

氏名	大野 瑞紀
本籍（国籍）	秋田県
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第 759 号
学位授与年月日	令和 2 年 3 月 2 3 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物生産科学専攻
学位論文題目	シロチョウ科における染色体進化の細胞遺伝学的解析（Cytogenetic analysis of chromosome evolution in pierid butterflies）
学位審査委員	主査 岩手大学教授 佐原 健 副査 澤井 健(岩手 教授), 金児 雄(弘前 助教), 佐藤 智(山形 准教授)

## 論文の内容の要旨

チョウ目昆虫の染色体研究は近年、カイコ(*Bombyx mori*)の BAC (bacterial artificial chromosome)-FISH (fluorescence *in situ* hybridization)法による染色体マッピングを皮切りに、飛躍的な成果をあげてきた。チョウ目昆虫染色体の対応関係と遺伝子配置の保存性が示されてきた一方、ごく最近、シロチョウ科 *Pieris* 属の種では、カイコと大きく異なる染色体構成をもつ例外が確認された。本研究は、シロチョウ科における染色体進化を調査するため、シロチョウ科複数種の染色体マッピングを行った。また、*Hox* 遺伝子群の座乗位置などの解析を行い、染色体リアレンジメントと *Pieris* 属の種における進化の関連性を議論した。本研究では、こうした研究背景等を緒言として第 I 章に記述した。

本研究第 II 章では、*Pieris* 属の種に生じた染色体の再構成による影響が、胚発生に生じたか否かを調べる基盤形成のために、染色体上の遺伝子配置に意義があるとされる *Hox* 遺伝子群について解析を行った。チョウ目昆虫で *labial* の発現は全くの未解析であったため、WISH (whole-mount *in situ* hybridization)を用いたカイコ胚発生における *labial* の発現解析を行い、チョウ目昆虫初となる *labial* 発現時期と発現位置を明らかにした。カイコの *labial* mRNA の発現が他の昆虫と同様、間挿節に認められたことから、チョウ目昆虫 *labial* が胚発生時に *Hox* 遺伝子として機能していると考えられた。さらに、オオモンシロチョウ(*Pieris brassicae*)において、*Hox* 遺伝子の *labial*, *pb*, *abdA* を内部配列に含む BAC を選抜、マッピングすることで、*labial* が他の *Hox* 遺伝子群と別染色体に座乗することを特定した。したがって、*Pieris* 属では *labial* が別染色体上に転移している一方で、機能は維持している可能性が強く示唆された。また、先行研究のオオモンシロチョウ染色体の BAC-FISH マッピング結果再精査のため、カイコ遺伝子オルソログを含む 75 BAC-DNA プローブをマッピングして、カイコならびにエゾスジグロシロチョウ(*Pieris napi*)とモンシロチョウ(*P. rapae*)に関して、それぞれのゲノム情報をもとに染色体比較を行った。その結果、カイコとは遺伝子配置が異なる一方で、*Pieris* 属 3 種間では染色体の対応関係ならびに遺伝子配置の保存性が確認された。

*Pieris* 属の属するシロチョウ亜科の姉妹系統であるモンキチョウ亜科は、進化的なチョウ目

昆虫の典型染色体数である  $n=31$  前後の染色体数を持つことから、カイコとの染色体の対応関係が疑われた。そこで、本研究第III章において、モンキチョウ亜科の普通種であるモンキチョウ (*Colias erate*) を染色体比較研究の対象とするための研究基盤構築を行った。高分子核 DNA を雄蛹 3 個体より抽出し、ゲノム断片のサイズ別に 2 種類の BAC ライブラリーを作製した。それぞれのライブラリーは 8,832 ならびに 6,528 BAC クローンから成り、平均インサート長は 75.4 kb と 90.3 kb であった。次に、雌雄 1 個体ずつの蛹より抽出した Total RNA を用いた RNA-seq によって、トランスクリプトーム情報を獲得した。任意のカイコ遺伝子をクエリーにして tblastx 検索により遺伝子オルソログを特定した。この配列情報に基づき Single tagged sequence (STS) primer を 117 ペア作製し、モンキチョウ BAC ライブラリーの PCR スクリーニングにより 77 BAC クローンを獲得した。

本研究第IV章では、より効率的に BAC スクリーニングに適したカイコ単一遺伝子オルソログを特定するアプリケーションツール (*Bombyx mori* Tool for Orthologs Picking: BmTOP) を新規に開発した。本ツールは、カイコゲノム情報に基づきインプットするトランスクリプトームデータからホモロジーの高い単一遺伝子オルソログを特定する。比較対象とするゲノム情報を変化させることで、比較対象とする生命種を変化させる発展性をもつ。本章では、BmTOP を用いて、モンキチョウ 1,978 contigs をカイコ単一遺伝子オルソログと特定した。この情報に基づき STS primer を新たに 160 ペア作製し、110 BAC クローンを追加獲得した。

本研究第V章では、本研究で特定された合計 187 BAC-DNA をプローブに、モンキチョウ染色体 FISH マッピングを行い、166 BAC-DNA プローブでシングルシグナルを得た。マッピング結果より、モンキチョウとカイコ染色体にはコリアリティーが存在し、*Pieris* 属の種とはオルソログ配置が異なることが示された。さらに、カイコとの間にオルソログ配置の逆転が 9 染色体で確認されるとともに 1 染色体で示唆された。前者の 9 染色体について、アゲハチョウ上科のナミアゲハ (*Papilio xuthus*) ゲノムデータを加えたオルソログ配置の比較解析を行った。その結果、5 染色体について、モンキチョウとナミアゲハとの対応染色体間にシンテニーが示唆された。カイコとナミアゲハで配置の逆転がある第 9 染色体は、カイコとナミアゲハの共通祖先で 1 回、ナミアゲハとモンキチョウの共通祖先で 2 回の逆位による、段階的な染色体進化が生じた可能性が示唆された。なお、2015 年 5 月に作製した標本中のモンキチョウ第 29 染色体に同種内での染色体逆位が観察された。

本研究第VI章において総合考察を行った。本研究から、*Pieris* 属ではカイコと大きく異なる染色体構成を共有しており、その起源はシロチョウ亜科内のいずれかの分岐群で生じたことが確実となった。染色体進化と種分化の関係を明確にするために、今後の展開として、シロチョウ亜科全てのクレードについて、染色体の対応関係を検証することが求められる。

## 論文審査の結果の要旨

チョウ目昆虫の染色体研究は近年、カイコ (*Bombyx mori*) の BAC (bacterial artificial chromosome)-FISH (fluorescence *in situ* hybridization) 法による染色体マッピングを皮切りに、飛躍的な成果をあげてきた。チョウ目昆虫染色体の対応関係と遺伝子配置の保存性が示されてきた一方、ごく最近、シロチョウ科 *Pieris* 属の種では、カイコと大きく異なる染色体構成をもつ例外が確認された。

本研究は、シロチョウ科における染色体進化を調査するため、シロチョウ科複数種の染色体マッピングと *Hox* 遺伝子群の座乗位置などの解析を行い、染色体リアレンジメントと *Pieris* 属の種における進化の関連性を議論した。得られた結果は、以下の通りである。

(1) 染色体上の遺伝子配置に意義があるとされる *Hox* 遺伝子群について WISH (whole-mount *in situ* hybridization) を用いたカイコ胚発生における *labial* の発現解析を行い、チョウ目昆虫初となる *labial* 発現時期と発現位置を明らかにした。さらに、オオモンシロチョウ (*Pieris brassicae*) において、*Hox* 遺伝子の *labial*, *pb*, *abdA* を内部配列に含む BAC を選抜、マッピングすることで、*labial* が他の *Hox* 遺伝子群と別染色体に座乗することを特定した。カイコ遺伝子オルソログを含む 75 BAC-DNA プローブをマッピングして、カイコならびにエゾスジグロシロチョウ (*Pieris napi*) とモンシロチョウ (*P. rapae*) に関して、それぞれのゲノム情報をもとに染色体比較を行った結果、カイコとは遺伝子配置が異なる一方で、*Pieris* 属 3 種間では染色体の対応関係ならびに遺伝子配置の保存性が確認された。

(2) 平均インサートサイズ 103 kb、クローン総数 15,360 のからなるモンキチョウ (*Colias erate*) の BAC ライブラリーを構築した。雌雄 1 個体ずつの蛹より抽出した Total RNA を用いた RNA-seq によって、トランスクリプトーム情報を獲得し、任意のカイコ遺伝子をクエリーにして tblastx 検索により遺伝子オルソログを特定した。さらに効率的な BAC スクリーニングのためアプリケーションツール (*Bombyx mori* Tool for Orthologs Picking: BmTOP) を開発した。BmTOP を用いて、モンキチョウ 1,978 contigs をカイコ単一遺伝子オルソログと特定した。この情報に基づき作製した STS primer ペアにより、合計 187 BAC クローンを獲得した。

(3) 本研究で特定された BAC-DNA をプローブに、モンキチョウ染色体 FISH マッピングを行った結果、モンキチョウとカイコ染色体にはコリアリティーが存在し、*Pieris* 属の種とはオルソログ配置が異なることが示された。カイコとの間にオルソログ配置の逆転が認められた 9 染色体について、アゲハチョウ上科のナミアゲハ (*Papilio xuthus*) ゲノムデータを加えたオルソログ配置の比較解析を行った結果、5 染色体について、モンキチョウとナミアゲハとの対応染色体間にシンテニーが示唆された。カイコとナミアゲハで配置の逆転がある第 9 染色体は、カイコとナミアゲハの共通祖先で 1 回、ナミアゲハとモンキチョウの共通祖先で 2 回の逆位による、段階的な染色体進化が生じた可能性が示唆された。

以上、シロチョウ科における分子学的な手法による細胞遺伝学的研究成果は、新たな科学的進展をもたらしたと高く評価できる。よって、本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士課程学位審査基準」に則り審査した結果、

本論文を博士（農学）の学位論文として十分に価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

主論文

**Ohno M**, Kawamoto M and Sahara K (2020): Development of an application, *Bombyx mori* tool for ortholog picking (BmTOP). *Journal of insect Biotechnology and Sericology* **88**, in press

参考論文

1. Yasukochi Y, Ohno M, Shibata F, Jouraku A, Nakano R, Ishikawa Y, Sahara K (2016): A FISH-based chromosome map for the European corn borer yields insights into ancient chromosomal fusions in the silkworm. *Heredity* 116, 75-83.
2. Šíchová J, Ohno M, Dincă V, Watanabe M, Sahara K, Marec F. (2016): Fissions, fusions, and translocations shaped the karyotype and multiple sex chromosome constitution in the northeast-Asian wood white, *Leptidea amurensis*. *Biological Journal of the Linnean Society* **118**, 457–471.
3. Kageyama D, Ohno M, Sasaki T, Yoshido A, Konagaya T, Jouraku A, Kuwazaki S, Kanamori H, Katayose Y, Narita S, Miyata M, Riegler M, Sahara K (2017): Feminizing Wolbachia endosymbiont disrupts maternal sex chromosome inheritance in a butterfly species. *Evolution Letters* **1(5)**, 232-244.