5	G	G	8	11,723,115..11,718,448	1,0623,766..10,619,096
76D08	2	1	G	G	23	20,887,167..20,894,029	19,518,680..19,525,754
52E13	2	2	C5	M	18	3,335,273..3,333,112	3,006,847..3,004,945
26D04	2	3	O	C	7	10,337,470..10,355,662	9,179,451..9,286,022
70B18	2	5	G	PM	7	8,643,028..8,632,391	7,588,510..7,577,888
63P18	2	4	R	B	5	8,319,619..8,325,553	7,682,768..7,688,472
46J08	2	6	C5	O	23	19,202,693..19,194,588	17,869,692..17,860,167
77M23	2	7	O	YO	23	21,055,045..21,060,438	19,689,420..19,694,897
56D05	2	8	R	R	24	13,271,275..13,257,577	11,091,510..11,078,134
81A19	3	1	O	Y	3	3,690,571..3,692,889	3,354,342..3,356,687
64F12	3	2	C5	M	13	893,544..903,244	961,852..967,529
62E07	3	3	G	G	13	2,202,107..2,225,159	1,815,810..1,832,924
60F18	3	4	R	R	17	4,290,839..4,298,832	5,005,638..5,013,552
70F06	3	5	R	YO	24	8,229,869..8,223,300	7,557,508..7,554,940
40C01	3	6	O	C	26	2,338,357..2,331,175	2,283,709..2,276,786
67M12	3	7	C5	B	17	18,219,796..18,217,829	16,678,685..16,650,354
71L17	4	1	G	PM	24	6,345,720..6,330,624	5,665,433..5,659,891
11J14	4	2	C5	M	19	12,812,041..12,802,449	12,854,223..12,844,940
65M23	4	3	G	G	11	6,764,889..6,761,027	6,484,960..6,480,249
44J07	4	4	O	Y	19	5,823,114..5,820,749	6,758,026..6,754,884
83B02	4	5	C5	C	10	9,112,516..9,094,831	8,303,521..8,282,243
43G07	4	6	R	B	11	330,233..395,524	340,565..405,889
58F07	4	7	R	R	11	10,600,102..10,583,121	9,792,719..9,776,551
66P21	4	8	C5	YO	9	15,602,218..15,615,637	13,281,968..13,295,293
38D20	5	1	O	C	27	12,584,732..12,582,179	8,751,393..8,749,005
56C04	5	2	G	G	13	10,927,160..10,917,999	10,632,074..10,620,359
63E05	5	3	R	R	13	5,634,810..5,647,466	5,346,792..5,364,426
44C17	5	4	O	Y	18	13,075,746..13,065,697	12,805,715..12,793,570
75K23	5	5	C5	M	20	5,002,210..4,998,502	4,780,188..4,776,159
43I22	6	1	G	G	9	1,248,924..1,230,092	1,310,449..1,288,622
79N22	6	2	R	R	24	17,184,560..17,214,882	15,875,187..15,890,342
81H6	6	3	O	Y	9	9,508,310..9,500,529	7,773,873..7,766,088
05J09	6	4	C5	C	2	6,547,749..6,556,280	5,384,271..5,401,943
74D17	6	5	G	PM	11	571,624..560,278	585,771..572,788
66H01	6	6	C5	B	8	17,164,196..17,181,897	14,492,053..14,474,590
51H17	6	7	C5	M	23	16,097,208..16,092,549	14,742,377..14,740,825

43H13	7	1	C5	M	4	13,061,963..13,066,027	11651397..1,1647,379
66C17	7	2	R	R	22	16,518,633..16,512,868	12,912,860..12,907,034
83B04	7	3	G	G	23	15,189,112..15,198,321	13,792,928..13,829,973
52M10	8	1	G	B	23	3,075,341..3,074,130	2,588,103..2,583,333
65A23	8	2	C5	MR	14	1,800,999..1,805,777	1,513,840..1,532,293
65A08	8	3	R	R	12	4,293,723..4,267,809	4,087,153..4,080,218
68N10	8	4	O	YO	15	13,952,971..13,961,637	13,157,114..13,166,356
78B16	8	5	C5	M	25	4,239,809..4,248,631	3,786,362..3,777,698
40P12	8	6	G	G	22	4,689,299..4,684,662	3,854,601..3,849,823
74D11	8	7	G	YG	4	571,624..560,278	585,771..572,788
52H05	8	8	O	Y	22	9,666,151..9,654,878	8,929,270..8,900,009
51I20	8	9	C5	PM	18	12,671,134..12,665,771	12,390,846..12,385,248
68G24	8	10	O	C	15	9,127,595..9,130,339	9,198,022..9,200,991
57M19	9	1	G	G	1 (Z)	8,533,563..8,553,627	8,035,471..8,055,380
65E17	9	2	O	Y	21	17,293,274..17,285,909	14,078,053..14,074,572
70H22	9	3	C5	M	24	17,462,853..17,471,473	16,237,551..16,245,822
65C08	9	4	Y	C	4	6,506,599..6,558,774	6,603,762..6,626,093
43O23	9	5	R	R	11	12,708,934..12,708,229	11,940,681..11,940,181
67D07	9	6	C5	YO	21	11,014,449..11,038,935	9,080,990..9,136,064
75J17	10	1	C5	C	16	4,033,955..4,020,319	4,106,035..4,089,144
63I03	10	2	O	Y	4	5,621,591..5,654,163	5,621,222..5,653,832
65M05	10	3	G	G	23	20,600,903..20,589,044	19,238,795..19,227,024
61M07	10	4	R	R	15	2,912,132..2,916,752	2,869,116..2,873,720
64P23	10	5	O	YO	28	9,944..11,074	106,026..107,250
56L04	10	6	C5	M	8	15,351,712..15,371,972	13,064,220..13,085,098
65J17	11	1	R	R	3	9,720,106..9,701,984	8,033,514..8,023,000
56I20	11	2	O	Y	4	10,813,131..10,815,998	9,808,363..9,812,757
40N14	12	1	R	Y	23	4,228,005..4,263,481	3,411,392..3,418,559
60G04	12	2	C5	M	5	5,494,261..5,501,925	4,834,652..4,865,390
38I12	12	3	R	PM	25	9,939,571..9,931,495	8,486,842..8,478,876
37E10	12	4	C5	G	27	10,599,890..10,592,929	7,719,059..7,708,186
47J20	12	5	C5	YO	15	13,440,221..13,424,589	12,637,715..12,626,732
40C02	12	6	O	C	25	10,820,044..10,832,614	9,436,115..9,418,886
51H09	12	7	G	B	25	8,544,709..8,533,314	7,129,623..7,119,011
70E02	12	8	G	YG	28	3,929,608..3,921,595	4,056,361..4,041,861
40B04	12	9	O	R	12	3,469,208..3,462,430	3,257,347..3,250,407
38B18	Z	1	R	R	1 (Z)	4,621,452..4,632,826	4,670,556..4,680,073
65L07	Z	1	C5	C	1 (Z)	6,513,219..6,533,895	6,026,373..6,126,632
64C13	Z	1	G	G	1 (Z)	6,611,934..6,623,391	6,126,863..6,147,892
59P21	Z	1	R	YO	1 (Z)	11,748,927..11,749,499	11,184,420..11,269,621
38O03	Z	1	C5	M	1 (Z)	1,401,583..1,416,493	1,448,811..1,469,527
55F13	Z	1	O	Y	1 (Z)	15,595,590..15,678,086	14,337,752..14,385,768
56G17	Z	1	C5	B	1 (Z)	21,842,454..21,845,665	20,052,875..20,060,295

* O=Orange-dUTP, G=Green-dUTP, C5=Cy5-dUTP, R=Red-dUTP, ** Y=Yellow, G=Green, R=Red, M=Magenta, C=Cyan, B=Blue, YO=Yellow Orange, PM=Pastel Magenta
MR=Magenta Red, YG=Yellow Green

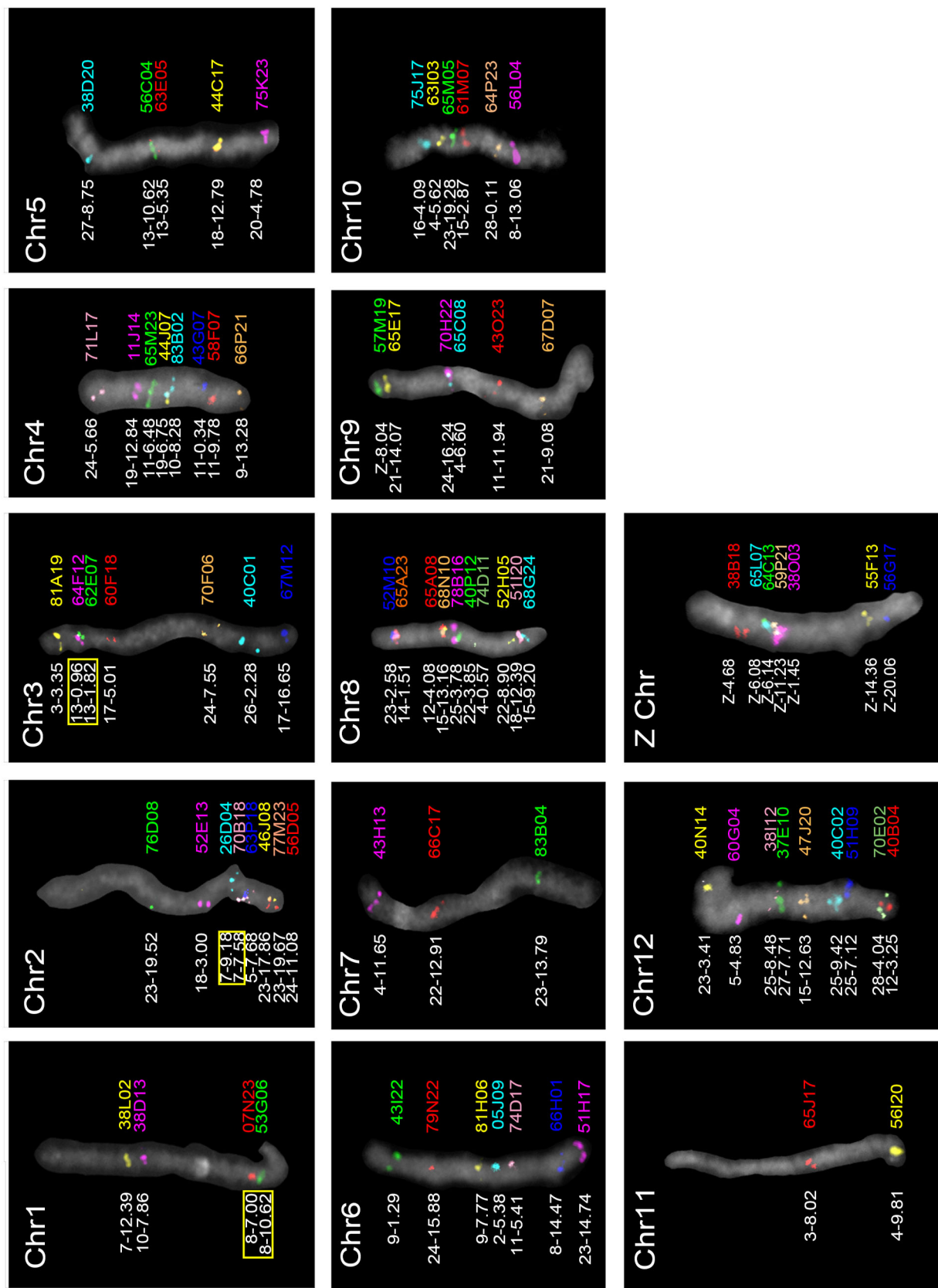


Figure 5 BAC-FISH mapping of *Stenopsysche marmorata* chromosomes and gene order comparison of orthologs between *Bombyx mori* and *S. marmorata*.

Individual pachytene bivalents (Chr1~12, Z) of *S. marmorata* were stained with DAPI (grey pseudocolored). The BAC signals were pseudocolored according to materials and methods. BAC information were presented in Table 33. Chromosome numbers-its position (Mb, Silkbase) of *B. mori* orthologs contained in the BACs were shown to the left. *S. marmorata* BAC codes (same color with the signal) were given to the right. Yellow boxes indicate microsyntenic regions to *B. mori* chromosomes.

第3節 チャバネヒゲナガカワトビケラへのクロスハイブリダイゼーションマッピング

ヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) の同属別種であるチャバネヒゲナガカワトビケラ (*S. sauteri*) は、北海道を除く日本全国に分布し、ヒゲナガカワトビケラと同所的に生息していることが多い種である (<http://mizukoku.nilim.go.jp/ksnkankyo/index.html>)。2 種間の形態的特徴は類似しているが、幼虫期は前肢基節にある突起の基部側の長短ならびに額頭楯正中線に沿った細長い斑紋の有無で種同定が可能である (津田・赤木 1962)。また、蛹と成虫に関しては距式で区別することができる (野崎 1986)。

鱗翅目昆虫 BAC プローブを用いたクロスハイブリダイゼーションは、近縁種において可能である (Yasukochi et al 2009; 2016)。毛翅目昆虫の近縁種間において、同一の BAC プローブを使用することができれば、複数種の解析が単一の BAC ライブラリーで可能となり、染色体進化に対する研究に寄与する。本節では、チャバネヒゲナガカワトビケラ染色体に対して、ヒゲナガカワトビケラ BAC プローブのクロスハイブリダイゼーションが可能であることを示すとともに、2 種間の染色体比較を行った。

材料および方法

1. 供試昆虫

本節に用いたチャバネヒゲナガカワトビケラは 2013 年 5~6 月と 2015 年 5~7 月に盛岡市上ノ橋付近の中津川付近にて、ヒゲナガカワトビケラとともに採集された個体を用いた。幼虫は、津田・赤木 (1962) に従い、前肢基節にある突起が基部側の方が短く、額頭楯正中線に沿った細長い斑紋が無い個体をチャバネヒゲナガカワトビケラとした。蛹と成虫に関しては野崎 (1986) に従って、前肢の距式が 0-4-4 の個体をチャバネヒゲナガカワトビケラ雌、2-4-4 の個体を同雄とした。

2. 染色体標本作製

チャバネヒゲナガカワトビケラにおける染色体標本作製の適時は、雄が終齢幼虫か蛹になる直前の体長が短縮化して各体節が太くなった個体、雌が終齢幼虫の短縮化する直前の個体であった。作製方法は、本章の第 1 節 2. 染色体標本作製に記載した方法と同様である。

3. クロスハイブリダイゼーションマッピング

FISH にはヒゲナガカワトビケラの BAC プローブを用いて、同種もしくはチャバネヒゲナガカワトビケラの gDNA から作製したコンペティターを用いた。その他の手順は、本章第 1 節に記載した方法を用いた。

結果

チャバネヒゲナガカワトビケラの染色体標本に対して試行した、ヒゲナガカワトビケラの BAC-DNA がクロスハイブリダイゼーションすることが確認された (data not shown)。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間の染色体対応関係を明らかにするために、58 BAC プローブ (Table 34) を用いたクロスハイブリダイゼーションマッピングを行った。ヒゲナガカワトビケラで同一染色体にマップされる BAC プローブは、チャバネヒゲナガカワトビケラでも同一染色体にシグナルが認められた (Figure 6)。しかしながら、第 1 染色体と Z 染色体にマップされた BAC プローブの順序と染色体位置が両者で異なる場合が認められた。第 1 染色体に関しては、ヒゲナガカワトビケラは 38L02 (黄)、38D13 (マゼンタ)、07N23 (赤)、53G06 (緑) の順序にマップされている (Figure 5: Chr1) のに対し、チャバネヒゲナガカワトビケラは 38D13 (マゼンタ)、38L02 (黄)、53G06 (緑)、07N23 (赤) の順序でマップされた (Figure 6: Chr1)。これは、染色体の上半部と下半部がそれぞれの順序が逆転した関係にある。ヒゲナガカワトビケラ Z 染色体には、38B18 (赤)、65L07 (シアン)、64C13 (緑)、59P21 (イエローオレンジ)、38O03 (マゼンタ)、55F13 (黄) の順序でマップされた (Figure 5: Z Chr) が、チャバネヒゲナガカワトビケラでは、38B18 (赤) と 65L07 (シアン) の間に 55F13 (黄) がマップされ、38O03 (マゼンタ) と 59P21 (イエローオレンジ) の順序が反対にマップされた (Figure 6: Z Chr)。

考察

ヒゲナガカワトビケラの BAC プローブを用いたチャバネヒゲナガカワトビケラのクロスハイブリダイゼーションマッピングより、鱗翅目昆虫において確認される近縁種間のクロスハイブリダイゼーションを用いた FISH マッピング、特に同属別種間に関しては、毛翅目昆虫でも可能であることが示された。日本には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以外に、シロアシヒゲナガカワトビケラ (*S. pallens*) とオキナワヒゲナガカワトビケラ (*S. shimidi*) の 2 種が生息し、また、アジアに生息する *S. formosana*、*S. tienmushanensis*、*S. laminata*、*S. simillis*、*S. himarayama*、*S. bergeri* の 6 種はチャバネヒゲナガカワトビケラよりヒゲナガカワトビケラに近縁だと推測されている (Saito et al 2018)。チャバネヒゲナガカワトビケラは、日本に生息するヒゲナガカワトビケラ属の種の中で、ヒゲナガカワトビケラと最も遠縁関係にある種とされる (Saito et al 2018)。本研究結果と系統関係を考慮すると、ヒゲナガカワトビケラ BAC プローブを用いることで、*Stenopsyche* 属すべての種に対して、同様のクロスハイブリダイゼーションマッピングを行い、染色体比較することで、近縁種間における染色体進化と種形成の関係性が解明されるかもしれない。

クロスハイブリダイゼーションマッピングより、両種の染色体にはコリニアリティーが認められた (Figure 6)。また、11 対の常染色体間にはリアレンジメントも確認されず、シ

ンテニーが認められた。一方、第 1 染色体間および Z 染色体間には、オルソログ配置に相違があった。鱗翅目昆虫間におけるオルソログマッピングの結果、Z 染色体間にはリアレンジメントが比較的多く確認される (Yasukochi et al 2009; Sahara et al 2013; Van't Hof et al 2013)。これらの結果は、別属の種間比較結果である。本研究では、同属別種間のオルソログ配置変異が検出されており、毛翅目昆虫では、鱗翅目昆虫に比べ染色体変異が起きやすい可能性は否定できない。特に、性染色体は常染色体に比べ、突然変異の蓄積率が理論上高くなるため、他の染色体と比べ変異が多いと推測されている (Miyata et al 1987; Ellegren and Fridolfsson 1997)。植物の *Helianthus* の一種においては、染色体逆位が種形成に関与したと考えられており (Barb et al 2014)、本研究の 2 種間においても Z 染色体の変異が種分化に関与している可能性がある。

一方、常染色体である第 1 染色体間のリアレンジメントは、鱗翅目昆虫種の比較で認められるように例外的なのか否かについては、より詳細な検討が必要と考えられる。こうした常染色体の変化が、染色体進化や種形成においてどのような役割を持っているかは、座上遺伝子の解析や変異領域の特定が求められ、さらなる分子遺伝学的解析と生態学的な解析に必要である。また、同種別個体間での染色体比較結果を踏まえた更なる解析の必要もある。

Table 34 *S. marmorata* BACs were used for Cross-hybridization mapping of *Stenopsyche sauteri*

BAC code	<i>S. marmorata</i> chromosome	Signal order on <i>S.</i> <i>marmorata</i> chromosome	<i>S. sauteri</i> chromosome	Signal order on <i>S.</i> <i>sauteri</i> chromosome	labeled dye*	pseudo- color**
38L02	1	1	1	2	O	Y
38D13	1	2	1	1	C5	M
07N23	1	4	1	4	R	R
53G06	1	5	1	3	G	G
76D08	2	1	2	1	O	G
52E13	2	2	2	2	G	M
26D04	2	3	2	3	C5	C
63P18	2	4	2	4	O	B
70B18	2	5	2	5	G	PM
46J08	2	6	2	6	R	O
77M23	2	7	2	7	R	YO
56D05	2	8	2	8	C5	R
81A19	3	1	3	1	G	Y
64F12	3	2	3	2	R	M
62E07	3	3	3	3	C5	G
60F18	3	4	3	4	O	R
65M23	4	3	4	1	G	G
83B02	4	5	4	2	C5	C
58F07	4	7	4	3	R	R
66P21	4	8	4	4	O	YO
38D20	5	1	5	1	G	C
56C04	5	2	5	2	G	G
44C17	5	4	5	3	C5	Y
75K23	5	5	5	4	C5	M
43I22	6	1	6	1	G	G
81H06	6	3	6	2	R	Y
05J09	6	4	6	3	O	C
66H01	6	5	6	4	C5	B
43H13	7	1	7	1	O	M
66C17	7	2	7	2	G	R
83B04	7	3	7	3	C5	G
65A23	8	2	8	1	C5	MR
65A08	8	3	8	2	O	R
68N10	8	4	8	3	G	YO
74D11	8	7	8	4	R	YG
57M19	9	1	9	1	O	G
65E17	9	2	9	2	R	Y
70H22	9	3	9	3	C5	M
65C08	9	4	9	4	G	C
43O23	9	5	9	5	C5	R
75J17	10	1	10	1	G	C
63I03	10	2	10	2	O	Y
65M05	10	3	10	3	G	G
61M07	10	4	10	4	R	R
64P23	10	5	10	5	O	YO
56L04	10	6	10	6	C5	M
65J17	11	1	11	1	O	R
56I20	11	2	11	2	G	Y
40N14	12	1	12	1	R	Y
60G04	12	2	12	2	C5	M
47J20	12	5	12	3	G	YO
40B04	12	9	12	4	O	R
38B18	Z	1	Z	1	O	R
65L07	Z	2	Z	3	G	C
64C13	Z	3	Z	4	O	G
59P21	Z	4	Z	6	C5	YO
38O03	Z	5	Z	5	C5	M
55F13	Z	6	Z	2	G	Y

* O=Orange-dUTP, G=Green-dUTP, C5=Cy5-dUTP, R=Red-dUTP,

** Y=yellow, M=Magenta, C=Cyan, B=Blue, YO=Yellow Orange, PM=Pastel Magenta
MR=Magenta Red, YG=Yellow Green

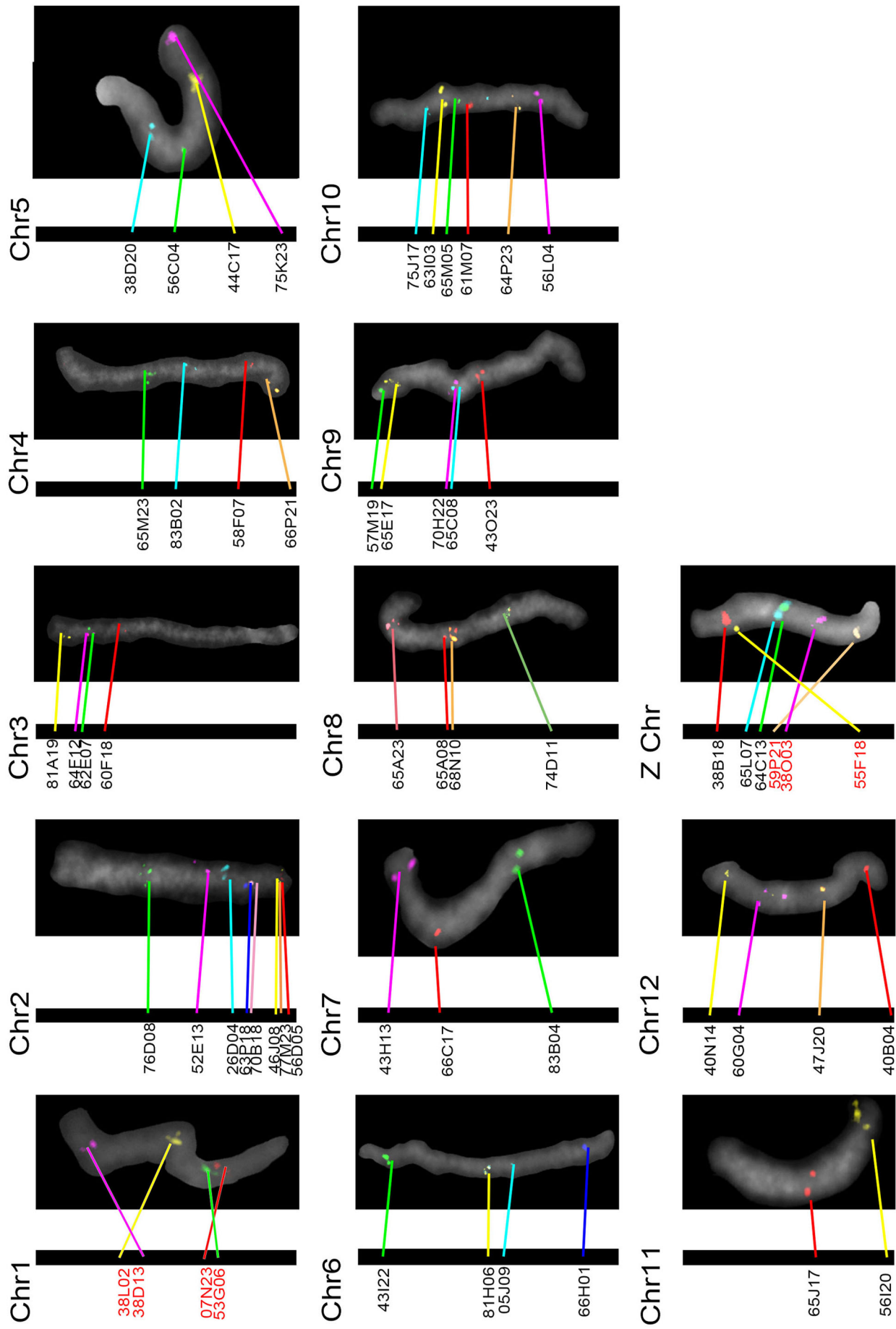


Figure 6 Comparison of individual chromosomes (*S. marmorata* VS *S. sauteri*) by cross-hybridization mapping probed by *S. marmorata* BACs.

Cross-hybridization signals from *S. marmorata* BAC probes are appeared on individual pachyene bivalents of *S. sauteri* (DAPI-stained images (gray pseudo color)). Black vertical bars represent *S. marmorata* chromosomes. BAC codes are shown on the left side of the bars. Red cords mean different ortholog orders between *S. marmorata* and *S. sauteri*. Color bars connected between *S. marmorata* chromosome image and signals show relative positions.

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

ヒゲナガカワトビケラは、遡上飛行する特性（西村 1987）から、ダム上下間における遺伝的分化の評価として利用されている（渡辺・大村 2005）。また、DNA 多型マーカーを用いた集団間変異の研究でも、その遺伝的多様性が確認されている（渡辺ら 2009; Yaegashi et al 2014）。鱗翅目昆虫においては、同一種内において地理的隔離で染色体変異が確認されており、地域ごとに異なる染色体構成を有する種が存在する（Yoshido et al 2011a; 20011b; 2013）。種内における行動や形態の違いと染色体変異の関係性は紐づけられ（Wellenreuther and Bernatchez 2018）、集団内には多くの染色体変異が存在すると推測される。特に、水生昆虫は、陸上生活をする昆虫と異なり、生息域を大きく変えることができないため、環境変化に適応するには、遺伝的多様性を高く維持する必要があると推測される。ところが、水生昆虫、特に毛翅目昆虫において染色体変異の検証を行おうとした場合、染色体の同定が行われていなかったという問題があった。

本研究によって確立した BAC-FISH 法によって、こうした問題が払拭され、同一集団内の複数個体から作製した染色体標本を用いた解析を行うことが可能となった。ヒゲナガカワトビケラ（*Stenopsyche marmorata*）とチャバネヒゲナガカワトビケラ（*S. sauteri*）の染色体比較より、染色体リアレンジメントが推測された第 1 染色体を対象に、ヒゲナガカワトビケラに対して、BAC-FISH 法による毛翅目昆虫初の染色体変異解析を行った。本章においては、同種内における染色体変異について検証をおこなった。第 1 節では、チャバネヒゲナガカワトビケラとの間に変異が認められた第 1 染色体を対象とした。第 2 節では、それ以外の常染色体に対して検証を行った。

第 1 節 第 1 染色体における染色体変異解析

これまでの研究成果として毛翅目昆虫における BAC-FISH 法が確立したため、染色体同定と染色体比較が可能となった。本節では、前章第 3 節において近縁種間の染色体リアレンジメントの検出されたうち第 1 染色体を対象に、ヒゲナガカワトビケラ個体群間と同一集団内の比較を行った。

材料および方法

1. 供試昆虫

本節の研究に用いたヒゲナガカワトビケラ（*S. marmorata*）は、2008 年 6 月に札幌市南区豊滝の盤の沢川および 2013 年 5~6 月に盛岡市上ノ橋付近の中津川で採集した幼虫と蛹である。

2. ヒゲナガカワトビケラ第 1 染色体の染色体変異解析

ヒゲナガカワトビケラの第 1 染色体にシグナルを示す 4 BAC プローブを同一集団内の複数個体に対して BAC-FISH マッピングした。BAC-FISH は、第Ⅲ章第 1 節 4～6. に記述した方法に従った。

結果

盛岡市中津川で 2013 年 5 月 17 日に採集した 9 個体と、2013 年 6 月 4 日に採集した 2 個体の計 11 個体によるマッピングパターンの比較より、第 1 染色体には 2 つの染色体パターンが確認された (Figure 7, Table 35)。7 個体は、第Ⅲ章第 2 節 Figure 5 の Chr1 と同一なマッピングパターンで、38L02 (黄)、38D13 (マゼンタ)、07N23 (赤)、53G06 (緑) の順にマップされた。38D13 と 07N23 の中間あたりは強く DAPI 染色されたヘテロクロマチン部位を伴う nucleolar organizer region (NOR) が確認された。相同染色体間でも同一のシグナルパターン (aa) と表記されるこれらを A パターンとした (Figure 7: A Pattern (aa))。4 個体は、07N23 (赤) と 53G06 (緑) のシグナルがそれぞれの相同染色体間で異なる (ba) ヘテロ対と認識され、これらを B パターン (Figure 7: B Pattern (ba)) とした。

札幌市盤の沢川にて採集した 3 個体のうち、2 個体は A パターンを示した (Table 35)。1 個体は、38L02 (黄) と 38D13 (マゼンタ) のシグナルがそれぞれの相同染色体間で異なる (ca) ヘテロ対と認識され、これを C パターンとした (Figure 7: C Pattern (ca), Table 35)。

考察

ヒゲナガカワトビケラ第 1 染色体には、札幌と盛岡の個体群間で同一パターンの染色体対 (A パターン) を共有した他に、それぞれ異なる逆位の生じた染色体が認められた (Figure 7, Table 35)。姉妹系統関係にある鱗翅目昆虫の同種内における染色体逆位の事例として、シロオビアゲハ (*Papilio polytes*) の雌ベイツ型擬態の有無 (Nishikawa et al 2015)、ヨーロッパアワノメイガ (*Ostrinia nubilalis*) の生殖隔離 (Kozak et al 2017) など重要な多様性をもたらす例が知られる。また、鳥類の一種であるエリマキシギ (*Calidris pugnax*) は、染色体逆位が、形態と生殖行動に大きな変化をもたすことが発見されている (Lamichhaney et al 2016; Küpper et al 2016)。

ヒゲナガカワトビケラにおいて、通常とは異なる形態や行動が認められた報告はないため、本種においては生殖隔離や形態などの著しい変化には関係のない逆位である可能性も否定はできない。また、ba や ca といったヘテロな形でのみ検出されたことから、bb や cc ホモの適応度が極めて低い可能性もある。B や C パターンの染色体は、ヒゲナガカワトビケラ集団からは排除されつつあるのかも知れない。では、何故、いまだ検出されるのか？チャバネヒゲナガカワトビケラと配置がやや類似する C パターンは両者の種分化と何らか

の関連性があるのかも知れない。ヒゲナガカワトビケラの第 1 染色体に座上している遺伝子の機能推定や、変異領域付近の遺伝子の解析、ヒゲナガカワトビケラのフィールド観察などさらなる研究蓄積により、こうした疑問の解決の突破口が見つかることを期待する。

Table 35 Mapping patterns of *Stenopsyche marmorata* chromosome 1

individual number	collecting date	sex*	collecting site	mapping pattern
19	2013.5.17	F	Nakatsugawa, Morioka, Iwate, Japan	B (ba)
20	2013.5.18	F	Nakatsugawa, Morioka, Iwate, Japan	A(aa)
21	2013.5.19	F	Nakatsugawa, Morioka, Iwate, Japan	B (ba)
23	2013.5.20	F	Nakatsugawa, Morioka, Iwate, Japan	A (aa)
24	2013.5.21	F	Nakatsugawa, Morioka, Iwate, Japan	A (aa)
25	2013.5.22	F	Nakatsugawa, Morioka, Iwate, Japan	A (aa)
26	2013.5.23	M	Nakatsugawa, Morioka, Iwate, Japan	B (ba)
27	2013.5.24	M	Nakatsugawa, Morioka, Iwate, Japan	A (aa)
28	2013.5.25	F	Nakatsugawa, Morioka, Iwate, Japan	A (aa)
29	2013.4.6	F	Nakatsugawa, Morioka, Iwate, Japan	B (ba)
30	2013.4.7	F	Nakatsugawa, Morioka, Iwate, Japan	A (aa)
9	2008.6.12	F	Ban-no-sawagawa, Sapporo, Hokkaido, Japan	A (aa)
14or15	2008.6.13	F	Ban-no-sawagawa, Sapporo, Hokkaido, Japan	A (aa)
18	2008.6.14	F	Ban-no-sawagawa, Sapporo, Hokkaido, Japan	C (ca)

* F: female, M: male

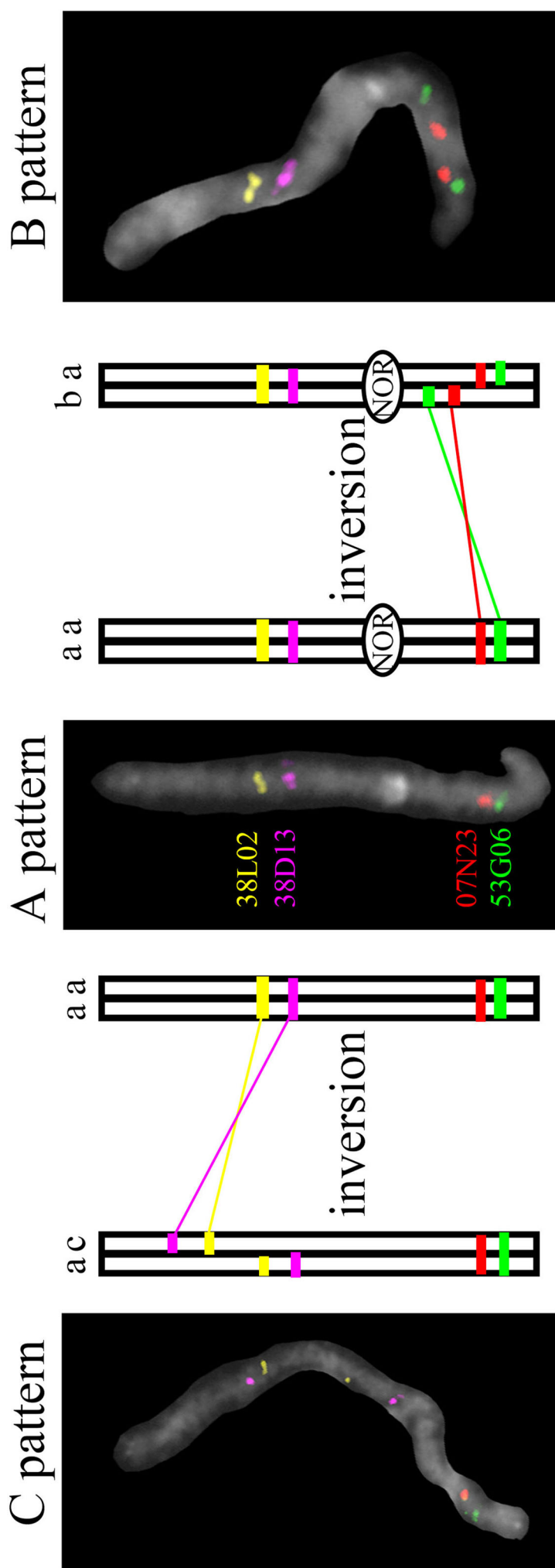


Figure 7 Three mapping patterns of *Stenopsysche marmorata* chromosome 1 bivalents.

Drawings show *S. marmorata* Chr1. Each color box in the Chr1 drawings indicates BAC signals on the *S. marmorata*. A and B patterns are found at Nakatsugawa (Morioka). C pattern is only found at Bannosawa-gawa (Sapporo). NOR: nucleolar organizer region

第2節 第12染色体における染色体変異解析

第1節においてヒゲナガカワトビケラの第1染色体には、2種類の逆位が確認された。他の染色体にも同様な染色体の多様性が存在する可能性があるため、第1染色体と同様にBAC-FISH法による解析を行った。また、同属別種のチャバネヒゲナガカワトビケラにおいても、同様に検証した。

材料および方法

1. 供試昆虫

本節の研究に用いたヒゲナガカワトビケラ (*S. marmorata*) は、2008年6月に札幌市南区豊滝の盤の沢川ならびに2013年5~6月に盛岡市上ノ橋付近の中津川にて採集した幼虫と蛹である。チャバネヒゲナガカワトビケラ (*S. sauteri*) は2013年5~6月と2015年5~7月に盛岡市上ノ橋付近の中津川付近にて採集した幼虫を用いた。

2. BAC-FISHによるヒゲナガカワトビケラ染色体変異解析

ヒゲナガカワトビケラの各染色体に、シグナルを示す4 BACプローブを複数個体に対してFISHマッピングした。BAC-FISHは、第III章第1節4~6. に記述した方法に従った。ヒゲナガカワトビケラ第11染色体は、シグナルを示すBACプローブが2つしかないため、本解析からは除外した。なお、染色体の多型が認められた第12染色体の解析には、6 BACプローブとトリプローブ法（第III章第1節）を使用した。

3. チャバネヒゲナガカワトビケラにおける染色体変異解析

染色体の多様性が確認されたヒゲナガカワトビケラ第1と第12染色体に対応するチャバネヒゲナガカワトビケラの染色体を解析対象とした。解析方法は、前述したBAC-FISHによるヒゲナガカワトビケラ染色体変異解析手法に準じて行った。つまり、第III章第3節のチャバネヒゲナガカワトビケラへのクロスハイブリダイゼーションマッピング方法が用いられた。

結果

各染色体で盛岡市中津川にて採集したヒゲナガカワトビケラ4個体以上のマッピングパターンの比較より、第12染色体のみマッピングパターンに多様性が確認され、合計8個体の解析から3つのマッピングパターンが認められた (Figure 8, Table 36)。詳細な染色体比較を行うため2 BACsを追加して、合計6 BACプローブによるマッピング比較を行った。その結果、1個体は第III章第2節 Figure 5のChr12と同一なマッピングパターンである、40N14

(黄)、60G04 (マゼンタ)、37E10 (緑)、40C02 (シアン)、51H09 (青)、70E02 (イエローグリーン) の順にマップされた。相同染色体間でも同一のシグナルパターン (xx) で表記されるこれらを X パターン (Figure 8: X Pattern (xx)) とした。5 個体には、40N14 (黄) と 60G04 (マゼンタ) および 38I12 (パステルマゼンタ) から 40C02 (シアン) のマップ位置が逆転している逆位 (yy) を持つ Y パターン (Figure 8: Y Pattern (yy)) が認められた。残りの 2 個体は、x 染色体と y 染色体がヘテロとなった Z パターン (Figure 8: Z Pattern (xy)) を持っていた (Table 35)。札幌市盤の沢川にて採集した 3 個体の解析では、3 個体すべてが X パターンであった (Figure 8: X Pattern (xx), Table 36)。

チャバネヒゲナガカワトビケラの第 1 染色体は 3 個体、第 12 染色体は 5 個体解析したが、それぞれの染色体マッピング結果に多様性は認められなかった。

考察

ヒゲナガカワトビケラは、第 12 染色体にも染色体変異が確認され、札幌と盛岡の個体群間で同一のパターンの染色体対 (X パターン) と盛岡個体群にしか認められない、Y と Z パターンが認められた (Figure 8, Table 36)。第 1 節で解析した第 1 染色体と異なり、第 12 染色体は異なるパターンと相同なマッピングパターンになるには、最低でも 2 回の染色体逆位が必要である。また、2 種類の染色体は、いずれもホモ型対 (X と Y パターン) が存在した。札幌個体群の解析個体数が 3 個体と少ないが、盛岡個体群で 8 個体中 1 個体しか確認されない X パターンの個体しか確認されないことは、札幌個体群には y タイプ染色体が存在していない可能性がある。また、現在の生息環境において y タイプ染色体がヘテロとなる Z パターンを持ったとしても適応的でないのかも知れない。前者が正しいとすると、y タイプ染色体は盛岡個体群のみに出現した可能性があり、このタイプの染色体をもつ個体の適応度が高い可能性がある。

リプローブを用いた本研究では、染色体多様性が認められた第 1 と第 12 染色体を個体内で比較する事が可能である (Tables 35, 36)。第 1 染色体がヘテロ対となったケースは限られたため、盛岡個体群の a タイプ対ホモ (A パターン) について第 12 染色体のパターンを調査した。その結果、X~Z 全てのパターンが存在した。つまり、双方の染色体パターンに同時に影響するような環境要因は考えられなかった。

セイヨウミツバチ (*Apis mellifera*) において、高地と低地において特定の染色体変異パターンが蓄積する報告 (Wallberg et al 2017) がある。ヒゲナガカワトビケラにおいても、上流から下流まで広く個体群を解析することや、盛岡と札幌間にさらなる個体群を加えた多地域で採集した個体の解析を行うことで、環境と染色体多様性の関係性を解析できる可能性がある。

ヒゲナガカワトビケラの第 2~第 10 各染色体には、多様性が認められなかったことから、少なくとも第 1、第 12 染色体は変異性に富む染色体であると言える。ヒゲナガカワトビケ

ラ属の各種においてこれらの第 1 と第 12 染色体に対応する染色体のマッピングパターンのみが変化しているならば、種形成において重要な染色体であると仮説することができた。しかしながら、チャバネヒゲナガカワトビケラの解析により、この仮説は棄却された。よって、ヒゲナガカワトビケラのみを確認される染色体の特徴である可能性を考慮しなければいけない。ヒゲナガカワトビケラは、約 200 万年前にシロアシヒゲナガカワトビケラ (*S. pallens*) との共通祖先から、チャバネヒゲナガカワトビケラは約 700 万年以上前に *S. bergeri* との共通祖先から分岐したと推定されている (Saito et al 2018)。それぞれの、近縁種の第 1 と第 12 染色体マッピング結果を得ることができれば、この可能性を検討できる。

Table 36 Mapping patterns of *Stenopsyche marmorata* chromosome 12

individual number	collecting date	sex*	collecting site	mapping pattern
21	17.5.2013	F	Nakatsugawa, Morioka, Iwate, Japan	X (xx)
24	17.5.2013	F	Nakatsugawa, Morioka, Iwate, Japan	Y (yy)
25	21.5.2013	F	Nakatsugawa, Morioka, Iwate, Japan	Y (yy)
26	21.5.2013	F	Nakatsugawa, Morioka, Iwate, Japan	Y (yy)
27	21.5.2013	M	Nakatsugawa, Morioka, Iwate, Japan	Z (xy)
28	21.5.2013	M	Nakatsugawa, Morioka, Iwate, Japan	Z (xy)
30	4.6.2013	F	Nakatsugawa, Morioka, Iwate, Japan	Y (yy)
16	14.6.2008	M	Ban-no-sawagawa, Sapporo, Hokkaido, Japan	X (xx)
17	14.6.2008	M	Ban-no-sawagawa, Sapporo, Hokkaido, Japan	X (xx)
18	14.6.2008	F	Ban-no-sawagawa, Sapporo, Hokkaido, Japan	X (xx)

* F: female, M: male

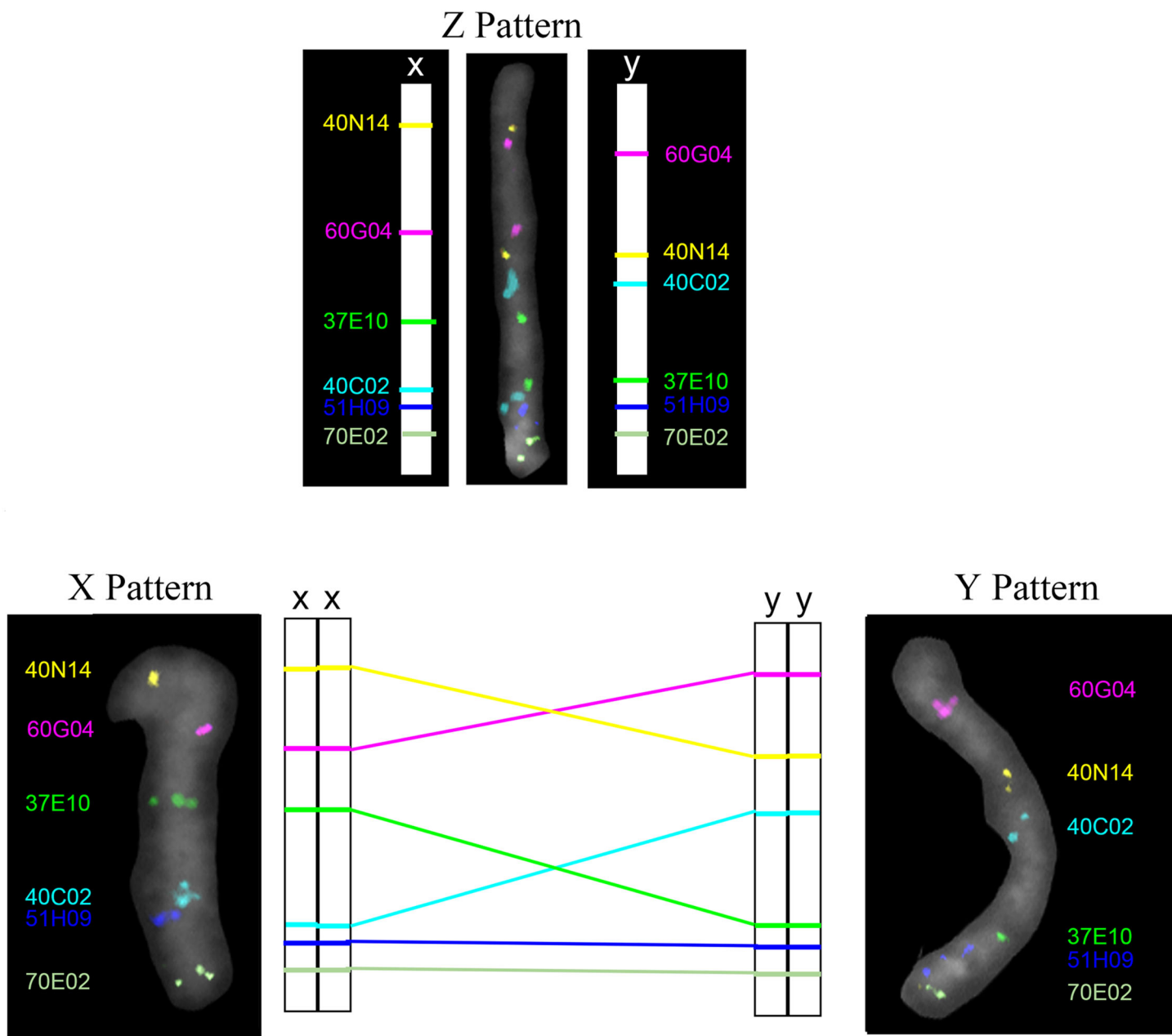


Figure 8 Three mapping patterns of *Stenopsyche marmorata* chromosome 12 bivalents.

Drawings show *S. marmorata* Chr12. Color lines in the Chr12 drawings indicate BAC signals on the *S. marmorata*. Color bars connected between each chromosome image and signals show relative positions.

第V章 ホタルトビケラの BAC-FISH 法の確立

序論

毛翅目昆虫はシマトビケラ亜目 (Annulipalpia)、エグリトビケラ亜目 (Integripalpia)、ナガレトビケラ亜目 (Spicipalpia) の3亜目に分類されているが、ナガレトビケラ亜目は、側系統であることが疑われている (Kjer et al 2016)。第II章から第IV章までは、主にシマトビケラ亜目に属するヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) とチャバネヒゲナガカワトビケラ (*S. sauteri*) を対象として染色体解析を行った。毛翅目昆虫の染色体進化と系統進化を理解するには、別亜目に属する種の解析も必須である。よって、本章では、毛翅目昆虫染色体研究をより発展させるべく、トビケラ類において最も進化的な種のひとつと考えられるエグリトビケラ亜目ホタルトビケラ (*Nothopsyche ruficollis*) を対象とした BAC-FISH マッピング研究を目論んだ。

ホタルトビケラは、日本全国に広く分布し (Nozaki 2002)、継代飼育も可能な種である (野崎・島田 1996)。本種は、終齢幼虫になると陸上夏眠をする特性を持つ (野崎・小林 1987)。成虫以外も陸生の生活環を有する特徴は、ホタルトビケラ属において広く認められており (Hayashi et al 2008)、進化的なグループと考えられる一因である。ホタルトビケラにおける遺伝学的研究基盤を整備することは、単純な解析種数の増加による毛翅目昆虫の染色体科学研究への寄与だけでなく、水生から陸生環境への進化を議論するうえで有用な知見となり得る。

本章では、ホタルトビケラを用いて、第1節において、BAC ライブラリーの構築、第2節では、RNA-seq による Total RNA 解析を用いた BAC セレクション、第3節で、ホタルトビケラ BAC-FISH の確立と一部ヒゲナガカワトビケラオルソログならびにカイコ (*Bombyx mori*) オルソログのマッピング比較を行った。

第1節 ホタルトビケラ BAC ライブラリーの構築

ヒゲナガカワトビケラの BAC プローブを用いた FISH において、クロスハイブリダイゼーションは認められず、このライブラリーをホタルトビケラの解析に流用することはできない。よって、本節では、エグリトビケラ科のホタルトビケラ BAC ライブラリーの構築を目指した。

材料および方法

BAC ライブラリーの構築は、第II章第1節のヒゲナガカワトビケラ BAC ライブラリー構築と同様に行った。下記に変更点を記載する。

1. 供試昆虫

本研究に用いたホタルトビケラは、倉西良一博士が 2017 年 6 月に千葉県君津市豊英 (N: 35°10'9.24; E: 140°0'26.58) にて採集した個体を分譲頂き、岩手大学農学部応用昆虫学研究室において、ポリスチレン容器にて飼育した個体を用いた。飼育は、野崎・島田 (1996) に従った。

2. HMW DNA の単離

ホタルトビケラの蛹 20 個体 (0.76 g) を用いて、ヒゲナガカワトビケラの BAC ライブラリー作製と同様に HMW DNA の単離を行った。

3. 完全消化実験～8. ライゲーション

変更点なく、ヒゲナガカワトビケラでの方法を踏襲した。

9. エレクトロポレーションによる大腸菌形質転換

使用するライゲーション液を 1～4 μ l に増加させ、コンピテントセルを *E. coli* DH5 α Electro-Cells (TaKaRa) に変更した。エレクトロポレーションは、1.25 または 1.5 KV、25 μ F、100 Ω の条件で分画 1、2 とともにエレクトロポレーションし、合計 4 条件で行った (A: 分画 1, 1.25 KV, 25 μ F, 100 Ω ; B: 分画 1, 1.5 KV, 25 μ F, 100 Ω ; C: 分画 2, 1.25 KV, 25 μ F, 100 Ω ; D: 分画 2, 1.5 KV, 25 μ F, 100 Ω)。

10. BAC ライブラリーと BAC-DNA プールの作製

本ライブラリーでは、384 well プレートに 1 コロニーずつ植菌したライブラリーと 4 コロニーずつ植菌したライブラリーを作製した。

11. BAC ライブラリーの評価

BAC-DNA の抽出は、QIAGEN Plasmid Midi Kit (12245, QIAGEN K.K.) を用いて行った。抽出方法は、第 II 章第 1 節 7. ベクタープラスミドの調整にて記述した内容と同様に行った。

結果

エレクトロポレーション条件と分画間の違いによるライブラリーの出来を比較するため、各条件から 4 クローンの BAC-DNA を抽出し、インサートサイズを測定した。条件 A、B は各 1 クローンのバンドが不鮮明であったため解析から除外した。条件 C の 1 クローンは *Not* I 消化が不十分な可能性があるため除外した。条件 D では、1 クローンがインサートを含んでいないクローンの可能性があるため除外した。よって、各 3 となった BAC-DNA の平均

インサートサイズは、条件 A が 48.67 Kb、B が 73.0 Kb、C が 35.5 Kb、D が 78.33 Kb であった (Figure 9, Table 37)。分画間での比較結果は、1 (A+B) が 60.83 Kb、2 (C+D) が 56.91 Kb で、1.5 KV 条件でのエレクトロポレーション (B, D) は、得られたクローン数が多かった (Table 37)。1.5 KV 条件のクローンでは、インサートサイズも大きいと推測された (Table 37) ため、この比較実験の後、1.25 KV でのエレクトロポレーションは中止し、1.5 KV のみでエレクトロポレーションを行った。また、分画 2 は分画 1 よりも倍近いクローン数が得られ、平均インサートサイズの差異も小さいため、分画 2 を用いたライゲーション液を中心にエレクトロポレーションに使用した。分画 1 から得られたクローンは、14,592、分画 2 は 30,720 であった。これらにより、平均インサートサイズ 57.97 Kb、総インサートサイズ約 2.4 Gb に相当するホタルトビケラ BAC ライブラリーが構築できた (Table 37)。内容としては、1 well 当たり 1 クローンのライブラリーは 30 枚、4 クローンのライブラリーが 20 枚の 384 well プレートから構成される。

考察

本節の研究において、毛翅目昆虫で 2 例目の BAC ライブラリーを構築できた。ヒゲナガカワトビケラと同様に、より大きな DNA 断片を含むと推測される分画 2 を用いて作製されたライブラリーの平均インサートサイズが分画 1 から作製されたライブラリーのインサートサイズより小さくなった (Table 37)。しかも、両分画の推定サイズよりも平均インサートサイズが大きく低下していた。これは、ヒゲナガカワトビケラと同様、大きなサイズの gDNA 断片は完全な *Hind*II 消化末端を持たなかったことが原因と考えられる。さらに、HMW DNA の抽出に際し、使用した個体数がヒゲナガカワトビケラは、蛹 3 個体、ホタルトビケラは蛹 20 個体と約 7 倍の個体から抽出していることも原因かもしれない。ホタルトビケラは、ヒゲナガカワトビケラよりも小型であり、必要な gDNA 量を確保するためには、個体数を増やす以外の方法は考えられないものの、個体数の増加は、HMW DNA を抽出できる均質な細胞以外のキチン質タンパクなどいわゆる夾雑物が増え、HMW DNA の純度を下げてしまうと考えられる。

作製した BAC ライブラリーの総インサートサイズ約 2.4 Gb は、lepbase (<http://lepbase.org/>) に登録されている毛翅目昆虫種の中で最大のゲノムサイズを誇る *Limnephilus lunatus* の約 1.84 ゲノム分に相当した。これによりホタルトビケラのほぼ全ゲノムに相当する BAC ライブラリーを構築できたと推定できる。しかしながら、ホタルトビケラが同一科に属する *L. lunatus* と同等もしくはそれ以上のゲノムサイズを持つ可能性を考慮すると、今後の研究を進める上で必要となる BAC 選抜が律速段階となりかねない。よって、1 well に 4 クローンの植菌を行うことで、384 well プレートストックの圧縮と作業の効率化を行った。単純に 4 プレーートのストックを作製する作業が 1 プレート相当になるため、作業効率は大幅に改善すると期待される。一方で、実際の作業での、well 間のクローンコンタ

ミが避けられない。また、シングルコロニーセクションに煩雑さが生じる問題がある。しかしながら、これら問題点を考慮してもなお、BAC セクションもセクションするプレート数の大幅減少は、同一 PCR 回数における陽性プレート取得確率の向上をもたらすと考えられる。

Table 37 Information of the *Nothopsyche ruficollis* BAC libraries

fraction	experimental condition	average insert size (Kb)	fraction dependent	
			average insert size (Kb)	stocked colonies
1	A	48.67	60.83	14,592
	B	73.0		
2	C	35.5	56.91	30,720
	D	78.33		
total			57.97	45,312

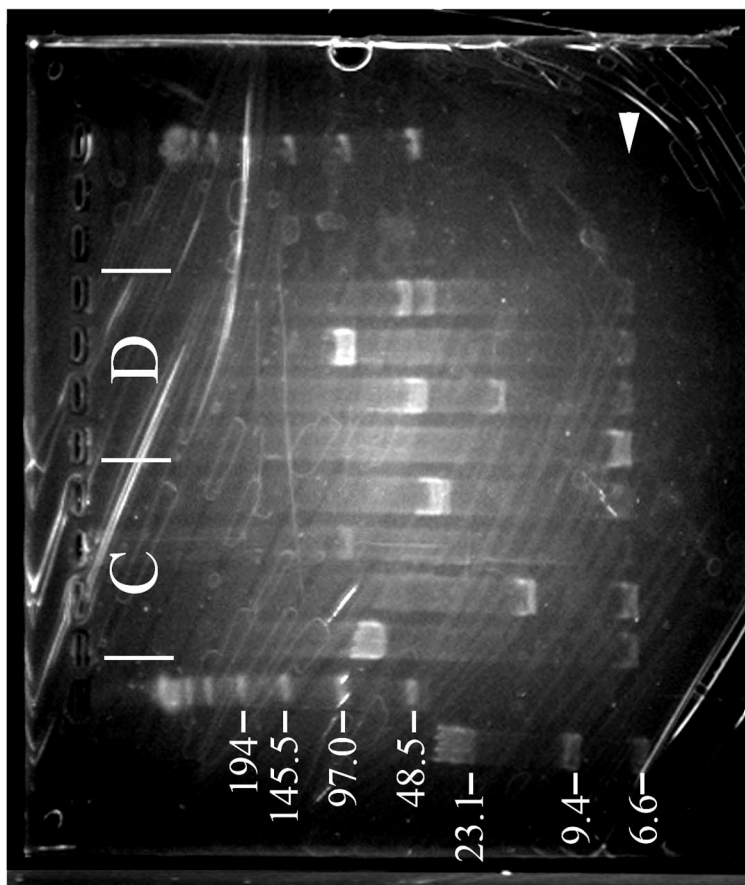
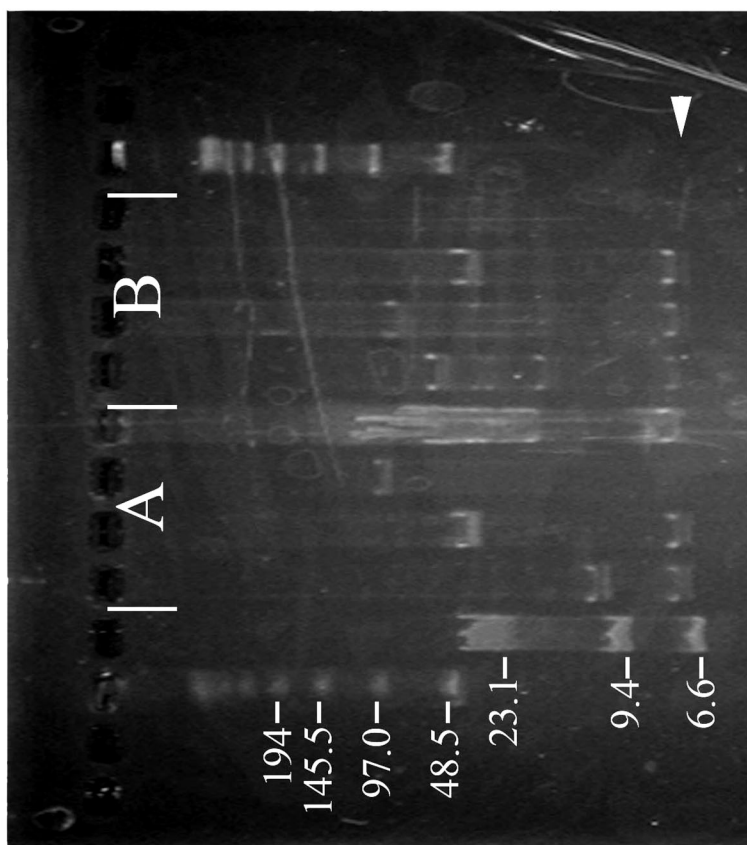


Figure 9 Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of *Nothopysche ruficollis* BAC-DNA digested with *Not* I .

Molecular size markers (Kb) are shown to the left of the gel photos. Arrowheads indicate the pBeloBAC11 vector DNA (7.4 Kb).

第2節 ホタルトビケラ BAC セレクション

ホタルトビケラ (*Nothopsyche ruficollis*) の遺伝子情報は、18S ribosomal RNA とミトコンドリア遺伝子が National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) に登録されているのみであった。そこで、ホタルトビケラにおいて網羅的な遺伝子配列を獲得するために、RNA-seq 解析を行った。獲得した配列に対し、第II章第2節にて決定したヒゲナガカワトビケラ遺伝子もしくはカイコ遺伝子をクエリーとしてそれぞれのオルソログを特定した。その配列情報から設計したプライマーを用いて、第1節で構築したホタルトビケラ BAC ライブラリーから、標的の配列を持つ BAC の PCR 選抜を行った。

材料および方法

1. 供試昆虫

本研究には、第1節同様、倉西良一博士から分譲頂いたホタルトビケラの蛹1個体を用いた。飼育は、第1節に記述した通りに行った。

2. Total RNA 抽出

Total RNA の抽出は、NucleoSpin® RNA (TaKaRa) を用いてプロトコールに従って行った。2等分した虫体それぞれを 1.5 ml チューブに入れ、200 µl の Buffer RA1 を加えてホモジナイズした。その溶液に 150 µl の Buffer RA1 と 3.5 µl の 2-メルカプトエタノールを加え攪拌した。コレクションチューブにセットした NucleoSpin® Filter に全量移し、遠心した (11,000×g, 1 min, RT)。溶液を完全に通過させた後、NucleoSpin® Filter を捨て、コレクションチューブに 350 µl の 70 % EtOH を加え、数回ピペッティングを行った。コレクションチューブにセットした NucleoSpin® RNA Column に全量を移し、遠心した (11,000×g, 30 sec, RT)。350 µl の Membrane Desalting Buffer を NucleoSpin® RNA Column に加え、遠心した (11,000×g, 1 min, RT)。10 µl の Reconstituted rDNase と 90 µl の Reaction Buffer for rDNase を混合し、NucleoSpin® RNA Column に 95 µl アプライし、15 分間室温で酵素処理を行った。その後、200 µl の Buffer RAW2 を NucleoSpin® RNA Column にアプライし、遠心した (11,000×g, 1 min, RT)。600 µl の Buffer RA3 をアプライし、遠心を行った (11,000×g, 30 sec, RT)。再度、250 µl の Buffer RA3 をアプライし、遠心した (11,000×g, 2 min, RT)。新しいコレクションチューブに NucleoSpin® RNA Column をセットし、60 µl の RNase free 滅菌水をアプライし、遠心 (11,000×g, 1 min, RT) によって、RNA の溶出を行った。抽出した RNA は NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) にて濃度測定を行った。

3. RNA-seq 解析

抽出した RNA は、北海道システム・サイエンス株式会社に依頼して、Illumina HiSeq による次世代シーケンス解析と Trinity による *de novo* アセンブルを行った。

4. ホタルトビケラアセンブルデータのアノテーション

Trinity により *de novo* アセンブルした配列データに対して、第 II 章第 2 節で得られたヒゲナガカワトビケラ cDNA 配列をクエリーとした tBLASTx 検索を行った。これによりヒゲナガカワトビケラ遺伝子と一対一対応するホタルトビケラ配列を特定した。同様に、カイコ遺伝子配列情報をクエリーとした tBLASTx 検索で、カイコ遺伝子に対応するホタルトビケラ配列を特定した。

5. ホタルトビケラの BAC セレクション

4. にて特定したホタルトビケラ配列を lepbases (<http://lepbases.org/>) に登録のある毛翅目昆虫の *Limnephilus lunatus* および *Glyptotendipes pellucidus* のゲノムデータに BLASTn 検索を行って、ホタルトビケライントロン領域を推定した。推定同一エクソン内に設計したプライマーを用いて PCR 選抜を行った。選抜方法は、第 II 章第 2 節に記載した通りである。

結果

北海道システム・サイエンス株式会社の RNA-seq は、約 4.65 Gb のシーケンス長から構成され、65,354 (平均コンティグ長 957 bp) のコンティグに *de novo* アセンブルされた (Table 38)。tBLASTx 検索の結果、ヒゲナガカワトビケラ遺伝子オルソログを持つ 67 コンティグ (Table 39) とカイコ遺伝子オルソログを含む 1,162 コンティグを特定した (data not shown)。さらに、ヒゲナガカワトビケラの第 4 染色体に座する LC381358、LC381335 および LC381337 (BAC コード 11J14、43G07 および 65M23, 第 III 章 Figure 5: Chr 4 参照) のホタルトビケラオルソログを含む BAC を選抜した (Table 40)。また、カイコ第 19 染色体の約 10.45 Mb と約 11.33 Mb (Silkbase 基準) に座する 2 遺伝子 (BGIBMGA004001 と BGIBMGA003972) それぞれのオルソログを含む 2 BACs を選抜した (Table 41)。

考察

ヒゲナガカワトビケラで行った cDNA ライブラリー構築とそのシーケンシングによる遺伝子配列情報の取得方法 (第 II 章第 2 節) から、本研究の RNA-seq に変更した結果、ヒゲナガカワトビケラの cDNA ライブラリーの約 100 倍以上の配列情報を得ることができた。カイコ遺伝子のホタルトビケラオルソログも約 5 倍に相当するオルソログを特定した。オルソログ数の拡大に伴い、最も少ない常染色体でも 14 のカイコオルソログとの比較が可能となった。仮に、第 1 節にて構築したホタルトビケラ BAC ライブラリーのゲノムカバー率

が 0.5 だった場合でも、これまで比較されてきた鱗翅目昆虫で使用されたオルソログ数には十分にそれらを含む BAC クローンを選抜できる計算となる。よって、ゲノムサイズが不明な非モデル生物においては、RNA-seq 解析による大規模な遺伝子配列獲得は、ゲノム比較マッピングにとって非常に有効的な手法であると言える。

本節の BAC セレクションは、各 well に 4 クローンずつ植菌したプレートから優先的にセレクションを行った。これは、1 クローンずつ植菌したプレートよりも、4 クローンのプレートの方が単純に 4 倍の確率で陽性クローンを含んでいる可能性があるためである。また、シングルコロニーセレクションの煩雑さが懸念されたが、8 クローン程度のセレクションで目的 BAC を選抜できた。単一クローンを 1 ウェルにストックした場合にも、確認のためシングルコロニーセレクションを行ってきた手間を考えると、問題となるほどの労力追加にはあたらない。複数の BAC クローンを 1 ウェルにストックする煩雑さにより、重複ストックがある程度発生した。しかしながら、この発生を考慮してもなお、複数ストックに優位性があると結論できる。

Table 38 Trinity-assembled summary of RNA-seq data in *Nothopsyche ruficollis*

Number of Contigs	Total Length (bases)	Average Length (bases)	Max Length (bases)	N50 Length (bases)	% of Mapped Reads
65,354	62,525,349	957	27,659	1,845	91.23

Table 39 *Nothopsyche ruficollis* Trinity data and its *Stenopsyche marmorata* orthologs, the ortholog-containing BACs and the mapped chromosomes

trinity numeber in <i>Nothopsyche ruficollis</i> RNA-seq data	Genbank ID of the <i>Stenopsyche marmorata</i> ortholog	<i>Stenopsyche marmorata</i> BAC that the orthologs carried	<i>Stenopsyche marmorata</i> chromosome
TRINITY_DN16173_c0_g1_i1	LC381325	07N23	1
TRINITY_DN12467_c0_g1_i1	LC381333	38D13	1
TRINITY_DN17022_c0_g1_i1	LC381324	38L02	1
TRINITY_DN4578_c0_g1_i1	LC381327	53G06	1
TRINITY_DN18760_c6_g2_i2	LC381387	70E02	2
TRINITY_DN17482_c0_g1_i3	LC381323	26D04	2
TRINITY_DN11243_c0_g1_i1	LC381369	46J08	2
TRINITY_DN22381_c0_g1_i1	LC381354	52E13	2
TRINITY_DN18060_c5_g1_i1	LC381320	63P18	2
TRINITY_DN11710_c0_g1_i2	LC381322	70B18	2
TRINITY_DN17740_c9_g1_i1	LC381371	76D08	2
TRINITY_DN18137_c6_g7_i1	LC381372	77M23	2
TRINITY_DN17647_c0_g3_i3	LC381383	40C01	3
TRINITY_DN13327_c0_g1_i1	LC381352	60F18	3
TRINITY_DN14902_c0_g1_i1	LC381343	62E07	3
TRINITY_DN18087_c0_g1_i12	LC381342	64F12	3
TRINITY_DN16530_c0_g1_i1	LC381353	67M12	3
TRINITY_DN11140_c0_g1_i1	LC381374	70F06	3
TRINITY_DN12644_c0_g1_i3	LC381312	81A19	3
TRINITY_DN15619_c0_g1_i1	LC381358	11J14	4
TRINITY_DN16748_c0_g1_i1	LC381335	43G07	4
TRINITY_DN10339_c0_g1_i1	LC381357	44J07	4
TRINITY_DN13220_c0_g1_i1	LC381338	58F07	4
TRINITY_DN13584_c0_g1_i1	LC381337	65M23	4
TRINITY_DN18234_c1_g1_i24	LC381332	66P21	4
TRINITY_DN13829_c0_g1_i2	LC381373	71L17	4
TRINITY_DN16203_c0_g1_i1	LC381334	83B02	4
TRINITY_DN18294_c4_g8_i1	LC381385	38D20	5
TRINITY_DN13592_c0_g1_i2	LC381356	44C17	5
TRINITY_DN15316_c0_g1_i1	LC381345	56C04	5
TRINITY_DN15050_c0_g1_i3	LC381344	63E05	5
TRINITY_DN18039_c5_g2_i3	LC381359	75K23	5
TRINITY_DN17492_c11_g1_i3	LC381311	05J09	6
TRINITY_DN17061_c0_g1_i1	LC381330	43I22	6
TRINITY_DN16663_c0_g1_i3	LC381329	66H01	6
TRINITY_DN17614_c8_g1_i4	LC381336	74D17	6
TRINITY_DN17719_c8_g1_i1	LC381376	79N22	6
TRINITY_DN15094_c0_g1_i1	LC381331	81H06	6
TRINITY_DN18253_c0_g1_i1	LC381364	66C17	7
TRINITY_DN17420_c0_g1_i1	LC381367	83B04	7

TRINITY_DN26499_c0_g1_i1	LC381362	40P12	8
TRINITY_DN12344_c0_g1_i1	LC381355	51I20	8
TRINITY_DN18396_c3_g5_i1	LC381363	52H05	8
TRINITY_DN10333_c0_g1_i1	LC381365	52M10	8
TRINITY_DN24476_c0_g1_i1	LC381348	68G24	8
TRINITY_DN18098_c0_g2_i4	LC381379	78B16	8
TRINITY_DN18167_c2_g1_i1	LC381339	43O23	9
TRINITY_DN16372_c0_g1_i1	LC381310	57M19	9
TRINITY_DN17547_c1_g1_i1	LC381361	65E17	9
TRINITY_DN18563_c0_g2_i2	LC381360	67D07	9
TRINITY_DN14979_c0_g1_i1	LC381377	70H22	9
TRINITY_DN14318_c0_g1_i1	LC381326	56L04	10
TRINITY_DN18514_c4_g2_i1	LC381347	61M07	10
TRINITY_DN14856_c0_g1_i3	LC381315	63I03	10
TRINITY_DN17893_c3_g1_i11	LC381370	65M05	10
TRINITY_DN18196_c0_g1_i2	LC381351	75J17	10
TRINITY_DN12789_c0_g1_i2	LC381317	56I20	11
TRINITY_DN17929_c1_g2_i3	LC381313	65J17	11
TRINITY_DN13550_c0_g1_i1	LC381381	38I12	12
TRINITY_DN17228_c0_g2_i1	LC381340	40B04	12
TRINITY_DN17528_c0_g1_i1	LC381378	40C02	12
TRINITY_DN16852_c0_g1_i1	LC381366	40N14	12
TRINITY_DN16867_c0_g1_i1	LC381349	47J20	12
TRINITY_DN15459_c0_g1_i1	LC381319	60G04	12
TRINITY_DN14672_c0_g1_i1	-*	61M24	Z
TRINITY_DN18213_c0_g2_i5	LC381309	64C13	Z
TRINITY_DN18213_c0_g2_i1	-*	65L07	Z

*: no record deposited

Table 40 PCR-selected *Nothopsysche ruficollis* BAC, the primer used for the selection, the product size and, *Stenopsysche marmorata* and *Bombyx mori*

ortholog information									
Trinity numeber in <i>Nr</i> * RNA-seq BAC	forward primer	reverse primer	produ ct size (bp)	<i>Sm</i> ** gene ID corresponded	<i>Bm</i> *** gene ID corresponded	<i>Sm</i> chromosome	<i>Bm</i> chromosome	Silkbase position	
TRINITY_DN1 4893_c0_g1_i1	31E02 ATCAAGCACAGTGAGGTGGG	CCCACGCAGAGGATTCTACC	202	-	BGIBMGA0 04001	not assigned	19	10,453,032.. 10,454,662	
TRINITY_DN1 4135_c0_g1_i1	39E22 GATGGGGAAAGATCGCCTCTG	TACCGTCTGCCCTCCAGTAA	202	-	BGIBMGA0 03972	not assigned	19	11,33,5351.. 11,337,766	
TRINITY_DN1 5619_c0_g1_i1	33I21 CCCGCTACCTGAACGAGAAAG	GCAATCCATCAGCACGTTGG	101	LC381358	-	4	19	12,854,223.. 12,844,940	
TRINITY_DN1 6748_c0_g1_i1	47D06 TCGTGGGAAAGTTCGTCGAG	ATACTCCGGGCACATGTTGG	92	LC381335	-	4	11	340,565..405 ,889	
TRINITY_DN1 3584_c0_g1_i1	47M18 GCGCTACAAAGTTTCCTCTGC	CCTTTTGGCGTAAGCTGGG	234	LC381337	-	4	11 (29)	6,484,960..6, 480,249	

*=*Nothopsysche ruficollis*, ***Sm*=*Stenopsysche marmorata*, ****Bm*=*Bombyx mori*

Table 41 *Nothopsysche ruficollis* BAC information used for FISH mapping in Figure 11

Trinity numeber in <i>Nr</i> * RNA-seq BAC	forward primer	reverse primer	<i>Sm</i> ** chromosome	<i>Bm</i> *** chromosome	Silkbase position	labeled dye	pseudo color
TRINITY_DN1 4893_c0_g1_i1	31E02 ATCAAGCACAGTGAGGTGGG	CCCACGCAGAGGATTCTACC	not assigned	19	10,453,032.. 10,454,662	Orange	Yellow
TRINITY_DN1 4135_c0_g1_i1	39E22 GATGGGGAAAGATCGCCTCTG	TACCGTCTGCCCTCCAGTAA	not assigned	19	11,33,5351.. 11,337,766	Green	Red
TRINITY_DN1 5619_c0_g1_i1	33I21 CCCGCTACCTGAACGAGAAAG	GCAATCCATCAGCACGTTGG	4	19	12,854,223.. 12,844,940	Green	Green
TRINITY_DN1 6748_c0_g1_i1	47D06 TCGTGGGAAAGTTCGTCGAG	ATACTCCGGGCACATGTTGG	4	11	340,565..405 ,889	Cy5	Magenta
TRINITY_DN1 3584_c0_g1_i1	47M18 GCGCTACAAAGTTTCCTCTGC	CCTTTTGGCGTAAGCTGGG	4	11 (29)	6,484,960..6, 480,249	Orange	Yellow

*=*Nothopsysche ruficollis*, ***Sm*=*Stenopsysche marmorata*, ****Bm*=*Bombyx mori*

第3節 ホタルトビケラ BAC-FISH マッピング

ホタルトビケラにおいては、染色体カウント実験も行われておらず、細胞遺伝学的な研究は白紙の状態である。本節では、ホタルトビケラ (*Nothopsyche ruficollis*) の染色体標本作製技術を確立し、本章第2節にて選抜した BAC をプローブとして用いた FISH 法を行うことを目論んだ。また、ヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) やカイコ遺伝子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 を特定しており、これらを用いた BAC-FISH マッピングから、ヒゲナガカワトビケラおよびカイコとの染色体比較研究の細胞遺伝学的基盤の構築を目指した。

材料および方法

1. 供試昆虫

本研究には、第1節同様、倉西良一博士から分譲頂いたホタルトビケラの個体を用い、飼育は、第1節に記述した通りに行った。

2. 染色体標本作製

雌雄共に終齢幼虫 (5 齢) から蛹の個体を用いて、減数第一分裂前期パキテン期の染色体標本の作製に適切なステージを検証した。作製方法は、第Ⅲ章第1節に記載した、染色体標本作製方法に準じて行った。

3. BAC-FISH 解析

BAC-FISH は第Ⅲ章第1節で確立した方法に準じて行った。コンペティターには、ホタルトビケラのソニケート gDNA を用い、ホタルトビケラ染色体標本に対して同種の BAC-DNA をプローブとして行った。また、リプローブも同様の手順で行った。

結果

ホタルトビケラのパキテン期の染色体標本を雄から作製するには、夏眠前の陸上への移動が確認される時期の個体が適切であった。雌の染色体標本は、夏眠前後のいずれの時期の個体でも作製が可能であった。作製した雌染色体標本には、卵原細胞の有糸分裂中期像が認められ、ホタルトビケラ雌の体細胞染色体数は、 $2n=55$ (Figure 10) とカウントされた。雌減数分裂前期パキテン期の染色体を観察したところ、他の多動原体型染色体構造を有する種と同様に、染色体を区別、カリオタイピングできるような形態的な差は乏しかった。また、ヒゲナガカワトビケラと同様に雌減数分裂前期のパキテン核で Z 染色体と推定される univalent が 1 つ観察された (data not shown)。多くの場合、セルフシナプシスの形態を

とった。

ヒゲナガカワトビケラの第4染色体にマップされる3 BAC (11J14, 43G07, 65M23) に含まれる遺伝子オルソログを持つホタルトビケラ BAC (33I21, 47D06, 47M18) が選抜されている(本章第2節 Table 40)。これらから抽出した BAC-DNA をプローブとした FISH を行い、ホタルトビケラでの BAC-FISH に成功した (Figure 11a)。マッピングの結果、ホタルトビケラの異なる 33I21 (緑)、47D06 (マゼンタ) ならびに 47M18 (黄) (Table 41) それぞれのプローブ特異的シグナルは、別々の3染色体上に認められた (Figure 11a)。そこで、カイコ第19染色体の約 10.45 Mb と約 11.33 Mb (Silkbase 基準) に座する2遺伝子 (BGIBMGA004001 と BGIBMGA003972) それぞれのオルソログを含む2 BACs (本章第2節 Table 40) を同一染色体標本にリプローブした。その結果、31E02 プローブシグナル (黄) は、すべての染色体に散在した (Figure 11b, Table 41)。一方、39E22 プローブシグナル (赤) は、33I21 (緑) シグナルをもつ染色体に認められた (Figure 11c, Table 41)。

考察

ホタルトビケラ雌の体細胞染色体数は、 $2n=55$ (Figure 10) と奇数を示した。雌における奇数染色体数は、これまで研究された毛翅目昆虫 (Klingstedt 1931; Makino and Kichijo 1934; Marec and Novák 1998; Lukuhtanov 2000) ならびに本研究の第III章第1節のヒゲナガカワトビケラでの結果と同様であることから Z0/ZZ (雌/雄) の性染色体システムが推測される。しかしながら、雌雄共に奇数の染色体数をもつ生物も発見されている (Kobayashi et al 2008) ことから、確証を得るためにも雄の染色体数を明確にする必要がある。さらに、Z染色体にシグナルを示す BAC を獲得することで、雌雄の性染色体構成を確定できる。

エグリトビケラ科において染色体数の基本数は $n=30$ とされ、カウントされた種で $n=28$ の種は報告例がない (Kiauta 1971)。鱗翅目昆虫においては、基本数 $n=31$ から染色体融合により染色体数が減少して、 $n=28$ となった事例が報告 (Yoshido et al 2011b; Nguyen et al 2013; Ahola et al 2014; Yasukochi et al 2016) されている。ホタルトビケラにおいても祖先種における同様な染色体融合で $n=28$ の染色体数が構成されている可能性がある。

本研究で、ホタルトビケラにおける BAC-FISH ならびにリプロービングテクニックが実行できた (Figure 11)。ヒゲナガカワトビケラと同様に行えた (本研究第III章) ことから、毛翅目昆虫において広く適応できると考えられる。BAC-FISH とリプロービングテクニックを用いた、ホタルトビケラとヒゲナガカワトビケラの染色体比較を行った結果 (Figure 11a, Table 41)、染色体のコリニアリティーは認められなかった。一方、カイコ Chr19 の約 1.5Mb 間に座する遺伝子のオルソログをもつ BAC プローブがホタルトビケラでも同一染色体上にマップされた (Figure 11c, Table 41)。ごく限られた情報ではあるが、ホタルトビケラは、鱗翅目昆虫種と類似した染色体対応関係を有する可能性が示唆された。この示唆の真偽を明らかにするために、さらなる BAC セレクションと FISH マッピングが必要である。なお、

カイコ Chr19 で上記 2 遺伝子の近傍に位置する遺伝子を含む BAC プローブのシグナルが染色体全体に認められた (Figure 11b) ことは非常に残念である。これは、鱗翅目昆虫種における BAC-FISH にも時々認められ、使用した BAC-DNA 配列に、高コピー数のリピート配列が含まれることが原因と考えられる。

日本のホタルトビケラ属は 7 種確認されており (Nozaki 2002)、幼虫は完全陸生種、半陸生種、水生種が混在している (Hayashi et al 2008)。ホタルトビケラ属においてもヒゲナガカワトビケラ科と同様なクロスハイブリダイゼーションマッピングを行うことで、生活環の変化と染色体との関係についてを解析できる可能性がある。

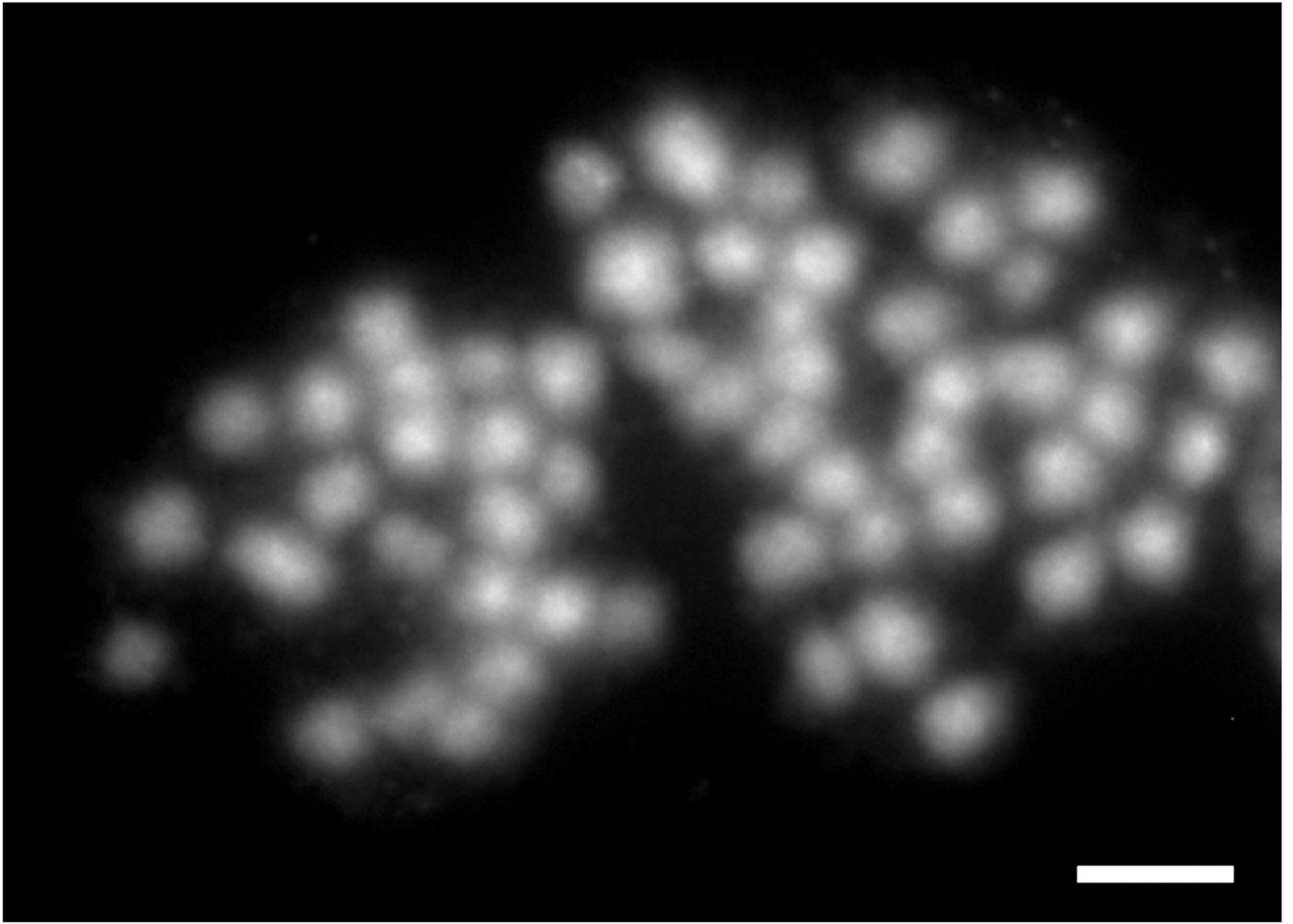


Figure 10 A mitotic complement of *Nothopsyche ruficollis* oogonia

DAPI stained (grey) chromosomes count $2n=55$. Scale bar 5 μm

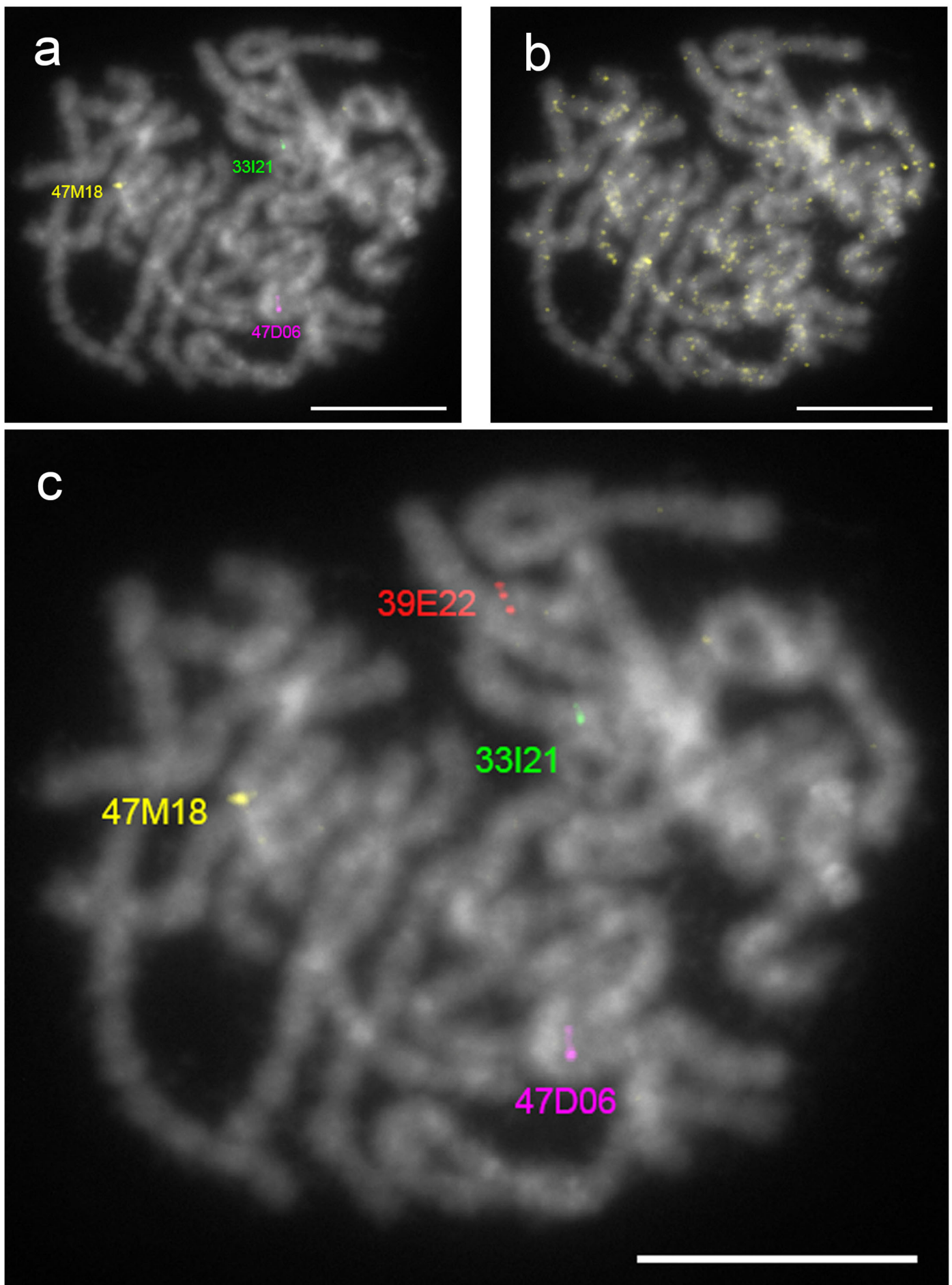


Figure 11 BAC-FISH mapping of a *Nothopsyche ruficollis* pachytene complement stained with DAPI (grey).

a: Three BAC probes 33I21 (green), 47D06 (magenta) and 47M18 (Yellow) are used and each specific signal appear on the different bivalents. b: Dispersed yellow signals from 31E02 are observed on all bivalents. c: 39E22 (red) is reprobated to the same chromosome complement as a. Red and green signals are observed on the same bivalent. See Table 41 for details of BAC information.

第VI章 総合考察

生物の全ゲノム配列を短時間でシーケンス可能となった現代では、個体間のゲノム配列から変異領域を容易に特定することが可能となり、集団内における変異の維持に、染色体の逆位が重要な役割を担っていることが示唆されている (Wellenreuther and Bernatchez 2018)。染色体研究の手法も、染色体のカウント、分染法による染色パターンの比較から、FISH による染色体の任意領域を蛍光し、直接視覚認識する技術が誕生した。このような技術を用いた鱗翅目昆虫の染色体研究で、性染色体と薬剤抵抗性に関与する遺伝子を有する常染色体の融合が急速な抵抗性の拡大に関与することや (Nguyen et al 2013)、近縁種間の染色体構造の進化 (Yoshido et al 2011a; b; Šíchová et al 2015; 2016; Zrzavá et al 2018) が明らかとされている。生物の進化とゲノムを構成する染色体には密接なつながりがあり、多様な分類群の染色体研究が生物の進化にかかわる多くの研究に寄与すると考えられる。

本研究では、鱗翅目昆虫と共通祖先を有する毛翅目昆虫の細胞遺伝学の研究基盤構築を目指し、ヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) とホタルトビケラ (*Nothopsyche ruficollis*) の BAC ライブラリーの構築、遺伝子配列情報の獲得を行い、BAC-FISH 法による染色体比較を行った。細胞遺伝学的研究基盤が構築されている鱗翅目昆虫と異なり、毛翅目昆虫には十分な研究基盤は存在しないため、新規に研究基盤を構築する必要があった。他の昆虫同様、毛翅目昆虫の多くは、成虫の形態により分類される。ところが、成虫と幼虫の対応付けは必ずしも行われておらず、多くの種では、幼虫における同定が困難である。本研究で最初に対象としたヒゲナガカワトビケラは、幼虫、蛹、成虫のいずれのステージにおいても種の同定方法が確立している (津田・赤木 1962, 野崎 1986)。また、日本全国に広く分布し、水質階級の指標生物として利用されるほど認知されている昆虫である (環境省 2017)。河川における個体数と底層生物におけるサイズも最大級のため、河川における優占種となることが多く、このような特徴から最も研究されている毛翅目昆虫の一種であり、細胞遺伝学研究の基盤構築に最も適する種のひとつであると考えられた。ホタルトビケラは、日本において 2 種しか確認されていない継代飼育できる毛翅目昆虫のひとつである (野崎・島田 1996)。継代飼育可能なもう 1 種のコガタシマトビケラ (*Cheumatopsyche brevilineata*) (農業環境技術研究所 2008) と比べ、個体サイズが大きく、ヒゲナガカワトビケラとコガタシマトビケラが属するシマトビケラ亜目 (Annulipalpia) とは異なるエグリトビケラ亜目 (Integripalpia) に属する。複数の分類群に属する毛翅目昆虫の研究基盤を構築することは、後述する毛翅目昆虫の系統関係や毛翅目昆虫と鱗翅目昆虫との染色体進化を議論するうえで必要であると考え研究対象種とした。

毛翅目昆虫と鱗翅目昆虫は、形態的な差に乏しく、分染法も適応できない分散動原体型染色体構造のため (Suomalainen 1969; Marec and Novak 1998)、長年染色体研究が停滞していた。しかしながら、鱗翅目昆虫において BAC や fosmid を用いた FISH 解析によって、染色体研究が大きく前進した。FISH 法の適用でモデル鱗翅目昆虫カイコ (*Bombyx mori*) におい

て初のカリオタイピングが達成され (Yoshido et al 2005)、カイコの単一遺伝子に対応する鱗翅目昆虫各種のオルソログ座上位置の比較から、鱗翅目昆虫間の染色体対応関係が明らかとされた (Yasukouchi et al 2009; Sahara et al 2013; Yasukochi et al 2016)。さらに、カイコの染色体数 $n=28$ から大規模な染色体数の変化が生じているヤママユガ科のエリサン (*Samia cynthia ricini*) $n=14$ における染色体の対応関係は、単純な染色体の融合/切断で説明することができることが示された (Yoshido et al 2011a; b)。これらの研究結果より、染色体数の増減を伴う変異が生じて、鱗翅目昆虫種間のマクロな染色体対応関係は失われないというコンセンサスが得られつつある。こうした染色体対応関係が共通祖先を有している毛翅目昆虫にも認められるならば、分散動原体型染色体構造の染色体進化理論と大きく異なる、強固な染色体座上遺伝子の維持機構が想定される。また、染色体の対応関係がなければ、進化理論に沿った系統間や種間における染色体進化と種形成について議論することができると考えられる。よって、細胞遺伝学の研究基盤を構築し、BAC-FISH による染色体比較解析を行った。その結果、本研究の第Ⅱ章と第Ⅴ章で達成されたヒゲナガカワトビケラおよびホタルトビケラ BAC ライブラリー構築は、世界初となった。さらに、これら BAC をプローブとした FISH (BAC-FISH) の適用 (第Ⅲ章ならびに第Ⅴ章) も、毛翅目昆虫で初めて可能とした。

第Ⅲ章の BAC-FISH マッピングの結果より、ヒゲナガカワトビケラと鱗翅目昆虫間には常染色体の対応関係は確認されなかった (Figures 3, 4, 5, Tables 31, 32, 33)。ヒゲナガカワトビケラの染色体数 $n=13$ は、鱗翅目昆虫の基本数 $n=31$ の半分以下であるが、鱗翅目昆虫間では染色体数の増減は、染色体対応関係崩壊に必ずしも関与しない (Yoshido et al 2011a; b)。ただし一般的には、染色体の再構成には染色体数の変化も伴う。ヒゲナガカワトビケラが鱗翅目昆虫種の染色体とはゲノムワイドに対応関係がない理由を議論するうえで、鱗翅目昆虫の系統学的にチョウと呼ばれているグループ (アゲハチョウ上科 (Papilionoidea) + セセリチョウ上科 (Hesperiidae)) の例外的な染色体対応関係を考える必要がある。チョウには染色体数 $n=5\sim 226$ の種が含まれており (De Prins and Saitoh 2003; Brown et al 2004; Lukhtanov 2015)、他の上科に属する種に比べて大規模な染色体変異が生じていることが示唆される。シロチョウ科のオオモンシロチョウ (*Pieris brassicae*) とモンシロチョウ (*Pieris rapae*) に対して行われた BAC-FISH マッピング結果では、性染色体を除いて他の鱗翅目昆虫種との染色体対応関係が失われている可能性が強く示唆されている (内藤 2009; 福田 2014; 大野 2017) が、一部の領域において、カイコとの対応関係が示唆されており、いわゆるマイクロシンテニーが存在する可能性がある。また、染色体数が $n=15$ (オオモンシロチョウ) と $n=25$ (モンシロチョウ) と大きく異なるこの 2 種間において、染色体の対応関係は単純な付着と切断で説明することができる。一方、染色体数 $n=31$ のモンキチョウ (*Colias erate*) においてはカイコとの染色体コリニアリティーが示唆されており、大規模な染色体の増減が起きている系統のみが染色体の対応関係を失ったと推測されている (大野 2017)。ヒゲナガカワトビケラが属しているシマトビケラ亜目に確認されている染色体数は、

n=13~15 とチョウのような染色体の多様性は確認されない (Kiauta 1971)。また、近縁種であるチャバネヒゲナガカワトビケラ (*S. sauteri*) との染色体対応関係が認められる (Figure 6) ことから、シマトビケラ亜目の種がチョウのような大規模な染色体リアレンジメントが生じている分類群ではないと推測される。したがって、ヒゲナガカワトビケラと鱗翅目昆虫種との染色体対応関係の崩壊は、シマトビケラ亜目内で生じた変化ではない可能性が考えられる。毛翅目昆虫の系統関係は、不明な点が残るもののシマトビケラ亜目がもっとも祖先的でエグリトビケラ亜目が最も進化的と考えられている (Ross 1967; Kjer et al 2016)。鱗翅目昆虫との分岐は約 2 億年前 (Misof et al 2014) であると推定されており、染色体リアレンジメントの少ない系統群も存在する可能性はある。これらの検証にはまず、エグリトビケラ亜目の種における鱗翅目昆虫種との染色体比較マッピングおよびヒゲナガカワトビケラ科と異なる科に属する種の染色体比較研究が必要である。因みに、モンシロチョウで認められた染色体リアレンジメント (大野 2017) とヒゲナガカワトビケラの染色体には、ゲノムワイドな対応関係は認められなかった (data not shown)。

ヒゲナガカワトビケラと鱗翅目昆虫との常染色体における対応関係の崩壊は明らかとなったが、性染色体である Z 染色体にはコリニアリティーが認められた (Figure 5: Z Chr)。毛翅目昆虫と鱗翅目昆虫は、WZ/ZZ もしくは ZO/ZZ (雌/雄) といった昆虫においてはマイナーなグループに属する雌ヘテロ型性染色体システムを共有している (Marec and Novák 1998)。鱗翅目昆虫の性染色体研究において、進化的な鱗翅目昆虫が獲得している雌特異的な性染色体 W の起源が常染色体由来 (A 説) であるか、B 染色体と言われるゲノムに必須ではない染色体もしくはゲノムに必須ではない配列由来 (B 説) かが議論されている (Traut and Marec 1996; Lukuhtanov 2000)。Fraïsse et al (2017) は、3 種の鱗翅目昆虫 (*Cameraria ohridella*, *Nemophora degeerella*, *Triodia sylvina*) のゲノム比較を行った。その結果、進化的な鱗翅目昆虫の Z 染色体座上遺伝子数に祖先的な種からの大幅な増加が確認されなかったため、彼らは B 説を支持した。Dalíková et al (2017) は、qPCR による Z 染色体座上遺伝子の比較から、A 説と B 説いずれでも説明可能であるとした。前者の研究では、対象としたカイコ Z 遺伝子オルソログの Z 染色体座上を直接確認しておらず、また、追加的に行われたトビケラ種 (*Limnephilus lunatus*) のデータは雌のみである (Fraïsse et al 2017)。本研究では、カイコ Z 染色体の約 8.04 Mb (Silkbase 基準) に座上する *IDGF* のヒゲナガカワトビケラオルソログを含む BAC は、常染色体にマップされており (Figure 4: Chr 9)、進化的な鱗翅目昆虫の Z 染色体に座上する遺伝子の一部がヒゲナガカワトビケラでは常染色体に座上することが明らかとなった。これは、Z 染色体の特定の領域が常染色体由来である可能性を残すデータと考えられる。したがって、鱗翅目昆虫における W 染色体の起源を B 説とするには更なる検証が必要であり、ヒゲナガカワトビケラでのカイコ Z 遺伝子オルソログの更なる特定とそれらを含む BAC 選抜ならびに FISH マッピングに期待がもたれる。

第 IV 章で行われたヒゲナガカワトビケラにおける個体間染色体変異の解析より、ヒゲナガカワトビケラの第 1、第 12 染色体に多様性が示された (Figures 7, 8, Tables 35, 36)。ヒゲ

ナガカワトビケラはマイクロサテライトマーカーによる研究で、個体群間における遺伝的多様性が確認され (Yaegashi et al 2014)、*cytochrome c oxidase subunit I* および *elongation factor-1 α* の配列データを元にした系統遺伝学解析で、高地に生息するヒゲナガカワトビケラは、別クレードに位置することが示されている (Saito et al 2018)。さらに、ヒゲナガカワトビケラ雌の遡上飛行は、ダムなどの物理障壁によって、境界の上下で遺伝的構造が明確に分かれる可能性が示されている (林・谷田 2008)。したがって、下流の川幅が大きい河川では遺伝的多様性が保たれ、上流から下流への遺伝的移動は、雨やダムの放水などで河川の水量の増加で一定数が移動可能であるが、下流から上流への移動は物理障壁によって拡散の程度が低いため、上下流間の距離が大きくなるほど個体群間の遺伝的変異が大きくなるはずである。遺伝的変異とその維持機構には染色体逆位が大きな役割を担っていると推測され (Wellenreuther and Bernatchez 2018)、分散能力の低い水生昆虫の一種であるヒゲナガカワトビケラの個体群間で染色体逆位が認められたことは、染色体逆位と環境適応、種形成における研究対象として非常に適していると言える。採集地と解析個体数の拡大から、更なる検証が求められる。

第V章で行われたホタルトビケラにおける BAC-FISH は、マッピングしたオルソログ数が少なく、更なる検証が必要であるが、ヒゲナガカワトビケラとの染色体対応関係が認められなかった。この結果は、毛翅目昆虫の系統発生を考える上で、染色体比較が有効な解析であることを示唆している。系統関係がはっきりとしないナガレトビケラ亜目がシマトビケラ亜目もしくはエグリトビケラ亜目と染色体対応関係が認められれば、どちらかの側系統説 (Francia and Wiggins 1997; Kjer et al 2016) が支持されるだろう。どちらとも認められなければ単系統説を支持することができる。これらの仮説を検証するためには、さらなる毛翅目昆虫における染色体比較解析が必要である。一方、1 染色体に関してではあったが、ホタルトビケラと鱗翅目昆虫との染色体対応関係が示唆された (Figure 11c)。これは、鱗翅目昆虫と毛翅目昆虫の共通祖先が分岐したとされる約 2 億年以上前から、特定の分類群に属する毛翅目昆虫の染色体座上遺伝子の構成が大きく変化していない可能性を残し、シマトビケラ亜目はエグリトビケラ亜目との共通祖先で大規模な染色体リアレンジメントが起きた種から、形成された系統であるとの仮説も成り立つ。しかしながら、蓋然性をもって議論するためには、さらなるホタルトビケラの BAC-FISH 解析の進展が待たれる。

毛翅目昆虫におけるゲノムデータは、lepbase (<http://lepbase.org/>) という鱗翅目昆虫のゲノムデータベースに 2 種 (*Limnephilus lunatus* と *Glyphotaelius pellucidus*) が登録されている。ところが、これらのシーケンス深度もアセンブル長も低く、鱗翅目昆虫と比較するゲノム比較に十分なデータとは言えない。しかしごく最近、Luo et al (2018) によって発表されたヒゲナガカワトビケラ科 *S. tienmushanensis* のゲノムデータは、Scaffold N50 が 1,297 Kb とゲノム比較可能な規模のデータである。また、この種はチャバネヒゲナガカワトビケラ (*S. sauteri*) よりもヒゲナガカワトビケラに系統学上近縁な種である (Saito et al 2018)。本研究の第III章の結果より、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間に

染色体対応関係が認められる (Figure 6) ことから、*S. tienmushanensis* にも対応関係が認められると推測される。本研究で解析に用いたヒゲナガカワトビケラ cDNA 配列データに *S. tienmushanensis* のコンティグデータをアノテーションすることで、ヒゲナガカワトビケラのマップした BAC 付近の配列を推測することが可能である。Luo et al (2018) は、RNAseq データも公開しているので、本研究の第 V 章で用いた、カイコオルソログ特定法を使用した解析から、ヒゲナガカワトビケラにおけるカイコ Z オルソログを含む BAC の特定につながる実験が想定できる。さらに、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間の FISH マッピングに差異のあった領域に存在する遺伝子や、ヒゲナガカワトビケラの同一個体群において染色体変異が確認された領域に対応する候補遺伝子を特定できる可能性が広がった。また、染色体標本が入手できれば、ヒゲナガカワトビケラ BAC プローブを用いたクロスハイブリダイゼーションによるマッピング解析も可能と考えられる。

以上より、本研究では、毛翅目昆虫における細胞遺伝学の研究基盤を構築することに成功し、BAC-FISH 解析に基づく染色体研究は、毛翅目昆虫の系統進化や種形成、環境適応の解析に寄与する可能性が示された。これら染色体研究とゲノム解読・解析技術を組み合わせることで、毛翅目昆虫を用いた分子細胞遺伝学の研究の基盤形成に本研究が大きく寄与したと確信する。

第Ⅶ章 摘要

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。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。毛翅目昆虫の染色体研究はこれまで、染色体数のカウント実験に留まっていた。本研究では、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。

本研究の第Ⅱ章では、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 65.38 Kb 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配列決定を行い、カイコ遺伝子と同一の進化的な由来をもつオルソログを特定した。

第Ⅲ章では、特異的な配列をもとに設計したプライマー (STS primer: single tagged sequence primer) を用いて、これらオルソログを含む 81 BACs の選抜に成功した。これらの BAC プローブを用いて、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 マッピング結果より、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。また、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た。

第Ⅳ章では、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、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認められた。この研究において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。その結果、個体間においても多様性が存在することを発見した。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。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。

第Ⅴ章において、エグリトビケラ亜目ホタルトビケラ (*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。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、上記の FISH に使用したヒゲナガカワトビケラ BAC の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Ⅷ章 参考文献

- Ahola V, Lehtonen R, Somervuo P, Salmela L, Koskinen P, Rastas P, Välimäki N, Paulin L, Kvist J, Wahlberg N, Tanskanen J, Horne EA, Ferguson LC, Luo S, Cao Z, de Jong MA, Duploux A, Smolander OP, Vogel H, McCoy RC, Qian K, Chong WS, Zhang Q, Ahmad F, Haukka JK, Joshi A, Salojärvi J, Wheat CW, Grosse-Wilde E, Hughes D, Katainen R, Pitkänen E, Ylinen J, Waterhouse RM, Turunen M, Vähärautio A, Ojanen SP, Schulman AH, Taipale M, Lawson D, Ukkonen E, Mäkinen V, Goldsmith MR, Holm L, Auvinen P, Frilander MJ and Hanski I (2014) The *Glanville fritillaria* genome retains an ancient karyotype and reveals selective chromosomal fusions in Lepidoptera. *Nature Communication* **5**, 4737
- Bai X, Sakaguchi M, Yamaguchi Y, Ishihara S, Tsukada M, Hirabayashi K, Tsukada M, Hirabayashi K, Ohkawa K, Nomura T and Arai R (2015) Molecular cloning, gene expression analysis, and recombinant protein expression of novel silk proteins from larvae of a retreat-maker caddisfly, *Stenopsyche marmorata*. *Biochemical and biophysical research communications* **464**(3), 814-819
- Banno Y, Sakaida K, Nakamura T, Tsuchida K, Kawaguti Y, Koga K and Doira H (1997) Reassessment of mapping of the E homeotic gene complex of *Bombyx mori* by linkage analysis and *in situ* hybridization with an *Antennapedia* clone as a probe. *Journal of Sericultural Science of Japan* **66**, 151-155
- Barb JG, Bowers JE, Renaut S, Rey JI, Knapp SJ, Rieseberg LH and Burke JM (2014) Chromosomal evolution and patterns of introgression in *Helianthus*. *Genetics* **114**, 165548
- Baxter SW, Davey JW, Johnston JS, Shelton AM, Heckel DG, Jiggins CD and Blaxter ML (2011) Linkage mapping and comparative genomics using next-generation RAD sequencing of a non-model organism. *PloS one* **6**(4), e19315
- Beldade P, Saenko SV, Pul N and Long AD (2009) A gene-based linkage map for *Bicyclus anynana* butterflies allows for a comprehensive analysis of synteny with the lepidopteran reference genome. *PLoS genetics* **5**, e1000366
- Blackmon H and Demuth JP (2015) Genomic origins of insect sex chromosomes. *Current Opinion in Insect Science* **7**, 45-50
- Brown KS Jr, von Schoutz B and Suomalainen E (2004) Chromosome evolution in Neotropical Danainae and Ithomiinae (Lepidoptera). *Hereditas* **141**, 216-236
- Dalíková M, Zrzavá M, Hladová I, Nguyen P, Šonský I, Flegrová M, Kubíčková S, Voleníková A, Kawahara AY, Peters RS and Marec F (2017) New Insights into the Evolution of the W Chromosome in Lepidoptera. *Journal of Heredity*, **108**(7), 709-719
- De Prins J and Saitoh K (2003) Karyology and sex determination. Lepidoptera, Moths and Butterflies: Morphology, Physiology, and Development. *Berlin: Walter de Gruyter*, 449-68
- Ellegren H and Fridolfsson AK (1997) Male-driven evolution of DNA sequences in birds. *Nature*

- genetics*, 17(2) 182-184
- Fraïsse C, Picard MA and Vicoso B (2017) The deep conservation of the Lepidoptera Z chromosome suggests a non-canonical origin of the W. *Nature communications* 8(1), 1486
- Frania HE and Wiggins GB (1997) Analysis of morphological and behavioral evidence for the phylogeny and higher classification of Trichoptera (Insecta). *Royal Ontario Museum, Life Sciences Contributions* 160, 1-67
- 福田拓斗 (2014) オオモンシロチョウにおける鱗翅目昆虫染色体リアレンジメントの検証. 岩手大学大学院農学研究科 修士論文 52pp
- 林義雄・谷田一三 (2008) ヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) の遺伝的集団構造に対するダム湖の影響. *応用生態工学* 11(2), 153-159
- Hayashi F, Kamimura Y and Nozaki T (2008) Origin of the transition from aquatic to terrestrial habits in *Nothopsyche* caddisflies (Trichoptera: Limnephilidae) based on molecular phylogeny. *Zoological science* 25(3), 255-260
- Heliconius Genome Consortium (2012) Butterfly genome reveals promiscuous exchange of mimicry adaptations among species. *Nature* 487, 94-98
- Ito K, Katsuma S, Kuwazaki S, Jouraku A, Fujimoto T, Sahara K, Yasukochi Y, Yamamoto K, Tabunoki H, Yokoyama T, Kadono-Okuda K and Shimada T (2016) Mapping and recombination analysis of two moth colour mutations, Black moth and Wild wing spot, in the silkworm *Bombyx mori*. *Heredity* 116, 52-59
- Kageyama D, Ohno M, Sasaki T, Yoshido A, Konagaya T, Jouraku A, Kuwazaki S, Kanamori H, Katayose Y, Narita S, Miyata M, Riegler M and Sahara K (2017) Feminizing *Wolbachia* endosymbiont disrupts maternal sex chromosome inheritance in a butterfly species. *Evolution Letters* 1(5), 232-244
- 環境省 (2017) 水生生物による水質評価法マニュアル -日本版平均スコア法.
- 加藤孟宏 (2013) コナガの BAC-FISH による遺伝子マッピング. 岩手大学大学院農学研究科 修士論文 38pp
- Kiaura B (1971) The chromosome conditions in the spermatogenesis of the caddis-fly *Goera pilosa* (Fabricius, 1775) (Trichoptera, Integripalpia, Limnephiloidea: Goeridae) from the God dal Fuorn in the Swiss National Park, with conderations on the phylogenetic position of the family. *Ergebn. wiss. unters. schweiz. Natn Parks* 9(64), 174-185
- Kim UJ, Birren BW, Slepak T, Mancino V, Boysen C, Kang H L, Simon MI and Shizuya H (1996) Construction and characterization of a human bacterial artificial chromosome library. *Genomics* 34(2), 213-218
- Kjer KM, Thomas JA, Zhou X, Frandsen PB, Prendini E and Holzenthal RW (2016) Progress on the phylogeny of caddisflies (Trichoptera). *Zoosymposia* 10(1), 248-256
- Klingstedt H (1931) Digametie beim Weibchen der Trichoptera *Limnophilus decipiens* Kol. *nebst*

- Erörterungen zur Theorie der Geschlechtsvererbung. Acta Zool Fennica* **10**, 1-69
- Kobayashi T, Yamada F, Hashimoto T, Abe S, Matsuda Y, Kuroiwa A (2008) Centromere repositioning in the X chromosome of XO/XO mammals, Ryukyu spiny rat. *Chromosome Research* **16**(4), 587-593
- Kozak GM, Wadsworth CB, Kahne SC, Bogdanowicz SM, Harrison RG, Coates BS and Dopman EB (2017). A combination of sexual and ecological divergence contributes to rearrangement spread during initial stages of speciation. *Molecular ecology* **26**(8), 2331-2347
- Küpper C, Stocks M, Risse JE, dos Remedios N, Farrell LL, McRae SB, Morgan TC, Karlionova N, Pinchuk P, Verkuil YI, Kitaysky AS, Wingfield JC, Piersma T, Zeng K, Slate J, Blaxter M, Lank DB and Burke T (2016) A supergene determines highly divergent male reproductive morphs in the ruff. *Nature Genetics* **48**(1), 79
- Lamichhaney S, Fan G, Widemo F, Gunnarsson U, Thalmann DS, Hoepfner MP, Kerje S, Gustafson U, Shi C, Zhang H, Chen W, Liang X, Huang L, Wang J, Liang E, Wu Q, Ming-Yuen Lee S, Xu X, Höglund J, Liu X and Andersson L (2016) Structural genomic changes underlie alternative reproductive strategies in the ruff (*Philomachus pugnax*). *Nature Genetics* **48**(1), 84
- Langer-Safer PR, Levine M and Ward DC (1982) Immunological method for mapping genes on *Drosophila* polytene chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America* **79**(14), 4381-4385
- Lukhtanov VA (2000) Sex chromatin and sex chromosome systems in nonditrysian Lepidoptera (Insecta). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **38**(2), 73-79
- Lukhtanov VA (2015) The blue butterfly *Polyommatus (Plebicula) atlanticus* (Lepidoptera, Lycaenidae) holds the record of the highest number of chromosomes in the non-polyploid eukaryotic organisms. *Comparative Cytogenetics* **9**, 683
- Luo S, Tang M, Frandsen PB, Stewart RJ and Zhou X (2018) The genome of an underwater architect, the caddisfly *Stenopsyche tienmushanensis* Hwang (Insecta: Trichoptera). *GigaScience* **7**(12), giy143
- Makino S and Kichijo H (1934) Female heterogamety in the trichopterous insect, *Stenopsyche griseipennis* MacLachlan (with 3 Figures). 北海道帝國大學理學部紀要= *Journal of the Faculty of Science Hokkaido Imperial University Series V I. Zoology* **3**(1), 9-16
- Marec F and Novák K (1998) Absence of sex chromatin corresponds with a sex-chromosome univalent in females of Trichoptera. *European Journal of Entomology* **95**, 197-209
- Marec F, Sahara K and Traut W (2010) Rise and fall of the W chromosome in Lepidoptera. *Molecular biology and genetics of the Lepidoptera* **49**
- Melters DP, Paliulis LV, Korf IF and Chan SW (2012) Holocentric chromosomes: convergent evolution, meiotic adaptations, and genomic analysis. *Chromosome Research* **20**, 579–293
- Miao XX, Xub SJ, Li MH, Li MW, Huang JH, Dai FY, Marino SW, Mills DR, Zeng P, Mita K, Jia

- SH, Zhang Y, Liu WB, Xiang H, Guo QH, Xu AY, Kong XY, Lin HX, Shi YZ, Lu G, Zhang X, Huang W, Yasukochi Y, Sugasaki T, Shimada T, Nagaraju J, Xiang ZH, Wang SY, Goldsmith MR, Lu C, Zhao GP and Huang YP (2005) Simple sequence repeat-based consensus linkage map of *Bombyx mori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 16303-16308
- Misof B, Liu S, Meusemann K, Peters SR, Donath A, Mayer C, Frandsen BP, Ware J, Flouri T, Beutel GR, Niehuis O, Petersen M, Izquierdo-Carrasco F, Wappler T, Rust J, Aberer JA, Aspöck U, Aspöck H, Bartel D, Blanke A, Berger S, Böhm A, Buckley RT, Calcott B, Chen J, Friedrich F, Fukui M, Fujita M, Greve C, Grobe P, Gu S, Huang Y, Jermiin SL, Kawahara YA, Krogmann L, Kubiak M, Lanfear R, Letsch H, Li Y, Li Z, Li J, Lu H, Machida R, Mashimo Y, Kapli P, McKenna DD, Meng G, Nakagaki Y, Navarrete-Heredia LJ, Ott M, Ou Y, Pass G, Podsiadlowski L, Poh H, Reumont MB, Schütte K, Sekiya K, Shimizu S, Slipinski A, Stamatakis A, Song W, Su X, Szucsich UN, Tan M, Tan X, Tang M, Tang J, Timelthaler G, Tomizuka S, Trautwein M, Tong X, Uchifune T, Walz GM, Wiegmann MB, Wilbrandt J, Wipfler B, Wong KF T, Wu Q, Wu G, Xie Y, Yang S, Yang Q, Yeates KD, Yoshizawa K, Zhang Q, Zhang R, Zhang W, Zhang Y, Zhao J, Zhou C, Zhou L, Ziesmann T, Zou S, Li Y, Xu X, Zhang Y, Yang H, Wang J, Wang J, Kjer MK and Zhou W (2014) Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science* **346**(6210), 763-767
- Mita K, Kasahara M, Sasaki S, Nagayasu Y, Yamada T, Kanamori H, Namiki N, Kitagawa M, Yamashita H, Yasukochi Y, Kando-Okuda K, Yamamoto K, Ajimura M, Ravikumar G., Shimomura M, Nagamura Y, Shin-i T, Abe H, Shimada T, Morishita S and Sasaki T (2004) The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*. *DNA Research* **11**, 207-235
- Miyata T, Hayashida H, Kuma K, Mitsuyasu K and Yasunaga T (1987) Male-driven molecular evolution: a model and nucleotide sequence analysis. *In Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 52 pp. 863-867. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- 内藤洋太 (2009) シロチョウ科 2 種における BAC-FISH マッピング. 北海道大学大学院農学院 修士論文 68pp
- Nguyen P, Sguyen P M, Ší, en J, KJ, V, Dal DalP M, M, V, Frydrychovv R, Neven LG, Sahara K and Marec F (2013) Neo-sex chromosomes and adaptive potential in tortricid pests. *The Proceedings National Academy of Sciences United States of America* **110**, 6931-6936
- Nishikawa H, Iijima T, Kajitani R, Yamaguchi J, Ando T, Suzuki Y, Sugano S, Fujiyama A, Kosugi S, Hirakawa H, Tabata S, Ozaki K, Morimoto H, Ihara K, Obara M, Hori H, Itoh T and Fujiwara H (2015) A genetic mechanism for female-limited Batesian mimicry in *Papilio* butterfly. *Nature Genetics* **47**(4), 405
- 西村登 (1987) ヒゲナガカワトビケラ. 文一総合出版, 東京
- 農業環境技術研究所 (2008) コガタシマトビケラの飼育法マニュアル.

- 野崎隆夫 (1986) 神奈川県内河川に生息するトビケラ 1. ヒゲナガカワトビケラ科. *神奈川県の水生生物* 第8 報, 65-70
- 野崎隆夫・小林紀雄 (1987) 森戸川 (神奈川県三浦半島) におけるホタルトビケラの生活史, 特に幼虫の陸上夏眠と蛹化および陸上産卵について. *陸水学雑誌* **48**(4), 287-293
- 野崎隆夫・島田武憲 (1996) 実験動物としてのホタルトビケラの累代飼育法. *全国公害研会誌* **21**(2), 91-95
- Nozaki T (2002) Revision of the genus *Nothopsyche* Banks (Trichoptera: Limnephilidae) in Japan. *Entomological Science* **5**(1), 103–124
- Ohkawa K, Miura Y, Nomura T, Arai R, Abe K, Tsukada M and Hirabayashi, K (2013) Long-range periodic sequence of the cement/silk protein of *Stenopsyche marmorata*: purification and biochemical characterisation. *Biofouling* **29**(4), 357-367
- 大野瑞紀 (2017) シロチョウ科数種における細胞遺伝学的解析. 岩手大学大学院農学部農学研究科 修士論文 130pp
- Okazaki S, Tsuchida K, Maekawa H, Ishikawa H and Fujiwara H (1993) Identification of a pentanucleotide telomeric sequence, (TTAGG)_n, in the silkworm *Bombyx mori* and in other insects. *Molecular and Cellular Biology* **13**(3), 1424-1432
- Pringle EG, Baxter SW, Webster CL, Papanicolaou A, Lee SF and Jiggins CD (2007) Synteny and chromosome evolution in the Lepidoptera: Evidence from mapping in *Heliconius melpomene*. *Genetics* **177**, 417-426
- Robinson R (1971) Lepidoptera genetics. *Pergamon, Oxford* 697pp
- Ross HH (1967) The evolution and past dispersal of the Trichoptera. *Annual review of entomology* **12**(1), 169-206
- Sahara K, Yoshido A, Kawamura N, Ohnuma A, Abe H, Mita K, Oshiki T, Shimada T, Asano S, Bando H and Yasukochi Y (2003) W-derived BAC probes as a new tool for identification of the W chromosome and its aberrations in *Bombyx mori*. *Chromosoma* **112**, 48-55
- Sahara K, Yoshido A and Traut W (2012) Sex chromosome evolution in moths and butterflies. *Chromosome research* **20**, 83-94
- Sahara K, Yoshido A, Shibata F, Fujikawa-Kojima N, Okabe T, Tanaka-Okuyama M and Yasukochi Y (2013) FISH identification of *Helicoverpa armigera* and *Mamestra brassicae* chromosomes by BAC and fosmid probes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **43**, 644-653
- Saito R, Kato S, Kuranishi RB, Nozaki T, Fujino T and Tojo K (2018) Phylogeographic analyses of the *Stenopsyche* caddisflies (Trichoptera: Stenopsychidae) of the Asian Region. *Freshwater Science* **37**(3), 562-572
- Shibata F, Sahara K, Naito Y and Yasukochi Y (2009) Reprobing of multicolour FISH in preparations of lepidopteran chromosomes. *Zoological Science* **26**, 187-190
- Šíchová J, Voleníková A, Dincă, Nguyen P, Vila R, Sahara K and Marec F (2015) Dynamic

- karyotype evolution and unique sex determination systems in Leptidea wood white butterflies. *BMC Evolutionary Biology* **15**, 89
- Šichová J, Ohno M, Dincá V, Watanabe M, Sahara K and Marec F (2016) Fissions, fusions, and translocations shaped the karyotype and multiple sex chromosome constitution of the northeast-Asian wood white butterfly, *Leptidea amurensis*. *Biological journal of the Linnean Society* **118**(3), 457-471
- Suetsugu Y, Futahashi R, Kanamori H, Kadono-Okuda K, Sasanuma S, Narukawa J, Ajimura M, Jouraku A, Namiki N, Shimomura M, Sezutsu H, Osanai-Futahashi M, Suzuki MG, Daimon T, Shinoda T, Taniai K, Asaoka K, Niwa R, Kawaoka S, Katsuma S, Tamura T, Noda H, Kasahara M, Sugano S, Suzuki Y, Fujiwara H, Kataoka H, Arunkumar KP, Tomar A, Nagaraju J, Goldsmith MR, Feng Q, Xia Q, Yamamoto K, Shimada T and Mita K (2013) Large scale full-length cDNA sequencing reveals a unique genomic landscape in a lepidopteran model insect, *Bombyx mori*. *Genes Genomes Genetics* **3**(9), 1481-1492
- Suomalainen E (1969) Chromosome evolution in the Lepidoptera. *Chromosome Today* **2**, 132-138
- The International Silkworm Genome Consortium (2008) The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **38**, 1036-1045
- Traut W (1976) Pachytene mapping in the female silkworm, *Bombyx mori* L. *Chromosoma* **58**(3), 275-284
- Traut W and Marec F (1996) Sex chromatin in Lepidoptera. *The Quarterly Review of Biology* **71**(2), 239-256
- Traut W, Sahara K and Marec F (2007) Sex chromosomes and sex determination in Lepidoptera. *Sexual Development* **1**, 332-346
- 津田松苗・赤木郁恵 (1962) 毛翅目. In 水生昆虫学. 津田松苗編, p112-148
- Van't Hof AE, Marec F, Saccheri IJ, Brakefield PM and Zwaan BJ (2008) Cytogenetic characterization and AFLP-based genetic linkage mapping for the butterfly *Bicyclus anynana*, covering all 28 karyotyped chromosomes. *PLoS One* **3**(12), e3882
- Van't Hof AE, Nguyen P, Dalíková M, Edmonds N, Marec F and Saccheri IJ (2013) Linkage map of the peppered moth, *Biston betularia* (Lepidoptera, Geometridae): a model of industrial melanism. *The Journal of Heredity* **110**(3), 283-295
- 渡辺幸三・大村達夫 (2005) ヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) 地域集団の RAPD 回帰によるダム上下流間の遺伝的分化の評価. 土木学会論文集 **790**, 49-58
- 渡辺幸三, 八重樫咲子, 菊池裕二, 竹門康弘, 風間聡・大村達夫 (2009) DNA 多型マーカーによるヒゲナガカワトビケラの流域内移動分散パターンの評価. 水環境学会誌 **32**(5), 253-258
- Wallberg A, Schoening C, Webster MT and Hasselmann M (2017) Two extended haplotype blocks are associated with adaptation to high altitude habitats in East African honey bees. *PLoS Genetics*

- Wellenreuther M and Bernatchez L (2018) Eco-evolutionary genomics of chromosomal inversions. *Trends in ecology & evolution*
- Wu C, Asakawa S, Shimizu N, Kawasaki S and Yasukochi Y (1999) Construction and characterization of bacterial artificial chromosome libraries from the silkworm, *Bombyx mori*. *Molecular Genetics and Genomics* **261**, 698-706
- Wu C, Proestou D, Carter D, Nicholson E, Santos F, Zhao S, Zhang HB and Goldsmith MR (2009) Construction and sequence sampling of deep-coverage, large-insert BAC libraries for three model lepidopteran species. *BMC genomics* **10**(1), 283
- Xia Q, Zhou Z, Lu C, Cheng D, Dai F, Li B, Zhao P, Zha X, Cheng T, Chai C, Pan G, Xu J, Lui C, Lin Y, Qian J, Hou Y, Wu Z, Li G, Pan M, Li C, Shen Y, Lan X, Yuan L, Li T, Xu H, Yang G, Wan Y, Zhu Y, Yu M, Shen W, Wu D, Xiang Z, Yu J, Wang J, Li R, Shi J, Li H, Li G, Su J, Wang X, Li G, Zhang Z, Wu Q, Li J, Zhang Q, Wei N, Xu J, Sun H, Dong L, Liu D, Zhao S, Zhao X, Meng Q, Lan F, Huang X, Li Y, Fang L, Li C, Li D, Sun Y, Zhang Z, Yang Z, Huang Y, Xi Y, Qi Q, He D, Huang H, Zhang X, Wang Z, Li W, Cao Y, Yu Y, Yu H, Li J, Ye J, Chen H, Zhou Y, Liu B, Wang J, Ye J, Ji H, Li S, Ni P, Zhang J, Zhang Y, Zheng H, Mao B, Wang W, Ye C, Li S, Wang J, Wong GK and Yang H (2004) A draft sequence for the genome of domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science* **306**, 1937-1940
- Yaegashi S, Watanabe K, Monaghan MT and Omura T (2014) Fine-scale dispersal in a stream caddisfly inferred from spatial autocorrelation of microsatellite markers. *Freshwater Science* **33**(1), 172-180
- Yamamoto K, Nohata J, Kadono-Okuda K, Narukawa J, Sasanuma M, Sasanuma SI, Minami H, Shimomura M, Suetsugu Y, Banno Y, Osoegawa K, de Jong PJ, Goldsmith MR and Mita K (2008) A BAC-based integrated linkage map of the silkworm *Bombyx mori*. *Genome Biology* **9**, R21
- Yasukochi Y (1998) A dense genetic map of the silkworm, *Bombyx mori*, covering all chromosomes based on 1018 molecular markers. *Genetics* **150**, 1513-1525
- Yasukochi Y, Ashakumary LA, Wu C, Yoshido A, Nohata J, Mita K and Sahara K (2004) Organization of the Hox gene cluster of the silkworm, *Bombyx mori*: a split of the Hox cluster in a non-*Drosophila* insect. *Development Genes and Evolution* **214**(12), 606-614
- Yasukochi Y, Ashakumary L, Baba K, Yoshido A and Sahara K (2006) A second generation integrated map of the silkworm reveals synteny and conserved gene order between lepidopteran insects. *Genetics* **173**, 1319-1328
- Yasukochi Y, Tanaka-Okuyama M, Shibata F, Yoshido A, Marec F, Wu C, Zhang H-B, Goldsmith MR and Sahara K (2009) Extensive conserved synteny of genes between the karyotypes of *Manduca sexta* and *Bombyx mori* revealed by BAC-FISH mapping. *PLoS ONE* **4**(10), e7465
- Yasukochi Y, Miura N, Nakano R, Sahara K and Ishikawa Y (2011) Sex-linked pheromone receptor

- genes of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, are in tandem arrays. *PLoS ONE* **6**(4), e18843
- Yasukochi Y, Ohno M, Shibata F, Jouraku A, Nakano R, Ishikawa Y and Sahara K (2016) A FISH-based chromosome map for the European corn borer yields insights into ancient chromosomal fusions in the silkworm. *The Journal of Heredity* **116**, 75-83
- 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
- Yoshido A, Bando H, Yasukochi Y and Sahara K (2005) The *Bombyx mori* karyotype and the assignment of linkage groups. *Genetics* **170**, 675-685
- Yoshido A, Sahara K, Marec F and Matsuda Y (2011a) Step-by-step evolution of neo-sex chromosomes in geographical populations of wild silkmoths, *Samia cynthia* ssp. *Heredity* **106**(4), 614-624
- Yoshido A, Yasukochi Y and Sahara K (2011b) *Samia cynthia* versus *Bombyx mori*: comparative gene mapping between a species with a low-number karyotype and the model species of Lepidoptera. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **41**, 370-377
- Yoshido A, Šíchová J, Kubíčková S, Marec F and Sahara K (2013) Rapid turnover of the W chromosome in geographical populations of wild silkmoths, *Samia cynthia* ssp. *Chromosome Research* **21**, 149-164
- Yoshido A, Marec F and 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
- You M, Yue Z, He W, Yang X, Yang G, Xie M, Zhan D, Baxter SW, Vasseur L, Gurr GM, Douglas CJ, Bai J, Wang P, Cui K, Huang S, Li X, Zhou Q, Wu Z, Chen Q, Liu C, Wang B, Li X, Xu X, Lu C, Hu M, Davey JW, Smith SM, Chen M, Xia X, Tang W, Ke F, Zheng D, Hu Y, Song F, You Y, Ma X, Peng L, Zheng Y, Liang Y, Chen Y, Yu L, Zhang Y, Liu Y, Li G, Fang L, Li J, Zhou X, Luo Y, Gou C, Wang J, Wang J, Yang H and Wang J (2013) A heterozygous moth genome provides insights into herbivory and detoxification. *Nature genetics* **45**(2), 220-225
- Zhang ZQ (2013) Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness. *Zootaxa* **3703**, 1-82
- Zrzavx M, Hladova I, Dalíková M, Šíchová J, Ůnap E, Kubíčková S and Marec F (2018) Sex chromosomes of the iconic moth *Abraxas grossulariata* (Lepidoptera, Geometridae) and its congener *A. sylvata*. *Genes* **9**(6), 279