

シロチョウ科における  
染色体進化の細胞遺伝学的解析

岩手大学大学院  
連合農学研究科  
大野 瑞紀

# シロチョウ科における染色体進化の細胞遺伝学的解析

<b>第I章 緒言</b>	<b>1</b>
<b>第II章 オオモンシロチョウ染色体マッピングデータの再解析</b>	<b>5</b>
序論	5
第1節 カイコ <i>labial</i> の発現解析	6
第2節 オオモンシロチョウにおける <i>labial</i> 遺伝子マッピング	25
第3節 オオモンシロチョウの BAC-FISH 遺伝子マッピング比較	41
第4節 シロチョウ2種ゲノムデータとの比較	65
<b>第III章 モンキチョウ BAC ライブラリーの構築と BAC 選抜</b>	<b>83</b>
序論	83
第1節 BAC ライブラリーの構築	83
第2節 RNA-seq	98
第3節 カイコ遺伝子配列を query としたモンキチョウのカイコオルソログ抽出	103
第4節 カイコオルソログを含む BAC の選抜	107
<b>第IV章 <i>Bombyx mori</i> tool for ortholog picking (BmTOP)を用いたカイコ単一遺伝子 オルソログの特定</b>	<b>111</b>
序論	111
第1節 BmTOP の開発	111
第2節 BmTOP を用いたモンキチョウトランスクリプトームデータの解析	116
第3節 BmTOP により抽出したカイコオルソログを含む BAC の選抜	128
<b>第V章 モンキチョウ BAC-FISH マッピングと種間比較</b>	<b>136</b>
序論	136
第1節 モンキチョウ遺伝子マッピングならびにカイコオルソログとの配置比較	136
第2節 シロチョウ科昆虫との比較	145
第3節 モンキチョウ染色体の進化予測	155
第4節 モンキチョウ第29染色体のインバージョン	165
<b>第VI章 総合考察</b>	<b>170</b>
<b>第VII章 摘要</b>	<b>175</b>
<b>第VIII章 参考文献</b>	<b>178</b>



## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、私の奔放さや至らなさに挫けず辛抱強くご指導いただき、さらに本論文のご校閲もお受けいただき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、心よりの感謝を申し上げます。

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 智博士に御礼申し上げます。

本研究の基盤に位置するモンキチョウ BAC ライブラリーの作製にあたり、ご指導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 剛博士に感謝を申し上げます。BAC セレクションをはじめとして、多くの研究でご指導と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 祐二博士に深謝いたします。また、オオモンシロチョウの配列データ解析にご助力いただきました同研究ユニットの上樂 明也博士に御礼申し上げます。

カイコ *labial* の発現解析ならびに配列全長の特定にあたり、数々のご指導ご鞭撻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新特性シルク開発ユニットユニット長 富田 秀一郎様に感謝を申し上げます。同ユニットの行弘 研司博士、河本 夏雄様にも改めて御礼申し上げます。

BmTOP の開発にあたり、New *Bombyx mori* gene models (2017) の情報を快くご提供いただきました東京大学大学院農学生命科学研究科学術支援専門職員 川本 宗孝博士に御礼申し上げます。専門外であった情報分野の知識について知恵をお貸しいただきましたアメリエフ株式会社ライフサイエンス部門・ゲノム医療部門 木本 直樹様に改めてお礼申し上げます。エレクトロポレーションの機材を使用させていただき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、同研究室准教授 畠山 勝徳博士に感謝いたします。

研究について私の多くの疑問の相談に乗っていただきましたチェコ科学アカデミー生物研究センター 吉戸 敦生博士に御礼申し上げます。モンキチョウ BAC ライブラリーの作製に特に尽力してくれた由利 昂大君、佐藤 穰君、佐々木 達史君、嗟峨 新樹さんにも、ここで改めて感謝を申し上げます。日々研究生活を共にした、安 嬰博士、研究室の皆様、ならびに卒業生の皆様に、改めて感謝いたします。

特に研究室に所属してから 6 年半、先輩として研究生活における面倒をずっと見てくださいました藤本 章晃博士には特別に感謝を申し上げます。

最後に、長きにわたり私生活を支え、私に多額の出資をしてくださった両親と家族に、惜しみない感謝を申し上げます。9 年間の大学生活で、私生活を支えるだけでなくデータ解析まで一緒にやってくださいました、妻である大野 美咲に心よりの感謝を贈ります。

2020 年 3 月 5 日 大野 瑞紀

## 第 I 章 緒言

真核生物における遺伝情報は、DNA に記録され、二本鎖 DNA が巻き付いたヌクレオソームを基本単位とするクロマチンを細胞核内に保有する。細胞分裂時に半保存的に複製された二本鎖 DNA は、さらに高次構造をとる染色体という構成単位にまとめられ、娘細胞に均等に分配される。1900 年代にメンデルの法則が再発見され遺伝子の概念が受け入れられると、DNA が遺伝子本体であると明らかにされた(Avery *et al.*, 1944; Hershey and Chase, 1952)。バッターで提唱された染色体説(Sutton, 1902; 1903)は、ショウジョウバエを用いた実証がなされた(Morgan, 1922)。染色体にはセントロメア領域が存在し、動原体に紡錘糸が付着して、染色体を両極に移動させて核分裂を生じる。染色体は、動原体が局在する集中動原体型染色体と、動原体が染色体全体に散在する分散動原体型染色体に分類される。分散動原体型染色体は、1935 年にカメムシ目昆虫で初めて発見(Schrader, 1935)されて以来、昆虫綱 472 種、植物 228 種、クモ綱 50 種、線虫 18 種で報告されている(Melters *et al.*, 2012)。これら分散動原体型染色体が確認された種を系統別に見ると、植物か動物かに関わらず様々なクレードで独立に生じており、進化の過程で動原体型は頻繁に切り替わっている。例えば、カヤツリグサ科の植物は分散動原体型染色体をもつが、同科のホタルイ属(*Scirpus*)では集中動原体をもつと報告されている(Nijalingappa, 1974)。分散動原体型染色体をもつ種を含むクレード数も種数も昆虫に多い(Melters *et al.*, 2012)。Misof *et al.* (2014)の高次分類に従うと、昆虫綱 9 目に分散動原体型染色体を持つ種が認められ、そのうち最多種数を誇るのがチョウ目昆虫である。

チョウ目昆虫は、昆虫綱で 2 番目の種数を持ち、動物界における全種数の約 10% を占める(Zhang, 2013)。現生の地球で最も繁栄しているグループの一つに挙げられるチョウ目昆虫は、トビケラ目昆虫を除く他の昆虫とは異なる雌ヘテロ型(WZ/ZZ あるいは Z0/ZZ)の性染色体システムを持つ。チョウ目昆虫の染色体研究は、Carnoy (1895)のヒトリガ(*Arctia caja*)の顕微鏡観察に始まり、減数分裂中期の染色体像のカウント実験が 20 世紀初頭、盛んに行われた(cf. Doncaster, 1914)。これらの功績の多くは Robinson (1971)にまとめられており、約 1,000 種の記載から、チョウ目昆虫の染色体数は  $n=31$  の種が 1/4 程度を占め、半数以上が  $n=29-31$  であるとわかった。このことから、チョウ目昆虫の典型的な染色体数は  $n=31$  とされている。カウント実験とは対照的に、チョウ目昆虫染色体の同定法は長い間確立されないままであった。一般的に集中動原体型の染色体は、体細胞中期における染色体の長さや動原体の位置、分染法などの核型分析による染色体同定が可能である。一方、チョウ目昆虫の染色体は、分散動原体型染色体に特徴的な、体細胞分裂中期に一次狭窄がなく、丸く凝集した形態をもつうえに、数も  $n=31$  が基本数と多く、核型分析は困難を極めた。そのため、Kawazoé の一連の研究(Kawazoé, 1987a; b; c; d; 1991a; b; 1992)や Traut (1976)の研究により、ごく限られた染色体が識別されるにとどまっていた。分散動原体型染色体の奇妙な特徴は、分子生物学が

発展する今世紀に至るまで、チョウ目昆虫の染色体研究における大きな障壁として立ちふさがることとなった。

チョウ目昆虫の染色体研究のブレイクスルーは、BAC-FISH (bacterial artificial chromosome-fluorescence *in situ* hybridization)によるモデルチョウ目昆虫カイコの正確な染色体カリオタイプングであった(Yoshido *et al.*, 2005)。当時のカイコ研究は、詳細な分子連関解析(Yasukochi *et al.*, 1998)や BAC ライブラリー(Wu *et al.*, 1999)の構築など、分子遺伝学の研究基盤が整ってきていた。Yoshido *et al.* (2005)は、PCR による BAC スクリーニングで分子連関地図に対応づけた、62 BAC-DNA をプローブに用いた FISH により全染色体の同定を実現した。一方で、ゲノムの解読も進んでおり、2004 年に日中双方からカイコドラフトゲノム情報が公表された(Mita *et al.*, 2004; Xia *et al.*, 2004)。カイコゲノム情報が公開されたことにより、オルソログ配列の情報をカイコ染色体上の配置と比較することが容易になった。これに伴い 2000 年代以降、カイコとの染色体比較研究結果が多数報告された(Pringle *et al.*, 2007; Beldade *et al.*, 2009; Yasukochi *et al.*, 2009; Baxter *et al.*, 2011; Yoshido *et al.*, 2011b; The Heliconius genome consortium, 2012; Sahara *et al.*, 2013; Van't Hof *et al.*, 2013; You *et al.*, 2013; Ahola *et al.*, 2014; Yasukochi *et al.*, 2016; Wan *et al.*, 2019)。なお、これらカイコゲノム情報は、2008 年にバージョンアップ(The International Silkworm Genome Consortium 2008)が行われ、本年、さらに高品質なアップグレード情報が公表された(Kawamoto *et al.*, 2019; Lu *et al.*, 2019)。

分散動原体型染色体の特徴として、染色体の切断や融合、大規模な転座が生じていても問題なく染色体分配が行われることから、染色体構成の急激な変化による進化の可能性が指摘されてきた(Bureš *et al.*, 2013)。分散動原体型染色体をもつ植物の *Luzula elegans* では、X 線照射で染色体の大規模なリアレンジメントを誘発した報告があり、この仮説はもっともらしいと考えられた(Jankowska *et al.*, 2015)。しかしながら、チョウ目昆虫ではシロチョウ科の種を除き、これまで調べられた全ての種において、染色体上の遺伝子配置に対応関係が確認された(Pringle *et al.*, 2007; Beldade *et al.*, 2009; Yasukochi *et al.*, 2009; Baxter *et al.*, 2011; Yoshido *et al.*, 2011b; The Heliconius genome consortium, 2012; Sahara *et al.*, 2013; Van't Hof *et al.*, 2013; You *et al.*, 2013; Ahola *et al.*, 2014; Yasukochi *et al.*, 2016; Wan *et al.*, 2019)。また、染色体間のオルソログ転移リアレンジメントは、種間で非常に少ない。例えば、コベニモンドクチョウとカイコの間では、約 6%程度観察される(The Heliconius genome consortium, 2012)。この報告は、染色体の切断や融合を許容する分散動原体型染色体の染色体進化理論と大きく異なる。つまり、チョウ目昆虫では、染色体座乗遺伝子配置の保持機構が想定される。一方、シロチョウ科オオモンシロチョウ(*Pieris brassicae*)の染色体比較 FISH マッピングは、本種と他のカイコ型染色体をもつ多くのチョウ目昆虫種との間にコリアリティーが存在しないことを示唆した(内藤, 2009; 福田, 2014; 大野, 2017)。さらにモンシロチョウ(*P. rapae*)とエゾスジグロシロチョウ(*P. napi*)のゲノムシーケンズデータより、これら *Pieris* 属の染色体構成は、カイコと大きく異なる一方で、同属間では対応関係があることが示された(Nallu *et al.*, 2018; Hill *et al.*, 2019)。したがって、これら *Pieris* 属の共通祖先においては、Bureš *et al.* (2013)の仮説

通り、染色体構成の急激な変化による進化が生じた可能性が推測された。

生物の進化には、小進化と大進化の区別がなされる。種内で認められる塩基置換とそれに伴うアミノ酸置換などの小進化は、輪状種の形成に関わる(Moritz *et al.*, 1992)。しかしながら、小進化の蓄積が種分化など大進化につながるか否かには議論がある。一方、大規模なアミノ酸置換や遺伝子配置の変化を伴う染色体変異は、種分化と密接な関わりがある。日本海と太平洋のイトヨ(*Gasterosteus aculeatus*)は、性染色体へ第9染色体が融合してネオY染色体になることで生殖隔離を引き起こし、種分化の引き金になったことが報告されている(Kitano *et al.*, 2009; Yoshida *et al.*, 2014)。日本海のイトヨは、ニホンイトヨ(*Gasterosteus nipponicus*)として近年新たに新種記載された(Higuchi *et al.*, 2014)。東アフリカのセイヨウミツバチは、山地の熱帯雨林に生息する *Apis mellifera monticola* と、サバンナなどの低地に生息する *A. m. scutellate* (アフリカミツバチ)の亜種が生息するが、シークエンス解析よりこれら2種は第7染色体と第9染色体に部分的に多型が蓄積した領域が存在することから、染色体の逆位が疑われる(Wallberg *et al.*, 2017)。すなわち、これら亜種間の形態や分布の違いは染色体変異に起因した可能性がある。また、チョウ目昆虫のシロチョウ科の *Leptidea* 属は、種によって性染色体の構成が大きく異なることが確認されている(Šichová *et al.*, 2015; 2016)。これらの染色体変異は、連続的変化した分布を持つ可能性がある。

多くの種が所属するチョウ目昆虫における種分化は、大きな染色体変異を伴っていないため、シロチョウ科における大規模な染色体リアレンジメントが、種分化に影響を与えたか否かは興味深い。同一染色体上に配置されることに意義があるとされる遺伝子群として、*Hox* (*homeobox*)遺伝子群が挙げられる。*Hox* 遺伝子は、左右対称な生物の体節決定に働く遺伝子のマスター因子の総称であり、動物界全体で広く保存されている。例えば、節足動物の *Hox* 遺伝子 *labial* にあたるニワトリの *gHoxb-1* を、キイロショウジョウバエの *labial* ノックアウト系統にトランスジェニックした場合、最長で2歳まで成長した報告がある(Lutz *et al.*, 1995)。ヒト(*Homo sapiens*)とキイロショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)の間でも、染色体上の遺伝子配置から遺伝子機能との空間的共線性まで高い保存性が確認されており、進化的な生物では常染色体上にクラスタリングされている(Lemons and McGinnis, 2006)。例外的に、キイロショウジョウバエでは *Hox* 遺伝子群は、同一染色体上で ANT-C と BX-C の2つのクラスターに 10 Mb 程度の距離で分かれている(Duncan, 1987; Kaufman *et al.*, 1990)。さらに同じ *Drosophila* 属の *D. repleta* ならびに *D. buzzatii* では、*labial* が *Hox* 遺伝子 *Abdominal-B* の隣に転座している(Negre *et al.*, 2003; 2005)。また、棘皮動物門のウニ、扁形動物門のマンスン住血吸虫、日本住血吸虫、脊索動物門のホヤ等では *Hox* 遺伝子の大規模な再編が生じており、これら生物の風変わりな形態との関係性が疑われている(Ikuta *et al.*, 2004; Pierce *et al.*, 2005; Cameron *et al.*, 2006; Gu *et al.*, 2012)。カイコの *Hox* 遺伝子群は、全て第6染色体上に座乗するが、*labial* だけは他の *Hox* 遺伝子群と約 10 Mb ほど離れた位置に座乗する(Yasukochi *et al.*, 2004)。チョウ目昆虫において他の昆虫種同様、*labial* が胚発生時に発現し、体節決定に関わっているのかどうかは不明であった。本研究の第II章では、カイコの卵を

WISH (whole-mount *in situ* hybridization)することで、チョウ目昆虫で *labial* が他昆虫種同様に胚発生ステージに間挿節で発現していることを初めて明らかにした。さらに、オオモンシロチョウの BAC-FISH マッピングより、*labial* が他の *Hox* 遺伝子群と別染色体に転座していることを示した。*Hox* 遺伝子群が複数の染色体にまたがって座乗する報告は、節足動物では初となる。

シロチョウ科は、コバネシロチョウ亜科、マルバネシロチョウ亜科、モンキチョウ亜科、シロチョウ亜科の4つに分類され、*Pieris* 属はシロチョウ亜科に属する (Wahlberg *et al.*, 2014)。シロチョウ亜科は、種数の観点からシロチョウ科において最も繁栄したグループであり、 $n=26-104$  の多様な染色体数をもつ (Robinson, 1971; Lukhtanov, 1991; Saura *et al.*, 2013)。マルバネシロチョウ亜科は、1属5種のみで構成され染色体情報は不明である (Mitter *et al.*, 2011)。モンキチョウ亜科は、ホシボシキチョウ (*Eurema brigitta*,  $n=12$ ) の1種を除き (de Lesse and Cnndamin, 1962; de Lesse, 1968)、全てが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 (Robinson, 1971; Lukhtanov, 1991; Saura *et al.*, 2013)。モンキチョウ亜科の昆虫がカイコとの染色体コリアリティーを維持していた場合、シロチョウ科における染色体構造変化の起源とその影響について議論することができる。そこで本研究の第III章から第IV章にかけて、モンキチョウ亜科の普通種であり、典型染色体数である  $n=31$  の染色体数をもつモンキチョウ (*Colias erate*) を対象に、染色体比較研究の基盤を構築した。近年、次世代シーケンサーの普及にしたがって、配列情報の解析方法も多岐にわたるようになった。オルソログ検出ツールはこれまでにいくつか報告があるが (Ebersberger *et al.*, 2009; Emms and Kelly, 2015; Cosentino and Iwasaki, 2018)、チョウ目昆虫オルソログ選抜に最適化されたアプリケーションツールは存在しなかった。第IV章では、カイコ単一遺伝子オルソログの選抜に特化したアプリケーションツールを独自に開発し、モンキチョウ BAC のスクリーニングに利用した。第V章では、BAC-FISH によるモンキチョウ染色体マッピングを行い、カイコとの染色体対応関係を明確に示した。モンキチョウとカイコとの間にオルソログ配置に逆転が認められた9染色体について、ナミアゲハチョウ (*Papilio xuthus*) との比較解析を追加で行い、染色体進化の過程を考察した。さらに、モンキチョウ第29染色体の逆位についても報告した。以上の研究成果をもとに、第VI章においてシロチョウ科の染色体進化とその起源について総合考察を行った。

## 第II章 オオモンシロチョウ染色体マッピングデータの再解析

### 序論

チョウ目昆虫の遺伝子配置は、これまでの染色体比較研究より、特に二門亜目に属する種において広く保存されていると考えられている(Pringle *et al.*, 2007; Beldade *et al.*, 2009; Yasukochi *et al.*, 2009; Baxter *et al.*, 2011; Yoshido *et al.*, 2011b; The Heliconius genome consortium, 2012; Sahara *et al.*, 2013; Van't Hof *et al.*, 2013; You *et al.*, 2013; Ahola *et al.*, 2014; Yasukochi *et al.*, 2016; Wan *et al.*, 2019)。しかしながら、シロチョウ科のオオモンシロチョウ(*Pieris brassicae*)において、染色体の構成がモデルチョウ目昆虫のカイコと大きく異なる可能性が示唆され(内藤, 2009; 大野, 2017)、モンシロチョウ(*P. rapae*)とエゾスジグロシロチョウ(*P. napi*)のゲノムシーケンスデータから確実性が高まった(Nallu *et al.*, 2018; Hill *et al.*, 2019)。ブロック単位の染色体リアレンジメントが多数生じたことと種分化に関連性が深いと考えると、染色体リアレンジメントがもたらした遺伝子発現や形質への影響は非常に重要であろう。祖先種において同一染色体上に座乗していた遺伝子群が、オオモンシロチョウで別染色体に分かれていたら、その遺伝子群の発現が形質や機能にどのような変化をもたらすのかは興味深い。

同一染色体上に配置されることに意義があるとされる遺伝子群として、*Hox* (*homeobox*)遺伝子群が挙げられる。*Hox* 遺伝子は、ホメオボックス遺伝子ファミリーに属する、左右対称な生物の体節決定に働く遺伝子のマスター因子の総称である。*Hox* 遺伝子は、動物界全体で広く保存されており、ヒトとショウジョウバエの間でも保存性が高く、進化的な生物では常染色体上にクラスターリングされている(Lemons and McGinnis, 2006)。節足動物の *Hox* クラスターは主に 10 種の遺伝子が、脊椎動物ではそこから *fushi-tarazu* (*ftz*)を除いた 9 種の遺伝子が同順序でクラスターを形成している(Di *et al.*, 2015)。*Hox* 遺伝子の特徴として、前後軸に沿った胚発生における遺伝子の発現位置が、染色体上の遺伝子順序に従う(Wolpert, 2011; Pascual-Anaya *et al.*, 2018)ため、*Hox* 遺伝子は、遺伝子の空間的配置と発現パターンに相互関係がある例として信じられている。

カイコの染色体では、これら *Hox* 遺伝子群が全て第 6 染色体上に座乗することが確認されている(Yasukochi *et al.*, 2004)。興味深いことに、*Hox* 遺伝子群に属する *labial* は、他の *Hox* 遺伝子群と約 10 Mb ほど離れた位置に座乗する。カイコを含むチョウ目昆虫では、*labial* の発現のみならず、塩基配列の全長が明らかになっていなかった。オオモンシロチョウにおける、*labial* とその他の *Hox* 遺伝子の座乗もこれまで明らかにされていなかった。

ゲノム配列解析が行われたシロチョウ亜科 2 種の染色体数は、双方とも  $n=25$  である。一方、我々が進めてきたオオモンシロチョウの染色体数は、 $n=15$  と大きく異なる(Robinson, 1971)。また、モンシロチョウのゲノムデータは、染色体レベルアセンブルができています

は言い難く、オオモンシロチョウを含めた3種間での染色体比較は、シロチョウ亜科における染色体進化を知る上で重要な情報となる。さらに、シロチョウ科内での比較にも活用できるため、本研究において果たす役割も大きい。

そこで本章第1節では、チョウ目昆虫の *labial* が発現しているかどうかを確認するために、カイコで配列の決定と発現解析を行った。第2節では、オオモンシロチョウ染色体に *Hox* 遺伝子を BAC (bacterial artificial chromosome)-FISH (fluorescence *in situ* hybridization) マッピングすることで、*Hox* 遺伝子の座乗する染色体を調べた。第3節では、先行研究のオオモンシロチョウ FISH マッピング結果を精査し、再マッピングを行った。今後、*Hox* 遺伝子群のように同一染色体上に座乗することが重要である遺伝子が提唱された場合、マッピング結果が正確であることは、誤ったデータによるミスを防ぎ、仮説の検証に役立つだろう。第4節では、最近報告された2種のシロチョウ科昆虫のゲノムアセンブリデータを、本研究結果と比較して染色体進化を考察した。

## 第1節 カイコ *labial* の発現解析

チョウ目昆虫では、カイコ *E* 偽対立遺伝子群と隣接する *Nc* 遺伝子座の研究から、幼虫の形態形成に関与する遺伝子クラスターの存在が示唆されてきた(市川, 1954)。市川の報告通りほとんどの *Hox* 遺伝子はクラスターとして第6連関群(第6染色体)に存在したが、*labial* だけは同一染色体上にありながら、他の *Hox* 遺伝子群とは離れた位置に座乗することが、BAC-FISHにより後に確認された(Yasukochi *et al.*, 2004)。さらに New *Bombyx mori* gene models (2017) (<http://silkbases.ab.a.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/index.cgi>)より、*labial* も部分配列のみではあるが、その座乗位置の詳細な情報が確認された(Kawamoto *et al.*, 2019)。データベース上では、第6染色体の 15,669,173-15,669,663 bp に *labial* の GeneModel (KWMTBOMO03695)が座乗しており、その他の *Hox* 遺伝子は、同染色体上の約 5.06-6.58 Mb にわたりクラスターを形成している(Kawamoto *et al.*, 2019)。コベニモンドクチョウおよびアトグロヒョウモンモドキでもカイコ同様に、*labial* が他 *Hox* クラスターと同一染色体にありながら、染色体上の座乗位置が大きく離れていることが、ドラフトゲノム解析によって示されている(The *Heliconius* genome consortium, 2012; Ahola *et al.*, 2014)。これらの結果より、チョウ目昆虫の *labial* について、染色体上の座乗位置の観点から、*Hox* 遺伝子としての胚発生時期の発現や機能の変化が疑われた。

カイコ *labial* は細胞遺伝学的大変興味深い遺伝子であるが、その発現はおろか塩基配列の全長すらわかっていなかった。先行研究より、チョウ目昆虫の *Hox* 遺伝子の発現解析は、*Dfd*, *Antp*, *Ubx*, *abd-A*, *Abd-B* について whole-mount *in situ* hybridization (WISH)により行われている(間瀬ら, 1994; Warren *et al.*, 1994; Suzuki and Palopoli, 2001; Parthasarathy and Gopinathan, 2005; Tomita and Kikuchi, 2009; Masumoto *et al.*, 2009)。本節では、これら先行研究の *Hox* 遺

伝子の発現時期や実験手法を参考に、カイコ *labial* の CDS 全長の解明ならびに発現解析を行った。

## 材料および方法

### 1. 供試昆虫

カイコ品種は、p50 系統を National Bioresource Project カイコを通じて、九州大学大学院農学研究院遺伝資源開発研究センターより分譲を受け使用した。農研機構にて使用したカイコ p50 系統は、生物機能利用研究部門 富田秀一郎ユニット長に分譲していただいた。どちらも全齢人工飼料育(Silk Mate 2M, 日本農産工業株式会社, 横浜)して用いた。実験に使用したカイコ卵は、45.5°C に保温した比重 1.075 の塩酸溶液にて 5 分間の即時浸酸処理により休眠打破して使用した。蚕の飼育は、室温 25°C、明期 12 時間、暗期 12 時間の恒温飼育室にて行った。

### 2. RT-PCR による部分カイコ *labial* mRNA の検出

RNAlater (AM7020, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US)で保存した即時浸酸後 1 日半-3 日のカイコ卵から、TRIzol (Thermo Fisher Scientific)のプロトコルに従って、total RNA を抽出した。つまり、粉碎試料 100 mg あたり TRIzol 1 ml を混合し、10 分室温で静置した後、等量の TRIzol と全体の 1/10 量のクロロホルムを加えて混合、15,000 rpm 15 分間、室温で遠心した。上清を別のチューブに移し、イソプロパノール沈殿を行った。70%エタノールでリンスし、RNase free の滅菌水に溶かした。DNase I (2270A, TaKaRa, 草津)処理を 37°C で 30 分行い、80°C で 5 分酵素の不活化を行った。エタノール沈殿を行い、RNase free の滅菌水に溶かした。

PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) (RR037A, TaKaRa)により上記 total RNA をテンプレートに cDNA を合成 (Table 2.1)。この cDNA をテンプレートにして、KWMTBOMO03695 より設計した、F2 と R1 プライマー(Table 2.2)を用いた PCR により、*labial* の部分配列を増幅した(Table 2.3)。PCR の条件は、94°C を 5 分処理後、94°C を 30 秒、55°C を 30 秒、72°C を 1 分の処理を 40 サイクル行い、72°C を 7 分の処理で終結させた。アガロースゲル電気泳動により PCR 産物の増幅サイズを確かめ、カイコ *labial* の発現ステージを調査した。ポジティブコントロールには、カイコ *labial* 領域を含む BAC である、9J8B をテンプレートにした PCR 産物を用いた。

### 3. カイコ *labial* 部分配列のクローニング

Kawamoto *et al.* (2019)が公開したカイコ *labial* 配列情報 KWMTBOMO03695 は、307 bp の部分配列情報である。これに対し、NCBI に登録された XM\_012696992.2 (PRJNA205630)は、



1,186 bp と長いものの、KWMTBOMO03695 よりもさらに 5'末端側の配列のプライマーを設計して R1 との組合せで PCR を行ったところ、増副産物が認められなかった(data not shown)。試行錯誤の結果、3'末端側の 7 bp から 26 bp までの配列からデザインした R4 (Table 2.2)と F2 のプライマーペアでは、設計通りの増副産物が得られた。この増副産物をアガロース電気泳動で移動し、増幅バンドを含む約 300 bp 付近のゲルを抽出した。Wizard® Genomic DNA Purification Kit (A1120, Promega, Madison, WI, US)マニュアルに従いゲルからの DNA 断片の抽出を行った。TA クローニングは、抽出した PCR 産物を pGEM®-T Easy Vector Systems (A1360, Promega)と T4 DNA ligase (M180A, Promega)を用いて(Table 2.4)、16°C で 30-60 分間ライゲーションを行った。4 µl の ligation mix とコンピテントセル 40 µl をプラスチックチューブ内にて混合し、氷上で 30 分インキュベートした。コンピテントセルは、液体窒素中に保存した DH5α を使用した。42°C ウォーターバスで 45 秒インキュベートし、すぐに氷上へ移すことでヒートショックによる形質転換を行った。2 分後に SOC (Table 2.5)を 400 µl 加え、37°C で 1 時間振とう培養した。X-Gal (9031, 富士フイルム和光純薬, 大阪) 50 µl を塗布したアンピシリン(50 µg/ml)入りの LB 寒天培地(Table 2.6)に滅菌したコンラージ棒で塗布した。培養は、37°C のインキュベーターで約 15 時間行った。シングル白コロニーを 10%グリセロールならびにアンピシリン(50 µg/ml)入り LB 液体培地で培養後-20°C に保存し、必要に応じて使用した。

#### 4. mRNA の抽出

RACE (rapid amplification of cDNA ends)のテンプレートとして、QuickPrep Micro mRNA Purification Kit (27925501, GE Healthcare, Chicago, IL, US)のプロトコルに従って RNase free の環境で mRNA を抽出した。抽出するカイコ卵のステージは、RT-PCR 結果を参考に、即時浸酸 2~4 日後とした。mRNA を抽出した方法は以下の通りである。カイコ卵を 1.5 ml チューブの 100 µl のラインまで加え、37°C に温めた extraction buffer 0.6 ml 中でホモジナイズし、卵殻を取り除いた。Dounce Tissue Grinder (357538, WHEATON, Millville, NJ, US)に移し、loose 10-20 回、tight 10 回で粉碎した。1.2 ml の elution buffer を加えて混ぜ、16,000× g で 1 分遠心し上清を除去した。スラリーを均一にした oligo(dT)-cellulose を 16,000× g で 1 分遠心し、上清をサンプルのチューブに加えて沈殿と 3 分間転倒混合した。16,000× g で 10 秒遠心し、上清を捨てた。1 ml の high salt buffer にタッピングで再懸濁し、16,000× g で 10 秒遠心し、上清を捨てる処理を 5 回繰り返した。1 ml の low salt buffer にタッピングで再懸濁し、16,000× g で 10 秒遠心し、上清を捨てる処理を 2 回繰り返した。0.3 ml の low salt buffer にタッピングで再懸濁し、MicroSpin Column に入れ、16,000× g で 10 秒遠心後、液を捨てた。0.5 ml の low salt buffer をカラムに加え、16,000× g で 10 秒遠心後、液を捨てる処理を 3 回繰り返した。カラムを RNA-free チューブに移し、65°C の elution buffer を 0.2 ml 加えて 1 分待ち 16,000× g で 10 秒遠心する処理を 2 回繰り返した。サンプル 400 µl あたりグリコーゲン 10 µl と K acetate solution を 40 µl を加え、軽く混合した。-20°C の 100%エタノールを 1 ml 加

え、-20°C で 30 分以上インキュベートし、4°C で 5 分間 16,000× g で遠心し、上清を捨てた。70%エタノールを加えて、すぐに使わない場合はそのまま-80°C でストックした。使用時には 70%エタノールを完全に取り除き、適量の DEPC-treated water (36415-54, nacalai tesque, 京都)に溶解して使用した。

## 5. RACE 法によるカイコ *labial* の配列全長の決定

RACE には SMARTer® RACE cDNA Amplification Kit (634914, Clontech (Takara Bio US), Mountain View, CA, US)を用いて SMART(Switching Mechanism At 5'end of RNA Template)にて行った。5'-RACE 用チューブには mRNA と 5'-CDS primer を加えて 3.75 µl に、3'-RACE 用チューブには mRNA と 3'-CDS primer を加えて滅菌水で 4.75 µl にメスアップした。双方とも 72°C で 3 分、42°C で 2 分処理し、14,000× g で 10 秒間遠心した。5'-RACE 用 mix のみ、SMARTer IIA oligo を 1 µl 加えた。これら 5'-RACE と 3'-RACE 用 Mix それぞれに各種試薬 (Table 2.7)を加え、合計 10 µl とした。42°C で 90 分間、逆転写反応を行い、10 分の 72°C 処理により酵素を失活させた。Tricine-EDTA buffer 200 µl で希釈し、-20°C で次の処理まで保存した。PCR には BD Advantage™ 2 PCR Kit (639207, BD, Franklin Lakes, NJ, US)を用いた。PCR 1 サンプルにつき 41.5 µl の Master mix を用意した (Table 2.8)。プライマーは、カイコ *labial* の予測部分配列 (XM\_012696992.2)より設計した Gene-specific primers (GSP)と、キットに付属する Universal Primer Mix (UPM)を用いた (Table 2.9)。RACE-PCR は Table 2.10 のように試薬を調整し、タッチダウン PCR の設定で PCR 反応を進めた。プロトコルは、94°C で 30 秒と 72°C で 3 分の処理を 5 サイクル、94°C 30 秒と 70°C 30 秒と 72°C 3 分の処理を 5 サイクル。94°C 30 秒と 68°C 30 秒と 72°C 3 分の処理を 20 サイクル行った。PCR 産物を電気泳動でバンドを確かめ、Wizard® Genomic DNA Purification Kit (A1120, Promega)のマニュアルに従いゲルからの DNA 抽出を行った。抽出した PCR 産物の pGEM®-T Easy Vector Systems (A1360, Promega)のクローニングは、本節材料および方法 3.と同様に行った。コロニーの生えたシャーレは 4°C に保存した。プラスミド DNA 抽出は、白色のシングルコロニーをアンピシリン (50 µg/ml)入りの LB 液体培地で一晚培養し、Automatic DNA Isolation System (PI-50, KURABO, 大阪)により自動で行った。

インサート DNA の配列決定は、ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Bio-systems, Waltham, MA, US)により、サンガーシーケンシングした。サンプルの調整は、BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (4337454, Thermo Fisher Scientific)を用い (Table 2.11)、96°C で 1 分処理後、96°C 10 秒、50°C 5 秒、60°C 4 分の 35 サイクル PCR により増幅した各サンプルに 10 µl ずつ滅菌水を加えて配列決定した。

## 6. カイコ卵の解剖

解剖皿は、SYLGARD™ 184 Silicone Elastomer Kit (98-0898, Dow, Midland, MI, US)で作製した。高見・北沢 (1960)を参考に発生ステージを推定し、ステージ 16-22 (丁 A 期-反転完了期)

のカイコ卵をスライドガラス上に接着剤(アロンアルファ, KONISHI, 大阪)で固定した。顕微鏡下にスライドガラスを固定し、上から 1×PBS を乗せた。メスでカイコ卵の背側(反転完了期は腹側)から切開し、胚を取り出して 1×PBS で満たした解剖皿にキュベットで移動した。解剖皿上で卵黄を除去して、胚のステージごとに 4%パラホルムアルデヒド PBS 溶液に入れて 4°C で 1 日固定した。1×PBS で 2 回リンス後、1×PBS 溶液で希釈した 50%メタノールに入れて、-20°C でストックした。

#### 7. mRNA の *in vitro* transcription

プラスミド DNA 抽出は、*labial* 部分配列をクローニングした大腸菌 (3.参照) をアンピシリン(50 µg/ml)入りの LB 液体培地で一晩培養し、Automatic DNA Isolation System (PI-50, KURABO)により自動で行った。*in vitro* transcription は、上記プラスミド DNA をテンプレートとして、MAXIscript® SP6/T7 Transcription Kit (AM1320, Ambion, Austin, TX, US)のプロトコルに従って、センス鎖とアンチセンス鎖毎に行った。それぞれ MAXIscript reaction Mix を調整し(Table 2.12)、37°C で 60-120 分静置にて反応させた。この反応には DIG RNA labeling Mix (11277073910, Roche, Basel, Switzerland)を使用したため、転写産物の UTP を DIG でラベルした。2 U/µl DNase を 1 µl 加えて、さらに 37°C で 15 分インキュベートした。0.5 M EDTA を 1 µl 加えて、RNA 用 sephadex G25 ゲル担体で TE バッファーを溶媒にゲル濾過を行った。精製された RNA プローブ溶液は、使用まで-80°C で保存した。

#### 8. whole-mount *in situ* hybridization (WISH)

1×PBS 溶液で希釈した 50%メタノールにストックしていたカイコ胚を 24 ウェルプレート (68405033, IWAKI, 榛原郡吉田町)に入れた PBSTw (1×PBS, 0.1% Tween20)で 希釈した 25%メタノールに移し、10 分以上シーソーで振盪してメタノールを混合した。この混合液をピペットマンで捨て、PBSTw を加えて 10 分間以上、シーソー振盪して胚を洗浄した。これも一度繰り返した後、液を捨て、Proteinase K (1 µg/ml) in PBSTw を加えて 1~2 分酵素処理した。処理液を捨て、PBSTw 中に 2 mg/ml に希釈した Glycin を加えて 5 分間振盪し、proteinase K を不活化した。不活化液を捨て、Parafix solution (1×PBS, 4%パラホルムアルデヒド, 4%スクロース, pH 7.4)を加えて 20 分間振盪固定した。固定液を捨て、PBSTw を加えて 10 分間以上のシーソー振盪による胚洗浄を 2 回行った。洗浄液を捨て、50% prehybridization buffer (Table 2.13)を加えて 3 分振盪した。液を捨て、室温の prehybridization buffer (Table 2.14)を加えて 10 分間振盪後、液を捨てて 65°C に温めた prehybridization buffer を加えて、温度を維持しながら 60 分間振盪してプレハイブリダイゼーションを行った。この処理液を捨て、65°C に温めた hybridization buffer with probe (Table 2.15)を加えて、温度を維持しながら 1 晩振盪してハイブリダイゼーションを行った。

1 晩ハイブリダイゼーション処理したサンプルの液を捨て、65°C に温めた hybridization buffer (Table 2.16)を加えて 20 分間 65°C で振盪し、プローブ洗浄を 2 度行った。洗浄液を捨

て、Buffer #1 (50% Formamide, 0.1% Tween20, 0.1% CHAPS, 4×SSC in distilled water)、Buffer #2 (50% Formamide, 0.1% Tween20, 0.1% CHAPS, 2×SSC in distilled water)、Buffer #3 (50% Formamide, 0.1% Tween20, 0.1% CHAPS, 1×SSC in distilled water)、Buffer #4 (50% Formamide, 0.1% Tween20, 0.1% CHAPS, 0.2×SSC in distilled water)の順に 4 溶液、それぞれ 65°C、15 分処理し、塩濃度を段階的に下げた。Buffer #4 溶液を PBSTw に置き換えて 10 分間以上シーソー振盪して胚のホルムアミド濃度を下げた。この処理液を捨て、PBSTw 稀釈 RNaseA (20 µg/ml) で 30 分振盪し、遊離 RNA を分解した。RNaseA 溶液を PBSTw に置換し、10 分間以上シーソー振盪して胚を洗浄した。洗浄液を捨て、PBSTw 稀釈した 1% Blocking Reagent (11096176001, Roche) を加えて 60 分振盪によるブロッキングを施した。ブロッキング液を捨て、Antibody solution (Table 2.17) を加えて 4°C で 1 晩振盪し、DIG の抗体(anti-digoxigenin-AP Fab Fragments)を結合させた。ここで加える Antibody solution は、事前に 50%メタノール in 1nPBS 溶液で固定した別のカイコ胚を、Antibody solution 2 ml ごとに 5-6 個加えて 1 時間以上 4°C で放置することで、非特異的に結合する余計な抗体を除去したものを使用した。

サンプルの液を捨て、PBSTw を加え 20 分以上振盪する操作を 4 回行い、胚を洗った。液を捨て、AP detection buffer (100mM NaCl, 50mM MgCl, 100mM TrisHCl (pH 9.5)) による 5 分処理を 2 度行った。その後、以下の処理を遮光条件で行った。AP detection buffer を捨て、10 ml の AP detection buffer に NBT/BCIP Ready-to-Use Tablet (11697471001, Roche) 1 錠を溶解した染色液を適量加えた。カイコ胚が十分に染まるまで静置し、PBSTw を等量加え 10 分間以上シーソー振盪により胚を脱色した。PBSTw を交換して脱色を 2 度繰り返し、PBSTw を適量入れた新しい細胞培養 24 ウェルプレートにセルセイバーチップで染色胚を移して顕微鏡下で観察した。染色後のカイコ胚は、1×PBS で 50%稀釈したグリセロール溶液中で 4°C に保存した。

Table 2.1 Composition of first-strand cDNA amplification mix for RT-PCR reaction

5× PrimeScript Buffer (for Real Time)	2 µl
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5 µl
Oligo dT Primer (50µM)	0.5 µl
total RNA	<500 ng
	adjust the volume to 10 µl with distilled water
above reagents contain in PrimeScript™ RT reagent Kit (TaKaRa, RR037A)	

Table 2.2 Primers used for *in vitro* transcription

Bmlab_F2	TGGCCAATCCCTTACTCAACC
Bmlab_R1	CTGGACTCCCGGCTGTTTTTC
Bmlab_R4	AGATGCGATTTTCGGACCACA

Table 2.3 Setting up the PCR reactions

10× Ex Taq Buffer (20mM) (TaKaRa, RR001A)	1 µl
dNTP Mixture (2.5mM each) (TaKaRa, RR001A)	0.8 µl
Forward primer (5µM)	1 µl
Reverse primer (5µM)	1 µl
TaKaRa Ex Taq (5 U/µl) (TaKaRa, RR001A)	0.05 µl
cDNA (Table 2.1)	0.5 µl
	adjust the volume to 10 µl with distilled water

Table 2.4 Composition of ligation mix

PCR product	3.2 µl
pGEM vector (20 ng/µl)	0.8 µl
2× Reaction Buffer	5 µl
T4 DNA ligase (Promega M1801)	1 µl

Table 2.5 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
KCl (和光純薬 163-03545)	0.02 g
adjust the volume to 100 ml with distilled water	
SOC	
SOB	1,000 $\mu$ l
1M Glucose (和光純薬 049-31165)	2 $\mu$ l
1M MgCl <sub>2</sub> (和光純薬 135-00165)	1 $\mu$ l
1M MgSO <sub>4</sub> (関東化学 58042-17)	1 $\mu$ l
prepare right before use it	

Table 2.6 Composition of LB agar plate (including ampicillin 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 0.2 ml of ampicillin solution (50 mg/ml) below at 60°C and dispense to 10 dishes.	
after fixed, keep at 4°C until using	

Table 2.7 Composition of first-strand cDNA amplification mix for RACE reaction

5× First-strand buffer	2 $\mu$ l
DTT (20mM)	1 $\mu$ l
dNTP (10mM)	1 $\mu$ l
RNase Inhibitor (40 U/ $\mu$ l)	0.25 $\mu$ l
SMARTScribe Reverse Transcriptome (100 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
above reagents contain in SMARTer® RACE cDNA Amplification Kit (Clontech 634914)	
5'- or 3'-RACE Mix	4.75 $\mu$ l

Table 2.8 Composition of RACE-PCR master mix

10× Advantage 2 PCR buffer	5 µl
50× dNTP Mix (10µM)	1 µl
50× Advantage 2 Polymerase Mix	1 µl
adjust the volume to 40 µl with distilled water	
above reagents contain in BD Advantage™ 2 PCR Kit (BD 639207)	

Table 2.9 Primers used for RACE-PCR

Universal Primer Mix (UPM) (SMARTer® RACE cDNA Amplification Kit, 634914, Clontech)	
Long Primer	TAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
Short Primer	CTAATACGACTCACTATAGGGC
Gene-Specific Primers (GSP)	
GSP1	CGGGCGCTACTATCAGCCCCTCCTTGAT
GSP2	AAGGCGTCCTGGGCAGTCCACAAGAC

Table 2.10 Setting up the 5'- and 3'-RACE PCR reactions

5'-RACE				
	Sample	UPM only*	GSP1 only*	GSP only**
5'-RACE-Ready cDNA	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl
10×UPM (634914, Clontech)	5 µl	5 µl	-	-
GSP1 (10µM) (Table 2.6)	1 µl	-	1 µl	1 µl
GSP2 (10µM) (Table 2.6)	-	-	-	1 µl
Master Mix (Table 2.5)	41.5 µl	41.5 µl	41.5 µl	41.5 µl
adjust the volume to 50 µl with distilled water				
3'-RACE				
	Sample	UPM only*	GSP2 only*	GSP only**
3'-RACE-Ready cDNA	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl
10×UPM (634914, Clontech)	5 µl	5 µl	-	-
GSP1 (10µM) (Table 2.6)	-	-	-	1 µl
GSP2 (10µM) (Table 2.6)	1 µl	-	1 µl	1 µl
Master Mix (Table 2.5)	41.5 µl	41.5 µl	41.5 µl	41.5 µl
adjust the volume to 50 µl with distilled water				

\*negative controls

\*\*positive control

Table 2.11 Setting up sanger sequence by ABI 3730xl DNA analyzer

BigDye™ Terminator 3.1 Ready Reaction Mix (4337454, Thermo Fisher Scientific)	2 µl
M13F or M13R primer (3.2µM)	1 µl
Template	120-150 ng
adjust the volume to 10 µl with distilled water	

Table 2.12 Composition of MAXIscript reaction mix

10× transcription buffer (Ambion, AM1320)	2 µl
T7 or SP6 RNA polymerase Mix (Ambion, AM1320)	2 µl
DIG RNA labeling Mix (10mM NTP+ DIG UTP) (Roche, 11277073910)	2 µl
DNA template	10 µl
adjust the volume to 20 µl with distilled water	

Table 2.13 Composition of 50% prehybridization buffer

prehybridization buffer (Table 2.14)	500 µl
PBSTw (1×PBS, 0.1% Tween20)	500 µl

Table 2.14 Composition of prehybridization buffer

Formamide (nacalai tesque, 16228-05)	50 ml
20×SSC (nacalai tesque, 32146-91)	25 ml
10% Tween20 (nacalai tesque, 23926-35)	1 ml
CHAPS (nacalai tesque, 07957-51)	100 mg
Heparin Sodium (nacalai tesque, 17513-96)	5 mg
DNA, MB-grade from fish sperm (10 mg/ml) (Roche, 11467140001)	5 ml
Blocking Reagent (Roche, 11096176001)	2 g
0.5M EDTA (pH 8.0) (nacalai tesque, 14347-21)	1 ml
adjust the volume to 95 ml with distilled water	

Table 2.15 Composition of hybridization buffer with probe

DNA, MB-grade from fish sperm (10 mg/ml) (Roche, 11467140001)	5 µl
RNA probe	1.25 µl
adjust the volume to 25 µl with distilled water (pH 7.4) incubate in 100°C (3 min) and ice chill rapidly	
prehybridization buffer (Table 2.14)	475 µl



Table 2.16 Composition of hybridization buffer

DNA, MB-grade from fish sperm (10 mg/ml) (Roche, 11467140001)	5 $\mu$ l
prehybridization buffer (Table 2.14)	475 $\mu$ l
adjust the volume to 500 $\mu$ l with distilled water	

Table 2.17 Composition of Antibody solution

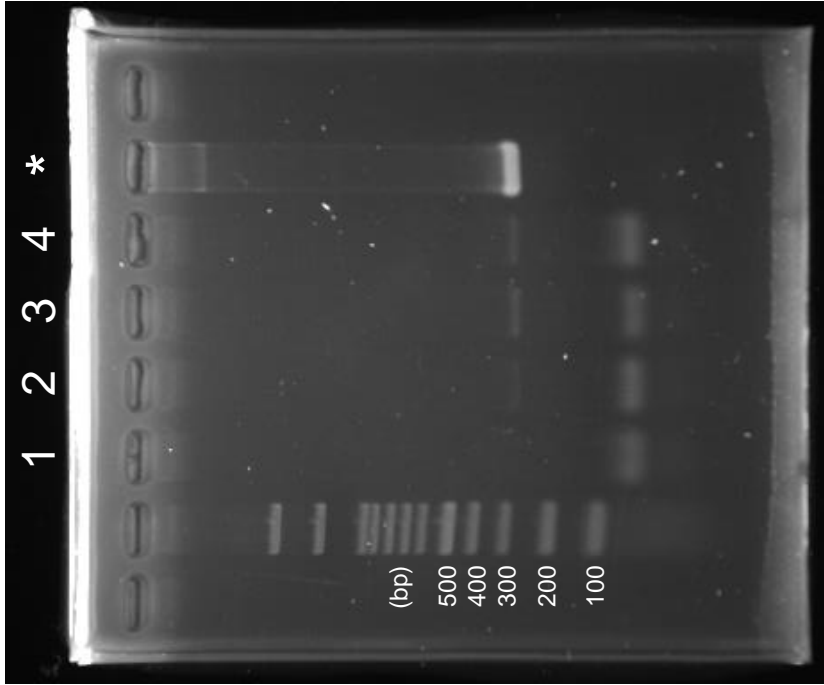
	dilution rate	
	$\times 300$	$\times 1,000$
Anti-DIG AP Fab fragment (150 U/200 $\mu$ l) (Roche, 11093274910)	6.7 $\mu$ l	2 $\mu$ l
10% Blocking reagent (Roche, 11096176001)	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
PBSTw (1 $\times$ PBS, 0.1% Tween20)	1.9 ml	1.9 ml

## 結果

RT-PCR より、*labial* は即時浸酸後 2 日目、2.5 日ならびに 3 日目のカイコ卵で発現しているが、1.5 日の卵では発現が無かった(Fig. 2.1)。後述した RACE 用に作製した即時浸酸後 4 日卵の total RNA から逆転写された cDNA を用いて PCR をしたところ、3 日目卵の結果と同様の増幅バンドが得られたため(data not shown)、RACE には即時浸酸後 2 日目と 3 日目ならびに 4 日目のカイコ卵から作製した cDNA を使用した。

TA クローニングした 5'-RACE と 3'-RACE の増副産物を各 7 プラスミドずつサンガーシーケンスしたところ、GSP1 プライマーの 822 bp 上流から始まる ATG がイニシエーションコドンであった。また、3'RACE では、GSP2 プライマーの 599 bp 先からポリ A 配列が認められた(Fig. 2.2)。5'-ならびに 3'-RACE クローンには、ポリ A 配列周辺を除いて、それぞれ 21 ならびに 4 個の配列相違があった(data not shown)。一塩基多型(SNPs)の可能性も排除できないが、PCR 増幅時の塩基取り込み間違いの可能性が高い。また、5'RACE クローンの 7 塩基目から 20 塩基目までが抜けたプラスミドが 1 つあった(data not shown)。Indel の可能性も捨てきれないが、これも同様に PCR 増幅時の間違いと考える方が自然である。これらの結果から、カイコ *labial* 遺伝子は、全長は 1.7 kb 強であり、blastn 解析から、783 bp の前後で 2 つエクソンに分かれることが予測された。エクソン間には、カイコの Assembled genome 上で約 48 kb の比較的大きいイントロンが認められた。なお、2 つのエクソンは、New *Bombyx mori* gene models (2017)のそれぞれ KWMTBOMO03695 と隣接する KWMTBOMO03696 を内包した。

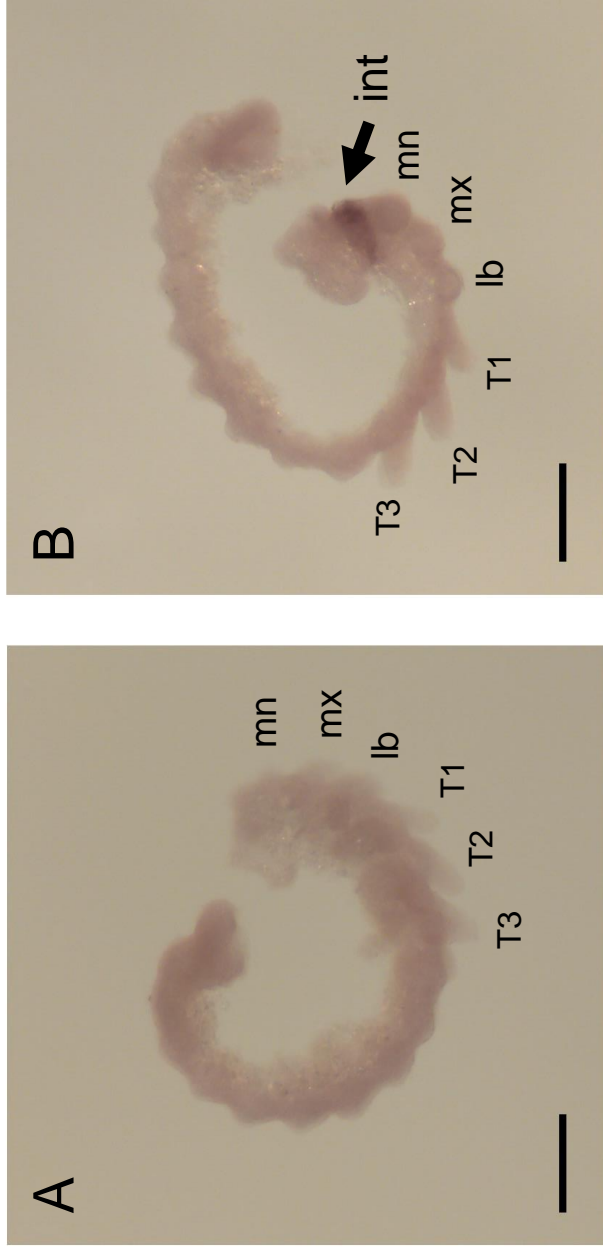
WISH によりカイコ胚発生における *labial* 発現場所の解析を行った結果、ステージ 18 において、アンチセンス鎖をプローブとした場合のみ、間挿節(intercalary segment)に明瞭な特異的なシグナルが検出された(Fig. 2.3)。同様にステージ 16-20 において、WISH シグナルを間挿節で検出した(Fig. 2.4)。ステージ 20 の胚子では、*labial* の発現は間挿節だけでなく、上唇原基(labrum rudiment)、原頭葉(procephalic lobes)の下部両端、尾脚原基(anal proleg rudiment)にもシグナルが認められた(Fig. 2.5)。



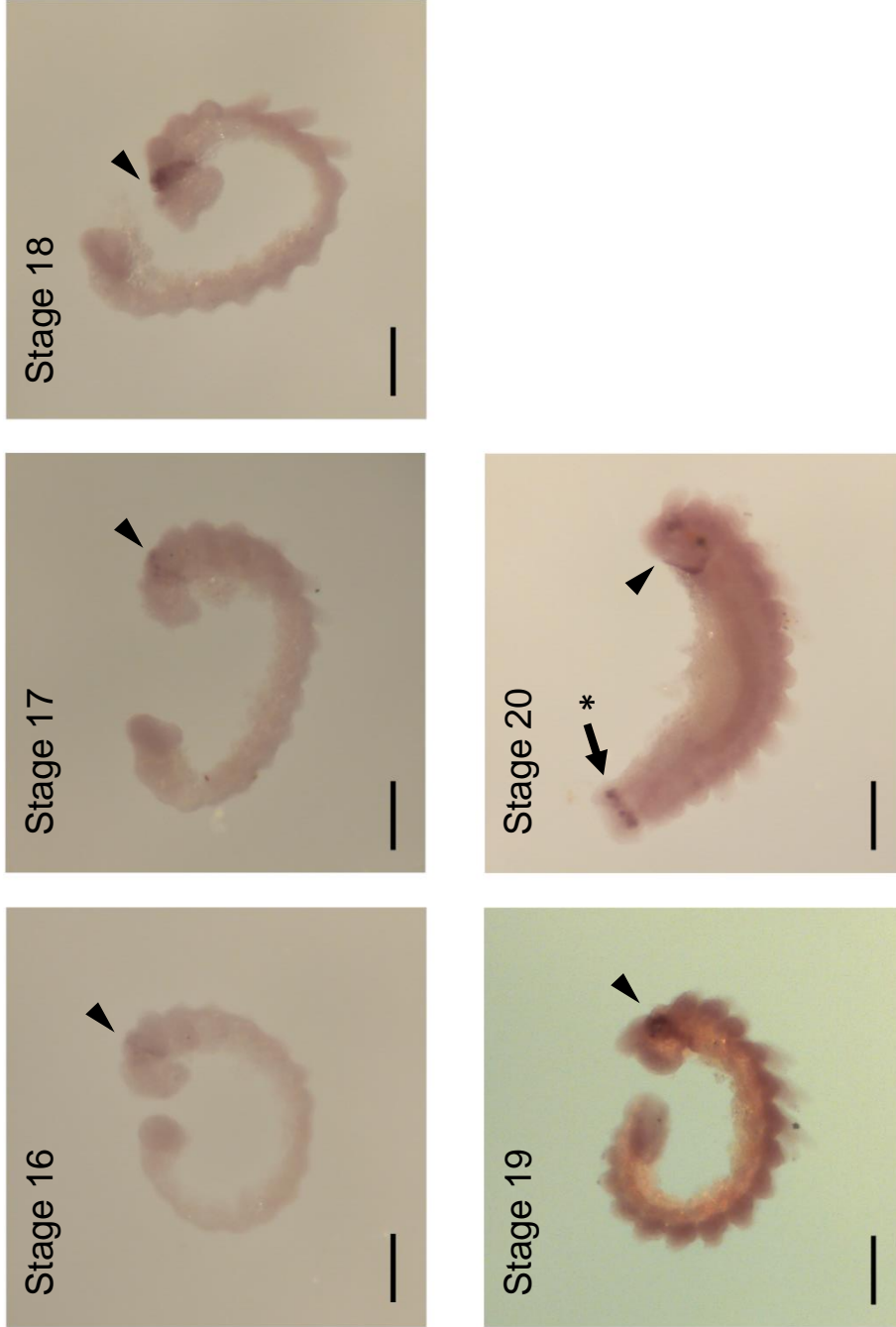
**Figure 2.1** Electrophoresis of *Bombyx mori labial* RT-PCR products. The amplified partial *labial* product size is 292 bp. The total RNAs were extracted from 1.5 (Lane 1), 2 (Lane 2), 2.5 (Lane 3) and 3 (Lane 4) days after hibernation-break (HCl) treatment. Asterisk marked lane: positive control PCR products used *B. mori* BAC-DNA (9J8B) containing *labial* gene.

ATGGGGAGTGTTTCGTCCGGTGC GGCTGACGTGCGGGCGTGCAATCGATAACCCGCGCC  
 GCTGAGCTAGCCCGCTCCGCAACCAAACGCACCTACATCCGGGACGTAGTGATGTGC  
 GCGATGTAAACGTATTGTCGCTATCGATAGACGCGGTGATCGTGACAAACATGATGACT  
 ATGGACGTCCGGATGTACAACAACCAACAGAACGGGTACGGAGGGCGCCGAGTACTATC  
 AGCAGGGGACCGGGTACCAGCCGCCTTACGAGGGCTACCACGAGGGATACTACGAGC  
 CGACGACGCACTACTACGAGCCTTTACTGCCCGGGCAGGCGGCCACGACCACCCCC  
 CCGCGCCGGTCATAAGCACAGACACGGGACTCTGTTACACGAATTTGGATTACGGTGA  
 CCTGCAGCCAAATTACCCTTTACACGCCTTACCGCAGCATCCGATTGAGCCGTTCAAG  
 CACCGGGATGAGGTCCCGAGACCGGAGGAGATGCACTTACACGAGCACAAGCTCGAC  
 AACCCTACTTTGGAGACGAAATACAACATGCATTTTCGTTGATGAGTCCTCCATGCAGTA  
 CAACCCTCCGGGTCCCGCTCTCCTGCGCTGAGTTTGAGCACTACCAGCCCAAAGA  
 GGAGTACGGAGGACTGAGGGAGGGATTCCCTCGTGAAGGAGAGACGATGTCGCATCT  
 TATCCCGAGCGGTCACCAATCCCACCCCTCTCACGCCACTGTGCCGACCTACAAATGG  
 ATGCAAGTCAAGAGAAACGTACCCAAACCAACCGCACCGAAGCTGATGATACCACCAG  
 CAGAATTCGTCAGTCAAGGCGTCTGGGCAGTCCACAAGACGGAATGCGCACACCAA  
 CGGGCCCCCAAATGATGGCCAATCCCTTACTCAACC GAACAACACCGGGCGGACTA  
 ACTTCACCAACAAACAGCTCACTGAATTGGAAAAGAATTCCACTTCAACAAATACTTGA  
 CCAGAGCGAGGAGGATAGAAATAGCCTCAGCGTTACAACGAGACGCAAGTTAA  
 AATATGGTTTCAGAACAGAAGGATGAAGCAGAAGAAACGGATCAAGGAGGGGCTGATA  
 GTAGCGCCCGAGGCCGCCCGACCACGTCAACCCAAACAAGTGTGGGATCTAATGA  
 AACAGCCGGGAGTCCAGTTAAGTGTATTGTGGTCCGAAATCGCATCTATACAGACGAT  
 TGAATTAATTATAATAAAACATTGTTTTTTTATGAGTGAGGACGTACAGCTTGTTTCATGTT  
 CATGCGATAGTCATTCAACAACAGTGAGCCGAGTCGGTGTCAATTTAGTTTTAATGTTTC  
 GTAGTCGTTTTTTGTAAGTTAAGTTTAACTTTGAACGAAAATGCGCTAGATAAATGTACC  
 TATAGTGTATTTATTTATTAATAAATCAACTATCGTTATTGCACTCTCTGAGAAATTCAGAT  
 GCGAGAGTTAATCGTGTACAACTTTAGTTATGTAGCGTTGTAATTTATGTACCTATGTAT  
 TTCCCGTAAAGAGATTATGCGTGACGGATAAGAAGTGAATAAGCTATTAGTTAAGTGCA  
 GCAAGAAGCAAGCTGCTTCTCGAACATAAAGCAGTATTCTGTCTACAGCCGGATTAGC  
 ATTGACTTTAACATTGCCAAGAAGAGTGCCATCAGGCATGCGGCCACAGAACTCCTCTT  
 TCCGTCTACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

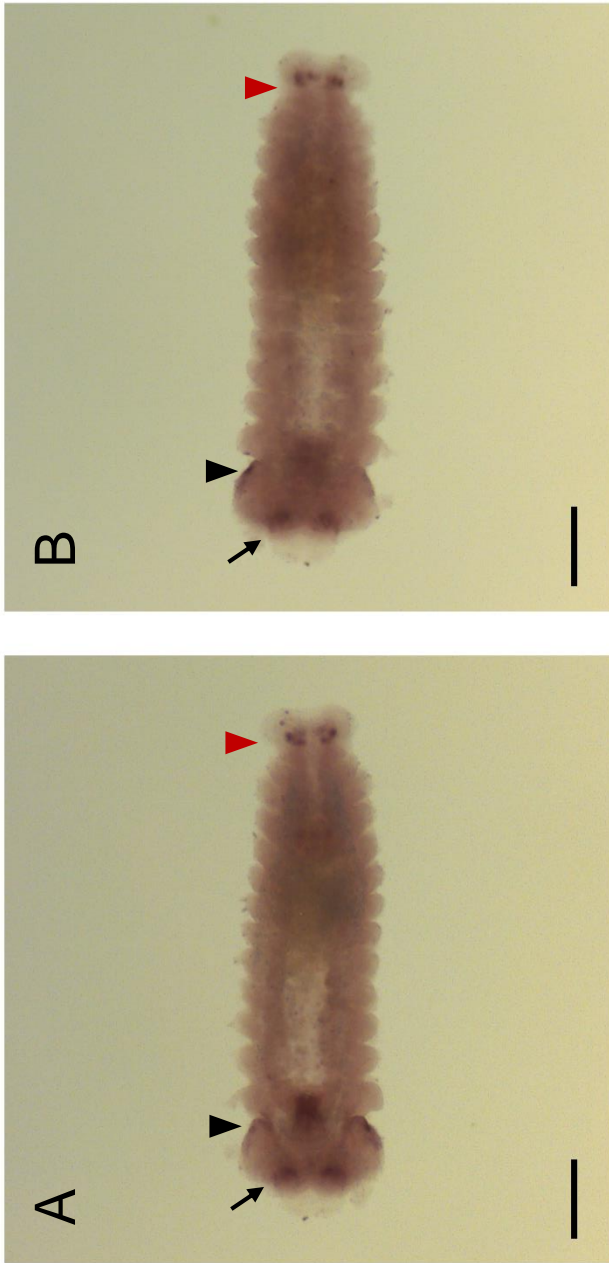
**Figure 2.2** A full-length cDNA sequence of *Bombyx mori labial* gene. Sequences with blue back color indicate a *B. mori* GeneModel, KWMTBOMO03695. Underlined bold sequences indicate primer region described in Table 2.2. Bold sequences with yellow back color indicate primers for RACE (Table 2.4).



**Figure 2.3** *Bombyx mori* labial expression in stage 18 embryos that stained labial expression detected by whole mount *in situ* hybridization (WISH). A; control using sense probe (a) showed no specific signals (negative control). B; antisense probe signals were appeared in intercalary segment (int, arrow) whereas no signals in mandibular rudiment (mn), maxillary rudiment (mx), labial rudiment (lb) and three thoracic segments and legs (T1-3). Black bars show 0.2 mm.



**Figure 2.4** Expression of *Bombyx mori labial* in stage 16-20 embryos. The WISH signals were appeared in intercalary segment (arrowheads). In stage 20 embryo the signals were also detected in anal proleg rudiment (asterisk), lateral procephalic lobes and labrum rudiment. Black bars show 0.2 mm.



**Figure 2.5** Expression of *Bombyx mori* labial in an stage 20 embryo. Both dorsal (A) and ventral (B) view showed expression signals in labrum rudiment (arrows), lateral procephalic lobes (black arrowheads) and anal proleg rudiment (red arrowhead) in addition to those in intercalary segment. Black bars show 0.2 mm.

## 考察

WISH に用いるカイコ胚はステージ 17-20 が適しており、これまで発現が研究に用いられた *Hox* 遺伝子は全て、この時期に発現が確認されている (Tomita and Kikuchi, 2009)。カイコにおいて、このステージは即時浸酸後 40 時間～3 日にあたる (北沢・高見, 1963)。RT-PCR ならびに WISH による発現解析より、*labial* がステージ 17-20 に発現が認められた (Figs. 2.1, 2.3-2.5)。また、即時浸酸後 4 日目胚の RT-PCR でも 3 日目同様にバンドが得られたことから (data not shown)、*labial* の発現は少なくとも即時浸酸後 4 日目 (ステージ 21 前後) まで維持される可能性も考えられる。

カイコ *labial* の染色体上の座乗位置は、他 *Hox* 遺伝子群と遠い上、並び順が逆であることが確認されている (Yasukochi *et al.*, 2004)。本研究では、細胞遺伝学的な変化にかかわらず *labial* が胚発生時の発現を維持していることが確認された (Figs. 2.3, 2.4)。昆虫を含む節足動物の *labial* は間挿節で発現し、胚発生を担うことが確認されている (Hughes and Kaufman, 2002a)。カイコでも同様に、間挿節での発現がステージ 16～20 で恒常的に確認されたことから、*labial* はカイコでも体節決定遺伝子として機能していることが強く示唆された。本研究結果と似た例として、*Drosophila repleta* ならびに *D. buzzatii* では *labial* が *Abd-B* の隣に転座しており、一方で胚発生時期の発現は維持していることが確認されている (Negre *et al.*, 2003; 2005)。ハエ目は、チョウ目とトビケラ目を合わせたカザリバネ上目の姉妹クレードにあたるため、少なくともこれら 3 目で、*labial* の染色体上の座乗位置が働きに関与しない可能性がある。

本研究では、ステージ 20 において間挿節の他にも原頭葉 (lateral procephalic lobes) の下部両端で遺伝子発現を検出した (Fig. 2.5, black arrow heads)。WISH による *labial* の発現解析より、*Tribolium* 属の遅いステージの胚では原頭葉の下部両端にシグナルが生じることが報告されている (Posnien and Bucher, 2010)。*Tribolium* 属の *labial* ノックダウンにより、間挿節と頭部側面が部分的に欠失することが確認されている。以上を考慮すると、チョウ目昆虫の *labial* にも *Tribolium* 属同様の間挿節と頭部側面での働きがある可能性がある。

ステージ 20 において、上唇原基 (labrum rudiment) の遺伝子発現も検出した (Fig. 2.5, black arrows)。胚発生時の頭部形成の仮説として、間挿節から上唇が形成されるモデルが提唱されている (Haas *et al.*, 2001)。しかし、*Drosophila* 属や *Tribolium* 属の発現解析では、上唇原基に発現は存在しなかった (Hughes and Kaufman, 2002b; Posnien and Bucher, 2010)。さらに *Tribolium* 属の機能解析では、*labial* ノックダウン個体で上唇原基に影響がないことが示されている (Posnien and Bucher, 2010)。昆虫の頭部形成の fate map が発表され、必ずしも上唇は間挿節のみで形成されるわけではないとの提唱もある (Posnien *et al.*, 2010)。これらの報告より仮説は否定された。しかし、多足類 *Lithobius atkinsoni* では *labial* の上唇原基における発現が確認されており (Hughes and Kaufman, 2002b)、本研究のカイコの発現結果と一致する。したがって、これらのグループごとに *labial* の機能が変化している可能性は捨てきれない。



カイコ胚のステージ 20 において興味深いポイントが、尾部原基(anal proleg rudiment)における *labial* の発現である(Fig. 2.5, dark red arrow heads)。これまでの節足動物 *labial* の発現解析において、前後軸の posterior 側の末端に発現が観測された例はない。最近の研究で、*Hox* 遺伝子が体節形成だけにとどまらず、複数の機能を持つ例が報告されている。例えば、カイコの *Antenapedia* は中部絹糸腺において *sericin-1* 遺伝子発現の活性化に働くことが示された(Kimoto *et al.*, 2014; Tsubota *et al.*, 2016)。さらに、エンマコガネの前胸の角が、翅を形成する *Hox* 遺伝子である *Sex combs reduced (Scr)* の制御を受けることが実証された(Hu *et al.*, 2019)。本研究で検出されたカイコ *labial* の尾部原基における発現も、他の昆虫には無い特殊な役割を持っているのかもしれない。

本研究では、*labial* の塩基配列全長をチョウ目昆虫で初めて報告した。RACE により獲得された配列情報は、KWMTBOMO03695 と KWMTBOMO03696 を内包していた。これらは GeneModel では 2 つに分かれているが、本研究より、1 つの遺伝子である可能性がかなりの確度をもって示めされた。本解析結果は、チョウ目昆虫の *labial* のさらなる役割を解析する際の遺伝子基盤として役立つだろう。

本研究の手法では、反転期(ステージ 21)以降の胚で非特異的なシグナルが多数表れるため、検出が困難であった。また、ステージ 15 以前は解剖が困難かつシグナルの検出も困難であった。今後ステージ 16-20 以外の胚の解析を行う場合、*labial* タンパクの抗体の作製などでブレイクスルーを図る必要があるだろう。

本研究でカイコが *labial* の胚発生時期における *Hox* 遺伝子様の発現を維持していることが明らかとなった。しかしながら、その機能解析には至っていない。筆者はカイコ *labial* の RNAi によるノックダウン実験を試みたが、dsRNA インジェクション卵が胚発生できずにほぼ全て死滅してしまうことから、結果を得ることができなかった(data not shown)。 *labial* 発現領域に注目した機能解析については、今後の課題としたい。

## 第2節 オオモンシロチョウにおける *labial* 遺伝子マッピング

*Hox* 遺伝子群は、染色体上の遺伝子配置が節足動物から哺乳類まで広く共通し、クラスターリングされている例が多数報告されている(cf. Lemons and McGinnis, 2006; Wolpert, 2011; Di *et al.*, 2015; Pascual-Anaya *et al.*, 2018 など)。また、ほとんどの種で染色体上の遺伝子配置と胚での発現パターンに空間的共線性が確認される一方で、棘皮動物門のウニ、扁形動物門の Manson 住血吸虫、日本住血吸虫、脊索動物門のホヤ等では *Hox* 遺伝子の大規模な再編が生じており、これらの生物が特異な形態をもつ要因であると考えられている(Ikuta *et al.*, 2004; Pierce *et al.*, 2005; Cameron *et al.*, 2006; Gu *et al.*, 2012)。

BAC-FISH マッピングによる先行研究より、オオモンシロチョウとモンシロチョウがカイコと大きく異なる染色体構造を持つことが示唆された(内藤, 2009; 福田, 2014; 大野, 2017)。*labial* を除いたカイコの *Hox* 遺伝子は、第6染色体に約 1.5 Mb のクラスターを形成するが、これは他昆虫種よりも広い(Pace *et al.*, 2016)。加えて *labial* は、そこからさらに 10 Mb 弱もの距離がある。このことから、染色体構造がカイコと大きく異なるオオモンシロチョウでは、*Hox* 遺伝子群が同一染色体上に座乗する理由がない場合、いずれかの *Hox* 遺伝子が別染色体に転座している可能性が考えられた。

本節では、オオモンシロチョウの *Hox* 遺伝子を内包する BAC を新規にセレクションし、BAC-FISH マッピングをすることで、*Hox* 遺伝子である *labial*, *pb*, *abdA* について、染色体上の座乗位置を特定した。

### 材料および方法

#### 1. 供試昆虫

本研究に用いたオオモンシロチョウ(*Pieris brassicae*)は、2007年に北海道大学にて卵塊あるいは初齢幼虫を採集し、飼育した個体を用いた。食草にはキャベツ(*Brassica oleracea* var. *capitata*)およびブロッコリー(*B. oleracea* var. *italica*)を用いた。

#### 2. 染色体標本作製

シロチョウ科昆虫は、染色体標本の作製方法と作製時期がほぼ共通している。雄は終齢2日目、雌は糸座を形成して体を固定し、胴回りに糸を掛けた蛹化直前の時期が最適であるため、その前後の時期を選択して用いた。スジコナマダラメイガ(*Equestia kuehniella*)生理食塩水(Table 2.18)中において、各昆虫体腔内より精巣または卵巣を摘出し、低張液(75 mM KCl)中で、精巣は 20 分強、卵巣は 20 分弱それぞれ低張処理を行った。次にカルノア液(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。生殖巣を摘出した個体は、-20°C で冷凍保存した。固定した細胞は、Traut (1976)の方法を改変して 60%酢酸中で溶解させな

から 42°C の Heating plate (HP-4530, アズワン, 大阪)上に置いたスライドガラス(1-6724-01, 武藤化学, 東京)に広げ、風乾法により染色体標本を作製した。スライドガラス一枚につき、精巣の場合は精包 2 つずつ、卵巢の場合は卵管 4 本ずつを標本作製に用いた。スライドガラスは前処理として 100% EtOH に HCl を 1%した溶液に常温で 30 分以上浸け置き、キムワイプで水滴を拭き取り、乾燥させた。染色体標本は 70%、80%、100%エタノールの順に洗浄を行い、風乾後に-20°C にて使用まで保管した。

### 3. ゲノム DNA 抽出および精製とコンペティター作製

ゲノム DNA の抽出は、Blin and Stafford (1976)に準じて、蛹もしくは終齢幼虫を用いて行った。昆虫体の磨砕は、滅菌済の乳棒と乳鉢、あるいはビーズクラッシャー  $\mu$ T-12 (TAITEC, 越谷)と YTZ®ボール  $\Phi$ 1.5 (ニッカトー, 堺)を用いて行った。昆虫体 1 g あたり 10-20 ml の Lysis buffer (Table 2.19)に溶解し、20 mg/ml の Proteinase K (39450-01-6, 富士フイルム和光純薬)を終濃度 200  $\mu$ g/ml となるよう加えた。それを 37°C の HYBRIDIZATION INCUBATER HB-80 (TAITEC)に入れた mini チューブローテーター(Fisher Scientific)にて一晩攪拌した。

ゲノムの精製は、フェノールクロロホルム抽出法により行った。つまり、Lysis buffer と等量の TE 飽和フェノールを加えて室温で 30 分間転倒混合後、室温で遠心(5000 rpm, 15 min)し、上清を新しいチューブに回収した。上清と等量の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)を加えて室温で 15 分間転倒混合し、混合液を室温で遠心(5,000 rpm, 15 min)した後、上清を新しいチューブに回収した。上清と等量のイソアミルアルコール入りクロロホルムを加えて、室温で 15 分間転倒混合し、混合液を室温で遠心(5,000 rpm, 15 min)した後、上清を新しいチューブに回収した。0.1 倍量の 3 M 酢酸ナトリウムを加え、攪拌した。0.7 倍量のイソプロパノールを加えて転倒混合後、遠心(14,000 rpm, 10 min, 4°C)により沈殿を得た。上清を除去し、70%エタノールを加えてリンスを行った。エタノールを完全に除去した genomic DNA (gDNA)を 1×TE に溶解した。10 mg/ml の RNase A (R5503, SIGMA)を終濃度 10  $\mu$ g/ml となるように加え転倒混合し、37°C インキュベーターで 2 時間放置した。さらに Proteinase K (39450-01-6, 富士フイルム和光純薬)を終濃度 200  $\mu$ g/ml となるよう加え、37°C インキュベーターで 2 時間放置した。その後、上記のフェノール、フェノールクロロホルム、イソアミルアルコール入りクロロホルムの処理をもう一度行った。処理を終えたサンプルに 0.1 倍量の 3 M 酢酸ナトリウムを加え、攪拌した。100%エタノールを 2.5 倍量加えて転倒混合後、遠心(14,000 rpm, 10 min, 4°C)により沈殿を得た。上清を除去し、70%エタノールを加えてリンスを行った。エタノールを完全に除去した gDNA を任意の分量の 1×TE に溶解し、-20°C で冷凍保存した。

コンペティターは、上記により抽出した gDNA を超音波破碎装置 VP-15S (TAITEC)によりソニケートして作製した。Duty cycle 60%, Tune 5.0 にセットし、2~3 秒間破碎後、1 分氷冷した。これを 2~3 セット行い、DNA 断片が 500 bp-1 kb 程度になるように調整した。コンペティターのサイズ評価は、電気泳動によって行った。調整したコンペティターは-20°C

で冷凍保存した。

#### 4. プライマーの設計

カイコ *Hox* 遺伝子オルソログをもったオオモンシロチョウ BAC をスクリーニングするために、Single-tagged site (STS) プライマーを設計した。設計に用いた遺伝子は *labial (lab)*、*proboscipedia (pb)*、*abdominal-A (abdA)* の 3 つである。Old gene models (2008) の当該遺伝子配列を、Lepbase v1 のエゾスジグロシロチョウ (*Pieris napi*) の CDS データに tblastx 検索を行い、オルソログを決定した。得られたカイコとエゾスジグロシロチョウの配列データを DNA Data Bank of Japan (DDBJ) の ClusterW (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>) で比較し、2 種間で保存性の高い 20 塩基前後のプライマー候補配列を複数ピックアップした。得られた配列を KAIKObase (<http://sgp.dna.affrc.go.jp/KAIKObase/>) および Lepbase (<http://lepbase.org/>) による blastn 検索および NCBI の Primer BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) による検索を行い、特異的な配列であると認められたものをプライマーとして用いた。

#### 5. サンガーシーケンシング

PCR 産物を Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) によりゲル抽出を行って調整した。PCR に用いたプライマーと DNA (100 ng) を調整し、ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer により配列決定した。得られた .abi ファイルはフリーソフト Chromas (<http://technelysium.com.au/wp/chromas/>) を用いて解析を行った。結果から、KAIKObase による BLAST 解析によりカイコ *Hox* 遺伝子オルソログであることを確認した。さらに NCBI の ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) を用いて、これら PCR 産物がいずれかの読み枠において正常に翻訳されるかどうかを確かめた。

#### 6. BAC スクリーニング

オオモンシロチョウ BAC のスクリーニングは、内藤 (2009) にて作製済の BAC-DNA プール(プレートプール、x プール、y プール)を用いて、Yasukochi (2002) と Yoshido *et al.* (2014) に準じた 2 段階スクリーニングで行った。実際のスクリーニングは農研機構 安河内祐二博士に依頼した。

#### 7. BAC-DNA の抽出・精製

目的の BAC クローンを 10 µg/ml クロラムフェニコール入り LB 培地 (Table 2.20) 2 ml に植菌し、Bio Shaker BR-23FH (TAITEC) を用いて 37°C で 2-5 時間振盪培養後、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 にスケールアップし、37°C で 14~18 時間振盪培養を行った。菌体を遠心分離 (6,000 rpm, 10 min, 4°C) することで集菌し、QIAGEN Plasmid Midi Kit (12245, QIAGEN K.K., 東京) のプロトコルを一部改変し BAC-DNA を抽出・精製した。

菌体を 4 ml の RNaseA 入り P1 buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA (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た。4 ml の P3 buffer (3M 酢酸カリウム (pH 5.5)) 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。遠心機は H9-R (KOKUSAN) を使用した。4 ml の QBT buffer (Table 2.21) 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 2.22) でカラムを 2 回洗浄後、68°C に温めた QF buffer (Table 2.23) 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 3M 酢酸ナトリウムと 0.7 倍量のイソプロパノールを加え、混合した上で遠心 (10,000 rpm, 30 min, 4°C) を行い、上清を捨てた。70% エタノールを 5 ml 加えリンスして遠心 (10,000 rpm, 15 min, 4°C) 後、上清を完全に除去し、400 µl の TE に溶解させた。この DNA 溶液を 1.5 ml エッペンドルフチューブに移し、0.1 倍量の 3M 酢酸ナトリウムと 2.5 倍量の 100% エタノールを加え、4°C で 10 分間、14,000 rpm で遠心を行った。上清を除去後、70% エタノールを 1 ml 加えリンス後、4°C で 2 分間、14,000 rpm で遠心を行った。上清を完全に除去し、20-120 µl の TE に溶解して Quantus FLUOROMETER (Promega) により DNA 量を測定した後、プローブ作製に用いた。BAC-DNA サンプルは、使用するまで -20°C で保存した。

## 8. Nick Translation による DNA のダイレクト標識

プローブとする BAC-DNA を、*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) を用いたダイレクトラベルで行った。これら dUTP は、Table 2.24 に示したように調整して用いた。

Enzyme Mix の自作は、以下の通り行った。RNase free Recombinant DNase I (5 U/µl, 2130A, TaKaRa) を DNase I dilution buffer (Table 2.25) に氷上で穏やかに混合し、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 2.26) と穏やかに 5-10 回ピペティング混合し、Enzyme Mix とした (Table 2.27)。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 2.28) でラベリングを行った。dNTP は normal (Table 2.24) 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。

## 9. FISH (fluorescence *in situ* hybridization)

### 1) 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% エタノールにそれぞれ 30 秒通して完全に風乾させた。Denature buffer (Table 2.29) 200 µl をアプラインし、24 プライ

mm のカバーガラス(24501, MATSUNAMI, 岸和田)を被せて 72°C の Heating plate (HP-4530, アズワン)上で 3.5 分間、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はずし、コプリンジャーに入れた-20°C の 70%エタノールに浸けて急冷した。常温の 80%、100% EtOH に 30 秒ずつ通して完全に風乾した。

## 2) 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, St. Louis, MI,US)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%エタノールを加え、遠心(14,000 rpm, 10 min, 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%エタノールを 200 µl 加えリンスして、遠心(14,000 rpm, 10 min, 4°C)後、上清を完全に除去した。5 µl のホルムアミド(F7503, SIGMA-ALDRICH)を加え、Micro Mixer E-36 (TAITEC)を用いて室温で振盪懸濁した。ペレットの溶解を確認後、5 µl の 20% dextran sulfate (SIGMA-ALDRICH)を加え、Micro Mixer E-36 (TAITEC)を用いて室温で振盪混合した。このプローブ溶液を 90°C で 5 分間処理して熱変性させ、水中にて急冷した。

## 3) Hybridization

変性させたプレパラートにプローブ溶液 10 µl をアプライし、24×50 mm のカバーガラス(C024321, MATSUNAMI)を被せた。カバーガラスの周囲をペーパーボンド(KOKUYO, 大阪)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 2.30)。

## 4) 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、1 µg/ml の DAPI 含有 Anti-fade (Table 2.31)をスライドにアプライした。24×32 mm のカバーガラスを被せてキムタオルを被せて強く押すことで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。

## 5) リプローブ

リプローブは Shibata *et al.* (2009)のチョウ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、プレパラートの処理と染色体の変性を、上記の通りに行った。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)で 3-10 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。その後 2×SSCで リンスを行った後、プレパラートの処理と染色体の変性を、上記の通りに行った。

#### 6) 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, Wetzlar, Germany)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ため、本研究の一部の画像では Red のシグナルが N3 フィルターで通過することで Orange にリークしている場合があった。

Table 2.18 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 <sub>3</sub> (和光純薬 031-00435)	0.2 g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O (和光純薬 031-00435)	0.33 g
distilled water	1 L

Table 2.19 Composition of lysis buffer

1M Tris-HCl (pH 8.0) (和光純薬 207-06275)	1 ml
0.5M EDTA (pH 8.0) (DOJINDO 345-01865)	2 ml
10%SDS (和光純薬 199-07141)	5 ml
adjust the volume to 50 ml with distilled water	

Table 2.20 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 1,000 ml with distilled water and autoclave	
add 0.5 ml of chloramphenicol solution (20 mg/ml) below at 60°C and keep at 4°C use.	
(for Glycerol stock: add 80 ml Glycerol)	

Table 2.21 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 2.22 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 2.23 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 2.24 Composition of dNTP Mix

10×dNTP Mix for labelling (normal)		
2.5mM dATP	50 µl	
2.5mM dCTP	50 µl	
2.5mM dGTP	50 µl	
2.5mM dTTP	34 µl	
fluorochrome-dUTP	40 µl	
		adjust the volume to 500 µl with distilled water

Table 2.25 Composition of DNase I dilution buffer

1.0M Tris (pH 7.5) (和光純薬 207-06275)	2 ml	
5.0M NaCl (和光純薬 191-01665)	1 ml	
10mM CaCl <sub>2</sub> (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 2.26 Composition of Enzyme Mix buffer

Glycerol (和光純薬 075-00616)	5 ml
1M Tris (pH 7.5) (和光純薬 207-06275)	500 $\mu$ l
1M MgCl <sub>2</sub> (和光純薬 135-00165)	100 $\mu$ l
1mM DTT (Roche 604927)	1 ml
BSA (5.0 mg/ml) (TaKaRa 1600)	1 ml
Distilled water	280 $\mu$ l

Table 2.27 Composition of Enzyme Mix

DNase I (0.5 U/ $\mu$ l) (TaKaRa 2270A)	1.2 $\mu$ l
DNA polymerase I (5.0 U/ $\mu$ l) (TaKaRa 2130A)	20 $\mu$ l
Enzyme Mix buffer (Table 2.26)	78.8 $\mu$ l

Table 2.28 Composition of labeling reaction for own dispensed enzyme mix

Direct labeling (self-supplied)	
Template DNA	500 ng
dNTP mix (Table 2.24)	2.5 $\mu$ l
10 $\times$ Nick Translation buffer	2.5 $\mu$ l
Enzyme Mix (Table 2.27)	2.5 $\mu$ l
adjust the volume to 25 $\mu$ l with distilled water	

Table 2.29 Composition of denature buffer

formamide (和光純薬 068-00426)	140 $\mu$ l
20 $\times$ SSC (Table 2.30)	20 $\mu$ l
distilled water	40 $\mu$ l

Table 2.30 Composition of 20 $\times$ SSC (pH 7.0)

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 1,000 ml with distilled water	

Table 2.31 Composition of Anti-fade with DAPI

---

DABCO (SIGMA D2522-25G)	0.233 g
1M Tris (pH8.0) (和光純薬 207-06275)	200 $\mu$ l
distilled water	800 $\mu$ l
DAPI (1.0 mg/ml) (SIGMA D9542)	10 $\mu$ l
Glycerol (和光純薬 075-00616)	9 ml

---

## 結果

スクリーニングに用いたオオモンシロチョウ *labial*, *pb*, *abdA* のプライマーは、エゾスジグロシロチョウ(Lerpbase v1)とカイコ(KAIKObase)の配列情報より保存性の高い配列を選び設計した(Table 2.32)。PCR 産物のシーケンスにより、カイコの各遺伝子のオルソログが間違いなく増幅されていることを確認した(Fig. 2.6)。BAC スクリーニングの結果、*labial* を含む BAC として 23O16 と 08L14、*pb* を持つ 08N03、*abdA* を持つ 05M20 が選抜された。これらを用いた BAC-FISH マッピングをオオモンシロチョウ染色体に行った結果、08N03 (*pb*)と 05M20 (*abdA*)は同一染色体上の近傍に、*labial* を含む 2 BACs は別染色体の中央寄りにシグナルが認められた(Fig. 2.7)。先行研究(内藤, 2009)で得られた BAC マーカーを用いて、本節で得られた BAC の座乗染色体を確認した所、08N03 と 05M20 がオオモンシロチョウ第 4 染色体、23O16 と 08L14 が第 9 染色体に座乗することが確認された(Fig. 2.8)。

## 考察

本節では、*Hox* 遺伝子を含むオオモンシロチョウ 4 BACs を用いた BAC-FISH により、それらの染色体座乗位置を明らかにした(Figs. 2.7, 2.8)。*labial* を除いた *Hox* クラスターの最も端に座乗する *pb* と、反対側の端から 2 番目に座乗する *abdA* を含む BAC シグナルが近傍に認められた(Fig. 2.7)ことから、オオモンシロチョウでも *Hox* クラスターに大きな変化は生じていないことが示唆された。一方で、オオモンシロチョウ *labial* を含む 2 BACs は別染色体上に座乗していた。このような例は、扁形動物門のマンソン住血吸虫、日本住血吸虫、脊索動物門のホヤ等で確認されている(Ikuta *et al.*, 2004; Pierce *et al.*, 2005; Gu *et al.*, 2012)。また、同じ節足動物のウミグモの一種(*Nymphon gracile*)では、*Hox* 遺伝子が複数消失している例が報告されているが(Manuel *et al.*, 2006)、節足動物において *Hox* 遺伝子群が部分的に別染色体に転座している例は、本研究が初の報告となる。近年、エゾスジグロシロチョウの染色体レベルのゲノム情報が公開された(Hill *et al.*, 2019)。*labial*, *pb*, *abdA* についてエゾスジグロシロチョウのゲノム情報を調べると、エゾスジグロシロチョウでも同様に *labial* のみが別の染色体にマップされ、本研究結果の信憑性を裏付ける。

キイロショウジョウバエでは、*Hox* 遺伝子群は *Antennapedia complex* (ANT-C)と *bithorax complex* (BX-C)の 2 つに分かれ、間に約 10 Mb の距離がある(Pace *et al.*, 2016)。キイロショウジョウバエは ANT-C の *Antennapedia* と BX-C の *abdA* と *AbdB* が、核内で Polycomb group proteins により共局在されることにより、不必要な時期における発現を抑制されているという報告がある(Bantignie *et al.*, 2011)。カイコならびにオオモンシロチョウの *labial* についても、同様に核内で他の *Hox* 遺伝子との共局在が確認できるかもしれない。

第 1 節の実験結果より、チョウ目昆虫でも *labial* の発現が維持されていることが示唆され

たが、別染色体に転座しているオオモンシロチョウでもそれが維持されているかどうかは疑問が残る。先行研究より、モンシロチョウの胚発生ステージは詳細に記録されているため(田中, 1968)、WISH の手法を確立できれば、カイコ同様に発現解析を進められるだろう。

>partial sequence of *Pieris brassicae labial*

GTGTA CTTCN GGAN CNA CTATTANACCTTCTTTNATCCGTTTCTN TTGTTTCATT CGTCG  
ATTTTGAANCCAGATCTNGACTTGCGTCTCATTCAATTGCAGAGCGGATGCTATTTCTAT  
CCTTCTCGCCCGTGTGAGGTATTTGTTGAAGTGGAATTCCTTTTCCAGTTCTGTAAGCT  
GTTTGTGGNGAAGNTAGTTCTGCCAGTGGTGTTCNAATTGAGGATGGTGNTNAGNAA  
NTGATTGANNAAGGNTNNNAGNGTCNCCCCG

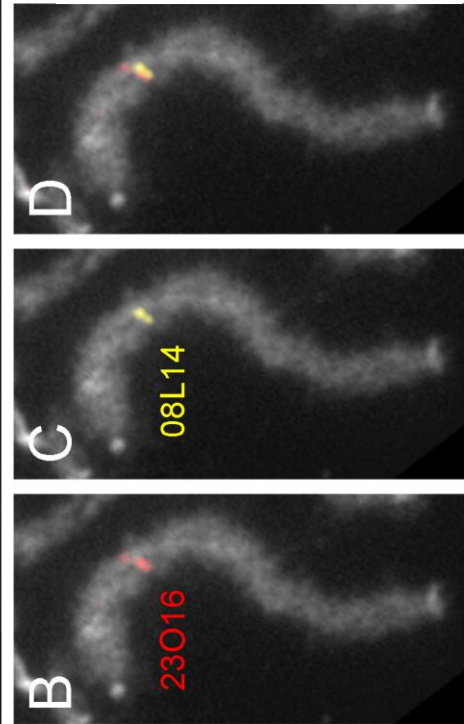
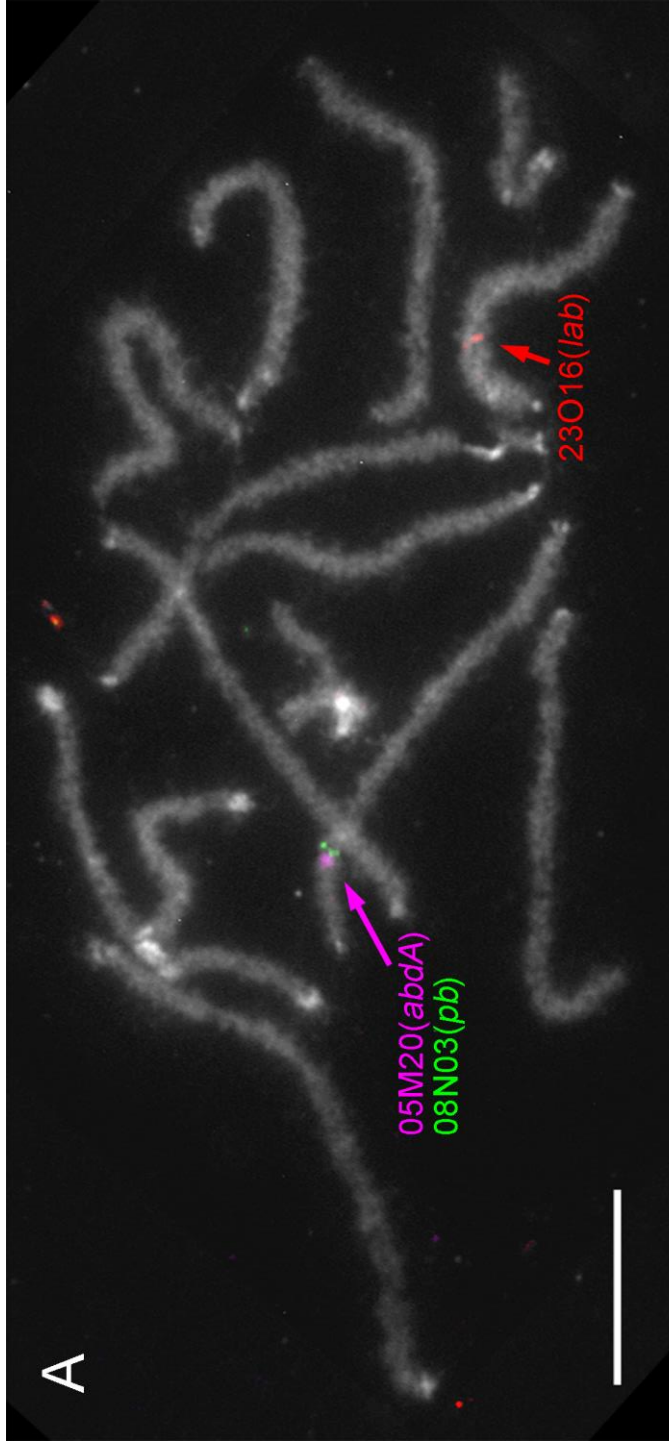
>partial sequence of *Pieris brassicae proboscipedia*

TGGGCTGANTGGCATGGCGGGCCTGACAGATGGTGGAAAGTTTTTCATCTGTGAACCT  
GACACCATCATCAACACCCGGCACACCGTCTAGTATGCATCAAAGTCCCCTTGGACAC  
TATCCAAGACCTTCGCCACCAAACGTTCCACCCGGACCTCCTCACCAATCGGTTCCAA  
ATGCTCTTCCACCCTACGTAATCAGAGGCAATGCACCTCCAGGCCAGTTTCTACCACAT  
CCTGATTCNNNATGGACA

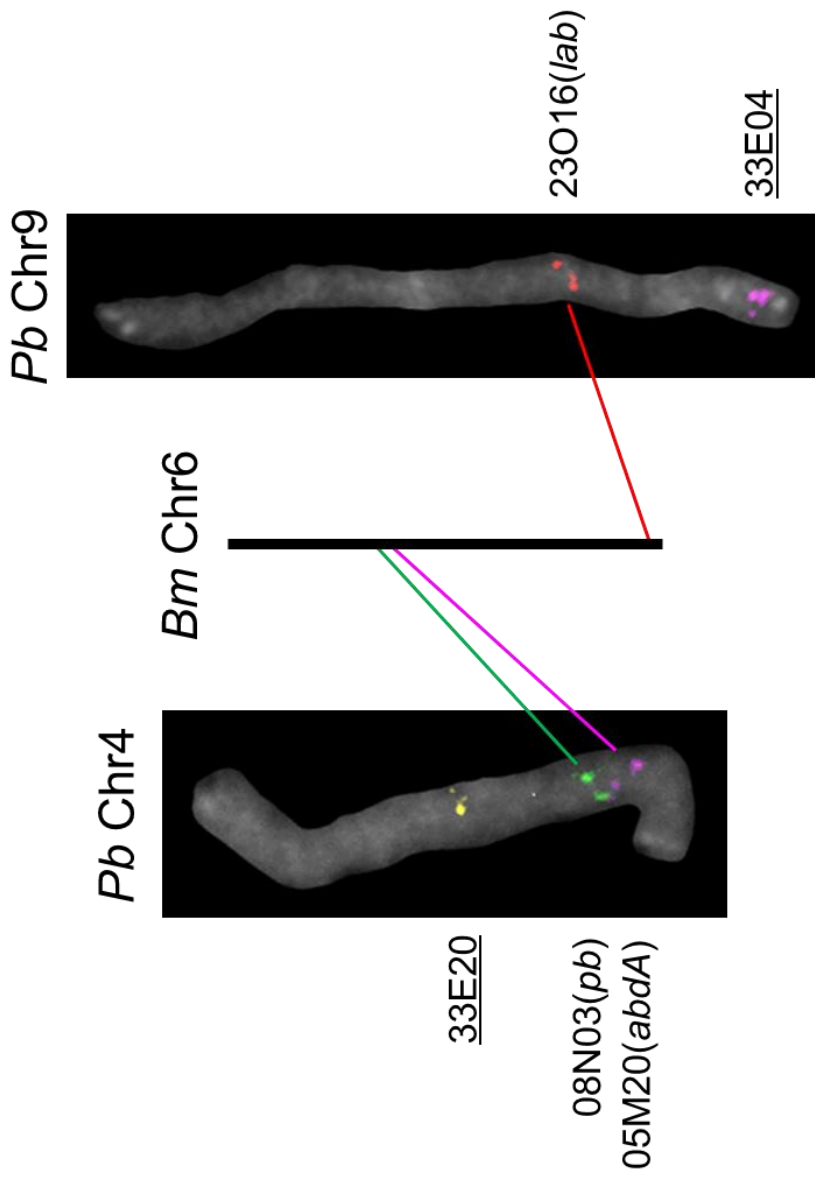
>partial sequence of *Pieris brassicae abdominal-A*

CCTTATTCAC TTTGAGGATATCTCCGCCCTTGTGCGATGGGCATTTTCATGGGATCGTGAT  
GGTGTGTCACGTGGTGACCGTGGTGCTGACTCTCCA ACTTGGCCTGTTTCTCTTGCTG  
TTGCTGTTTCATCCTATCCTGCTCCTCTCGTTCTCTGCGAGCCTGCTCGTTTATTTCTTT  
CACCGCTCTCAATTCTTTCTTTAGTTTCATTCTGTCGATTCTGAAACCATATTTTTATTTGC  
CTCTCTGTGAGG

**Figure 2.6** PCR amplified sequence data in *Pieris brassicae*.



**Figure 2.7** BAC-FISH mapping of *Pieris brassicae* Hox genes  
 (A) BAC-FISH for *P. brassicae* pachytene chromosomes (n=15) used 05M20 (*abd-A*, magenta), 08N03 (*pb*, green) and 23O16 (*labial*, red) probes. A white bar represents 10  $\mu$ m. (B-C) A pachytene bivalent in which 23O16 (B, red signal) and 08L14 (C, yellow signal) probes hybridized. These BACs carry *P. brassicae labial* gene. (D) Superposed image of 23O16 and 08L14 signals on a bivalent. The signals look duplicated.



**Figure 2.8** Comparison of *Hox* gene locations between *Pieris brassicae* and *Bombyx mori*. Black bar represents *B. mori* Chr6 (*Bm* Chr6). 33E20 and 33E04 (Underlined) are marker BACs for *P. brassicae* chromosome 4 (*Pb* Chr4) and 9 (*Pb* Chr9) respectively. *pb*, *proboscipedia*; *abdA*, *abdominal A*; *lab*, *labial*



Table 2.32 *Pieris brassicae* STS primers of *Hox* genes

gene name	STS primer		size (bp)
	Forward	Reverse	
<i>lab</i>	CGGCTGTTTTTCATTAGAGCC	CTGATGATACCT <u>ICCGGCGGA</u>	365
<i>pb</i>	TCT <u>CTGG</u> ACGCCGTTGGTTG	GTCCATACGGAAATC <u>AGGATG</u>	297
<i>abdA</i>	AGT <u>ATCAGTCAGGATTTG</u> CTA	GCACACGCGCT <u>CTGCCTCAC</u>	311

Underlined nucleotides are different from those of *Bombyx mori*.

### 第3節 オオモンシロチョウの BAC-FISH マッピング比較

オオモンシロチョウ(*Pieris brassicae*) (n=15)の BAC-FISH マッピング結果は、シロチョウ科の染色体比較による細胞遺伝学的な進化研究を、種数を増やして多岐にわたるクレードを進めていく上で、比較対照として重要な位置を占める。オオモンシロチョウの染色体研究は、私たちの研究室で続けられているが(内藤, 2009; 福田, 2014; 大野, 2017)、先行研究の染色体マッピングに一部不正確もしくは間違いが認められ、再精査が必要であると判明した。

エゾスジグロシロチョウ(*P. napi*)とモンシロチョウ(*P. rapae*)の *Pieris* 属 2 種は、ともに染色体数 n=25 をもつ。両種は、ゲノム配列解析が行われており(Nallu *et al.*, 2018; Hill *et al.*, 2019)、両者は染色体対応関係の存在が示唆されている(Hill *et al.*, 2019)。また、オオモンシロチョウとモンシロチョウの 2 種は BAC-FISH 解析が行われている(内藤, 2009; 大野, 2017)。オオモンシロチョウは染色体数 n=15 であり、長い 10 染色体はモンシロチョウの 2 本ずつ合計 20 染色体と対応すること、性染色体を含む短い 5 染色体はモンシロチョウの 1 本ずつ合計 5 染色体と対応することが、FISH 結果より示唆されている。

本節では、先行研究でスクリーニングされた BAC-DNA をプローブとして、改めてオオモンシロチョウ染色体の BAC-FISH マッピングを行った。加えて、それらオオモンシロチョウプローブをモンシロチョウ染色体にクロスハイブリダイゼーションし、オオモンシロチョウ染色体との比較をおこなった。本研究の再精査により、内藤 (2009)ならびに大野 (2017)の結果のうち、モンシロチョウ染色体のオオモンシロチョウ染色体との対応関係が部分的に不明あるいは不正確であると判明した。そこでオオモンシロチョウ染色体がモンシロチョウならびにエゾスジグロシロチョウ染色体と融合・切断の関係にあるとの推定(内藤, 2009)とエゾスジグロシロチョウゲノムデータ blast 解析サイト(<http://blast.lepbase.org/>)を利用して、対応関係が未特定の染色体に座乗する BAC を新規に特定した。

#### 材料および方法

##### 1. 供試昆虫

本研究に用いたオオモンシロチョウ(*Pieris brassicae*)は、2007 年と 2016 年に北海道大学にて卵塊あるいは初齢幼虫を採集し、飼育した個体を用いた。モンシロチョウ(*Pieris rapae*)は、2007 年と 2015 年に北海道大学と岩手大学でそれぞれ採集、飼育した個体を用いた。双方の種とも、食草にはキャベツ(*Brassica oleracea* var. *capitata*)およびブロッコリー(*B. oleracea* var. *italica*)を用いた。

##### 2. 染色体標本作製

どちらの種についても、第 II 章第 2 節に記載した方法に従い、染色体標本作製した。

### 3. ゲノム DNA 抽出、精製ならびにコンペティター作製

どちらの種についても、第 II 章第 2 節に記載した方法に従い、ゲノム DNA 抽出、精製ならびにコンペティター作製を行った。

### 4. オオモンシロチョウ BAC ライブラリー

第 II 章第 2 節に記載したオオモンシロチョウ BAC ライブラリーを使用した。

### 5. セレクション済みの BAC クローンの再選抜

内藤 (2009)の先行研究により、47 オオモンシロチョウ BAC クローンが DOP-PCR スクリーニングされている。PCR 産物の配列データをクエリーにしたカイコ *New Bombyx mori gene models* (2017)に対する tblastx による再解析ならびに先行研究の FISH マッピング画像の再解析により利用可能と判断した 35 BAC クローンを本研究では用いた(Table 2.33)。これには、*pierisin* を含む 09I07 も含まれる。また、FISH マッピング結果をベースにした BAC セレクション法(福田, 2014; 大野, 2017)により選抜されている 40 BAC クローンも用いた(Table 2.34 参照)。NOR 領域にペインティングシグナルを生じる 01A06 (福田, 2014)も使用した。これら Table 2.33, 2.34 にまとめられた全ての BAC ならびに 01A06 は、Ohno *et al.* (2020a)に論文として公表済みである。さらに内在する遺伝子配列は不明なものの、オオモンシロチョウと第 1 と第 10 染色体にマップされる 02G02 と 01D07 も使用した。

### 6. BAC-DNA の抽出・精製

第 II 章第 2 節に記載した方法に従い、BAC-DNA の抽出・精製を行った。

### 7. Nick Translation による DNA のダイレクト標識

第 II 章第 2 節に記載の自作 Nick translation enzyme mix と方法に従って、BAC-DNA のラベリングを行い、FISH プローブを作製した。

### 8. FISH (fluorescence *in situ* hybridization)

第 II 章第 2 節に記述した方法に従って行った。プローブとして用いた BAC クローンと標識に用いた dye は、Table 2.35 と Table 2.36 に示した。Table 2.35 には後述する 04I10, 17C23, 16B01, 08K20, 04I09, 17D07, 13B05, 04B14 の 8 BAC プローブ情報も含まれる。

オオモンシロチョウの染色体番号は大野 (2017)に従った。モンシロチョウの染色体番号は Hill *et al.* (2019)のエゾスジグロシロチョウの Scaffold Chromosome number を参考に、改めてナンバリングした。

### 9. 新規プライマーの設計

モンシロチョウの染色体マッピングに使われた BAC について、それぞれに含まれる配列

をエゾスジグロシロチョウ (*P. napi*) のゲノムデータ (Hill *et al.*, 2019) と比較し、エゾスジグロシロチョウオルソログを特定した。それら遺伝子の座乗染色体から推定される上記 81 BAC クローン (Tables 2.33, 2.34) の未対応染色体を調べた。その結果、エゾスジグロシロチョウ Chr15 (*Pn* Chr15) と *Pn* Chr25 上の遺伝子オルソログを含むオオモンシロチョウ BAC クローンが選抜されていなかった。さらに、マッピング結果の再精査を行う上で *Pn* Chr3, 6, 13, 22 の BAC クローンの選抜が必要となった。そこで、これら 6 染色体より Gene model を任意に選択し、SilkBase (<http://silkbases.ab.a.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/index.cgi>) で tblastx 検索を行うことでオルソログを決定した。Primer BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) により 20 塩基前後のプライマー候補配列を複数ピックアップした。さらに Lepbase (<http://lepbase.org/>) のシロチョウ科昆虫 2 種 (モンシロチョウ、ワタリオオキチョウ) に対して blastn 検索を行い、特に保存性の高かったプライマーを各染色体から 2 ペアずつ計 19 プライマーペアを設計した (Table 2.37)。シロチョウ科 3 種の間でプライマーの設計位置に一塩基多型があった場合 (Table 2.37 の赤字の塩基配列)、モンシロチョウの塩基配列に従って設計した。モンシロチョウのプライマーの設計位置に N が存在した場合、エゾスジグロシロチョウの配列に従った (Table 2.37 の青字の塩基配列)。

## 10. BAC スクリーニング

内藤 (2009) が作製したオオモンシロチョウ BAC-DNA プール (プレート、x ならびに y プール) を用いて、Yasukochi (2002) と Yoshido *et al.* (2014) に準じた 3 段階スクリーニングで行った。はじめにプレートプールの PCR を行い、想定長のバンドが得られるプレート候補を絞った。次に x プール 16 行と y プール 24 列それぞれの PCR を行い、該当する BAC クローンを特定した。PCR のポジティブコントロールとしてオオモンシロチョウ gDNA をテンプレートに用い、増幅産物のサイズ比較を行った。最後に、クロラムフェニコール (10 µg/ml) 入り LB 寒天培地に展開したシングルコロニーに対してコロニー PCR を行い、目的の配列を含むシングル BAC クローンを得た。PCR 条件は、94°C 5 分、次に 94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 1 分を 40 サイクル、最後に 72°C 5 分として行った。PCR 溶液組成は、Table 2.38 に記述した。ここで選抜された 11 BACs から、FISH により単一シグナルを示した 8 BAC クローンを BAC-FISH プローブとしてマッピングに用いた (Table 39, ラベリングについては Table 35 参照)。

## 11. モンシロチョウ第 13、第 15 染色体を標識するマーカーの選抜

オオモンシロチョウ第 1 染色体と第 10 染色体の標識として 03I04 と 27B21 クローンの FISH を行ったオオモンシロチョウ染色体標本を用いて、座乗染色体および内部配列の未解析の BAC-DNA のリプローブ FISH を行った。それぞれの染色体上にシングルシグナルが得られた BAC-DNA について、モンシロチョウ第 10 染色体 (03I04) と第 16 染色体 (27B21) を標識したモンシロチョウ染色体へのリプローブ FISH を行った。標識された染色体と別染色体

にシングルシグナルが得られたものを、それぞれモンシロチョウ第 13 ならびに第 15 染色体のマーカ―とした。これら 02G02 と 01D07 も BAC-FISH プロブとして用いた(ラベリングについては Table 35 参照)。

## 12. リプローブ FISH

第 II 章第 2 節材料および方法の 9. 5)に記載の方法を用いて、上記のリプローブ FISH を行った。

Table 2.33 Accession number, *Bombyx mori* orthologous gene ID and its chromosomal localities in selected *Pieris brassicae* BAC clones

<i>P. brassicae</i> BAC code	gene definition	<i>B. mori</i> chromosome*	KAIKObase		SilkBase	
			GeneID: BMgn	Location (bp)	GeneID: KWMTBOMO	Location (bp)
26C08	<i>apterous</i>	Z	002127	3,494,076..3,509,710	00112	3,557,391..3,583,260
28G13	<i>heparanase-like</i>	Z	000620	6,445,220..6,447,057	00186	5,963,213..5,965,045
02A12	<i>kettin</i>	Z	000622	6,513,219..6,533,895	00190	6,026,373..6,126,632
27J24	<i>Ftz-fl</i>	Z	000716	11,668,015..11,753,033	00379	11,253,049..11,269,571
35P07	<i>period</i>	Z	000485	12,956,618..13,004,501	00426	12,478,149..12,525,867
28B22	<i>invected</i>	2	009643	7,906,255..8,000,280	00936	6,796,671..6,813,722
19J07	<i>dopa decarboxylase</i>	4	015002	12,515,221..12,534,917	02052	11,088,955..11,095,686
33M14	<i>Ras1</i>	6	006257	15,827,185..15,829,388	03639	14,084,835..14,085,614
05K04	<i>kinease-like</i>	7	008726	14,943,270..14,947,140	04175	12,891,332..12,900,916
06M01	<i>heat shock cognate protein</i>	9	002381	17,631,867..17,634,517	05355	15,413,065..15,416,485
02B20	<i>laccase 2</i>	10	006744	4,778,344..4,841,719	05553	5,001,072..5,005,732
33P19	<i>NADPH cytochrome P450 reductase</i>	10	006836	8,644,971..8,675,152	05674	7,829,094..7,858,347
07O07	<i>ribosomal protein S15A</i>	10	006867	9,615,964..9,619,175	05723	8,805,486..8,808,995
03J08	<i>topoisomerase II</i>	11(29)	011615	8,587,969..8,605,185	06463	7,807,281..7,822,277
33E20	<i>Dmc1</i>	11(29)	011811	11,626,450..11,635,244	06575	10,821,577..10,827,641
07L23	<i>saposin-related</i>	12	010419	4,985,860..5,008,980	07114	4,811,656..4,853,351
35P21	<i>ribosomal protein L31</i>	13	000959	9,474,492..9,476,209	07888	9,182,960..9,184,684
33E04	<i>ribosomal protein L21</i>	13	001106	16,214,478..16,216,997	08100	15,952,645..15,955,376
02L08	<i>heat shock 70 kD protein cognate</i>	15	007950	1,589,150..1,592,670	08642	1,519,699..1,522,872
34B07	<i>nuclear receptor GRF</i>	15	007887	5,024,493..5,056,048	08778	5,035,387..5,035,928
33C09	<i>ribosomal protein P0</i>	15	003309	16,146,287..16,149,987	09300	15,448,144..15,451,870
35F09	<i>ribosomal protein P40</i>	17	007311	5,809,790..5,813,508	10248	5,809,820..5,813,560
27B21	<i>elongation factor 1 alpha-like</i>	18	008302	12,665,771..12,671,134	11083	12,385,248..12,390,846
19P22	<i>translation elongation factor 2</i>	19	004165	12,802,449..12,812,041	11731	12,844,940..12,854,223
29A13	<i>ribosomal protein S20</i>	20	009130	13,287,099..13,290,395	12287	11,518,093..11,521,394
14E22	<i>ribosomal protein S17</i>	21	001483	6,328,718..6,330,761	12460	4,417,937..4,418,422
19C02	<i>ribosomal protein S15</i>	21	001471	6,718,157..6,721,856	12483	4,792,546..4,796,242
35O12	<i>ribosomal protein L37</i>	22	000395	8,726,863..8,728,404	13074	7,963,772..7,965,583
04C04	<i>inhibitor of apoptosis protein</i>	23	011524	9,458,048..9,460,531	13749	8,300,555..8,307,800
03I04	<i>activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1</i>	23	011297	15,051,524..15,055,267	13922	13,682,392..13,686,507
34C07	<i>coatomer subunit gamma</i>	23(30)	011180	20,849,206..20,851,428	14157	19,481,013..19,485,149
29H01	<i>ADP/ATP translocase</i>	24	003829	15,066,749..15,069,434	14732	13,846,478..13,847,851
35L09	<i>silk gland factor-1</i>	25	005101	12,671,875..12,674,954	15391	11,258,153..11,259,291
05P24	<i>90-kDa heat shock protein</i>	27	004612	12,582,179..12,584,732	16087	8,749,005..8,751,393
09I07	<i>pierisin</i>	N**	N	N	N	N

\*: Number in parentheses indicate corresponded to chromosome numbers of Lepidopteran species that karyotype numbers are n = 31 (see Sahara et al., 2013)

\*\*: no data

Table 2.34 Summary of coding sequence (CDS) and its *Bombyx mori* orthologs in sequenced *Pieris brassicae* BAC clones

BAC code	DDBJ accession #	contig length (bp)	CDS	CDS position	KAIKObase		SilkBase	
					<i>Bm</i> homologues	Position	Gene ID: KWTBOMO	Position
01A01	AP017472	28,332	01A01_A	(-)1222..1536	BGIBMGA013196	Chr16:14875777..14878526 (+)	09977	Chr16:13822922..14001590 (+)
01A03	AP017473	89,645	01A03_A	(-)18341..25845	BGIBMGA008589	Chr18:16427100..16431508 (+)	11164	Chr18:15295883..15327483 (+)
			01A12_A	(+)438..6187	NM_001142971.1	Chr16:8470712..8491873 (-)	09747	Chr16:8666965..8691260 (-)
			01A12_B	(+)8581..10504	AK385537	Chr16:8463588..8465884 (-)	09746	Chr16:8662279..8663640 (-)
01A12	AP017474	96,972	01A12_C	(-)10585..12371	AK383543	Chr16:8459027..8463651 (+)	09745	Chr16:8656211..8661083 (+)
			01A12_D	(+)19051..24277	AK380962	Chr16:8444302..8452918 (-)	09744	Chr16:86444982..8650300 (-)
			01A12_E	(+)45480..48753	AK378418	Chr16:8414648..8419512 (-)	09742	Chr16:8615176..8618090 (-)
			01A12_F	(-)40395..83248	NM_001111350.1	Chr16:8367791..8444546 (+)	09741	Chr16:8565641..8566629 (+)
01A15	AP017475	45,950	01A15_A	(-)9..35959	BGIBMGA013297	Chr24:4045536..4115959 (-)	14371	Chr24:3781636..3810416 (-)
01A16	AP017476	19,524	01A16_A	(+)2035..17280	BGIBMGA011932	Chr11:6632586..6638275 (+)	06397	Chr11:6342531..6357766 (+)
	AP017477	3,115	01A20_A	(-)2473..2844	AK381205	Chr21:4331375..4347538 (+)	12436	Chr21:3355051..3370448 (+)
	AP017478	10,628	01A20_B	(-)9004..9261	BGIBMGA001412	Chr21:12124786..12125809 (-)	12647	Chr21:10205265..10207697 (-)
			01A20_C	(+)12346..13281	NM_001047016.1	Chr21:12161081..12163183 (+)	12650	Chr21:10272295..10273447 (+)
01A20	AP017479	14,294	01A20_D	(+)7568..10437	BGIBMGA001569	Chr21:12150812..12153519 (+)	12649	Chr21:10247605..10262372 (+)
			01A20_E	(+)4777..5697	BGIBMGA001568	Chr21:12133825..12137093 (+)	12649	Chr21:10247605..10262372 (+)
			01A22_A	(-)2144..7833	XM_012696208.1	Chr26:98732..107051 (+)	15469	Chr26:60746..121647 (+)
			01A22_B	(-)12229..27038	AK382920	Chr26:47505..92053 (+)	15469	Chr26:60746..121647 (+)
01A22	AP017480	60,181	01A22_C	(+)40781..42707	BGIBMGA010774	Chr26:33729..41506 (-)	15468	Chr26:46566..54385 (-)
			01A22_D	(-)48908..50285	BGIBMGA010777	Chr26:28169..30627 (+)	15467	Chr26:41456..45483 (+)
			01A22_E	(+)52735..59993	NM_001099839.1	Chr26:4243740..4268944 (+)	15618	Chr26:4301832..4302758 (-)
			01A23_A	(-)7958..14368	BGIBMGA003910	Chr17:16131873..16148303 (-)	10595	Chr17:14942388..14949536 (-)
01A23	AP017481	62,361	01A23_B	(+)14841..17043	NM_001046851.1	Chr17:16164367..16168720 (+)	10596	Chr17:14962917..14966610 (+)
			01A23_C	(-)19432..21291	BGIBMGA003909	Chr17:16169427..16171914 (-)	10597	Chr17:14967958..14970966 (-)
			01B05_A	(+)39842..40073	BGIBMGA006147	Chr4:4417091..4421153 (+)	none	
			01B05_B	(+)51980..52266	BGIBMGA006148	Chr4:4431071..4432766 (+)	01773	Chr4:4391139..4405848 (+)
01B05	AP017482	83,304	01B05_C	(+)64138..73564	BGIBMGA014526	Bm_scaf368: 6443-17190 (-)	01774	Chr4:4411879..4421881 (+)
			01B05_D	(+)81478..83260	AK381119	Chr4:4475039..4479445 (+)	01776	Chr4:4433259..4440042 (+)
			01C04_A	(+)5100..8636	BGIBMGA008348	Chr18:6403599..6413723 (-)	10894	Chr18:6172692..6176570 (-)
01C04	AP017483	24,592	01C04_B	(-)9938..10729	BGIBMGA008476	Chr18:6400214..6402087 (+)	10893	Chr18:6163461..6171371 (+)

	AP017484	15,903	01B07_A	(-)2842..6319	AK378391	Bm_scaf146:124182..142948 (-)	11277	Chr19:2369163..2372735 (-)
			01B07_B	(+)7866..9823	BGIBMGA002764	Bm_scaf146:146260..153323 (+)	11279	Chr19:2385936..2387350 (+)
			01B07_C	(-)11307..12329	NM_001047020.1	Bm_scaf146:154376..155897 (-)	11281	Chr19:2394923..2396045 (-)
01B07			01B07_D	(+)668..1402	BGIBMGA002765	Bm_scaf146:156858..157448 (+)	11280	Chr19:2389546..2397656 (+)
	AP017485	10,912	01B07_E	(-)2236..4398	NM_001200007.1	Bm_scaf146:159533..164070 (-)	11282	Chr19:2399516..2404075 (-)
			01B07_F	(+)5923..7815	AK383052	Bm_scaf146:165455..168537 (+)	11283	Chr19:2405346..2408387 (+)
			01C11_A	(+)491..9926	BGIBMGA009343	Chr14:12472751..12544314 (-)	08497	Chr14:10842395..10863463 (-)
	AP017486	35,586	01C11_B	(+)15199..17739	BGIBMGA009344	Chr14:12449938..12464562 (-)	08495	Chr14:10823826..10832583 (-)
			01C11_C	(-)23170..25765	BGIBMGA009355	Chr14:12446413..12447669 (+)	08493	Chr14:10814104..10815444 (+)
			01C11_D	(-)27369..31539	AK384262	Chr14:12446369..12447733 (+)	08492	Chr14:10805114..10813085 (+)
01C11			01C11_E	(+)3104..7946	AK384417	Chr14:12374965..12397225 (-)	08489	Chr14:10748516..10763293 (-)
			01C11_F	(+)17373..17939	NM_001146714.1	Chr14:12371101..12371733 (+)	08488	Chr14:10741414..10742178 (+)
	AP017487	26,347	01C11_G	(+)18162..18379	BGIBMGA000830	Bm_scaf477: 8396-8818 (-)	08487	Chr14:10732384..10733484 (+)
			01C11_H	(-)21442..24045	BGIBMGA009428	Bm_scaf196: 26774-33059 (+)	08469	Chr14:10446237..10469501 (+)
	AP017488	38,117	01C11_I	(+)9206..11743	BGIBMGA009425	Chr14:11191744..11194281 (+)	08468	Chr14:10360747..10363468 (+)
			01C16_A	(+)6977..19944	BGIBMGA002114	Chr1:2589020..2620621 (+)	00094	Chr1:2688957..2728729 (+)
01C16	AP017489	64,670	01C16_B	(-)31437..32144	BGIBMGA002017	Chr1:2657432..2658139 (-)	00096	Chr1:2765638..2766766 (-)
			01C16_C	(-)3264..26450	BGIBMGA002018	Chr1:2489754..2548751 (-)	00091	Chr1:2591994..2658046 (-)
	AP017490	40,441	01C16_D	(-)31243..34970	BGIBMGA014489	Bm_scaf299: 23813-35602 (-)	00092	Chr1:2659409..2665996 (-)
			01D04_A	(+)11367..13716	AK383340	Chr1:17274185..17282806 (+)	00542	Chr1:16045600..16061069 (+)
			01D04_B	(+)18121..19878	BGIBMGA012334	Chr1:17291431..17299500 (+)	00543	Chr1:16069510..16077745 (+)
			01D04_C	(+)31587..36981	NM_001102463.1	Chr1:17338625..17350605 (+)	00545	Chr1:16116700..16127502 (+)
01D04	AP017491	86,531	01D04_D	(-)40425..42921	BGIBMGA012255	Chr1:17353416..17357547 (-)	00546	Chr1:16131316..16169849 (-)
			01D04_E	(-)43552..50812	BGIBMGA012254	Chr1:17360348..17382950 (-)	00546	Chr1:16131316..16169849 (-)
			01D04_F	(-)76627..76764	AK384462	Chr1:17454337..17454955 (+)	00548	Chr1:16223310..16295639 (-)
			01D04_G	(-)82524..84518	BGIBMGA012252	Chr1:17465579..17480343 (-)	00548	Chr1:16223310..16295639 (-)
			01D09_A	(+)11458..15251	BGIBMGA012197	Chr24:17347172..17353723 (-)	14835	Chr24:16036988..16045926 (-)
01D09	AP017492	32,592	01D09_B	(-)21846..30501	AK379879	Chr24:15775855..15790218 (-)	14762	Chr24:14578409..14587566 (-)
			01D09_C	(+)17504..20245	BGIBMGA002352	Bm_scaf232: 120-3674 (+)	14836	Chr24:16092241..16096056 (+)
			01D21_A	(+)34769..35959	BGIBMGA005134	Chr25:10708993..10710059 (-)	15330	Chr25:9305494..9320085 (-)
			01D21_B	(+)48469..53982	AK385727	Chr25:10662231..10700192 (-)	15329	Chr25:9260077..9297025 (-)
01D21	AP017494	75,241	01D21_C	(-)55420..62440	BGIBMGA005068	Chr25:10650987..10660571 (+)	15328	Chr25:9243096..9257580 (+)
			01D21_D	(-)68584..69225	AK385615	Chr25:10646847..10648028 (+)	15328	Chr25:9243096..9257580 (+)
			01D21_E	(+)72445..73452	BGIBMGA005136	Chr25:10640837..10642085 (-)	15327	Chr25:9237395..9239315 (-)





01D19	AP017507	30,421	01D19_A	(+481..7557	BGIBMGA003443	Chr15:16724374..16748667 (+)	09324	Chr15:16028085..16050079 (+)
	AP017508	22,264	01D19_B	(+13820..15579	AK383241	Chr15:16750286..16759573 (-)	09325	Chr15:16054216..16062324 (-)
			01D22_A	(-3865..5271	AK387494	Chr19:4478415..4480225 (+)	11427	Chr19:5402574..5404083 (+)
			01D22_B	(+5907..8108	AK377982	Chr19:4505832..4510004 (-)	11432	Chr19:5429687..5433833 (-)
01D22	AP017509	75,055	01D22_C	(+16..1518	AK381374	Chr19:4480697..4490925 (-)	11428	Chr19:5404812..5414573 (-)
			01D22_D	(-10202..15705	AK381185	Chr19:4492716..4502125 (+)	11430	Chr19:5416514..5428715 (+)
			01D22_E	(-17057..36976	AK388124	Chr19:4689010..4743616 (-)	11436	Chr19:5601908..5665423 (-)
	AP017510	44,860	01A21_A	(+32876..34502	BGIBMGA011910	Chr11:5519152..5523686 (+)	06349	Chr11:5158097..5165319 (+)
			01A21_B	(+5426..11995	AK385912	Chr11:5436505..5445770 (-)	06345	Chr11:5088005..5094936 (-)
			01A21_C	(-14457..17730	AK378774	Chr11:5455029..5460410 (+)	06346	Chr11:5096237..5101647 (+)
			01A21_D	(+18647..20184	AK379416	Chr11:5447421..5452879 (-)	06345	Chr11:5088005..5094936 (-)
			01A21_E	(+20810..26114	AK377422	Chr11:5424884..5432080 (-)	06342	Chr11:5066035..5069756 (-)
01A21	AP017511	66,697	01A21_F	(-28857..30770	AK377300	Chr11:5415920..5423951 (+)	06341	Chr11:5057397..5065155 (+)
			01A21_G	(-31445..35046	BGIBMGA011906	Chr11:5408303..5413118 (+)	06340	Chr11:5051007..5054727 (+)
			01A21_H	(-35284..38051	BGIBMGA011905	Chr11:5395623..5400864 (+)	none	
			01A21_I	(-39280..42314	AK381751	Chr11:5368462..5393249 (+)	06337	Chr11:5024457..5033032 (+)
			01D11_A	(+778..2363	BGIBMGA006831	Chr10:9049684..9057501 (-)	05689	Chr10:8236968..8245001 (-)
			01D11_B	(-3623..16134	BGIBMGA006851	Chr10:9032250..9046215 (+)	05688	Chr10:8219772..8233639 (+)
	AP017513	39,321	01D11_C	(+18393..27861	AK383301	unmapped	05687	Chr10:8203985..8215001 (-)
			01D11_D	(-33100..34590	AK384851	Chr10:8993593..8996568 (+)	05684	Chr10:8180632..8182302 (+)
			01D11_E	(-5541..12913	BGIBMGA006848	Chr10:8974806..8977170 (+)	05681	Chr10:8131052..8162543 (+)
	AP017514	23,942	01D11_F	(-20968..21142	BGIBMGA006847	Chr10:8941573..8941737 (+)	none	
			01D20_A	(+668..6259	NM_001046869.1	Chr1:4623193..4632826 (-)	00147	Chr1:4670556..4680073 (-)
			01D20_B	(-12704..25846	BGIBMGA002148	Chr1:4589526..4616211 (+)	00145	Chr1:4651174..4663666 (+)
			01D20_C	(-35353..44395	BGIBMGA002144	Chr1:4347434..4359054 (+)	00140	Chr1:4397239..4402554 (+)
			01D20_D	(-54410..59106	BGIBMGA002143	Chr1:4311259..4315093 (+)	00139	Chr1:4345659..4360131 (+)
01D20	AP017515	85,327	01D20_E	(-67567..69354	BGIBMGA002142	Chr1:4304547..4309885 (+)	00139	Chr1:4345659..4360131 (+)
			01D20_F	(-73125..80693	BGIBMGA002141	Chr1:4236755..4239095 (+)	00135	Chr1:4282059..4285192 (+)
			01D20_G	(-82873..83069	BGIBMGA002140	Chr1:4127055..4140509 (+)	00131	Chr1:4193229..4197405 (+)
			01B11_A	(+3599..5872	BGIBMGA007803	Chr1:4105784..4118503 (+)	00130	Chr1:4159099..4192173 (+)
	AP017516	6,035	01B11_B	(+29728..30047	NM_001046675.1	Chr15:8526488..8529679 (-)	08945	Chr15:8595854..8599467 (-)
			01B11_C	(-31626..36913	NM_001098277.1	Chr15:12250170..12251252 (+)	09135	Chr15:11917641..11919370 (+)
01B11	AP017517	89,843	01B11_D	(+52998..56632	AK387164	Chr15:12275195..12281129 (+)	09136	Chr15:11919925..11935650 (-)
							09137	Chr15:11943171..11948730 (+)

01C17	AP017519	10,974	01C17_A	(+231..6656	BGIBMGA011888	Chr11:5006851..5012953 (+)	06316	Chr11:4651873..4679517 (+)
	AP017520	25,126	01C17_B	(+13514..17316	BGIBMGA011890	Chr11:5025980..5032057 (+)	06316	Chr11:4651873..4679517 (+)
01E04	AP017521	38,427	01E04_A	(-13016..15138	AK378226	Chr11:5110274..5114967 (+)	06321	Chr11:4750203..4754213 (+)
			01E04_B	(+18603..19157	BGIBMGA001612	Chr11:3997442..3997972 (-)	none	
			01E04_C	(-26860..27343	BGIBMGA001615	Chr11:3885492..3889677 (-)	06288	Chr11:4018932..4036060 (-)
			01E04_D	(-28753..34281	BGIBMGA001614	Chr11:3895691..3904017 (-)	06288	Chr11:4018932..4036060 (-)
01C24	AP017522	43,534	01C24_A	(+20046..20213	BGIBMGA009560	Bm_scaf157: 186681-189512 (+)	14629	Chr24:11534989..11573403 (+)
	AP017523	34,474	01C24_B	(+7075..8399	BGIBMGA009561	Bm_scaf157: 207134-210459 (+)	14629	Chr24:11534989..11573403 (+)
			01C24_C	(-24272..34137	AK381705	Chr24:13159390..13189636 (+)	14608	Chr24:11160016..11182643 (-)
01D06	AP017524	74,087	01D06_A	(+13035..23533	AK383724	Bm_scaf332:25252..14628 (+)	09597	Chr16:5033119..5058605 (+)
			01D06_B	(+25049..26022	AK378378	Bm_scaf332:16097..17122 (+)	09598	Chr16:5060089..5061045 (+)
			01D06_C	(-26874..27410	BGIBMGA014200	Bm_scaf332:21140..22332 (-)	09599	Chr16:5064617..5093858 (-)
			01D06_D	(-34514..42481	BGIBMGA012992	Chr16:4963094..4971216 (-)	09599	Chr16:5064617..5093858 (-)
			01D06_E	(+43552..44622	BGIBMGA012840	Chr16:4971710..4973528 (+)	09600	Chr16:5093989..5096129 (+)
			01D06_F	(-46496..53128	AK387085	Chr16:4978029..5007930 (-)	09601	Chr16:5102493..5139158 (-)
			01D06_G	(+62776..63749	AK383258	unmapped	10333	Chr17:7804077..7807342 (-)
01C22	AP017525	26,557	01C22_A	(+20584..26090	BGIBMGA002876	Chr10:17923507..17940260 (-)	06018	Chr10:16165305..16211701 (-)
	AP017526	24,215	01C22_B	(+17958..19343	BGIBMGA002825	Chr10:17903914..17905425 (+)	06017	Chr10:16156622..16158275 (+)
			01C22_C	(+8107..16354	BGIBMGA002824	Chr10:17885946..17896436 (+)	06016	Chr10:16136242..16146913 (+)
01D10	AP017527	20,165	01D10_A	(+5730..7515	AK387407	Chr12:8714836..8723282 (+)	07226	Chr12:8607286..8615203 (+)
			01D10_B	(-7361..8955	AK386625	Chr12:8722443..8727344 (-)	07227	Chr12:8618637..8619615 (-)
			01D10_C	(-4559..4889	AK385517	Chr12:8705237..8710435 (-)	07225	Chr12:8599188..8603125 (-)
			01D10_D	(+10812..15295	AK387441	Chr12:8728113..8743531 (+)	07228	Chr12:8626426..8636125 (+)
			01D10_E	(-16771..18421	AK381277	Chr12:8744558..8750410 (-)	07229	Chr12:8640029..8643015 (-)
	AP017528	11,233	01D10_F	(+8570..9574	KAIKOGA015882	Chr12:8651689..8656908 (-)	07222	Chr12:8517532..8543915 (-)
			01D10_G	(+2763..5606	BGIBMGA010370	Chr12:8626560..8630172 (-)	07222	Chr12:8517532..8543915 (-)
			01D10_H	(-6649..8267	AK382698	Chr12:8622096..8625248 (+)	07222	Chr12:8517532..8543915 (-)
	AP017529	17,599	01D10_I	(+9543..10645	BGIBMGA010371	Chr12:8618344..8620075 (-)	07220	Chr12:8461891..8510955 (-)
				(+11578..17599				
AP017530	AP017531	1,704	01D10_J	(+932..1099	BGIBMGA010372	Chr12:8583579..8615110 (-)	07220	Chr12:8461891..8510955 (-)
		10,897		(+1..9488				
AP017532		21,279	01D10_K	(+1..7840				
				(+17254..20903	BGIBMGA010373	Chr12:8572841..8580420 (-)	07220	Chr12:8461891..8510955 (-)
AP017533		11,805	01D10_L	(-126..10052	BGIBMGA010576	Chr12:8549728..8558232 (+)	07218	Chr12:8435906..8449220 (+)

AP017534	11,540	01A24_A	(+)7584..8370	AK378168	Chr6:8849069..8853573 (+)	03445	Chr6:8055253..8059240 (+)
AP017535	12,385		(+)7070..12255			03450	Chr6:8055253..8059240 (+)
AP017536	8,253	01A24_B	(+)1383..8253	BGIBMGA006517	Chr6:8941876..8981359 (+)	none	
AP017537	2,986		(+)549..2732			03452	Chr6:8194763..8196872 (-)
AP017538	10,345	01A24_C	(+)3904..6056	AK382603	Chr6:8987647..8989964 (-)	16075	Chr27:8225243..8227194 (-)
AP017539	11,656		(+)3323..11526			16074	Chr27:8211385..8222684 (-)
AP017540	1,329	01C10_A	(+)1..105	BGIBMGA004576	Chr27:11090497..11114303 (-)	16073	Chr27:8203398..8208504 (-)
AP017541	3,449		(+)438..1072			15921	Chr27:2162668..2165898 (-)
AP017542	8,361		(+)241..8053			15920	Chr27:2154179..2158438 (+)
AP017543	31,280	01D15_A	(+)1377..3062	BGIBMGA001310	Chr23:207031..254028 (-)	15918	Chr27:2049824..2122249 (-)
AP017544	3,440	01D15_B	(-)6233..7823	AK378296	Chr23:226570..230570 (+)	15913	Chr27:1958710..2006176 (+)
AP017545	23,534	01D15_C	(+)26061..31031	BGIBMGA013392	Chr27:3181868..3243021 (-)	15912	Chr27:1913314..1956039 (-)
AP017546	11,273		(+)347..2487			15912	Chr27:1913314..1956039 (-)
AP017547	29,641	01D15_D	(+)1268..22892	BGIBMGA013394	Chr27:3091362..3162315 (+)	15912	Chr27:1913314..1956039 (-)
		01D15_E	(-)9331..10544	BGIBMGA014312	Bm_scaf1156: 3055-5275 (+)	15912	Chr27:1913314..1956039 (-)
		01D15_F	(-)12..6430	BGIBMGA013396	Chr27:3035089..3043854 (-)	10189	Chr17:4152113..4167820 (+)
		01D15_G	(+)22063..26178	BGIBMGA005587	Chr17:3503681..3523963 (+)	10191	Chr17:4176423..4181295 (+)
		01D16_A	(+)314..7651	BGIBMGA005588	Chr17:3525616..3532772 (+)	10193	Chr17:4190709..4198932 (-)
AP017548	34,984	01D16_B	(+)13658..15683	AK381041	Chr17:3554450..3563961 (+)	10194	Chr17:4202103..4220193 (+)
		01D16_C	(-)21387..23572			10195	Chr17:4228247..4262522 (-)
		01D16_D	(+)27969..34881	BGIBMGA005589	Chr17:3576845..3588279 (-)	10195	Chr17:4228247..4262522 (-)
		01D16_E	(+)1975..5571			14186	Chr23:20038114..20045281 (-)
AP017549	31,843	01D16_F	(-)13924..15287	BGIBMGA005612	Chr17:4218181..4262474 (-)	14185	Chr23:20013142..20034309 (+)
		01E08_A	(-)29857..30900	NM_001142611.1	Chr17:3576845..3588279 (-)	14187	Chr23:20048689..20055191 (-)
		01E08_B	(+)6091..14564	NM_001046901.1	Chr23:21764381..21770922 (-)	14191	Chr23:20124862..20170359 (+)
		01E08_C	(-)15602..26187	AK382908	Chr23:21738753..21760795 (+)	14191	Chr23:20124862..20170359 (+)
		01E08_D	(-)27994..32312	AK382962	Chr23:21772712..21781565 (-)	14195	Chr23:20245122..20250340 (+)
AP017550	118,471	01E08_E	(+)76441..82790	BGIBMGA011136	Chr23:21848239..21863937 (+)		
		01E08_F	(+)90396..98285	BGIBMGA011137	Chr23:21875775..21894483 (+)		
			(+)112661..114556	AK387753	Chr23:21965079..21972757 (+)		

01E05	AP017551	77,804	01E05_A	(-)126..2203	NM_001256994.1	Chr8:13105771..13110996 (-)	04678	Chr8:12019635..12024648 (-)
			01E05_B	(-)11074..16907	BGIBMGA005286	Chr8:13114526..13123939 (-)	04679	Chr8:12028182..12037598 (-)
			01E05_C	(-)18042..19921	AK386860	Chr8:13133686..13137859 (-)	04680	Chr8:12047756..12051268 (-)
			01E05_D	(+)20500..24706	FS918194	Chr8:13138589..13141106 (+)	04681	Chr8:12052169..12073632 (+)
			01E05_E	(+)26663..41247	AK381216	Chr8:13143011..13161452 (+)	04681	Chr8:12052169..12073632 (+)
			01E05_F	(+)57170..65470	BGIBMGA005524	Chr8:13203305..13213859 (+)	04684	Chr8:12116109..12126797 (+)
			01D18_A	(-)66323..84689	BGIBMGA010573	Chr12:7992739..8015692 (+)	07206	Chr12:7859647..7888937 (+)
			01D18_B	(+)89177..89914	BGIBMGA010498	Chr12:1330216..1331071 (+)	06983	Chr12:1088492..1089456 (+)
01D18	AP017552	121,287	01D18_C	(+)93323..95641	AK386061	Chr12:1335559..1339082 (+)	06985	Chr12:1093902..1096653 (+)
			01D18_D	(-)96876..100430	AK383097	Chr12:1339854..1346886 (-)	06986	Chr12:1098900..1105221 (-)

Table 2.35 *Pieris brassicae* BACs used for BAC-FISH mapping, information of labeled dyes and corresponded *Bombyx mori* orthologs

<i>Pieris brassicae</i>			<i>Bombyx mori</i>		
Chr	BAC code	FISH (Fig. 2.9) probe dye (pseudocolor)	Chr	Gene ID: KWMTBOMO	Location (bp)
1	03I04	Cy5 <sup>a</sup> (magenta)	23	13922	13,682,392..13,686,507
1				13976	15,192,807..15,213,521
1				13979	15,239,176..15,243,776
1				13980	15,246,357..15,255,411
1	01D13	O <sup>a</sup> (yellow)	23	13982	15,276,387..15,306,538
1				13983	15,310,847..15,320,653
1				13985	15,333,101..15,339,266
1				13984	15,329,627..15,332,429
1				13988	15,357,360..15,361,916
1	01A15	R <sup>a</sup> (red)	24	14371	3,781,636..3,810,416
1	02B20	G <sup>a</sup> (green)	10	05553	5,001,072..5,005,732
1	02G02*	Cy5 (cyan)		NA	NA
1	04I10	O (red orange)	25	14969	1,212,284..1,214,211
2	01C04	O (magenta)	18	10894	6,172,692..6,176,570
2				10893	6,163,461..6,171,371
2				08497	10,842,395..10,863,463
2				08495	10,823,826..10,832,583
2				08493	10,814,104..10,815,444
2				08492	10,805,114..10,813,085
2	01C11	O <sup>a</sup> (yellow)	14	08489	10,748,516..10,763,293
2				08488	10,741,414..10,742,178
2				08487	10,732,384..10,733,484
2				08469	10,446,237..10,469,501
2				08468	10,360,747..10,363,468
2	02L08	Cy5 (cyan)	15	08642	1,519,699..1,522,872
2				15469	60,746..121,647
2	01A22	G (green)	26	15468	46,566..54,385
2				15467	41,456..45,483
2				15618	4,301,832..4,302,758
2	06M01	R (red)	9	05355	15,413,065..15,416,485
3				06871	18,057,736..18,059,752
3				06872	18,067,334..18,071,815
3	01D05	G <sup>a</sup> (yellow)	11	06873	18,137,675..18,155,032
3				06874	18,193,293..18,194,797
3				06879	18,220,913..18,222,502
3				06878	18,212,037..18,219,742
3				04678	12,019,635..12,024,648
3				04679	12,028,182..12,037,598
3	01E05	R (red)	8	04680	12,047,756..12,051,268
3				04681	12,052,169..12,073,632
3				04684	12,116,109..12,126,797
3	01A01	Cy5 (magenta)	16	09977	13,822,922..14,001,590
3				09597	5,033,119..5,058,605
3				09598	5,060,089..5,061,045
3				09599	5,064,617..5,093,858
3	01D06	G (green)	16	09599	5,064,617..5,093,858
3				09600	5,093,989..5,096,129
3				09601	5,102,493..5,139,158
3			17	10333	7,804,077..7,807,342
3	05K04	O (cyan)	7	04175	12,891,332..12,900,916
4				10595	14,942,388..14,949,536
4	01A23	R <sup>a</sup> (red orange)	17	10596	14,962,917..14,966,610
4				10597	14,967,958..14,970,966
4	33E20	O <sup>a</sup> (magenta red)	11	06575	10,821,577..10,827,641

4				06018	16,165,305..16,211,701
4	<u>01C22</u>	G (green)	10	06017	16,156,622..16,158,275
4				06016	16,136,242..16,146,913
4				06061	17,269,425..17,271,564
4			10	06064	17,280,526..17,295,364
4				06069	17,542,269..17,545,084
4	<u>01D23</u>	G <sup>a</sup> (RGB blue)		06070	17,560,443..17,561,914
4			20	11788	29,988..53,425
4			12	07093	4,051,424..4,075,154
4			8	04234	560,192..568,295
4				07206	7,859,647..7,888,937
4	<u>01D18</u>	R (red)	12	06983	1,088,492..1,089,456
4				06985	1,093,902..1,096,653
4				06986	1,098,900..1,105,221
4				07226	8,607,286..8,615,203
4				07227	8,618,637..8,619,615
4				07225	8,599,188..8,603,125
4	<u>01D10</u>	O <sup>b</sup> (yellow green)	12	07228	8,626,426..8,636,125
4				07229	8,640,029..8,643,015
4				07222	8,517,532..8,543,915
4				07220	8,461,891..8,510,955
4				07218	8,435,906..8,449,220
4	<u>01D19</u>	Cy5 (magenta)	15	09324	16,028,085..16,050,079
4				09325	16,054,216..16,062,324
4	<u>33C09</u>	Cy5 <sup>a</sup> (cyan)	15	09300	15,448,144..15,451,870
4				01773	4,391,139..4,405,848
4	<u>01B05</u>	Cy5 <sup>c</sup> (pastel magenta)	4	01774	4,411,879..4,421,881
4				01776	4,433,259..4,440,042
5	<u>01E03</u>	O (red orange)	9	04957	2,950,633..2,958,383
5	<u>33P19</u>	G (cyan)	10	05674	7,829,094..7,858,347
5				05689	8,236,968..8,245,001
5				05688	8,219,772..8,233,639
5	<u>01D11</u>	Cy5 <sup>a</sup> (magenta)	10	05687	8,203,985..8,215,001
5				05684	8,180,632..8,182,302
5				05681	8,131,052..8,162,543
5	<u>07O07</u>	G <sup>a</sup> (green)	10	05723	8,805,486..8,808,995
5	<u>05P24</u>	R (red)	27	16087	8,749,005..8,751,393
5				16075	8,225,243..8,227,194
5	<u>01C10</u>	O <sup>a</sup> (yellow)	27	16074	8,211,385..8,222,684
5				16073	8,203,398..8,208,504
6				15921	2,162,668..2,165,898
6				15920	2,154,179..2,158,438
6	<u>01D15</u>	O (RGB blue)	27	15918	2,049,824..2,122,249
6				15913	1,958,710..2,006,176
6				15912	1,913,314..1,956,039
6	<u>03J08</u>	O <sup>b</sup> (yellow orange)	11	06463	7,807,281..7,822,277
6	<u>01A16</u>	G (green)	11	06397	6,342,531..6,357,766
6	<u>01C17</u>	O <sup>a</sup> (yellow)	11	06316	4,651,873..4,679,517
6				06349	5,158,097..5,165,319
6				06345	5,088,005..5,094,936
6				06346	5,096,237..5,101,647
6	<u>01A21</u>	G <sup>a</sup> (cyan)	11	06342	5,066,035..5,069,756
6				06341	5,057,397..5,065,155
6				06340	5,051,007..5,054,727
6				06337	5,024,457..5,033,032
6	<u>17C23</u>	R <sup>a</sup> (red)	11	06217	2,572,043..2,622,340
6	<u>16B01</u>	R (yellow green)	11	06291	4,132,261..4,139,282
6	<u>08K20</u>	Cy5 <sup>a</sup> (magenta)	13	07945	10,802,055..10,820,292
6	<u>35P21</u>	Cy5 (pastel magenta)	13	07888	9,182,960..9,184,684

7	34B07	G <sup>a</sup> (RGB blue)	15	08778	5,035,387..5,035,928
7	35O12	O <sup>a</sup> (magenta)	22	13074	7,963,772..7,965,583
7				12436	3,355,051..3,370,448
7	<u>01A20</u>	G (green)	21	12647	10,205,265..10,207,697
7				12650	10,272,295..10,273,447
7				12649	10,247,605..10,262,372
7	19C02	O <sup>b</sup> (pastel magenta)	21	12483	4,792,546..4,796,242
7	14E22	R <sup>a</sup> (cyan)	21	12460	4,417,937..4,418,422
7	09I07**	G <sup>b</sup> (yellow green)		NA	NA
7	29A13	O (red orange)	20	12287	11,518,093..11,521,394
7				12215	9,591,701..9,647,969
7				12222	9,952,657..9,981,698
7	<u>01C12</u>	Cy5 (yellow)	20	12242	10,307,845..10,318,059
7				12241	10,299,210..10,306,897
7				12238	10,259,060..10,260,924
7				12237	10,242,200..10,257,759
8	04I09	Cy5 (magenta)	23	13721	7,649,545..7,656,599
8	04C04	R (red)	23	13749	8,300,555..8,307,800
8				09747	8,666,965..8,691,260
8				09746	8,662,279..8,663,640
8	<u>01A12</u>	O <sup>a</sup> (yellow)	16	09745	8,656,211..8,661,083
8				09744	8,644,982..8,650,300
8				09742	8,615,176..8,618,090
8				09741	8,565,641..8,566,629
8				11427	5,402,574..5,404,083
8				11432	5,429,687..5,433,833
8	<u>01D22</u>	Cy5 <sup>a</sup> (cyan)	19	11428	5,404,812..5,414,573
8				11430	5,416,514..5,428,715
8				11436	5,601,908..5,665,423
8				11277	2,369,163..2,372,735
8				11279	2,385,936..2,387,350
8	<u>01B07</u>	G <sup>a</sup> (green)	19	11281	2,394,923..2,396,045
8				11280	2,389,546..2,397,656
8				11282	2,399,516..2,404,075
8				11283	2,405,346..2,408,387
8	17D07	O <sup>b</sup> (pastel magenta)	3	01129	2,872,917..2,877,800
8	13B05	G <sup>b</sup> (yellow green)	3	01131	2,890,414..2,897,786
9	33E04	R <sup>b</sup> (red orange)	13	08100	15,952,645..15,955,376
9	33M14	G <sup>a</sup> (green)	6	03639	14,084,835..14,085,614
9				10189	4,152,113..4,167,820
9				10191	4,176,423..4,181,295
9	<u>01D16</u>	G <sup>b</sup> (cyan)	17	10193	4,190,709..4,198,932
9				10194	4,202,103..4,220,193
9				10195	4,228,247..4,262,522
9	19J07	O <sup>a</sup> (yellow)	4	02052	11,088,955..11,095,686
10	04B14	G (cyan)	20	11985	4,776,159..4,780,188
10	01D07*	O (red orange)		NA	NA
10	27B21	O <sup>a</sup> (yellow)	18	11083	12,385,248..12,390,846
10	<u>01A03</u>	Cy5 <sup>a</sup> (magenta)	18	11164	15,295,883..15,327,483
10				03445	8,055,253..8,059,240
10	<u>01A24</u>	G <sup>a</sup> (green)	6	03450	8,055,253..8,059,240
10				03452	8,194,763..8,196,872
11	35L09	O <sup>c</sup> (magenta)	25	15391	11,258,153..11,259,291
11				15330	9,305,494..9,320,085
11	<u>01D21</u>	G <sup>c</sup> (green)	25	15329	9,260,077..9,297,025
11				15328	9,243,096..9,257,580
11				15327	9,237,395..9,239,315
11	19P22	O <sup>b</sup> (yellow)	19	11731	12,844,940..12,854,223
12	34C07	Cy5 <sup>a</sup> (cyan)	23	14157	19,481,013..19,485,149



12				14186	20,038,114..20,045,281
12				14185	20,013,142..20,034,309
12	<u>01E08</u>	O (yellow)	23	14187	20,048,689..20,055,191
12				14191	20,124,862..20,170,359
12				14195	20,245,122..20,250,340
12	07L23	O <sup>a</sup> (red)	12	07114	4,811,656..4,853,351
12	35F09	G (green)	17	10248	5,809,820..5,813,560
13	<u>01C24</u>	R (red)	24	14629	11,534,989..11,573,403
13				14608	11,160,016..11,182,643
13	29H01	Cy5 (magenta)	24	14732	13,846,478..13,847,851
13				14835	16,036,988..16,045,926
13	<u>01D09</u>	G (green)	24	14762	14,578,409..14,587,566
13				14836	16,092,241..16,096,056
13	01A06***	O (yellow)	(11)	NA	NA
14				08945	8,595,854..8,599,467
14	<u>01B11</u>	R <sup>c</sup> (red)	15	09135	11,917,641..11,919,370
14				09136	11,919,925..11,935,650
14				09137	11,943,171..11,948,730
Z	28B22	G (yellow green)	2	00936	6,796,671..6,813,722
Z	35P07	O (pastel magenta)	1	00426	12,478,149..12,525,867
Z	27J24	R (red orange)	1	00379	11,253,049..11,269,571
Z				00542	16,045,600..16,061,069
Z				00543	16,069,510..16,077,745
Z	<u>01D04</u>	Cy5 (magenta)	1	00545	16,116,700..16,127,502
Z				00546	16,131,316..16,169,849
Z				00548	16,223,310..16,295,639
Z				00094	2,688,957..2,728,729
Z	<u>01C16</u>	G <sup>a</sup> (green)	1	00096	2,765,638..2,766,766
Z				00091	2,591,994..2,658,046
Z				00092	2,659,409..2,665,996
Z	26C08	Cy5 <sup>a</sup> (cyan)	1	00112	3,557,391..3,583,260
Z				00147	4,670,556..4,680,073
Z				00145	4,651,174..4,663,666
Z				00140	4,397,239..4,402,554
Z	<u>01D20</u>	Cy5 <sup>b</sup> (RGB blue)	1	00139	4,345,659..4,360,131
Z				00135	4,282,059..4,285,192
Z				00131	4,193,229..4,197,405
Z				00130	4,159,099..4,192,173
Z	28G13	R <sup>b</sup> (red)	1	00186	5,963,213..5,965,045
Z	02A12	O <sup>a</sup> (yellow)	1	00190	6,026,373..6,126,632

BACs with underline were applied to Next Gene sequencing.

\*: unknown insert sequences

\*\**: pierisin*

\*\*\*: contains ribosomal genes and corresponds to NOR

a: reprobated FISH

b: twice reprobated FISH

c: 3 times reprobated FISH

Table 2.36 *Pieris brassicae* BAC probe information used for BAC-FISH (Fig. 2.10) comparison between *P.brassicae* and *P. rapae*

<i>Pieris brassicae</i>			<i>Pieris rapae</i>	
Chr	BAC code	FISH probe dye (pseudocolor)	Chr	FISH probe dye (pseudocolor)
1	03I04	Cy5 <sup>a</sup> (red)	10	R (red)
1	02B20	G <sup>a</sup> (green)	13	G (green)
1	02G02*	Cy5 (magenta)	13	Cy5 (magenta)
1	04I10	O (yellow)	13	O (yellow)
2	01C04	O (yellow)	6	O (yellow)
2	01C11	O <sup>a</sup> (green)	6	G (green)
2	02L08	Cy5 (magenta)	4	Cy5 (magenta)
2	01A22	G (green)	4	O (yellow)
2	06M01	R (red)	4	G (green)
3	01E05	R (magenta)	18	Cy5 (magenta)
3	05K04	O (yellow)	12	O (yellow)
4	01A23	R <sup>a</sup> (green)	9	G (green)
4	33E20	O <sup>a</sup> (red)	9	R (red)
4	33C09	Cy5 <sup>a</sup> (magenta)	14	Cy5 (magenta)
4	01B05	Cy5 <sup>c</sup> (yellow)	14	O (yellow)
5	33P19	G (magenta)	8	Cy5 (magenta)
5	07O07	G <sup>a</sup> (red)	8	R (red)
5	05P24	R (yellow)	21	O (yellow)
6	01D15	O (RGB blue)	11	Cy5 (RGB blue)
6	03J08	O <sup>b</sup> (green)	11	G (green)
6	01C17	O <sup>a</sup> (yellow)	25	G <sup>a</sup> (yellow)
6	01A21	G <sup>a</sup> (cyan)	25	Cy5 <sup>a</sup> (cyan)
6	17C23	R <sup>a</sup> (red)	25	O (red)
6	16B01	R (yellow green)	25	G (yellow green)
6	08K20	Cy5 <sup>a</sup> (magenta)	25	O <sup>a</sup> (magenta)
6	35P21	Cy5 (pastel magenta)	25	Cy5 (pastel magenta)
7	35O12	O <sup>a</sup> (green)	7	G (green)
7	14E22	R <sup>a</sup> (magenta)	5	Cy5 (magenta)
7	09I07**	G <sup>b</sup> (red)	5	R (red)
7	29A13	O (yellow)	5	O (yellow)
8	04C04	R (red)	3	O <sup>a</sup> (red)
8	01D22	Cy5 <sup>a</sup> (cyan)	3	Cy5 <sup>a</sup> (cyan)
8	17D07	O <sup>b</sup> (pastel magenta)	22	O (pastel magenta)
8	13B05	G <sup>b</sup> (yellow green)	22	G (yellow green)
9	33E04	R <sup>b</sup> (magenta)	17	Cy5 (magenta)
9	33M14	G <sup>a</sup> (green)	17	G (green)
9	01D16	G <sup>b</sup> (cyan)	17	O (cyan)
9	19J07	O <sup>a</sup> (yellow)	20	Cy5 (yellow)
10	04B14	G (cyan)	15	G (cyan)
10	01D07*	O (yellow)	15	O (yellow)
10	27B21	O <sup>a</sup> (green)	16	G (green)
10	01A03	Cy5 <sup>a</sup> (magenta)	16	Cy5 (magenta)
11	35L09	O <sup>c</sup> (magenta)	2	G (magenta)
11	01D21	G <sup>c</sup> (green)	2	Cy5 (green)
11	19P22	O <sup>b</sup> (yellow)	2	O (yellow)
12	34C07	Cy5 <sup>a</sup> (yellow)	12	O (yellow)
12	07L23	O <sup>a</sup> (green)	12	G (green)
12	35F09	G (magenta)	12	Cy5 (magenta)
13	29H01	Cy5 (magenta)	23	O (magenta)
13	01D09	G (green)	23	G (green)
14	01B11	R <sup>c</sup> (red)	24	R (red)
Z	28B22	G (yellow)	Z	O (yellow)
Z	35P07	O (green)	Z	G (green)
Z	27J24	R (magenta)	Z	Cy5 (magenta)
Z	28G13	R <sup>b</sup> (red)	Z	R (red)

\*: unknown insert sequences

\*\*.: *perisin*

a: reprobated FISH

b: 2nd reprobated FISH

c: 3rd reprobated FISH

Table 2.37 *Pteris brassicae* STS primer pairs used for BAC selection

name	sequence		name	sequence		size (bp)	BAC code	gene definition
	Forward primer	Reverse primer		Forward primer	Reverse primer			
Pteris_futsch_F	GCACCTCCAAGACCAAGAAA	TTGGTCCTCTAGGAGCCCGTT	Pteris_futsch_R	TTGGTCCTCTAGGAGCCCGTT	106	-	microtubule-associated_protein_futsch	
Pteris_MTG1_F	GCCCGTAGGTAGCCAAAGAT	GTAACTCCAGCTACCCGACC	Pteris_MTG1_R	GTAACTCCAGCTACCCGACC	624	04H10	mitochondrial_GTPase_1	
Pteris_Nup43_F	TTTACTGGT AGTTGGGACGA	CCATTGGATAGAGACACAGC	Pteris_Nup43_R	CCATTGGATAGAGACACAGC	188	-	nucleoporin_Nup43	
Pteris_RpL7_F	TGTTCATGCGTATCCGTGGT	TAGGTAAGCCCAAGGTGATG	Pteris_RpL7_R	TAGGTAAGCCCAAGGTGATG	165	04B14	ribosomal_protein_L7	
Pteris_NFKBIZ_F	TCACCCCAACCCAAACGTC	ATGGACGTGCTCCGGTATTCC	Pteris_NFKBIZ_R	ATGGACGTGCTCCGGTATTCC	155	16B01	NF-kappa-B_inhibitor_zeta	
Pteris_SPAC3H802_F	GGCTGTGAGTAGACACTATCC	TAATAACTGGCCAGCAGCCAG	Pteris_SPAC3H802_R	TAATAACTGGCCAGCAGCCAG	90	-	CRAL-TRIO_domain-containing_protein_C3H8.02	
2944_aux2_F	ATGGGACGGTTGTGATGGTG	ACATGTCATTTGGCTCCAG	2945_atx2_R	ACATGTCATTTGGCTCCAG	113	-	ataxin-2-like_protein	
2946_cct8_F	ACGCGAGTTGGATGTAGAAC	TGTGGTCTTCTCTGGCAGAAAT	2947_cct8_R	TGTGGTCTTCTCTGGCAGAAAT	370	04I09	chaperonin	
2948_mael_F	GGTGGCATTCCAAATGGGCTA	CCAGCCCGTCTACACATTTGA	2949_mael_R	CCAGCCCGTCTACACATTTGA	233	-	protein_maelstrom_homolog	
2950_SAYP_F	CCCATACTTAAGCCACC GGA	CGGTACCTGGCTTACCCCAAT	2951_SAYP_R	CGGTACCTGGCTTACCCCAAT	187	06D11*	supporter_of_activation_of_yellow_protein	
2952_PhD7364_F	TGACGACCGTACAGGGAAC	GAGACCTTCCCGATGGCTT	2953_PhD7364_R	GAGACCTTCCCGATGGCTT	489	17C23	uncharacterized_protein	
2954_PhD10179_F	TACTGGCTTCGGTCAAACCT	TCACCTCCCTTGGCCGGAGTAT	2955_PhD10179_R	TCACCTCCCTTGGCCGGAGTAT	91	02K21*	uncharacterized_protein	
2956_ovo_F	CCCACAAGGAAGGGCAAATG	CGATGTGATTGTGCCCTCC	2957_ovo_R	CGATGTGATTGTGCCCTCC	177	08K20	protein_ovo	
2958_med7_F	GTGCATTTGCCAGACTCTCCT	TTGACGGTTTTGCAACTCCA	2959_med7_R	TTGACGGTTTTGCAACTCCA	147	-	mediator_of_RNA_polymerase_II_transcription_subunit_7	
3220_RpS26_F	TTGTGGCAACAGGTC AAG	GTTGCAAAATCTGTGGGGGG	3221_RpS26_R	GTTGCAAAATCTGTGGGGGG	93	-	ribosomal_protein_beta_S26	
3222_CAPZB_F	CATCCGTGGACCAACCATA	AGGCATTTGACCCCATCTCA	3223_CAPZB_R	AGGCATTTGACCCCATCTCA	147	17D07	F-actin_capping_protein_beta_subunit	
3224_EIF5A_F	ACCCACAACATGGATGTCCC	AGGTCCTCGTCTGGGATCTT	3225_EIF5A_R	AGGTCCTCGTCTGGGATCTT	134	13B05	translation_initiation_factor_5A	
3226_RARS_F	TGGGGCACACAGTTTGGTAT	CACCTTGTACCGGCCCTTCT	3227_RARS_R	CACCTTGTACCGGCCCTTCT	738	17D02*	putative_arginyl-tRNA_synthetase	
3228_ham_F	AAAACAACAGCAAGACGGGC	GGGTGAACGGGCA TCGGAAA	3229_ham_R	GGGTGAACGGGCA TCGGAAA	645	-	PR_domain_zinc_finger_protein_16-like_isoform_XI	

-: no BAC detected

\*: Detect multiple signals in BAC-FISH mapping (nonspecific)

red nucleotides are different from those in *Pteris napa*.

blue nucleotide, C, is different from that in *Pteris rapae* (N).

Table 2.38 PCR reaction mix for BAC selection

---

10× Standard <i>Taq</i> Reaction Buffer	1 $\mu$ l
dNTPs (2.5mM) (GeneACT, Inc NT050)	0.8 $\mu$ l
10 $\mu$ M Forward Primer	0.5 $\mu$ l
10 $\mu$ M Reverse Primer	0.5 $\mu$ l
<i>Taq</i> DNA Polymerase (NEB M0273E)	0.05 $\mu$ l
Template DNA	variable
	adjust the volume to 10 $\mu$ l with distilled water

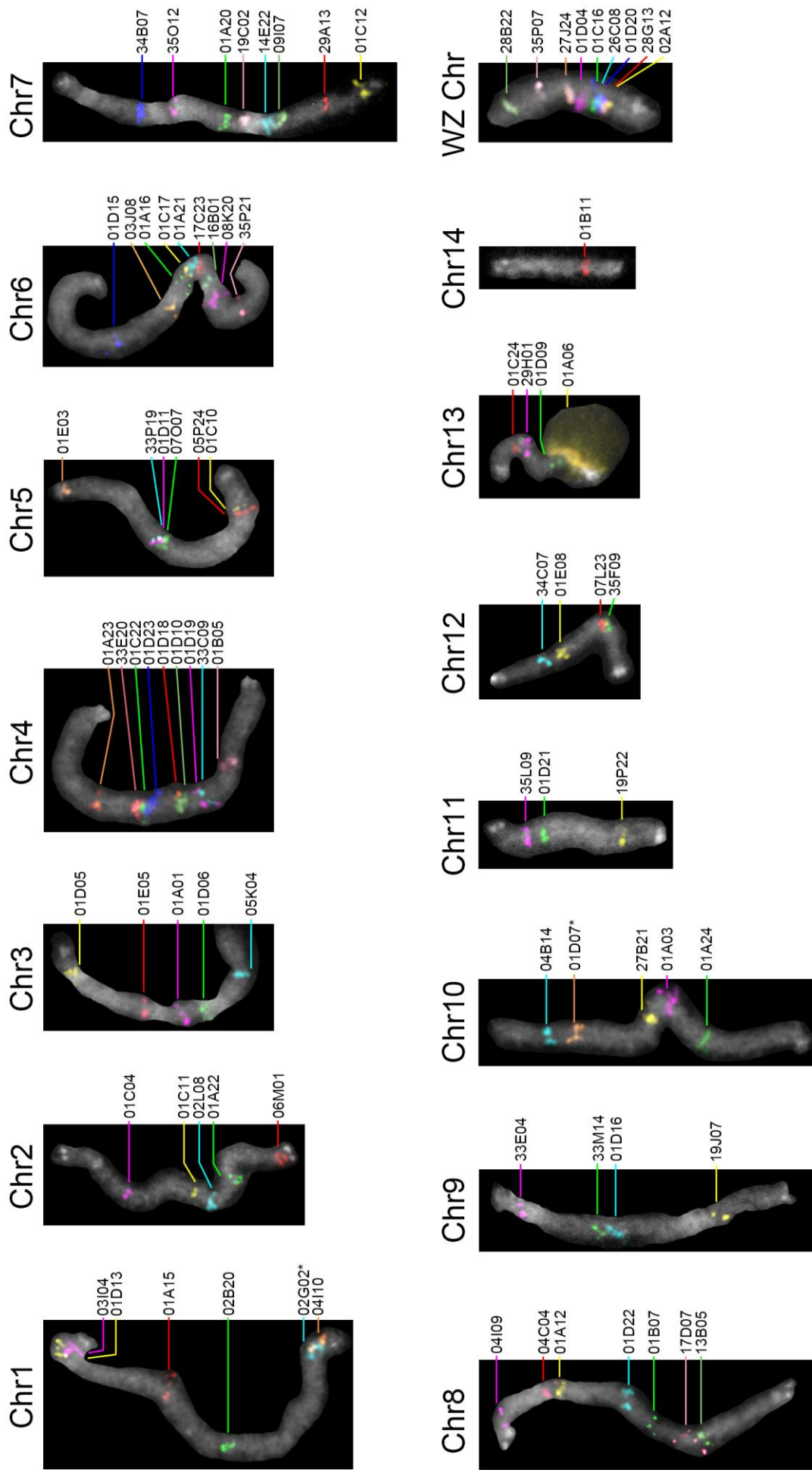
---



## 結果

BAC-FISH マッピングにより、85 BAC プローブ(Tables 2.35)をオオモンシロチョウ染色体上にマッピングできた(Fig. 2.9)。このデータと Table 2.33, 2.34 ならびに 2.39 にまとめられたオオモンシロチョウとカイコの染色体上におけるオルソログの配置を比較すると、座乗順は大きく異なった。一方、両種の Z 染色体同士と、オオモンシロチョウ第 13 染色体(*Pb* Chr13)とカイコ第 24 染色体(*Bm* Chr24)の間に、対応関係が認められた。ただし例外として、*Bm* Chr2 に座乗する *invected* のオルソログが、オオモンシロチョウ染色体では性染色体の端に座乗し、また、*Bm* Chr11 に座乗する NOR は *Pb* Chr13 に座乗する。つまり、他の常染色体においては、部分的な対応領域はあるものの、ほとんどのオルソログの座乗染色体は異なり、両者の染色体対応はごく僅かな領域の細切れであった。

オオモンシロチョウ BAC プローブは、モンシロチョウ染色体にクロスハイブリダイゼーションするため、上記 85 BAC クローンのうち 54 BAC-DNA と *pierisin* を含む 09I07 をプローブとしてモンシロチョウ染色体に FISH マッピングした(Fig. 2.10, Table 2.36)。当初、モンシロチョウ第 13, 15 ならびに 25 染色体に座乗する BAC が存在しないと判明した。これらの染色体を同属別種のエゾスジグロシロチョウの配列情報(Hill *et al.*, 2019)と照らし合わせた結果、*P. napi* Scaffold Chromosome 13 (*Pn* Chr13), Chr15 および 25 に対応するモンシロチョウ染色体に BAC-FISH マッピングできていなかった。そこで、これら 3 染色体に座乗する Gene Model の配列データを任意に選択し、ゲノムが公開されているシロチョウ科昆虫 3 種の配列情報を元にプライマーを設計し(Table 2.37)、5 BAC クローンを選抜した(Table 2.39)。そのうち、*Pn* Chr13 に対応する 04I10 ならびに *Pn* Chr15 に対応する 04B14 について、マーカーとして選抜した 02G02 と 01D07 とともに FISH をした結果、想定通りそれぞれモンシロチョウ第 13 染色体と第 15 染色体にマッピングされた(Fig. 2.10)。さらに再精査の結果、内藤 (2009)ではモンシロチョウ第 10 染色体にマップされていた 02B20 が、正しくは第 13 染色体にマップされることを確認した。一方で *Pn* Chr25 に対応する 3 BACs (17C23, 16B01, 08K20)は、*Pn* Chr22 に対応する 2 BACs (01C17, 01A21)と共にモンシロチョウ第 25 染色体に座乗することが確認された(Figs. 2.9, 2.10)。そこで *Pn* Chr22 と *Pieris* 属 2 種の染色体をより網羅的に対応付けするために、上記と同様の手順でプライマーを追加で設計し、*Pn* Chr22 に対応する 2 BAC クローン(17D07, 13B05)を新たにスクリーニングした(Table 2.39)。FISH の結果、これらはオオモンシロチョウ第 8 染色体ならびにモンシロチョウ第 22 染色体に座乗した。また、マッピング結果の再精査のために、*Pn* Chr3 に対応する 04I09 をスクリーニングした。これは想定通りオオモンシロチョウ第 8 染色体ならびにモンシロチョウ第 3 染色体にマッピングされた(Figs. 2.9, 2.10)。



**Figure 2.9** BAC-FISH mapping in *Pieris brassicae* chromosomes. Eighty-one BACs including orthologs of *Bombyx mori* genes and 2 BACs including *piersin* or rDNA sequences mapped on *P. brassicae* pachytene chromosomes ( $n=15$ ). We have not determine the carrying sequence in the 2 asterisked BACs (02G02 and 01D07). Individual images of chromosome bivalents were obtained from different pachytene nuclei, therefore relative chromosome lengths were different. BAC codes (see Tables 2.34, 2.35) were shown in right of the pictures.





## 考察

本節では、先行研究の結果を精査することで、オオモンシロチョウ染色体が従来のカイコ型の染色体構成から大きく変化している研究結果をより確かなものとした(Tables 2.33, 2.34, Fig. 2.9)。この結果は、最近発表されたエゾスジグロシロチョウの報告と一致する(Hill *et al.*, 2019)。本研究では、クロスハイブリダイゼーションによるモンシロチョウ染色体との細胞遺伝学的な比較解析により、モンシロチョウ全染色体を誤りの無い BAC クローンで標識し、オオモンシロチョウと対応づけることができた(Table 2.36, Fig. 2.10)。この結果は、オオモンシロチョウとモンシロチョウ染色体が対応関係を持つこと、ひいては、エゾスジグロシロチョウとも対応関係があることを示す。最新の分子系統解析(Okamura *et al.*, 2019)を参照すると、オオモンシロチョウ染色体は、モンシロチョウとエゾスジグロシロチョウとの共通祖先種における融合によって生じたと推測できる。本節の結果は、今後のシロチョウ科の染色体進化研究において重要な基盤知識となるだろう。

本研究では、*Pieris* 属の遺伝子配置に保存性がある仮説を利用して、未標識のモンシロチョウ第 13 ならびに 15 染色体を検出する新規 BAC クローンを特定した(Table 3.39)。染色体上の座乗位置のみが決定している 2 BAC クローンをアンカーとして用いることで、新規 BACs が座乗しているモンシロチョウ染色体を速やかに特定することができた(Fig. 2.10)。一方で、モンシロチョウ第 25 染色体を特定するために *Pieris napi* Scaffold Chromosome 25 (*Pn* Chr25)に座乗する遺伝子を含む 17C23, 16B01, 08K20 をモンシロチョウ染色体に FISH した結果、予想に反して *Pn* Chr22 に座乗する遺伝子を含む 01C17, 01A21 と同じ第 25 染色体に座乗した(Fig. 2.10)。そこで *Pn* Chr22 より追加でプライマーを設計し、2 BAC クローンを FISH したところ、これらはモンシロチョウ第 22 染色体に座乗した(Fig. 2.10)。この結果は、上記のオオモンシロチョウ染色体がモンシロチョウとエゾスジグロシロチョウとの共通祖先種における 10 回の染色体融合によって生じた仮説に反する。エゾスジグロシロチョウゲノムのミスアセンブリや、転座している遺伝子を偶然選んでしまった可能性も捨てきれないことから、エゾスジグロシロチョウゲノム情報との詳細な比較や、さらなる FISH 解析が喫緊の課題となる。

## 第4節 シロチョウ2種ゲノムデータとの比較

第3節では、オオモンシロチョウ染色体の FISH マッピング結果を再精査し、カイコとの比較を行った。また、オオモンシロチョウとモンシロチョウの染色体は、前者の長い 10 染色体のそれぞれにモンシロチョウの 2 染色体ずつが対応することを示した(Fig. 2.10)。最近の研究で、オオモンシロチョウと同属別種の近縁種であるモンシロチョウ(*Pieris rapae*, n=25)とエゾスジグロシロチョウ(*Pieris napi*, n=25)のゲノムデータが公開された(Shen *et al.*, 2016; Nallu *et al.*, 2018; Hill *et al.*, 2019)。オオモンシロチョウ染色体は、*Pieris* 属で唯一 n=15 であり、染色体数の変化に伴う染色体構成の変化は、進化の観点から興味深い題材である。そこで本節では、オオモンシロチョウのマッピングに用いた BAC の内部配列とこれらゲノムデータの公開された 2 種との配列情報を比較することで、*Pieris* 属内での遺伝子配置の保存性について議論する。

さらに第3節において、*Pn* Chr22 に座乗する遺伝子を含む 01C17, 01A21 が、*Pn* Chr25 に座乗する遺伝子を含む BAC と共に、モンシロチョウ第 25 染色体に座乗することが確認された。本節ではこれらの BAC をエゾスジグロシロチョウならびにその近縁種に FISH することで、改めてエゾスジグロシロチョウの遺伝子配置を確認した。

## 材料および方法

### 1. 供試昆虫

本研究に用いたオオモンシロチョウ(*Pieris brassicae*)ならびにモンシロチョウ(*P. rapae*)は、第 II 章第 3 節に記載した通りである。エゾスジグロシロチョウ(*P. napi*)は、2010 年 5 月にチェコ共和国 České Budějovice にて岩手大学 佐原健博士が染色体標本作製したものを使用した。また、2009 年 8 月に北海道札幌市で佐原健博士が染色体標本作製した *P. napi*-like species (※)も同様に使用した。

(※)最近の研究で、北海道産のエゾスジグロシロチョウがヨーロッパの集団と別種である説が提唱されている(Tadokoro 2015; 小田, 2016; 2018)。しかしながら、その種名や分類については現在議論が行われている最中であることから、本論文では *Pieris napi*-like と記載した。

### 2. 40 BAC クローンのシーケンス

FISH マッピング結果をベースにした BAC セレクション法(福田, 2014; 大野, 2017)により選抜されている 40 BAC クローン(Table 2.34 参照)は、以下の方法でシーケンス済である。

すべての BAC clone を混ぜた 1 つの HiSeq 用シーケンスライブラリを作成し、Illumina HiSeq 2000 sequencing system (101 bp paired-end)によるシーケングを Eurofins Genomics

(Tokyo, Japan)に委託して行なった。Raw read data を Trimmomatic 0.32 (Bolger *et al.*, 2014)でクリーニングした。BWA 0.6.1-r104 (Li and Durbin, 2009)で pCC1BAC vector (GenBank: EU140750)にマッピングを行い、マップされたものを除去した。それを SOAPdenovo2 2.04 (Luo *et al.*, 2012)で k-mer size 87 bp で *de novo assemble* を行った。ここまでの解析は、農研機構 上樂明也博士に依頼した。生成したコンティグ配列と各 BAC clone の対応は、BAC-end sequence data もしくは *de novo assemble* した配列データより設計したプライマーペアを用いて、PCR にて特定した。この手順は農研機構 安河内祐二博士に依頼した。

### 3. BAC クローン内部配列の BLAST 解析

80 BACs (Tables 2.33, 2.34 参照)の内部配列に含まれるオオモンシロチョウ CDS 情報をクエリーに、Lepbase (<http://lepbase.org/>)のシロチョウ科昆虫 2 種(エゾスジグロシロチョウ、モンシロチョウ)に対して blastn 検索を行った。

### 4. エゾスジグロシロチョウ染色体の FISH (fluorescence in situ hybridization)

第 II 章第 2 節に記述した方法に従って行った。プローブとして用いた BAC クローンと標識に用いた dye は、Table 2.40 に示した。

### 5. リプローブ FISH

第 II 章第 2 節材料および方法の 9. 5)に記載の方法を用いてリプローブ FISH を行った。

Table 2.40 *Pieris brassicae* BAC probe information used for BAC-FISH (Fig. 2.12) in *P. napi* and *P. napi*-like species

<i>P. brassicae</i> BAC code	FISH probe dye (pseudocolor)	<i>P. napi</i> Scaffold Chromosome / modScaffold	<i>P. napi</i> Chromosome (FISH)
01C17	O (yellow)	22	25
01A21	G (cyan)	22	25
17C23	G <sup>a</sup> (red)	25	25
16B01	Cy5 (yellow green)	25	25
08K20	Cy5 <sup>a</sup> (magenta)	25	25
35P21	O <sup>a</sup> (pastel magenta)	40_1	25

a: reprobated FISH

## 結果

オオモンシロチョウの内部配列に含まれる CDS をエゾスジグロシロチョウならびにモンシロチョウオルソログ(Gene ID)に対応づけた。それぞれの情報に加えてカイコのオルソログ情報を Table 2.41 にまとめた。さらに、オオモンシロチョウの BAC-FISH マッピング結果 (Fig. 2.9) を、エゾスジグロシロチョウのゲノムデータに対応づけた図を作成した (Fig. 2.11)。エゾスジグロシロチョウの Scaffold chromosome 25 本のうち、22 本について、オオモンシロチョウ染色体と 2 BACs 以上で対応づけられた (Fig. 2.11)。残りの 3 本には、それぞれ 1 BACs ずつが対応づけられた。これらの結果より、エゾスジグロシロチョウ染色体は、カイコ染色体との対応関係も遺伝子配置の保存性もなかった一方で、シロチョウ科 3 種では遺伝子配置まで広く保存されていることが確認された。

第 3 節でモンシロチョウ第 25 染色体に座乗した、*Pn* Chr22, 25 ならびに *Pn* modScaffold 40\_1 に座乗する遺伝子のオルソログを含む BAC クローンを、実際のエゾスジグロシロチョウ染色体に FISH マッピングした (Fig. 2.12)。01C17, 01A21 を含む全ての BAC クローンは *Pn* Chr25 に単一シグナルを示し、ゲノムアセンブリ情報とは異なる結果となった。このゲノム情報とは異なる遺伝子配置は、北海道産の *P. napi*-like splices についても同様であった (Fig. 2.12)。

## 考察

ゲノム解析情報の比較からエゾスジグロシロチョウとモンシロチョウの 2 種間では、染色体間にコリニアリティーが確認されている (Nallu *et al.*, 2018; Hill *et al.*, 2019)。本節では、FISH マッピング結果との比較により、オオモンシロチョウ染色体がエゾスジグロシロチョウならびにモンシロチョウと同様の遺伝子配置を持つことが確認された (Table 2.41, Fig. 2.11)。特にエゾスジグロシロチョウとの比較では、25 本全ての染色体をマッピングデータと対応づけることができた。これらの結果より、オオモンシロチョウ染色体は、それらの共通祖先種の単純な切断あるいは融合により成立したと推測される。これら 3 種の分子系統関係を種の系統関係に置き換えることができれば、共通祖先種から最初にエゾスジグロシロチョウが分化し、その後オオモンシロチョウとモンシロチョウの種分化が起こった推定される (Okamura *et al.*, 2019)。したがって前項の考察通り、オオモンシロチョウ染色体は、2 染色体が融合した 10 組の染色体変異によって  $n=15$  が成立した可能性が高い。

しかしながら、詳細にオルソログの座乗関係を調査すると、いくつかの例外が染色体マッピング結果から確認された (Fig. 2.11)。エゾスジグロシロチョウ第 22 染色体 (*Pn* Chr22) に座乗する遺伝子のオルソログを持つ 4 オオモンシロチョウ BAC クローンのうち、17D07 と 13B05 がオオモンシロチョウ第 8 染色体 (*Pb* Chr8) に座乗する一方で、01C17 と 01A21 は *Pb*

Chr6 に座乗した。モンシロチョウのゲノム情報でも、これら 4 BACs のうち 01C17 と 01A21 は ScG6Pog\_4、17D07 が ScG6Pog\_87、13B05 が ScG6Pog\_346 にそれぞれ別々に対応している (Table 2.41)。さらに FISH マッピングより 17D07 と 13B05 がモンシロチョウ第 22 染色体 (*Pr* Chr22) に座乗する一方で、01C17 と 01A21 は *Pr* Chr25 に座乗したことから、エゾスジグロシロチョウ染色体特異的なリアレンジメント、あるいはアセンブリミスが疑われた (Fig. 2.10)。そこで、エゾスジグロシロチョウ染色体にオオモンシロチョウ BAC の FISH マッピングを行ったところ、01C17 と 01A21 はゲノムデータ上での遺伝子配置と異なり、*Pn* Chr25 に対応する BAC と共にマップされた (Fig. 2.12)。したがって、01C17 と 01A21 の対応する領域が、Hill *et al.* (2019) のエゾスジグロシロチョウゲノムのアセンブリミスである可能性が高い。エゾスジグロシロチョウでは、この他にも、35P21 のもつオルソログが modScaffold 40\_1 に座乗しており、染色体上にマッピングできていなかった。本研究の FISH 結果より、modScaffold 40\_1 の少なくとも 35P21 のもつオルソログ周辺について、*Pn* Chr25 にマップされることが明らかとなった (Fig. 2.12)。これら *Pn* Chr25 に座乗した 6 BAC クローン (01C17, 01A21, 17C23, 16B01, 08K20, 35P21) は、オオモンシロチョウ、モンシロチョウおよび *Pn*-like species でも同様の配置になったことから、*Pieris* 属においてこれらの座乗遺伝子オルソログ配置が保存されていることが示唆された (Fig. 2.12)。

オオモンシロチョウ Z 染色体に座乗する 35P07 の内部配列は、*Pn* Chr23 の遺伝子オルソログであった。一方、モンシロチョウオルソログは、ゲノムデータと FISH マッピングどちら結果においても Z 染色体上に座乗していた (Table 2.41, Fig. 2.10)。したがって、エゾスジグロシロチョウ特異的なリアレンジメントがあったのかもしくは、Hill *et al.* (2019) のアセンブリミスが疑われる。エゾスジグロシロチョウでは、この他にも、28G13 と 02A12 のもつオルソログが modScaffold 95\_1 に座乗しており、染色体上にマッピングできていなかったが、モンシロチョウでは全て ScG6Pog\_27 に座乗していたことから、シロチョウ科 3 種では *invected* を含む Z 染色体の座乗遺伝子オルソログ間に配置保存性が示唆された。

01A01\_A (*Pb* Chr3, Fig. 2.11) は、エゾスジグロシロチョウトランスクリプトームデータに対する blastn 解析では、No hit であった。しかし、エゾスジグロシロチョウのゲノムアセンブリデータに blastn を行うと、*Pn* Chr12 上の配列に hit する。BAC シグナルが *Pb* Chr3 上で隣接する 01D06 の CDS はすべて、オオモンシロチョウ scaffold 95 のオルソログであることから、双方のオルソログは、*Pn* Chr12 に座乗すると推察された。

先行研究より、オオモンシロチョウ第 1-10 染色体は、モンシロチョウ 2 本ずつの染色体が、それぞれ 1 本に融合した形となっていると示唆されてきた。この仮説を元に考えると、*Pn* Chr22 はオオモンシロチョウ第 8 染色体 (*Pb* Chr8) の下部分に対応することに齟齬はない (Fig. 2.11)。実際に、*Pb* Chr8 に座乗する 17D07 ならびに 13B05 に含まれる遺伝子のオルソログは、*Pn* Chr22 の約 2.2-3.2 Mb に座乗している。一方で、アセンブリミスが示唆された 01C17 と 01A21 に含まれる遺伝子のオルソログは *Pn* Chr22 の約 4.6~5.1 Mb に座乗し、それより下流については対応付けができていない (Fig. 2.11, Table 2.41)。*Pn* Chr22 がオオモンシ

ロチョウ第 8 染色体およびモンシロチョウ第 22 染色体と対応することは、それぞれの染色体における 17D07 と 13B05 の座乗位置から蓋然性が高いが、マッピングしていない領域が予想外の位置に対応する可能性も留意すべきだろう。BAC が 1 つしか獲得できなかった *Pn* Chr15, 20, 24 も含め、今後 BAC-FISH マーカーを増やすことで対応関係の解明を目指したい。さらに、これら 3 種の染色体の向きや、種間での逆転を観察するためには、各染色体に 3 カ所のマーカーが必要であることから、今後ゲノムデータを利用したさらなるマーカーの拡充が求められるかもしれない。

配列決定した 40 BAC クローンのうち、34 BAC クローンが 2 つ以上の CDS を含んでいた (Table 2.41)。それらのカイコ遺伝子オルソログを確認すると、そのうち 27 BAC クローンは、全てのカイコオルソログが 1 Mb 以内に座乗していた。残りの 7 BAC クローンのうち、01A20, 01A22, 01B11, 01D09 ならびに 01D18 の 5 つが、カイコでは 1 Mb 以上の遺伝子間距離があるオルソログと一緒に含んでいた (Table 2.42)。一方、シロチョウ科 2 種ではこれらの CDS のオルソログは、エゾスジグロシロチョウで最大 80.1 kb、モンシロチョウで最大 23.9 kb 以内に座乗していた (Table 2.42)。オオモンシロチョウで隣接しているこれらの CDS のオルソログは、シロチョウ科 2 種でも最大 3 つの Gene Model を挟んで隣接していた。対照的に、カイコではこれら CDS のオルソログ間に最少で 72 の Gene Model が存在した (Table 2.42)。

残る 2 BAC クローン (01D06, 01D23) のうち 01D06 の CDS のカイコオルソログは、異なる染色体上に分かれて座乗した (Table 2.42)。エゾスジグロシロチョウとモンシロチョウでは、すべてのオルソログが *Pn* Chr12 と ScG6Pog\_95 にそれぞれ座乗しており、シロチョウ科 3 種で共通する染色体配置であると推測できる。01D23 に含まれる CDS (01D23\_A~H) のカイコオルソログは、*Bm* Chr10, 20, 12 および 8 に座乗する。エゾスジグロシロチョウでは 01D23\_A~D が Chr 9 に、01D23\_E~H が modScaffold 90\_1 に座乗、モンシロチョウでも、01D23\_A~D が ScG6Pog\_60 に、01D23\_E~H が ScG6Pog\_38 に座乗した (Table 2.42)。これらの結果から、少なくとも 01D23\_E~H までは、シロチョウ科 3 種で保存されていることが確認された。一方、エゾスジグロシロチョウとモンシロチョウでは 01D23\_A~D は別染色体に座乗する可能性がある。興味深いことに、オオモンシロチョウ染色体で 01D23 に隣接する 01D18 に含まれる CDS のオルソログは、エゾスジグロシロチョウでは *Pn* Chr14 に、モンシロチョウでは ScG6Pog\_38 に座乗する (*Pb* Chr4, Fig. 2.11, Table 2.42)。01D23\_E から H がモンシロチョウにおいて ScG6Pog\_38 に対応することから、01D23\_E から H に対応するエゾスジグロシロチョウ modScaffold 90\_1 は、*Pn* Chr14 にマップされる可能性が推測される。01D23 は、*Pb* Chr4 の中央に座乗し、01D23\_A から D は *Pn* Chr9 の染色体末端にオルソログが存在する (Fig. 2.11)。これらの結果は、01D23 がオオモンシロチョウで融合した染色体領域であることを強く示唆する。01D23 BAC-DNA プローブの FISH シグナルが *Pr* Chr7 と 8 ならびに *Pn* Chr9 と 14 の染色他末端に認められる可能性について検証する必要がある。

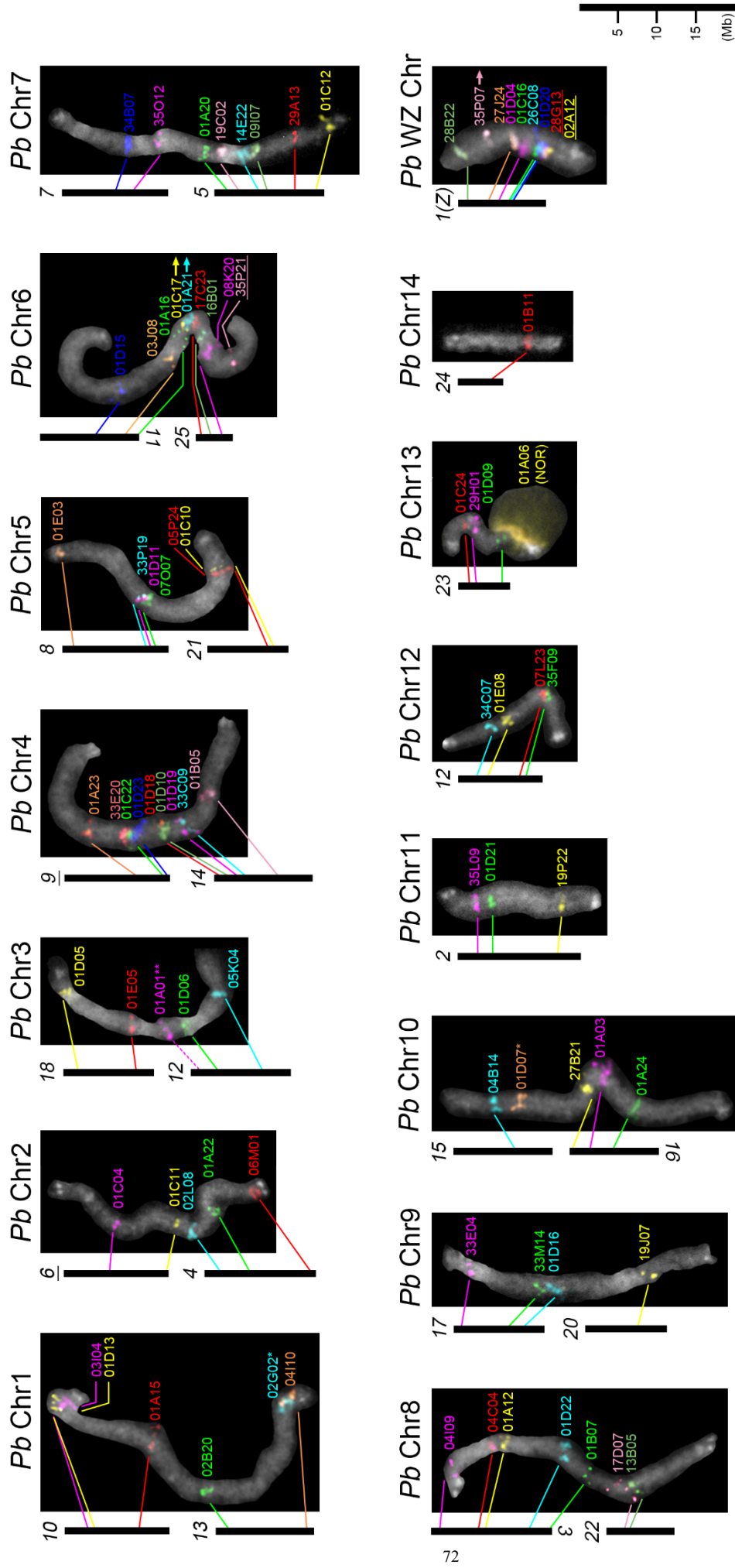
*Pb* Chr3 にマップされた 01E05 (Fig. 2.11) について、01E05\_A~E のオルソログがエゾスジグロシロチョウにおいて *Pn* Chr18 に座乗する一方で、01E05\_F のオルソログは *Pn* Chr4 に

所属した(Table 2.41)。モンシロチョウでは、No hitであった 01E05\_C を除いて、全てのオルソログが同一 scaffold に座乗していた。よって、01E05\_F オルソログの *Pn* Chr4 に所属は、エゾスジグロシロチョウ特異的な転座か、もしくはアセンブリミスであると考えられる。*Pb* Chr7 にマップされた 01C12 (Fig. 2.11) の CDS オルソログについて、モンシロチョウでは複数の小さな scaffold に分散して対応したが、エゾスジグロシロチョウでは 01C12\_C を除いて全て *Pn* Chr5 に対応していた。エゾスジグロシロチョウの modScaffold 437\_1 は、*Pn* Chr4 に内包され、モンシロチョウの対応 scaffolds はひとつにアセンブルできるのかも知れない。

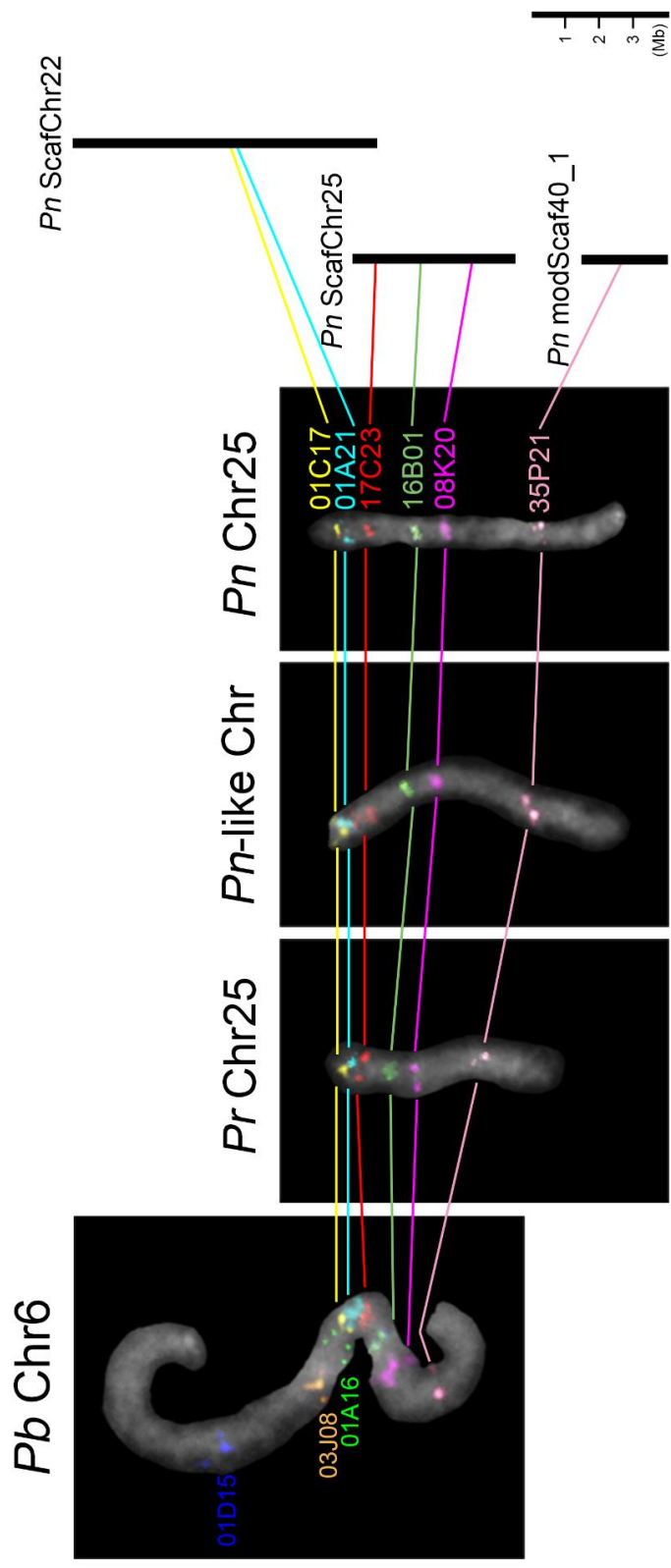
本研究でオオモンシロチョウ染色体に FISH マッピングを行わなかった BAC についても同様に、シロチョウ科 2 種との対応関係を確認した。これらについてもマッピングを進めることが最善ではあるが、対応するエゾスジグロシロチョウの染色体番号から推測すると、既に十分量のマッピングがされている部分に座乗することが予測されるため、重要度は低い (Table 2.41)。しかし前述のように、オオモンシロチョウ BAC と FISH マッピングやクロスハイブリダイゼーションマッピングを介してエゾスジグロシロチョウとオオモンシロチョウゲノムデータのさらなる連結に寄与するならばマッピングを行ってもよい。

本研究で行った BAC の内部配列間の比較では、カイコオルソログ間にもオオモンシロチョウとのマイクロシンテニックな関係は認められた。これらの結果は、Hill *et al.* (2019) の主張する、シンテニックブロック単位での大きなリアレンジメントがシロチョウとカイコの間に認められるとの結果を支持する。今後、BAC-FISH マッピングによるマクロな比較と、BAC の内部配列を利用したミクロな比較の双方から、 $n=25$  のシロチョウ類からの  $n=15$  のオオモンシロチョウの染色体進化の詳細を検討したい。また、多くのチョウ目昆虫の染色体構成を代表するカイコ型染色体とは異なる「シロチョウ型」の染色体構成が現れた起源ならびにその影響について注目していきたい。いずれもアブラナ科作物の重要害虫であるシロチョウ科 3 種に、害虫化をもたらした特異的な遺伝子や遺伝子配置の変更があったのか注目に値する。





**Figure 2.11** Comparison of individual chromosomes in *Pieris napi* and *P. brassicae*. Black bars and numbers represent *P. napi* chromosome information. Black ruler show *P. napi* chromosome length. Individual images of chromosome bivalents were obtained from different pachytene nuclei, therefore relative chromosome lengths were different. *P. brassicae* BAC codes were shown in right of the pictures. Underlined BACs do not assign *Pn* Chr but modScaffolds. \*: BACs with no sequence information; \*\*: no gene hit as *P. napi* orthologs. 01C17 and 01A21 contain some orthologs located on *P. napi* chromosome 22. 01A06 BAC carries rDNA repeats that compose NOR (nucleolar organizer region).



**Figure 2.12** Chromosomal comparison of four *Pieris* species (*Pieris brassicae*, *P. rapae*, *P. napi* and *P. napi*-like species) by BAC-FISH. Black bars and numbers represent *P. napi* scaffold chromosome or modScaffold information. Black ruler show *P. napi* scaffold length. *Pn*-like: Related species of *P. napi* collected in Hokkaido.

Table 2.41 Coding sequences (CDS) in *Pieris brassicae* BAC clones compared with orthologs in *Pieris napi*, *Pieris rapae* and *Bombyx mori*.

<i>Pieris brassicae</i>				<i>Pieris napi</i>				<i>Pieris rapae</i>				<i>Bombyx mori</i>			
BAC code	Chr	DDBJ accession #	CDS	GeneID: PIENAPG	Chr/Mod-Scaffold	Position	GeneID: PIERAPG	ScG6Pog	Position	Gene ID: KWMTBOMO	Chr	Position			
03I04	1	LC505738	03I04	00000002859	10	3,050,298..3,053,961	00000009457	26	2,744,523..2,747,864	13922	23	13,682,392..13,686,507			
			01D13_A	00000004625	10	4,105,827..4,128,376	00000012659	26	3,747,349..3,767,538	13976	23	15,192,807..15,213,521			
		AP017495	01D13_B	00000012740	10	4,132,786..4,135,948	00000004287	26	3,768,369..3,768,958	13979	23	15,239,176..15,243,776			
			01D13_C	00000012740	10	4,132,786..4,135,948	00000008024	26	3,783,809..3,786,374	13979	23	15,239,176..15,243,776			
			01D13_D	none			00000001553	26	3,776,166..3,782,742	13980	23	15,246,357..15,255,411			
01D13	1	AP017496	01D13_E	00000007408	10	4,153,367..4,165,770	00000000165	26	3,792,530..3,795,621	13982	23	15,276,387..15,306,538			
			01D13_F	00000005988	10	4,166,213..4,170,516	none			13983	23	15,310,847..15,320,653			
		AP017497	01D13_G	00000007702	10	4,181,415..4,185,392	00000001342	26	3,818,679..3,822,396	13985	23	15,333,101..15,339,266			
			01D13_H	00000003389	10	4,178,341..4,181,072	00000000474	26	3,815,921..3,818,365	13984	23	15,329,627..15,332,429			
		AP017498	01D13_I	00000004173	10	4,196,068..4,200,918	00000004993	26	3,830,763..3,832,969	13988	23	15,357,360..15,361,916			
01A15	1	AP017475	01A15_A	00000004782	10	9,852,152..9,864,153	00000011457	164	3,267,913..3,281,500	14371	24	3,781,636..3,810,416			
02B20	1	LC505715	02B20	00000006972	13	1,866,746..1,873,018	00000011258	172	1,643,329..1,648,761	05553	10	5,001,072..5,005,732			
04I10	1	none		00000005871	13	12,041,655..12,044,246	00000014868	30	7,182,525..7,185,832	14969	25	1,212,284..1,214,211			
01C04	2	AP017483	01C04_A	none			00000014293	69	3,822,033..3,825,853	10894	18	6,172,692..6,176,570			
			01C04_B	00000006667	6	5,728,887..5,730,224	00000005082	69	3,815,142..3,820,754	10893	18	6,163,461..6,171,371			
			01C11_A	00000008873	6	13,643,953..13,647,162	00000006018	68	77,594..90,559	08497	14	10,842,395..10,863,463			
		AP017486	01C11_B	00000011272	6	13,631,266..13,634,175	00000006445	68	95,114..97,987	08495	14	10,823,826..10,832,583			
			01C11_C	00000013296	6	13,620,393..13,623,584	00000004129	68	102,510..104,820	08493	14	10,814,104..10,815,444			
			01C11_D	00000004979	6	13,609,194..13,618,516	00000007168	68	104,997..112,201	08492	14	10,805,114..10,813,085			
01C11	2		01C11_E	00000010540	6	13,606,976..13,614,462	00000010311	444	358..6,342	08489	14	10,748,516..10,763,293			
		AP017487	01C11_F	none			00000003232	78	133,519..134,165	08488	14	10,741,414..10,742,178			
			01C11_G	none			none			08487	14	10,732,384..10,733,484			
			01C11_H	00000010080	6	13,588,009..13,590,957	00000003582	68	133,409..139,469	08469	14	10,446,237..10,469,501			
		AP017488	01C11_I	00000012910	6	13,553,876..13,571,609	00000013531	68	156,086..173,998	08468	14	10,360,747..10,363,468			
02L08	2	LC505723	02L08	00000007309	4	2,371,546..2,374,939	00000003173	33	2,052,047..2,055,710	08642	15	1,519,699..1,522,872			
			01A22_A	00000011294	4	5,936,925..5,939,358	00000014907	128	2,055,510..2,095,338	15469	26	60,746..121,647			
			01A22_B	00000001184	4	5,954,714..5,961,528	00000014907	128	2,055,510..2,095,338	15469	26	60,746..121,647			
01A22	2	AP017480	01A22_C	00000004676	4	5,983,233..5,985,958	none			15468	26	46,566..54,385			
			01A22_D	00000008791	4	5,989,499..5,992,436	00000010445	128	2,099,447..2,104,869	15467	26	41,456..45,483			
			01A22_E	00000012895	4	5,994,241..5,997,944	00000005925	128	2,105,725..2,109,386	15618	26	4,301,832..4,302,758			
06M01	2	LC505714	06M01	00000010419	4	14,235,192..14,238,173	00000010437	128	9,072,468..9,075,636	05355	9	15,413,065..15,416,485			

01D05	3	AP017502	01D05_A	00000013286	18	1,204,704..1,206,500	00000007146	104	1,253,083..1,255,695	06871	11	18,057,736..18,059,752
			01D05_B	00000001247	18	1,209,542..1,226,430	00000001368	104	1,258,370..1,296,878	06872	11	18,067,334..18,071,815
			01D05_C	00000003397	18	1,272,495..1,275,615	00000000997	104	1,301,204..1,346,680	06873	11	18,137,675..18,155,032
			01D05_D	00000006422	18	1,315,105..1,316,712	00000012790	104	1,344,006..1,345,553	06874	11	18,193,293..18,194,797
			01D05_E	00000000697	18	1,317,888..1,320,774	00000008467	104	1,346,938..1,347,450	06879	11	18,220,913..18,222,502
			01D05_F	00000007718	18	1,320,433..1,330,742	00000009792	104	1,350,750..1,361,289	06878	11	18,212,037..18,219,742
			01E05_A	00000004118	18	9,768,634..9,776,386	00000002140	9	6,132,682..6,137,060	04678	8	12,019,635..12,024,648
			01E05_B	00000001731	18	9,778,472..9,792,343	00000011455	9	6,139,053..6,166,929	04679	8	12,028,182..12,037,598
			01E05_C	00000010539	18	9,796,476..9,799,438	none			04680	8	12,047,756..12,051,268
			01E05_D	00000002091	18	9,799,614..9,802,668	00000010839	9	6,148,615..6,183,325	04681	8	12,052,169..12,073,632
			01E05_E	00000002888	18	9,824,609..9,827,026	00000010839	9	6,148,615..6,183,325	04681	8	12,052,169..12,073,632
			01E05_F	00000004395	4	5,190,727..5,198,098	00000009003	9	6,193,041..6,215,179	04684	8	12,116,109..12,126,797
			01A01_A	none	12		00000011278	95	4,663,163..4,765,628	09977	16	13,822,922..14,001,590
			01D06_A	00000007745	12	3,442,427..3,456,765	00000013514	95	2,308,888..2,314,931	09597	16	5,033,119..5,058,605
			01D06_B	00000001143	12	3,457,921..3,459,310	00000014638	95	2,306,928..2,308,337	09598	16	5,060,089..5,061,045
			01D06_C	00000006130	12	3,458,975..3,464,107	00000012990	95	2,290,707..2,306,723	09599	16	5,064,617..5,093,858
			01D06_D	00000007658	12	3,465,374..3,482,381	00000012990	95	2,290,707..2,306,723	09599	16	5,064,617..5,093,858
			01D06_E	00000000747	12	3,483,088..3,485,225	00000011899	95	2,288,199..2,290,317	09600	16	5,093,989..5,096,129
			01D06_F	00000012051	12	3,485,422..3,493,866	00000006493	95	2,284,220..2,288,072	09601	16	5,102,493..5,139,158
			01D06_G	00000007842	12	3,507,962..3,509,256	00000007442	95	2,269,051..2,271,242	10333	17	7,804,077..7,807,342
05K04	3	LC505713	05K04	00000008541	12	9,400,887..9,406,150	00000001389	291	506,837..522,072	04175	7	12,891,332..12,900,916
			01A23_A	00000011330	9	8,431,983..8,447,889	00000007951	77	6,510,933..6,523,039	10595	17	14,942,388..14,949,536
			01A23_B	00000005967	9	8,428,418..8,431,709	00000013872	77	6,507,443..6,511,668	10596	17	14,962,917..14,966,610
			01A23_C	00000005007	9	8,422,551..8,424,216	00000008259	77	6,503,192..6,506,576	10597	17	14,967,958..14,970,966
33E20	4	LC505719	33E20	00000002164	901_1	214..1,185	00000012634	169	3,156,597..3,158,753	06575	11(29)	10,821,577..10,827,641
			01C22_A	00000008077	9	13,229,562..13,236,574	00000003487	60	3,203,569..3,271,039	06018	10	16,165,305..16,211,701
			01C22_B	none			none			06017	10	16,156,622..16,158,275
			01C22_C	00000008445	9	13,189,142..13,202,583	00000004584	60	3,185,109..3,192,945	06016	10	16,136,242..16,146,913
			01D23_A	00000004139	9	13,930,393..13,935,520	00000011759	60	3,784,479..3,794,581	06061	10	17,269,425..17,271,564
			01D23_B	00000009676	9	13,936,633..13,940,607	00000001270	60	3,793,986..3,798,897	06064	10	17,280,526..17,295,364
			01D23_C	none			none			06069	10	17,542,269..17,545,084
			01D23_D	00000012290	9	13,985,727..13,986,807	00000007582	60	3,840,036..3,840,958	06070	10	17,560,443..17,561,914
01D23	4	AP017499	01D23_E	00000001651	90_1	653,954..657,259	00000004011	38	1,943,486..1,945,710	11788	20	29,988..53,425
			01D23_F							07093	12	4,051,424..4,075,154
			01D23_G	00000001477	90_1	635,095..642,659	00000012897	38	1,932,923..1,941,075	07093	12	4,051,424..4,075,154
			01D23_H							04234	8	560,192..568,295

01D18	4	AP017552	01D18_A	00000002514	14	1,486,315..1,495,703	00000000562	38	9,323..52,075	07206	12	7,859,647..7,888,937
			01D18_B	00000000361	14	1,474,989..1,476,371	00000007109	38	52,792..55,901	06983	12	1,088,492..1,089,456
			01D18_C	00000010139	14	1,470,692..1,473,260	00000008632	38	56,068..60,980	06985	12	1,093,902..1,096,653
			01D18_D	00000012817	14	1,465,857..1,469,327	00000003642	38	60,784..64,590	06986	12	1,098,900..1,105,221
			01D10_A	00000012793	14	2,169,485..2,171,549	00000009777	155	96,227..99,750	07226	12	8,607,286..8,615,203
			01D10_B	00000001316	14	2,171,735..2,173,411	00000000421	155	96,232..97,761	07227	12	8,618,637..8,619,615
		AP017527	01D10_C	00000009380	14	2,158,059..2,169,686	00000008813	155	99,864..103,025	07225	12	8,599,188..8,603,125
			01D10_D	00000011736	14	2,177,594..2,178,884	00000002889	155	89,196..94,973	07228	12	8,626,426..8,636,125
			01D10_E	00000005862	14	2,180,591..2,184,519	00000001972	155	87,882..90,586	07229	12	8,640,029..8,643,015
		AP017528	01D10_F	none			none			07222	12	8,517,532..8,543,915
			01D10_G	none			none			07222	12	8,517,532..8,543,915
			01D10_H	00000003723	14	2,121,144..2,123,678	00000000291	155	142,051..144,778	07222	12	8,517,532..8,543,915
01D10	4	AP017529	01D10_I	00000013611	334_I	13,626..16,723	00000013908	155	148,273..168,083	07220	12	8,461,891..8,510,955
				0000002438	14	2,111,352..2,113,174	00000013908	155	148,273..168,083		12	
		AP017530	01D10_J	00000003253	14	2,101,479..2,104,007	00000013184	155	170,795..204,406	07220		8,461,891..8,510,955
		AP017531		00000002877	14	2,096,726..2,098,059						
				00000006076	14	2,084,915..2,095,166						
		AP017532	01D10_K	00000005138	14	2,070,691..2,080,207	00000013184	155	170,795..204,406	07220	12	8,461,891..8,510,955
			01D10_L	00000004700	14	2,044,397..2,049,501	00000008697	155	208,542..237,150	07218	12	8,435,906..8,449,220
				00000009226	14	4,284,408..4,294,589	0000004206	61	4,095,641..4,111,883	09324	15	16,028,085..16,050,079
01D19	4	AP017507	01D19_A	00000009226	14	4,284,408..4,294,589	0000004206	61	4,095,641..4,111,883	09324	15	16,028,085..16,050,079
		AP017508	01D19_B	00000011350	147_I	26,604..35,150	00000001987	61	4,128,476..4,132,028	09325	15	16,054,216..16,062,324
33C09	4	LC505726	33C09	00000000691	14	4,668,556..4,671,208	00000006146	61	3,765,124..3,775,542	09300	15	15,448,144..15,451,870
			01B05_A	00000010569	14	8,326,308..8,332,424	00000013696	61	405,695..424,058	none		
			01B05_B	none			00000013696	61	405,695..424,058	01773	4	4,391,139..4,405,848
01B05	4	AP017482	01B05_C	00000009220	14	8,363,721..8,366,135	00000008762	61	378,846..393,905	01774	4	4,411,879..4,421,881
			01B05_D	00000001671	14	8,378,088..8,382,003	00000008815	61	368,711..375,601	01776	4	4,433,259..4,440,042
01E03	5	AP017501	01E03_A	00000013049	8	1,187,389..1,198,852	00000012454	75	2,584,704..2,590,301	04957	9	2,950,633..2,958,383
33P19	5	LC505716	33P19	00000012638	8	10,194,347..10,208,281	00000006512	59	1,756,914..1,771,402	05674	10	7,829,094..7,858,347
			01D11_A	00000005959	8	10,444,927..10,452,723	none			05689	10	8,236,968..8,245,001
			01D11_B	00000004397	8	10,428,603..10,433,112	00000011677	59	1,987,653..2,002,729	05688	10	8,219,772..8,233,639
01D11	5	AP017513	01D11_C	00000007864	8	10,415,053..10,428,562	00000010833	59	1,975,866..1,987,667	05687	10	8,203,985..8,215,001
			01D11_D	00000007239	8	10,404,214..10,405,662	00000006422	59	1,970,221..1,973,483	05684	10	8,180,632..8,182,302
			01D11_E	00000006219	8	10,379,072..10,393,797	00000000196	59	1,955,775..1,958,558	05681	10	8,131,052..8,162,543
		AP017514	01D11_F	none			none			none		
07O07	5	LC505717	07O07	00000004987	8	10,809,387..10,811,241	00000001294	59	2,373,993..2,374,736	05723	10	8,805,486..8,808,995

05P24	5	LC505743	05P24	00000012295	21	7,869,957..7,872,113	00000007351	28	1,463,751..1,465,907	16087	27	8,749,005..8,751,393
		AP017539		00000001009	21	8,312,903..8,322,366	00000005509	28	1,860,547..1,862,810	16075	27	8,225,243..8,227,194
01C10	5	AP017540	01C10_A				00000014682	28	1,867,378..1,871,651	16074	27	8,211,385..8,222,684
		AP017541		00000003182	21	8,323,677..8,327,817	00000009787	28	1,879,418..1,887,776	16073	27	8,203,398..8,208,504
		AP017542										
			01D15_A	00000003337	11	6,182,664..6,195,469	00000003001	72	765,199..780,566	15921	27	2,162,668..2,165,898
		AP017543	01D15_B	00000010385	11	6,176,614..6,179,362	00000011599	72	762,460..768,101	15920	27	2,154,179..2,158,438
				00000011865	11	6,157,502..6,175,137						
		AP017544	01D15_C	00000007918	11	6,149,600..6,155,013						
01D15	6	AP017545		00000002063	11	6,129,908..6,136,081						
		AP017546		00000005117	11	6,120,030..6,125,393						
			01D15_D	00000012312	11	6,085,520..6,093,509	00000009896	72	636,904..682,600	15913	27	1,958,710..2,006,176
			01D15_E	00000004035	11	6,097,102..6,108,110	00000014013	72	683,275..715,070	15912	27	1,913,314..1,956,039
		AP017547	01D15_F	00000004035	11	6,097,102..6,108,110	00000014013	72	683,275..715,070	15912	27	1,913,314..1,956,039
			01D15_G	00000009552	11	6,111,963..6,116,061	00000014013	72	683,275..715,070	15912	27	1,913,314..1,956,039
03J08	6	LC505718	03J08	00000003728	11	2,332,228..2,346,945	00000012628	169	1,526,341..1,541,250	06463	11(29)	7,807,281..7,822,277
01A16	6	AP017476	01A16_A	00000005654	11	579,879..585,665	00000011101	169	537,784..551,041	06397	11	6,342,531..6,357,766
01C17	6	AP017519	01C17_A	00000010157	22	4,904,545..4,907,495	00000013625	4	594,896..600,736	06316	11	4,651,873..4,679,517
		AP017520	01C17_B				none			06316	11	4,651,873..4,679,517
			01A21_A	00000004259	22	4,732,029..4,733,896	00000010554	4	560,208..579,646	06349	11	5,158,097..5,165,319
			01A21_B	00000008205	22	4,739,988..4,749,302	00000005476	4	410,505..481,780	06345	11	5,088,005..5,094,936
			01A21_C	00000013578	22	4,734,377..4,738,376	00000011303	4	467,098..471,024	06346	11	5,096,237..5,101,647
			01A21_D	00000000764	22	4,717,338..4,729,895	none			06345	11	5,088,005..5,094,936
01A21	6	AP017511	01A21_E	00000007971	22	4,701,000..4,713,772	00000010262	4	392,685..399,925	06342	11	5,066,035..5,069,756
			01A21_F	00000009791	22	4,701,000..4,713,772	00000012498	4	387,259..389,591	06341	11	5,057,397..5,065,155
			01A21_G	00000009791	22	4,701,000..4,713,772	00000008600	4	378,451..387,213	06340	11	5,051,007..5,054,727
			01A21_H	00000009791	22	4,701,000..4,713,772	00000008600	4	378,451..387,213	none		
			01A21_I				00000003613	4	358,327..377,732	06337	11	5,024,457..5,033,032
17C23	6	none		00000012591	25	754,973..761,220	00000007364	11	114,330..119,835	06291	11	4,132,261..4,139,282
16B01	6	none		00000006943	25	2,053,430..2,059,252	00000011125	49	1,639,136..1,694,540	06217	11	2,572,043..2,622,340
08K20	6	none		00000006176	25	3,554,522..3,568,491	00000013008	49	512,504..525,526	07945	13	10,802,055..10,820,292
35P21	6	LC505721	35P21	00000011717	40_1	1,153,552..1,155,106	0000001685	23	102,330..103,336	07888	13	9,182,960..9,184,684
34B07	7	LC505724	34B07	00000009179	7	6,742,467..6,762,267	00000009308	7	3,854,328..3,922,781	08778	15	5,035,387..5,035,928
35O12	7	LC505736	35O12	00000003071	7	9,288,750..9,290,285	00000004707	7	1,550,807..1,551,298	13074	22	7,963,772..7,965,583

AP017477	01A20_A	00000007518	5	1,926,226..1,936,037	none	12436	21	3,355,051..3,370,448
AP017478	01A20_B	none			none	12647	21	10,205,265..10,207,697
01A20	01A20_C	00000005040	5	1,937,032..1,954,498	00000004980	12650	21	10,272,295..10,273,447
AP017479	01A20_D	00000005040	5	1,937,032..1,954,498	00000005897	12649	21	10,247,605..10,262,372
01A20	01A20_E	00000005040	5	1,937,032..1,954,498	00000005897	12649	21	10,247,605..10,262,372
19C02	19C02	00000002356	5	3,385,743..3,387,648	00000003775	12483	21	4,792,546..4,796,242
14E22	14E22	00000006828	5	5,628,220..5,635,539	00000004923	12460	21	4,417,937..4,418,422
09I07	AB037676	09I07	5	6,749,844..6,756,398	00000011531	none		
29A13	29A13	00000002166	5	10,556,714..10,557,986	00000006278	12287	20	11,518,093..11,521,394
01C12_A	01C12_A	00000012419	5	13,980,523..13,993,948	00000004016	12215	20	9,591,701..9,647,969
01C12_B	01C12_B	00000006650	5	13,974,724..13,977,389	none	12222	20	9,952,657..9,981,698
AP017505	01C12_C	00000002946	437_1	10,198..12,567	00000008041	12222	20	9,952,657..9,981,698
01C12_D	01C12_D	00000006825	5	13,958,132..13,962,496	00000002958	12242	20	10,307,845..10,318,059
01C12_E	01C12_E	00000011372	5	13,933,122..13,950,933	00000007248	12241	20	10,299,210..10,306,897
01C12_F	01C12_F	00000011546	5	13,930,131..13,931,729	00000009555	12238	20	10,259,060..10,260,924
AP017506	01C12_G	00000013072	5	13,921,111..13,929,515	none	12237	20	10,242,200..10,257,759
01C12_H	01C12_H	00000013072	5	13,921,111..13,929,515	00000002816	12237	20	10,242,200..10,257,759
01C12_I	01C12_I	none			00000011948	12222	20	9,952,657..9,981,698
04I09	none	00000002686	3	14,216,127..14,221,751	00000014212	13721	23	7,649,545..7,656,599
04C04	LC505737	04C04	3	8,853,127..8,856,002	00000006149	13749	23	8,300,555..8,307,800
01A12_A	01A12_A	00000007622	3	8,208,174..8,229,939	00000011409	09747	16	8,666,965..8,691,260
01A12_B	01A12_B	00000001329	3	8,205,017..8,207,038	00000000275	09746	16	8,662,279..8,663,640
01A12_C	01A12_C	00000002647	3	8,202,492..8,206,978	none	09745	16	8,656,211..8,661,083
AP017474	01A12_D	00000007645	3	8,195,503..8,199,695	00000002498	09744	16	8,644,982..8,650,300
01A12_E	01A12_E	00000000347	3	8,179,106..8,181,203	00000005490	09742	16	8,615,176..8,618,090
01A12_F	01A12_F	00000005768	3	8,182,286..8,193,649	00000012515	09741	16	8,565,641..8,566,629
01D22_A	01D22_A	00000012197	3	3,312,638..3,314,050	00000014120	11427	19	5,402,574..5,404,083
01D22_B	01D22_B	00000007045	3	3,310,865..3,311,929	00000004614	11432	19	5,429,687..5,433,833
AP017509	01D22_C	00000006733	3	3,316,568..3,322,941	00000003454	11428	19	5,404,812..5,414,573
01D22_D	01D22_D	00000011380	3	3,302,450..3,308,653	00000000937	11430	19	5,416,514..5,428,715
01D22_E	01D22_E	00000012280	3	3,277,095..3,299,839	00000006398	11436	19	5,601,908..5,665,423
01B07_A	01B07_A	00000007382	3	404,012..408,522	00000005721	11277	19	2,369,163..2,372,735
AP017484	01B07_B	none			00000002032	11279	19	2,385,936..2,387,350
01B07_C	01B07_C	00000010120	3	414,420..415,439	00000003144	11281	19	2,394,923..2,396,045
01B07_D	01B07_D	none			00000002032	11280	19	2,389,546..2,397,656
AP017485	01B07_E	00000004633	3	422,940..425,920	00000009352	11282	19	2,399,516..2,404,075
01B07_F	01B07_F	00000008781	3	426,158..428,143	00000002148	11283	19	2,405,346..2,408,387

17D07	8	none	00000013129	22	2,229,992..2,234,163	00000005629	87	1,038,634..1,040,406	01129	3	2,872,917..2,877,800
13B05	8	none	00000001496	22	3,211,785..3,217,084	00000002732	346	272,882..275,609	01131	3	2,890,414..2,897,786
33E04	9	LC505722	33E04	17	984,298..985,306	00000014874	52	993,919..995,476	08100	13	15,952,645..15,955,376
33M14	9	LC505712	33M14	17	7,124,697..7,125,254	00000007437	52	6,809,283..6,809,840	03639	6	14,084,835..14,085,614
			01D16_A	17	8,836,900..8,855,484	00000006390	168	276,687..313,610	10189	17	4,152,113..4,167,820
			01D16_B	17	8,836,900..8,855,484	00000006390	168	276,687..313,610	10191	17	4,176,423..4,181,295
		AP017548	01D16_C	17	8,868,855..8,872,381	00000007503	168	322,344..326,495	10193	17	4,190,709..4,198,932
01D16	9		01D16_D	17	8,881,195..8,890,609	00000015001	168	336,554..347,404	10194	17	4,202,103..4,220,193
		AP017549	01D16_E	17	8,897,682..8,901,135	00000008669	168	373,195..394,648	10195	17	4,228,247..4,262,522
			01D16_F	17	8,919,076..8,929,394	00000008669	168	373,195..394,648	10195	17	4,228,247..4,262,522
19J07	9	LC505711	19J07	20	7,231,622..7,233,130	none			02052	4	11,088,955..11,095,686
04B14	10	none	0000000310	15	7,998,524..8,001,923	00000007298	5	911,413..913,418	11985	20	4,776,159..4,780,188
27B21	10	LC505730	27B21	16	11,777,082..11,780,582	00000009786	58	61,720..65,975	11083	18	12,385,248..12,390,846
01A03	10	AP017473	01A03_A	16	9,075,312..9,083,349	00000005628	96	1,080,169..1,110,774	11164	18	15,295,883..15,327,483
		AP017534	01A24_A	16	5,787,673..5,792,804	00000006356	317	861,623..865,190	03445	6	8,055,253..8,059,240
		AP017535									
01A24	10	AP017536	01A24_B	16	5,902,083..5,929,210	00000012442	317	744,940..761,971	03450	6	8,055,253..8,059,240
		AP017537				00000004437	317	734,921..744,624	none		
		AP017538	01A24_C	16	5,932,479..5,935,032	00000000529	317	728,523..731,603	03452	6	8,194,763..8,196,872
35L09	11	LC505742	35L09	2	2,390,538..2,391,575	00000007942	93	74,236..75,273	15391	25	11,258,153..11,259,291
			01D21_A			none			15330	25	9,305,494..9,320,085
			01D21_B	2	4,877,131..4,883,553	00000006758	47	664,205..667,717	15329	25	9,260,077..9,297,025
01D21	11	AP017494	01D21_C	2	4,860,435..4,878,003	00000012946	47	667,999..682,709	15328	25	9,243,096..9,257,580
			01D21_D			none			15328	25	9,243,096..9,257,580
			01D21_E	2	4,853,353..4,854,520	00000008390	47	684,077..685,761	15327	25	9,237,395..9,239,315
19P22	11	LC505731	19P22	2	12,741,437..12,755,577	00000009203	78	2,697,254..2,707,443	11731	19	12,844,940..12,854,223
34C07	12	LC505739	34C07	19	2,284,808..2,288,278	00000014769	37	1,633,057..1,645,351	14157	23(30)	19,481,013..19,485,149
			01E08_A	19	3,313,430..3,320,544	00000002760	37	280,990..287,340	14186	23	20,038,114..20,045,281
			01E08_B	19	3,298,828..3,313,051	00000000966	37	288,096..346,267	14185	23	20,013,142..20,034,309
			01E08_C	19	3,293,272..3,297,690	none			14187	23	20,048,689..20,055,191
01E08	12	AP017550	01E08_D	19	3,219,835..3,255,790	00000009180	37	305,795..366,900	14191	23	20,124,862..20,170,359
			01E08_E	19	3,219,835..3,255,790	00000001682	37	368,034..393,742	14191	23	20,124,862..20,170,359
			01E08_F	19	3,208,951..3,214,114	00000013425	37	400,042..411,805	14195	23	20,245,122..20,250,340
07L23	12	LC505720	07L23	19	7,620,320..7,642,584	00000014201	16	780,696..801,570	07114	12	4,811,656..4,853,351
35F09	12	LC505729	35F09	19	8,455,675..8,458,692	00000001449	99	32,448..34,508	10248	17	5,809,820..5,813,560



01C24	13	AP017522	01C24_A	none	00000014748	39	620,840..657,498	14629	24	11,534,989..11,573,403
		AP017523	01C24_B	none	0000000246	39	696,141..711,849	14629	24	11,534,989..11,573,403
			01C24_C	00000004303	00000006407	39	735,627..740,999	14608	24	11,160,016..11,182,643
29H01	13	LC505740	29H01	0000001423	0000002831	208	446,245..447,156	14732	24	13,846,478..13,847,851
			01D09_A	0000000772	00000003462	27	12,045,838..12,085,236	14835	24	16,036,988..16,045,926
01D09	13	AP017492	01D09_B	00000011973	00000010214	27	12,055,224..12,103,669	14762	24	14,578,409..14,587,566
		AP017493	01D09_C	00000012756	00000002800	27	12,013,402..12,045,013	14836	24	16,092,241..16,096,056
		AP017516	01B11_A	00000013524	00000013094	143	809,908..813,112	08945	15	8,595,854..8,599,467
01B11	14	AP017517	01B11_B	00000012661	0000002813	143	837,029..838,166	09135	15	11,917,641..11,919,370
			01B11_C	00000003055	00000003844	143	838,593..854,858	09136	15	11,919,925..11,935,650
			01B11_D	00000002096	00000010181	143	860,245..864,836	09137	15	11,943,171..11,948,730
28B22	Z	LC505710	28B22	0000001306	00000006800	27	893,911..940,389	00936	2	6,796,671..6,813,722
35P07	Z	LC505709	35P07	0000001617	00000005361	27	3,724,498..3,751,736	00426	1	12,478,149..12,525,867
27J24	Z	LC505708	27J24	00000006138	00000011104	27	5,173,650..5,224,853	00379	1	11,253,049..11,269,571
			01D04_A	00000007662	00000009732	27	6,030,256..6,040,403	00542	1	16,045,600..16,061,069
			01D04_B	00000011688	00000001494	27	6,043,371..6,048,117	00543	1	16,069,510..16,077,745
			01D04_C	00000011096	00000006327	27	6,049,658..6,060,366	00545	1	16,116,700..16,127,502
01D04	Z	AP017491	01D04_D	00000013282	00000004343	27	6,059,787..6,140,942	00546	1	16,131,316..16,169,849
			01D04_E	00000006817	00000004343	27	6,059,787..6,140,942	00546	1	16,131,316..16,169,849
			01D04_F	none	none			00548	1	16,223,310..16,295,639
			01D04_G	00000001846	00000004343	27	6,059,787..6,140,942	00548	1	16,223,310..16,295,639
			01C16_A	00000011089	00000002390	27	7,030,600..7,046,054	00094	1	2,688,957..2,728,729
01C16	Z	AP017489	01C16_B	00000001987	00000006000	27	7,018,194..7,020,676	00096	1	2,765,638..2,766,766
			01C16_C	00000009908	00000000772	27	7,064,265..7,112,285	00091	1	2,591,994..2,658,046
		AP017490	01C16_D	00000009841	00000012937	27	7,059,787..7,064,114	00092	1	2,659,409..2,665,996
26C08	Z	LC505705	26C08	00000002013	00000005599	27	7,350,130..7,367,628	00112	1	3,557,391..3,583,260
			01D20_A	00000011124	00000006807	27	7,677,968..7,685,436	00147	1	4,670,556..4,680,073
			01D20_B	00000008397	00000013366	27	7,669,254..7,674,961	00145	1	4,651,174..4,663,666
			01D20_C	00000008397	none			00140	1	4,397,239..4,402,554
01D20	Z	AP017515	01D20_D	00000009508	00000006740	27	7,615,830..7,628,337	00139	1	4,345,659..4,360,131
			01D20_E	00000009902	00000006740	27	7,615,830..7,628,337	00139	1	4,345,659..4,360,131
			01D20_F	00000009174	00000014183	27	7,576,598..7,615,067	00135	1	4,282,059..4,285,192
			01D20_G	00000009174	00000014183	27	7,576,598..7,615,067	00131	1	4,193,229..4,197,405
28G13	Z	LC505706	28G13	00000012331	00000003461	27	8,216,162..8,219,676	00130	1	4,159,099..4,192,173
						95_1	385,279..386,817	00186	1	5,963,213..5,965,045

02A12	Z	LC505707	02A12	00000006482	95_1	424,399,438,043	00000004452	27	8,245,102,834,321	00190	1	6,026,373,6126,632
			01E04_A	00000007651	22	4,885,355,4,895,375	00000001220	4	624,322,629,466	06321	11	4,750,203,4,754,213
			01E04_B	00000011016	96_1	303,123,308,728	00000001220	4	624,322,629,466	none		
01E04	NM	AP017521	01E04_C	00000003434	22	4,542,131,4,545,671	00000013547	4	231,692,274,449	06288	11	4,018,932,4,036,060
			01E04_D	00000001713	96_1	327,615,350,112	00000013547	4	231,692,274,449	06288	11	4,018,932,4,036,060
04P18	NM	LC505741	04P18	00000005738	13	9,506,385,9,508,026	00000007452	30	4,397,758,4,398,908	15114	25	5,419,305,5,421,593
14C10	NM	LC505725	14C10	00000007858	7	6,504,803,6,506,453	00000007137	7	4,086,846,4,089,558	08797	15	5,475,794,5,480,567
29F08	NM	LC505735	29F08	00000005087	5	3,508,464,3,510,895	00000005176	8	5,823,033,5,825,789	12497	21	5,027,635,5,031,580
29N15	NM	LC505728	29N15	00000005552	12	2,720,916,2,728,070	00000005687	95	3,103,864,3,109,064	09830	16	9,953,789,9,958,322
33A09	NM	LC505727	33A09	none			00000001076	2	7,242,103,7,244,395	09442	16	1,283,499,1,288,160

NM: Not Mapped in Fig.2.9

Table 2.42 Coding sequence (CDS) of *Pieris brassicae* BAC clones in which the distance of *Bombyx mori* orthologs is more than 1 Mb or mapped on different chromosomes

<i>Pieris brassicae</i>				<i>Bombyx mori</i>				<i>Pieris napi</i>				<i>Pieris rapae</i>			
BAC code	CDS	intergenic distance (kb)	Chr	gene ID	distance between two genes (kb)	number of gene models between the two genes	Chr/mod-Scaffold	gene ID	distance between two genes (kb)	number of gene models between the two genes	ScG6Pog	gene ID	distance between two genes (kb)	number of gene models between the two genes	
				KWMTBOMO				PIENAPG				PIERAPG			
01A20	01A20_A 01A20_E	<67* <sup>1</sup>	21	12436 12649	6,877	212	5	7518 5040	1.0	0	8	9022 5897	3.7	1	
01A22	01A22_D 01A22_E	2.4	26	15467 15618	4,180	150	4	8791 12895	1.8	0	128	10445 5925	0.9	0	
01B11	01B11_A 01B11_B	27.0	15	08945 09135	3,318	189	24	13524 12661	80.1	1	143	13094 2813	23.9	3	
01D09	01D09_A 01D09_B	6.6	24	14835 14762	1,449	72	23	772 11973	13.0	0	27	3462 10214	0.0	0	
01D18	01D18_A 01D18_B	4.5	12	07206 06983	6,799	222	14	2514 361	9.9	0	38	562 7109	0.7	0	
01D06	01D06_F 01D06_G	9.6	16 17	09601 10333	_* <sup>3</sup>	CND_* <sup>3</sup>	12	12051 7842	18.0	0	95	6493 4762	0.6	0	
01D23	01D23_D 01D23_E 01D23_F/G 01D23_H	18.0 2.5 <11.1* <sup>1</sup>	10 20 12 8	06070 11788 07093 04234	_* <sup>3</sup> _* <sup>3</sup> _* <sup>3</sup> _* <sup>3</sup>	_* <sup>3</sup> _* <sup>3</sup> _* <sup>3</sup> _* <sup>3</sup>	9 90_1	12290 1651 1477	_* <sup>3</sup> _* <sup>3</sup> 11.3	_* <sup>3</sup> 0 0	60* <sup>2</sup> 38	7582 4011 12897 11661	_* <sup>3</sup> 1.1 1.5	_* <sup>3</sup> 1 0	

\*: maximally calculated by contig length and insert size of each BAC clone that determined by pulsed field gel electrophoresis.

\*<sup>2</sup>: another homolog appeared in a 26,597 bp-long scaffold (ScG6Pog\_2172)

\*<sup>3</sup>: cannot determined because of mapped on different chromosomes or scaffolds

### 第Ⅲ章 モンキチョウ BAC ライブラリーの構築と BAC 選抜

#### 序論

第Ⅱ章において、シロチョウ亜科 *Pieris* 属 3 種は、カイコと異なる遺伝子配置をもつことが確認された。また、最近の研究からシロチョウ亜科特異的な染色体の再構成が示唆されているが(Hill *et al.*, 2019)、その変異の起源と影響は不明である。染色体の大規模な構成変化の起源を知ることは、それに伴う形態学的、行動学的な変化とあわせて考察するためにも重要である。姉妹系統のモンキチョウ亜科の代表的な染色体数  $n=31$  は、進化的なチョウ目昆虫の典型染色体数であり、遺伝子配置がチョウ目昆虫全体で広く保存されていることが示唆されている(Yasukochi *et al.*, 2016)。つまり、モンキチョウ亜科の染色体研究は、シロチョウ科の染色体進化を知る上で重要な立ち位置を占めると考えられる。

網羅的な染色体解析には BAC-FISH が有効な方法であるが、BAC-FISH マッピングには BAC ライブラリーと全染色体を網羅する塩基配列情報が必須である。しかしながら、モンキチョウ亜科において BAC ライブラリーの構築された種は存在せず、BAC ライブラリーのスクリーニングに使用可能なレベルの塩基配列情報は、アメリカ固有種のワタリオオキチョウ(*Phoebis sennae*)の 1 種のみであった。モンキチョウ亜科の種数は、*Colias* 属と *Eurema* 属に多く、シロチョウ科内での比較研究にはこれらの中から普通種を用いて行うことがより望ましいと考えられた。

そこで、本章の第 1 節において、モンキチョウ亜科モンキチョウ(*Colias erate*,  $n=31$ )の BAC ライブラリー構築を行った。第 2 節において、RNA-sequencing (RNA-seq)による網羅的な coding sequences (CDS)の配列決定を行った。これは、BAC スクリーニングに用いる配列情報の獲得法としては初の試みとなる。第 3 節では、代表的なカイコ遺伝子群のモンキチョウオルソログを BLAST 解析により特定した。第 4 節で、前節で得られた情報に基づき設計した single tagged site (STS)プライマーを用いて、それらオルソログを含む 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

モンキチョウにおけるゲノム情報は存在しないため、染色体比較のために新規にゲノム情報基盤を構築する必要がある。本節では、主に Suzuki *et al.* (1997; 2012)、Fujimoto *et al.* (2018)ならびに Okumura *et al.* (2019)を参考に、手順を一部改変して、特定のゲノム断片を安定してクローニングした BAC ライブラリー構築に取り組んだ。

## 材料および方法

### 1. 供試昆虫

本節のモンキチョウ (*Corias erate*) は、2015 年に川原果樹園(岩手県盛岡市, 39.726192, 141.155853)にて雌成虫を複数採集し、採卵させて得た幼虫を飼育して使用した。食草にはシロツメクサ(*Trifolium repens*)およびアカツメクサ(*T. pratense*)を用いた。

### 2. 高分子核 DNA の調整

高分子核 DNA (HMW-DNA) 試料は、モンキチョウ雄蛹 3 個体(約 750 mg)を用いて調整した。氷上に設置した乳鉢を液体窒素で予冷し、試料に液体窒素を加えながら乳棒で磨砕した。十分に磨砕した試料を氷冷 NI buffer (Table 3.1)が 50 ml 入ったビーカーに移し、スパチュラで懸濁して 15 分間室温で放置した。その後、NI buffer を 100 ml 追加しよく懸濁した。0.1 M EDTA (pH 8.0)に浸してオートクレーブを行った MIRACLOTH (Millipore, Burlington, MA, US)を新しいビーカーに被せ輪ゴムで固定した。この器具を用い試料懸濁液を濾過後、3 本の 50 ml チューブに分注した。遠心(600 × g, 10 min, 4°C)したチューブの上清をデカントで除き、チューブ 1 本につき NI buffer 10 ml で再懸濁して 30 ml 溶液を 1 チューブにまとめた。再度遠心(600 × g, 10 min, 4°C)を行い、デカントで上清を除き、沈殿に 1 ml の NI buffer を加え、先切りチップを用いたピペティングにて再懸濁した。45°C のウォーターバス内で 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 (50121, Lonza, Basel, Switzerland, Table 3.2 参照)を懸濁液と等量の 1 ml 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 Laboratories Inc. Hercules, CA, US)に流し込み、ラップで包んでから氷上で 30 分放置してプラグをゲル化させた。50 ml チューブ内で HMW-DNA 抽出用 Lysis buffer stock (Table 3.3) 30 ml と 20 mg/ml Proteinase K (39450-01-6, 富士フイルム和光純薬, 大阪) 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た、50°C で 24 時間静置した。この酵素処理中は、数時間おきに軽く転倒混合した。新しい Lysis buffer (30 ml Lysis buffer stock for HMW-DNA + 150 μl Proteinase K (20 mg/ml))にとりかえて、再び 50°C で 24 時間放置した。Lysis buffer を捨て、TE50 (0.01M Tris (pH 8.0), 0.05M EDTA (pH 8.0))を加え、4°C で 2 時間プラグをリンスした。この操作を計 5 回繰り返し、5 回目の TE50 を捨てたら 0.002 M PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride, 329-98-6, 富士フイルム和光純薬)含有 TE50 を加え、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 時間プラグをリンスした。この操作を計 5 回繰り返し、最終的に TE50 内のプラグを冷蔵庫に保存した。

### 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 control 用)に TE を 10 ml ずつ用意してから、TE を 10

ml 入れた滅菌シャーレ内にプラグを 1 つ取り出し、滅菌済みスパチュラのヘラ部分で二等分して各チューブに入れ、チューブを寝かせて 4°C に 1.5 時間放置した。TE を取り変えてチューブを寝かせて 4°C でさらに 1.5 時間放置した。これらの操作中に各 2~3 回ほど転倒混合した。

#### (B) *Hind*III による制限酵素処理 (完全消化)

1.5 ml チューブに滅菌水 200  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 0.1% BSA (TaKaRa) 30  $\mu$ l, 15 U/ $\mu$ l *Hind*III (TaKaRa バイオ, 草津) 2  $\mu$ l 加え、氷上でピペティング混合した。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 時間インキュベートした。完全消化処理中に、適宜タッピング混合した。

#### (C) パルスフィールドゲル電気泳動

0.5 $\times$  TBE に溶解した 1% Pulse Field Certified Agarose (1620137, Bio-Rad) を専用の型に流し込み、泳動ゲルを作製した。3 L の 0.5 $\times$  TBE を満たした泳動層に泳動ゲルを設置し、本体とポンプとクーラーの電源を入れて泳動に備えた。

完全消化用と control 用のプラグを泳動ゲルの well にそれぞれ差し込み、 $\lambda$ -*Hind*III マーカー (3403, TaKaRa) と  $\lambda$ -ladder (170-3635, New England BioLabs, Ipswich, MA, US) マーカーとともに CHEF-MAPPER (Bio-Rad) によりパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) を行った。プラグを入れた穴と空の穴は、ボイル溶解して 45°C に保っておいた穴埋め用 1% アガロースゲル (Sea Plaque GTG, 50111, Lonza) で埋めた。泳動条件は、14°C、5.1 V/cm、30 sec  $\rightarrow$  50 sec、24 h、linear、120° Angl とした。24 時間泳動後、エチジウムブロマイドで 30 分染色し、ラップに包み 1 時間放置して染色液を浸透させた。その後 UV 照射下で写真撮影を行った。

### 4. 部分消化の条件検討 (*Hind*III 濃度の決定)

#### (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、TE を 10 ml 入れた滅菌シャーレ内にプラグを 2 個取り出し、片方は滅菌済みスパチュラのヘラ部分で格子状に 12 等分した。もう片方は二等分し、半分を 6 等分、もう半分は次回用に新しい TE50 に入れて保存した。合計 18 断片のプラグをチューブに入れ、チューブを寝かせて 4°C で 2 時間置いた。TE を取り変えてチューブを寝かせて 4°C でもう 2 時間放置した。これらの操作中に各 2~3 回ほど転倒混合した。再度 TE を取り変えてチューブを寝かせ、4°C で 1 晩放置した。

#### (B) *Hind*III による制限酵素処理 (部分消化)

1.2 $\times$  M buffer with BSA (Table 3.3) 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  $\mu$ l 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 1 本につきプラグ片を 2 個ずつ入れ(最大と最小のプラグをセットで入れていく)、フラッシュの後、タッピングした。4°Cで 5 時間放置し、プラグに酵素液を浸透させた。1 M  $MgCl_2$  を各 0.75  $\mu$ l 加え、氷上で 1 時間放置してプラグに浸透させた。37°Cで 10 分間インキュベートして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  $\mu$ l 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(PFGE)

0.5 $\times$  TBE で溶解した 1% Pulse Field Certified Agarose を専用の型に流し込み、泳動ゲルを作製した。3 L の 0.5 $\times$  TBE を入れた泳動層に静置し、本体とポンプとクーラーの電源を入れて泳動に備えた。

泳動ゲルの well にプラグを 2 個ずつ、それぞれ奥まで滅菌スパチュラとチップで差し込んだ。Well の左から右に *Hind*III 処理濃度の濃いプラグを挿入した。PFGE 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、ラップでくるみ 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、100-140 kb の領域に制限酵素処理された DNA が集中する条件を決定した。

### 5. 部分消化 (ゲルからの核酸抽出)

#### (A) TE 置換

15 ml チューブ 1 本(部分消化本番用)に TE を 10 ml 用意してから、TE を 10 ml 入れた滅菌シャーレ内にプラグを 3 個取り出し、全てのプラグを滅菌ブレードで格子状に 12 等分した。合計 36 断片のプラグをチューブに入れ、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)

条件検討に用いたのと同じ 1.2 $\times$  M buffer with BSA (Table 3.3)を溶媒に、4 段階の *Hind*III 濃度の酵素液を 1.5 ml チューブ 18 本に 62.5  $\mu$ l ずつ作製した。*Hind*III 処理によるモンキチョウ HMW-DNA の完全消化の確認および部分消化の条件検討の結果、本研究では、2, 4, 8, 16 U/ $\mu$ l で 10 分間消化する 4 段階の条件を選択して処理した。TE 置換した 36 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(最大と最小のプラグをセットで入れていく)、フラッシュの後、タッピングした。4°Cで 5 時間放置して、プラグに酵素液を浸透させた。1 M  $MgCl_2$  を各 0.75  $\mu$ l 加え、氷上で 1 時間放置してプラグに浸透させた。37°Cで 10 分間インキュベートして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  $\mu$ l 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(PFGE)

0.5× TBE 溶解した 1% Sea Plaque GTG アガロースゲルを専用の型で固め、泳動ゲルを作製した。3 L の 0.5× TBE とゲルを泳動層設置し、本体とポンプとクーラーの電源を入れて泳動に備えた。

泳動ゲルにプラグを 9 もしくは 8 個ずつ 4 レーン、それぞれ奥まで滅菌スパチュラとチップでギュウギュウに詰め込んだ。条件検討時と同様、左から右に処理濃度の濃いプラグを挿入した。別のレーンに消化の成功確認用に 1 プラグ挿入し、プラグを入れた穴と空の穴は、溶解して 45°C に保っておいた穴埋め用 1% Sea Plaque GTG アガロースゲルで埋めた。 $\lambda$ -HindIII マーカーと  $\lambda$ -ladder マーカー(N0341S, New England BioLabs)を加え、CHEF-MAPPER により PFGE を行った。泳動条件は、二段階に分けて行った。第一段階は 14°C、6 V/cm、90 sec 一定、4 h、linear、120° Angle の条件で行い、泳動終了後すぐに第二段階の 14°C、6 V/cm、6 sec 一定、12 h、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

電気泳動後の低融点アガロースゲルにラップをかけ、プラグを挿入した 4 レーンをメスで切り抜いた。残りのマーカー部分をエチジウムブロマイドで 30 分染色し、UV 照射下で写真を撮影して 100-140 kb に相当する部分を定規で確認した。 $\lambda$ -ladder マーカーを指標にして 100-120 kb に相当する領域を分画 1、120-140 kb に相当する領域を分画 2 と定義してそれぞれ切り出した。各分画を 2 mm 角に刻んで 15 ml チューブ 2 本に別々に入れた。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 3.5)を 12 ml ずつ加えてゲル片を混合し、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 を全て吸い取った。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、70°C のウォーターバスで 15 分間温めて完全に溶解させた。その後、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 の  $\beta$ -Agarase I (M0392S, New England BioLabs)をそれぞれ加えた。ピペティングせず、チップの先で混ぜるように穏やかによく混合し、40°C 2 時間のインキュベーションによりアガロースを分解した。処理中は 30 分ごとに優しくタッピング混合した。その後、氷上で 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た。得られた上清を 45°C の Heating plate (HP-4530, アズワン, 大阪)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 5 U の  $\beta$ -Agarase I (New England BioLabs)を追加で加えた。この際ピペティングは行わず、チップの先で混ぜるように穏やかによく混合した。落下する埃などを避けるためカバーをして、1 時間前後溶液を 1/5 程度まで蒸発、濃縮した。次に、STE buffer (Table 3.6)に浮かべたセルロースフィルター(VSWP02500, Millipore)上で 1 時間透析を



行った。これらの作業は、全て先切りチップで穏やかに行った。最終的に液量が 50-100  $\mu$ l 程度になるまで濃縮と透析を繰り返し(2~3 回)、1.5 ml チューブに移して 4°C で保存した。

## 7. ベクタープラスミドの調整

*Hind*III 部分消化したモンキチョウのゲノム DNA を挿入するベクタープラスミドには、pBeloBAC11 (Kim *et al.*, 1996)を用いた。本研究では、当該ベクターをトランスフェクトした大腸菌グリセロールストックを鈴木剛博士(大阪教育大学教授)より分譲していただき、以下の処理を行いライゲーションに用いた。QIAGEN midi kit (12145, Qiagen, Venlo, Netherlands)を用いたプラスミド DNA の単離を行い、プラスミド DNA 1  $\mu$ g を 37°C で 5 時間 *Hind*III 処理した(Table 3.7)。処理後、TE 150  $\mu$ l を加えてトータル 300  $\mu$ l とし、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)し、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)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(M8K2290, ナカライテスク, 京都)を 1  $\mu$ l 加え、3 M 酢酸ナトリウム 30  $\mu$ l を加えて軽く混合した。100% エタノールを 750  $\mu$ l 加えてよく転倒混合し、冷蔵庫に 1 晩放置した。翌日、遠心(15,000 rpm, 20 min, 4°C)後に上清を捨て、800  $\mu$ l の 70% エタノールでリンスして再度遠心(15,000 rpm, 20 min, 4°C)し、上清を捨て、15 min 風乾してエタノールを完全に除去した。最終的にベクターDNA を 10  $\mu$ l の TE に溶解した。

セルフライゲーションを防ぐための処理として 5'突出末端の脱リン酸化を行った。ベクターDNA 溶液に Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP) (2250A, TaKaRa)を用いた CIAP 処理を 37°C ウォーターバスで 30 分間行った(Table 3.8)。処理後すぐに、0.8% Agarose ゲルを用いて 50 V でゆっくりアガロースゲル電気泳動を行った。エチジウムブロマイドで 15 分間染色、UV 照射下で写真撮影した。UV 照射は DNA にダメージを与えるため、照射後すぐに写真を撮影し、できるだけ UV 照射時間を最小限に留めた。ゲル抽出は Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, US)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った。アガロースゲル 10 mg につき 10  $\mu$ l の Membrane Binding Solution (4.5M guanidine isothiocyanate, 0.5M potassium acetate (pH 5.0))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した。処理中に 4 回程度タッピングにより液体を混合してゲル片を完全に溶かした。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, 10mM potassium acetate (pH 5.0), 16.7 $\mu$ M EDTA (pH 8.0)) 700  $\mu$ l を SV Column に入れて遠心(15,000 rpm, 1 min, RT)した。チューブに回収された液を捨て、Membrane Wash Solution 500  $\mu$ 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、20  $\mu$ l の Nuclease-Free Water を SV Column に入れて 1 分間インキュベート、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-20°C で冷凍保存した。

#### 8. ライゲーション

通常は、ベクターとインサート DNA のモル比が 10 : 1 となるように、先切りチップを用いて 3 U/ $\mu$ l T4 ligase (Promega)を含む全量 50  $\mu$ l の反応液を 0.2 ml チューブ内にて混合する。しかし、モンキチョウ HMW-DNA 濃度は、分画 1 が 0.6 ng/ $\mu$ l、分画 2 が 0.3~1.0 ng/ $\mu$ l 程度と想定よりも薄かった。このため、ベクター : インサート DNA = 30 : 1 というベクター過多のモル比で調整した(Table 3.9)。モル比計算は、ベクターを 7 kb、インサート DNA を 70 kb と仮定して行った。反応液は、サーマルサイクラー(PCR Thermal Cycler Dice, TaKaRa もしくは PCR System 9700, GeneAmp®, Applied Biosystems, Waltham, MA, US)を用い、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, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)上で 2 時間透析を行った。最終的に 30-40  $\mu$ 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

氷冷したキュベット(BM ディスポキュベット電極 Bio-Rad 用 1 mm, BM165-2089, BM 機器, 東京)を、金属部分を触らないように開けておいた。コンピテントセル(HST08 Premium Electro-Cells, TaKaRa)を氷上で溶かし、1.5 ml チューブに入れたライゲーション液 1  $\mu$ l に 18  $\mu$ l 加えて優しくピペッティングで混合した。キュベットの奥の狭くなっているところに、両側の金属部と接するように混合液をアプライした。キュベットを GENE PULSER Xcell (Bio-Rad)にセットし、1.5 KV or 1.25 KV、25  $\mu$ F、100  $\Omega$  の条件でエレクトロポレーションを行った。パルスの発生終了後、すぐに SOC 培地(Table 3.10)を 1 ml 優しく加え、ゆっくりと 2 回程度ピペッティングした。各懸濁液を 15 ml チューブに移し、Bio Shaker BR-23FH (TAITEC, 越谷)にて 37°C で 1 時間振盪培養後、遠心(5,000 rpm, 5 min, RT)して菌体を沈殿させた。上清をデカントで捨てて 50-100  $\mu$ l 程度とし、ゆっくりとピペッティング攪拌の後、X-Gal (9031, 富士フイルム和光純薬) 100  $\mu$ l と IPTG (9030, 富士フイルム和光純薬) 50  $\mu$ l を塗布したクロラムフェニコール(12.5  $\mu$ g/ml)入りの LB 寒天培地 (Table 3.11)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 20 時間培養した。コロニーの生えたシャーレはパラフィルムを巻いてストックまで 4°C で保存した。

#### 10. BAC ライブラリーと BAC-DNA プールの作製

長期保存用 BAC ライブラリーと BAC スクリーニングに用いる BAC-DNA pool は Yasukochi (2002)に従って作製した。384 well の一時保存プレートに、クロラムフェニコール (10  $\mu$ 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 3.12)を

8連ピペットマンで 50  $\mu$ l ずつ全ての well に分注した。滅菌した爪楊枝でシャーレからシנגルコロニーをつつき、一時保存プレートに 1 コロニーずつ植菌した。全ての well に植菌したら、37°Cで1晩培養した。これを y プール作製用プレートとし、40 枚作製して、-20°C に一時保存した。

アルミホイルをプレートに押し付けて Well の跡をつけ、一時保存プレートと同程度の大きさに切って 70%エタノールと UV で消毒したスチロール板(Seria にて購入)に貼り付けた。その跡を目印にして、空の一時保存プレートを下敷きに、スチロール板に 384 本の爪楊枝を刺した。それを裏返して 70%エタノールで消毒し、鋭角側の先端を UV 照射して一晩滅菌した (コピーツール)。滅菌した y プール作製用プレートにコピーツールを突き刺し、ストック用 LB 培地を分注した 384 well の恒久保存プレートにコンタミしないようゆっくり移した。全ての先端が液面の中まで到達したことを確認し、一枚の一時保存プレートに爪楊枝をゆっくり移した。同様に確認後、ゆっくり抜いて 70% エタノールで消毒し、爪楊枝はオートクレーブして再利用した。コピーした各プレートは 37°Cで1晩培養した。どちらも計 40 枚のコピーを、恒久保存プレートはそのまま-80°C冷凍庫で保存し、もう一枚の一時保存プレートは、x プール作製用プレートとして-20°Cで一時的保存した。

上記の y プール作製用プレートから、8 連ピペットマンを用いて、列ごとに培養液を 5  $\mu$ l ずつ計 80  $\mu$ l 集めた。同様に、x プール作製用プレートからも行ごとに培養液を 5  $\mu$ l ずつ計 120  $\mu$ l 集めた。それらの DNA を列・行ごとにミニプレップ法で抽出し、x と y BAC-DNA プールを作製した。さらにそれぞれプレートごとにまとめたプレート DNA プールも作製した。

## 11. BAC ライブラリーの評価

モンキチヨウ BAC より QIAGEN Plasmid Midi Kit (12245, QIAGEN)で各 BAC-DNA 抽出後、*NotI* (1600, TaKaRa)を用いて 37°Cで5時間以上消化した(Table 3.13)。BAC-DNA の抽出法は、第 I 章第 2 節の材料および方法に記述したプロトコルに従った。処理した各 DNA は PFGE によりインサートの評価を行った。

0.5 $\times$  TBE 溶解した Pulse Field Certified Agarose (Bio-Rad)を専用の型で固め、泳動ゲルを作製した。3 L の 0.5 $\times$  TBE とゲルを設置し、本体とポンプとクーラーの電源を入れた。消化済みの各 BAC-DNA を  $\lambda$ -*HindIII* マーカー(TaKaRa)と  $\lambda$ -ladder マーカー(New England BioLabs)とともに CHEF-MAPPER (Bio-Rad)により電気泳動した。泳動条件は、Auto algorithm の 5-400 kb に設定し、14°Cで泳動した。15 時間 16 分後、エチジウムブロマイドで 30 分染色し、ラップでくるみ 1 時間放置して浸透させた。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 3.1 Composition of Nuclei Isolation buffer (NI buffer)

NI buffer stock	
1M Tris (pH9.5) (和光純薬 207-06275)	40 ml
1M KCl (和光純薬 163.03545)	80 ml
Sucrose (和光純薬 196-00015)	171.15 g
adjust the volume to 1,000 ml with distilled water	
NI buffer	
NI buffer stock	50 ml
1M Spermidine (和光純薬 191-13831)	200 $\mu$ l
1M Spermine (和光純薬 198-09811)	50 $\mu$ l
2-mercapto ethanol (SIGMA M-7154)	50 $\mu$ l

Table 3.2 Composition of 1.5% low melting point agarose

1M Tris (pH9.5) (和光純薬 207-06275)	12 $\mu$ l
0.5M EDTA (pH8.0) (DOJINDO 345-01865)	24 $\mu$ l
distilled water	1,164 $\mu$ l
InCert Agarose (FMC) (Lonza 50121)	18 mg

Table 3.3 Composition of Lysis buffer stock for HMW-DNA

Sarkocyl (IBI 06535)	5 g
0.5M EDTA (pH 8.0) (DOJINDO 345-01865)	200 ml
adjust the volume to 1,000 ml with distilled water	

Table 3.4 Composition of 1.2 $\times$  M buffer with BSA

1M Tris (pH7.5) (和光純薬 207-06275)	60 $\mu$ l
1M DTT (Roche 604927)	6 $\mu$ l
5M NaCl (和光純薬 191-01665)	60 $\mu$ l
0.1% BSA (TaKaRa 1600)	600 $\mu$ l
adjust the volume to 5 ml with distilled water	

Table 3.5 Composition of Agarase I buffer

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

Table 3.6 Composition of STE buffer

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

Table 3.7 *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 5 h	

Table 3.8 CIAP 5' end dephosphorylation

Vector DNA (~1 µg)	10 µl
1M 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 3.9 Ligation mix used for *Colias erate* BAC construction

vector (processed) (ca. 24 ng/µl)	1 µl
insert DNA (ca. 0.5 ng/µl)	16 µl
10×Ligation buffer (Promega M1801)	5 µl
T4 Ligase (3 U/µl) (Promega M1801)	1 µl
adjust the volume to 50 µl with distilled water	
Ligated by 14°C for 20 h	

Table 3.10 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
KCl (和光純薬 163.03545)	0.02 g
adjust the volume to 100 ml with distilled water	
SOC	
SOB	1,000 $\mu$ l
1M Glucose (和光純薬 049-31165)	20 $\mu$ l
1M MgCl <sub>2</sub> (和光純薬 135-00165)	10 $\mu$ l
1M MgSO <sub>4</sub> (関東化学 58042-17)	10 $\mu$ l
prepare right before use it	

Table 3.11 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 0.1 ml of chloramphenicol solution (20 mg/ml) below at 60°C and dispense to 20 dishes.	
after fixed, keep at 4°C until using	

Table 3.12 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 1,000 ml with distilled water and autoclave	
add 0.1 ml of chloramphenicol solution (20 mg/ml) below at 60°C and keep at 4 until use.	
(for Glycerol stock: add 80 ml Glycerol)	

Table 3.13 Composition of restriction enzyme *Not* I

<i>Not</i> I (10 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
10 $\times$ H Buffer (TaKaRa 1600)	2 $\mu$ l
0.1% BSA (TaKaRa 1600)	2 $\mu$ l
0.1% Triton X-100 (TaKaRa 1600)	2 $\mu$ l
BAC DNA	200 ng
adjust the volume to 20 $\mu$ l with distilled water	
incubate at 37°C over night	

## 結果

本研究では、PFGE ゲルから切り出した分画別に 2 種類のモンキチョウ BAC ライブラリーを作製した。泳動ゲル上で 100-120 kb の部分(分画 1)より抽出した HMW-DNA により 01-22 番プレートを、120-140 kb の部分(分画 2)より抽出した HMW-DNA により 23-40 番プレートを作製した。エレクトロポレーションを計 66 回行い、BAC を植菌した LB シャーレを分画 1 で 33 枚分、分画 2 で 31 枚分得た。青白コロニーの比率より算出されたライゲーション効率、分画 1 では約 68.6%、分画 2 では約 71.9%であった(Table 3.14)。計算上、エレクトロポレーション 1 回につき分画 1 で約 367、分画 2 で約 226 の BAC クローンが得られた。合計 40 プレートをモンキチョウ BAC ライブラリーとしてストックした。PCR スクリーニング用としてプレート DNA プール、x ならびに y DNA プールを作製した。

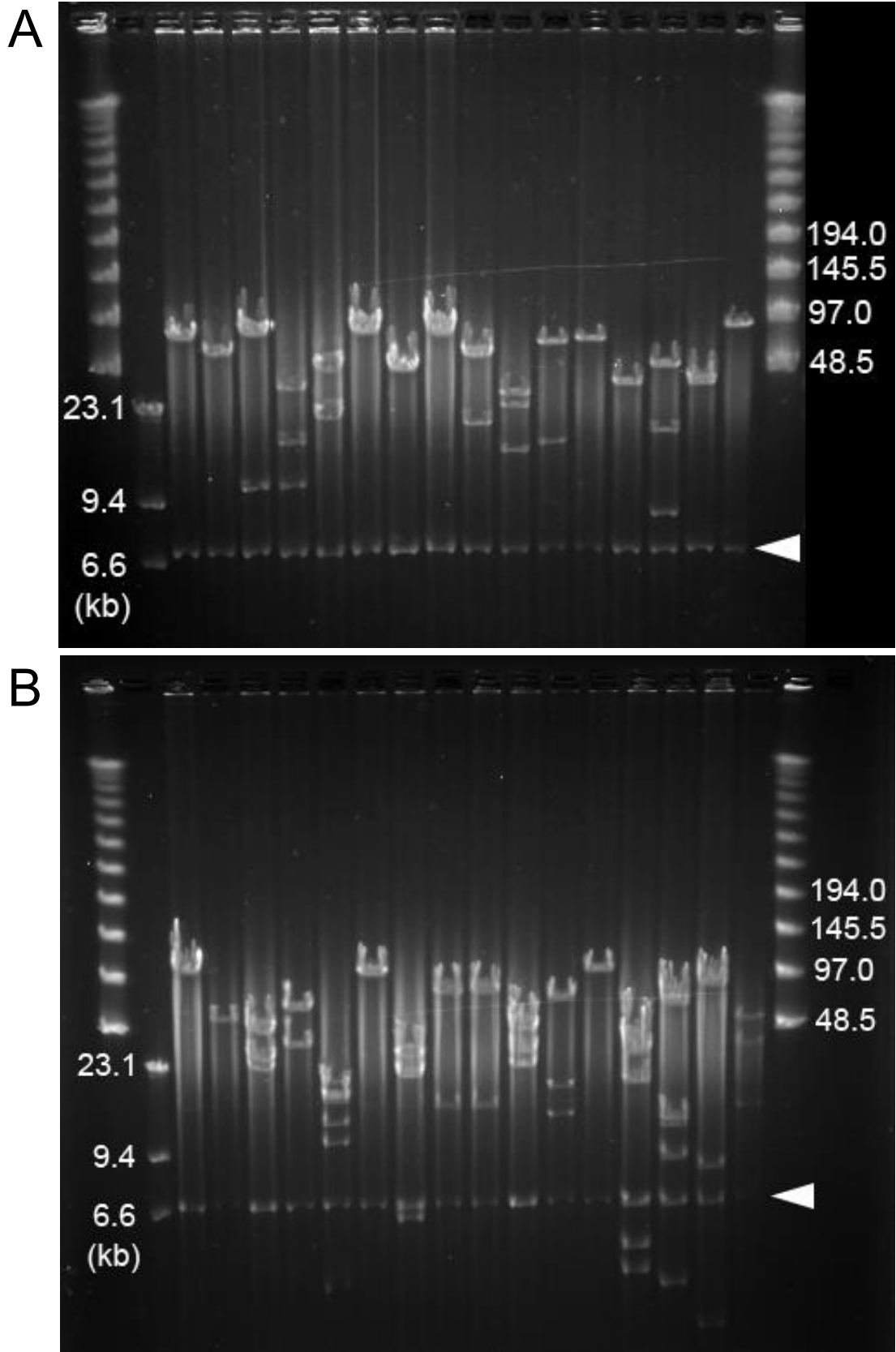
分画 1 由来の 16 BACs (01A01~01P01)、分画 2 由来の 16 BACs (23A01~23P01)の平均インサートサイズはそれぞれ 75.4 kb と 90.3 kb であった (Figure 3.1, Table 3.14)。さらに、各 16 BACs のインサートサイズ合計が分画 1 で 1,206.7 kb、分画 2 で 1,444.9 kb であることと、インサート DNA 内の *NotI* サイト合計が分画 1 で 10 コ、分画 2 で 26 コであったことから、モンキチョウの GCGGCCGC 配列出現頻度は、それぞれ、平均 120.7 kb と 55.6 kb (合計の平均は 73.7 kb)につき 1 回と推定された。

## 考察

本節では、モンキチョウ亜科で初となる BAC ライブラリーの構築に成功した。作製した BAC ライブラリーの総インサートサイズは約 1.26 Gb であり、モデルチョウ目昆虫のカイコのゲノムサイズである 460.3 Mb (Kawamoto *et al.*, 2019)と比較すると、約 2.74 ゲノム分相当となった。さらにより近縁な種では、モンキチョウと同じシロチョウ科モンキチョウ亜科に属するワタリオオキチョウのゲノムサイズは 345 Mb 前後と報告されていることから (Cong *et al.*, 2016)、本 BAC ライブラリーは約 3.66 ゲノム分をカバーすると推測される。これらの結果より、本節でゲノム全体をほぼ網羅するライブラリーを構築できたと結論した。

本ライブラリー作製時のライゲーション効率は約 70% (Table 3.14)であり、効率が悪かった。その原因としては、HMW-DNA の抽出濃度が薄かったことに起因する、約 30:1 というベクター過多のライゲーションによる影響であると考えられる。作製した BAC ライブラリーから抽出した、任意の BAC-DNA を用いてトリアルルの 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)。本節では、BAC-FISH によるシロチョウ亜科の種間における染色体比較を行う上で、基盤となるライブラリーが完成したと評価できる。





**Figure 3.1** Examination of insert size by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in *Colias erate* BAC library constructed from fraction 1 (A) and fraction 2 (B). Molecular size markers (kb) were appeared in both sides. The pBeloBAC11 BAC vector (7.507 kb) was detected in all lanes (arrowheads).

Table 3.14 Basic information of *Colias erate* BAC library constructed in the present study

fraction	colonies		average insert size (kb)*	average number of <i>NotI</i> site
	white	blue		
1	12,103	5,544	75.4	0.625
2	7,020	2,745	90.3	1.625

\* see Figure 1 for the details

## 第2節 RNA-seq

チョウ目昆虫の BAC-FISH による染色体比較の先行研究では、公開されたゲノムデータや独自に cDNA ライブラリーから獲得した EST 配列データを参照して BAC スクリーニング用の STS プライマー設計を行っていた(Sahara *et al.*, 2013; Yasukochi *et al.*, 2016; Fujimoto *et al.*, 2018)。Next-generation sequencing (NGS)が普及する以前に用いられてきた cDNA 配列決定法は、BAC ライブラリーの他にライブラリーをつくる必要があり、時間も費用も嵩むばかりか煩雑でもあった。NGS による RNA-seq は、非モデル昆虫からも大量のトランスクリプトームデータを効率的に取得することができる有効な方法である。これにより、事前に研究対象の配列情報を得るステップが大きく省力化され、これまでより短時間で BAC スクリーニングを終えることができると考えられる。よって、本節では、BAC スクリーニングに用いる塩基配列の新たな獲得手法として、RNA-seq を行った。さらに Raw data では CDS 情報として十分に活用できないため、獲得した配列情報の *de novo assemble* 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モンキチョウ(*Colias erate*)は、2017年に岩手大学構内にて黄色翅の雌成虫を採集した個体から得られた集団である。RNA抽出には、蛹化4日目の雌雄1個体ずつを RNA Later (AM7020, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US)で処理、-20°Cで保存したサンプルを使用した。本サンプルは2017年6月12日に保存開始し、同年8月31日に RNA抽出した。食草にはシロツメクサ(*Trifolium repens*)およびアカツメクサ(*T. pratense*)を用いた。子供集団雌の翅色比率は白:黄=11:9であった。

#### 2. Total RNA 抽出

Total RNAの抽出は NucleoSpin® RNA (MACHEREY-NAGEL, Düren, Germany)のプロトコルに従って行った。下記に簡単に手順を記述する。ガラス製ホモジナイザーに昆虫体1個体に RA1を1ml加えて、粉碎した。440 µlの RA1を追加し、RP1を14 µl加えた。4つのカラムに移し、13,000 rpmにて2分間、室温で遠心した。カラムを通過した液に各350 µlの70%エタノールを加えてピペティングした。次のカラムに溶液を移し、13,000 rpmにて1分間、室温で遠心(以降の遠心はいずれも室温)した。350 µlの MDBをカラムに入れて、13,000 rpmで2分間遠心した。rDNase 80 µlと rDNase Buffer 720 µlの混合溶液をカラムにアプライして15分間インキュベートした。RA2を200 µl加えて13,000 rpmにて1分間遠心した。落下した溶液を捨て、RA3を600 µlカラムに加えて13,000 rpmにて1分間遠心した。落下溶液を捨て、再びRA3を250 µlカラムに加えて13,000 rpmにて2分間遠心した。さら

に 13,000 rpm で 2 分間遠心し、カラム内の溶液を完全に取り除いた。RNase-free チューブにカラムを移して、RNase-free water を 60  $\mu$ l アプライし、1 分間インキュベートした。13,000 rpm で 1 分間遠心し、RNA 溶液を回収した。また、別法として、第 II 章第 1 節と同様に、TRIzol (Thermo Fisher Scientific)によりプロトコルに従って total RNA を抽出したものを比較対照として用意した。

### 3. Quality Check

抽出した total RNA のクオリティを確認するために、DynaMarker® RNA High for Easy Electrophoresis (DM170, BioDynamics Laboratory Inc., 東京)を利用して非変性ゲル電気泳動した。その方法を以下に要約する。RNA loading buffer AG+ 19  $\mu$ l と 37% formamide sd. 1  $\mu$ l を混合した。これを 3  $\mu$ l 用いて、RNA サンプル 0.05-15  $\mu$ g と混合し、合計 5  $\mu$ l とした。75°C で 3 分処理し、氷上で急冷することで RNA を変性させた。1.5% Agarose ゲルを用いてアガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで 15 分間染色、UV 照射下で写真撮影し、クオリティーチェックを行った。

さらに、NanoDrop (Thermo Scientific)と Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, US)による RNA サンプルの品質チェックを、北海道システムサイエンス株式会社に委託して行った。Bioanalyzer による解析では、RNA の客観的な分解度評価を行うために、RNA を分解度で分類する評価基準である RNA Integrity Number (RIN)を使用した。

### 4. RNA-seq と *de novo* assemble

モンキチョウ雌雄 1 個体ずつの全身から抽出した混合 RNA 溶液を 1 サンプルとして、HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA, US)を用いて 1 lane, PE-101 bp, 4 Gb スケールのシーケンシングを行った。Cutadapt v1.1 (<https://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/>)と Trimmomatic v0.32 (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>)を利用し、raw data のクリーニングを行った。Trinity v2.4.0 を用いた *de novo* assemble によりアセンブリデータ(contig)を獲得した。以上は、北海道システムサイエンス株式会社に委託して行った。

## 結果

RNA 抽出は、NucleoSpin® RNA と TRIzol を用いて別々に 2 回行った。品質検査の結果、TRIzol で抽出した total RNA サンプルは分解が進んでいたため、前者のカラム抽出したサンプルを RNA-seq に使用した。品質検査結果の詳細は、以下に記述する。

抽出した total RNA の品質ならびに分解度評価は 3 つの手法で行った。はじめに、DynaMarker® RNA High for Easy Electrophoresis 非変性ゲルによる泳動結果より、18S+28S rDNA の分解度を視覚的に確認した(Fig. 3.2A)。雌雄どちらの抽出サンプルにも 2 kb 程度で

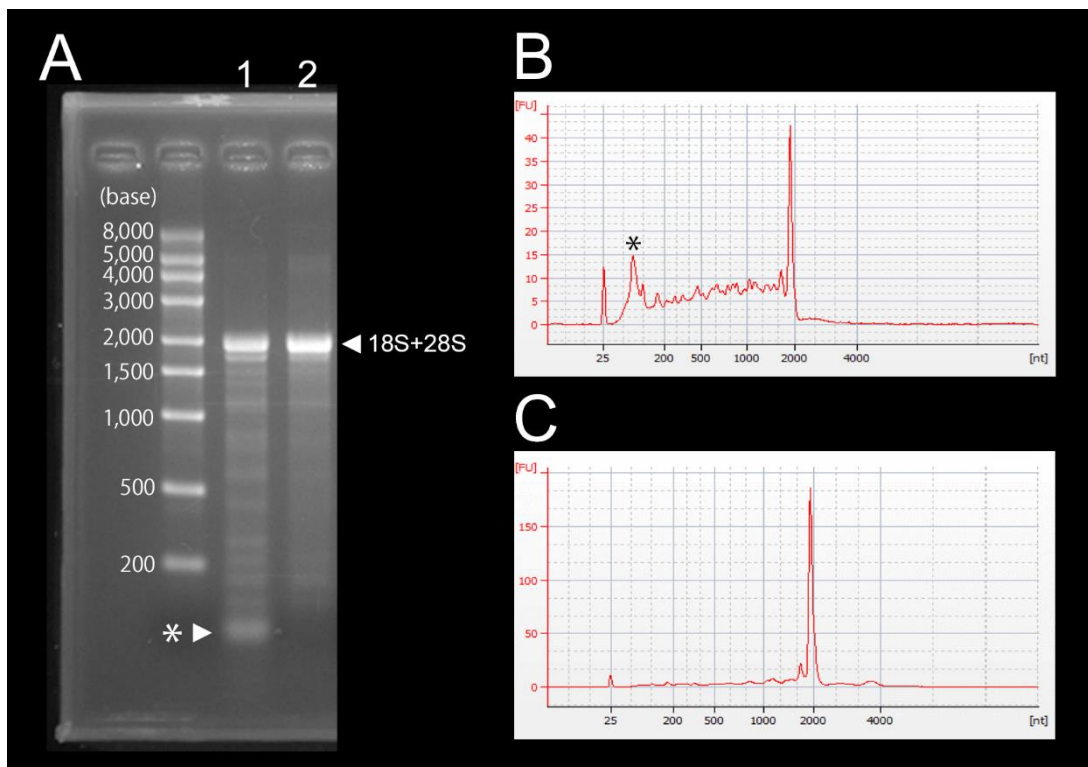
強いバンドが検出されたが、TRIzol で抽出したサンプルでは、18S+28S rDNA のバンド以外にラダー状の薄いバンドが生じていた。次に、分光光度計による測定より、RNA 抽出試薬やタンパク質のコンタミを、A260/A280 比と A260/A230 比から解析した(Table 3.15)。抽出法にかかわらず、分光光度計による確認では十分な品質が確認できた。最後に Bioanalyzer による測定を行い、rDNA 比と RNA Integrity Number (RIN)の測定から客観的な分解度評価を行った(Fig. 3.2B, C)。どちらの抽出方法でも、波形のピークが 2 kbases 弱で確認されたが、ピークの値に約 4 倍の差があった(Fig. 3.2)。TRIzol 抽出サンプルでは、ピーク以外にも断片化された RNA が検出されており、電気泳動の結果と一致していた。また、Bioanalyzer で確認された 100 bases 程度の波形のピークも、泳動結果から確認された(Fig.3.2B, アスタリスク)。カラムで抽出したサンプルでは、2 kbases 程度に波形のピークは集中しており、泳動結果でも rDNA 以外のバンドはほぼ確認できなかつた。これらの結果より、カラムで抽出した total RNA は RNA-seq に十分な品質であることが確認された。

モンキチョウ RNA-seq から得られた Raw data は、4,053 Mbases、リード数は、40,123,928 リードであった(Table 3.16)。de novo assemble の結果、N50 が 1,357 base の 64,764 contigs が得られた(Table 3.17)。

## 考察

本研究で獲得したトランスクリプトームデータは 64,764 contigs であり、N50 は 1,357 bp である。先行研究で網羅的な FISH マッピングが行われた *Heliothis virescens* では 5,415 ESTs (Shelby and Popham, 2009)、*Mamestra brassicae* では 1,286 ESTs (Kamimura *et al.*, 2012)の配列情報で BAC ならびに fosmid クローンのスクリーニングが行われていた(Sahara *et al.*, 2013)。RNA-seq で得られた配列情報量はこれらを遥かに上回り、PCR スクリーニングに用いる STS プライマーの設計に十二分量を満たしていると考えられる。

RNA-seq はステージ別の発現量解析によく用いられ、本研究のように配列情報のライブラリーとして用いる場合は少ない。RNA-seq は次世代シーケンサーを利用した実験としては安価で、CDS 情報を比較的短時間で大量に得ることができる。本節の目的である、STS プライマー設計のための遺伝子情報の取得という観点であれば、1 レーンの解析で十分であることから、本分野での RNA-seq 技術の利用は有効である。



**Figure 3.2** Quality check of *Colias erate* total RNA. (A) RNA electrocataphoresis by DynaMarker®RNA High for Easy Electrophoresis kit (1.5% non-denaturing agarose gel, 0.5× TAE). Lane 1 shows total RNA isolated using TRIZOL. Lane 2 shows total RNA isolated using NucleoSpin® RNA column. Fragmentation RNA check of by Agilent 2100 Bioanalyzer of TRIZOL (B) and NucleoSpin® RNA column (C). An asterisks in (B) indicates peak of RNA digestion (ca. 100 base).

Table 3.15 Quality check results of total RNA in *Colias erate*

Isolation method	Nanodrop		Bioanalyzer	
	A260/A280	A260/A230	28S/18S	RIN
(1)	2.12	2.24	0.00	4.2
	2.09	2.18	0.00	4.8
(2)	2.20	2.22	0.06	6.7
	1.49	1.47	0.05	7

Isolation method are (1) TRIzol or (2) NucleoSpin® RNA.

Table 3.16 Sequence raw lead data summary of RNA-seq data in *Colias erate*

Total length (Mbases)	Number of Reads	% of >= Q30 Bases	Mean Quality Score
4,053	40,123,928	95.72	36.77

Table 3.17 Trinity-assembled summary of RNA-seq data in *Colias erate*

Number of Contigs	Total Length (bases)	Average Length (bases)	Max Length (bases)	N50 Length (bases)	% of Mapped Reads
64,764	53,424,823	824.9	23,639	1,357	94.87

### 第3節 カイコ遺伝子配列を query としたモンキチョウのカイコオルソログ抽出

染色体対応関係を種間比較する場合、どの解析手法においてもオルソログ遺伝子の配置を比較するのがセオリーである。特に、EST 配列をもとに BAC のスクリーニングを行う方法では通常、tblastx 解析などによりカイコ単一遺伝子のオルソログを特定する(Yasukochi *et al.*, 2016; Fujimoto *et al.*, 2018)。そこで本節では、先行研究に従い BLAST 解析を活用してカイコ遺伝子とのオルソログの特定を試みた。

BAC スクリーニングに用いる STS プライマーは、増幅産物の配列長が確実かつ特異的でない、誤った BAC を選抜する要因となりかねない。RNA-seq 結果のみからプライマーの設計を行った場合、想定していないイントロンや遺伝子間領域を挟んでしまい、想定したサイズのバンドが検出できない場合がある。したがって、プライマー設計に先んじてスプライシングサイトを予測した方がよい。本研究では、公開されているモンキチョウと同亜科の *Phoebis sennae* のゲノム情報(Cong *et al.*, 2016)との比較から、モンキチョウで想定されるエキソン-イントロン構造を予測した。その上で、予測されたモンキチョウ単一エクソンから、STS プライマーを設計した。

#### 材料および方法

##### 1. モンキチョウ contig におけるカイコオルソログの検出

*de novo assemble* したモンキチョウトランスクリプトーム配列に対して、カイコ 242 遺伝子を query として、blast+v2.2.31 (NCBI)による tblastx 解析を行った。オルソログが推定できた contig について、score と e-value の値、contig の長さやプライマー設計の難易度、カイコ染色体上での座乗位置などの観点から、BAC スクリーニングに利用する contigs を任意に選択した。選択した contig をクエリーとし、カイコに tblastx 解析を行うことで、カイコ染色体上の一カ所に座乗するオルソログであることを確認した。

##### 2. STS プライマー設計

選択したモンキチョウのカイコオルソログ遺伝子配列をクエリーに、Lepbase v4 (<http://lepbase.org/>)の *Phoebis sennae* scaffold v1.1 に blastn 解析を行うことでスプライシングサイトの予測を行った。単一エクソンをクエリーに、Primer BLAST (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)を実行し、プライマーを設計した。設計したプライマーがターゲット遺伝子領域のみを増幅するように、モンキチョウトランスクリプトームデータに blastn を blastn-short オプションで実行し、その結果が予測通りである場合、STS プライマー合成へと進んだ。



## 結果

モンキチョウトランスクリプトームデータに対して、カイコの代表的な 242 遺伝子を query とし、tblastx 解析を行った結果、181 contigs がオルソログ候補として検出された。このモンキチョウ 181 contigs について、遺伝子の長さやプライマー設計の難易度、カイコ染色体上での座乗位置などの観点からプライマー設計を行う contig を選択し、クエリーとして *New Bombyx mori gene models* (2017) (Kawamoto *et al.*, 2019) に対する tblastx 解析を行った。2 度の tblastx 解析を通じて、モンキチョウ contig に 117 カイコ遺伝子オルソログが特定された。これらのモンキチョウ遺伝子について、モンキチョウのエキソン領域を *Phoebis sennae* ゲノム情報との比較によって予測し、STS プライマーを 117 ペア設計できた (Table 3.18)。

## 考察

カイコ 242 遺伝子の解析により、181 contigs をカイコオルソログ候補として検出し、BAC スクリーニングに用いるカイコ遺伝子オルソログを 117 選択した (Table 3.18)。本節の研究結果より、カイコ全染色体に対応するモンキチョウ contigs を選択できたものの、染色体全体を網羅しているとは言いがたい。この問題はクエリーとする遺伝子数を増やせば解決できるが、本節の方法では手間がかかりすぎるため、より効率的な選抜方法が求められる。

117 contig がカイコ遺伝子と 1 対 1 の対応関係であった一方で、モンキチョウ contig の TRINITY\_DN19960\_c0\_g1\_i1 と TRINITY\_DN22710\_c0\_g1\_i1 は、カイコゲノム上でそれぞれ 2 つずつの近傍遺伝子に対応していた。これらはいずれもモンキチョウ 1 contig がカイコでは 2 つに分割した形をとっていた。TRINITY\_DN19960\_c0\_g1\_i1 は、876 bp を境目に、前半がカイコ KWMTBOMO00859 と、後半が KWMTBOMO00857 と高いホモロジーを示す。カイコではどちらも *distal-less* とアノテーションされている。TRINITY\_DN22710\_c0\_g1\_i1 は、1,185-1,195 bp を境目に、前半がカイコ KWMTBOMO15584 と、後半が KWMTBOMO15583 と高いホモロジーを示す。カイコではどちらも *coatamer\_protein\_complex\_subunit\_alpha* (CPCSa) とアノテーションされている。これら 2 つの contig が 2 つのカイコ遺伝子とホモロジーが高い理由として、いくつかの仮説が立てられる。まず 1 つには、モンキチョウ contig あるいはカイコ GeneModel のアセンブリミスが考えられる。2 つ目として、モンキチョウの 1 遺伝子が、カイコでは 2 遺伝子に分割して別々に機能している可能性である。いずれにしても、本研究ではカイコ染色体の一カ所に contig と対応する遺伝子が座乗していれば比較解析が可能であることから、これら 2 contig がカイコで 2 遺伝子ずつと対応していたとしても、BAC スクリーニングおよび FISH マッピングには影響が少ないと考えられるため、STS プライマーの設計に利用した。

Table 3.18 *Colias erate* STS primer pairs used for BAC selection

<i>Colias erate</i> Transcriptome ID	Forward primer	Reverse primer	Size (bp)	Gene definition*
TRINITY_DN15848_c0_g1_i2	AACGGTTGCTCCGTCACAT	AAGCAGGAGCCTGTCAGATG	102	<i>tan_protein</i>
TRINITY_DN23054_c3_g1_i3	GCTGGACGAACCCACTAAC	GTCTAAAGTCGTGGCTGACC	107	<i>ATP-binding_cassette_subfamily_F_member_2</i>
TRINITY_DN22414_c0_g1_i1	CTGCTTGTGGCCCTGATAC	ACCCACCAATCTGGCAATGG	437	<i>heparanase-like_protein</i>
TRINITY_DN21355_c0_g1_i12	GCACAGTCTCGTCAACCTCA	CATGTTGTCCCTCCACGAGT	207	<i>kettin_protein</i>
TRINITY_DN15542_c0_g1_i1	GAGAACCCTGGACGTAGACCG	TCAGCATCACCTCAACAGAC	107	<i>imaginal_disk_growth_factor</i>
TRINITY_DN17488_c0_g1_i1	TTCTGCTGATGTAGCGCAGG	CCTCCAACGAGGAACCCATC	111	<i>triosephosphate_isomerase</i>
TRINITY_DN21427_c1_g1_i1	AAATGGCAGACTCGAAGCGA	TTGGGCTGTGTTTCGTCAG	125	<i>proton-coupled_folate_transporter</i>
TRINITY_DN24057_c0_g1_i1	GCACCAGACTGCGATCGTT	GTAGTCTTAGCCGGGGAAG	196	<i>Y-box_protein</i>
TRINITY_DN12322_c0_g1_i1	CAGCACCATCCGTCTCATCA	TAGTGTGTTGGCTCCTCG	170	<i>insulin-like_growth_factor_2_mRNA-binding_protein_1</i>
TRINITY_DN18559_c0_g1_i3	TAAGACATGCAGCGAACGGT	TTTGAGCGTGTACTCCACC	181	<i>period</i>
TRINITY_DN15847_c0_g1_i1	CACAAGAACAACCCGACCTCA	TAGAACGCAAGGGCAGAAGA	150	<i>6-phosphogluconate_dehydrogenase</i>
TRINITY_DN17302_c0_g1_i1	AAGTGGATCGCAAGCTCAA	CATCTTCTCGGCACATTCG	248	<i>SNF4/AMP-activated_protein_kinase_gamma_subunit</i>
TRINITY_DN13328_c0_g1_i1	GAGTGAACGTGCTGGTGTGA	TGGGTGTACACTGTTTGGCT	209	<i>lactate_dehydrogenase</i>
TRINITY_DN33948_c0_g1_i1	CACCAATGGCACCAAGATCG	CGTCGATTTGCTTGTGGCG	274	<i>potassium_voltage-gated_channel_protein_Shaker1</i>
TRINITY_DN16891_c0_g1_i1	CCTCTCATACGGTTCGGAGC	CTTCTGAACACGACTCCCC	175	<i>phenylalanine_hydroxylase</i>
TRINITY_DN16711_c0_g1_i1	ACGACCGATGGCTGAATGTT	TGGCCCTTTGATACCATGT	661	<i>3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA_reductase_precursor</i>
TRINITY_DN19960_c0_g1_i1	TAACACGCGAGCATCGGAAA	TCATCTTAGCCGGAGCTGGC	466	<i>homeotic_protein_distal-less</i>
TRINITY_DN20784_c0_g4_i4	GTCACCGGAAGAGTCCGAAG	CAGGCACATCTTCTTGCT	158	<i>homeobox_protein_invented</i>
TRINITY_DN16853_c0_g1_i1	CAACCGTCTGATCCACGTA	CCGTCTTCTAGTGAGCCG	171	<i>40S_ribosomal_protein_S21</i>
TRINITY_DN15621_c0_g1_i1	TTGTGCTATCAACGACCC	ATGGACCTTCCAGCTGCTC	721	<i>glyceraldehyde-3-phosphate_dehydrogenase</i>
TRINITY_DN13605_c0_g1_i1	GGCATGATCCCCACAAGAC	TACTTGGCCAGGCTTTA	149	<i>ribosomal_protein_L13A</i>
TRINITY_DN21284_c0_g1_i1	GAGGCTACCTGCTCCACAG	TCCTTCCGCAATAACGCTCA	188	<i>protein_msta</i>
TRINITY_DN22462_c1_g6_i2	GCTCGGAAGATGTAAGGGC	GGTAGCCGGCAGAATGACA	126	<i>protein_ultraspiracle_homolog</i>
TRINITY_DN8970_c0_g1_i1	GAGTGGGTCGCAAGTCCA	GATGCTCTCGGCCCATTT	184	<i>ribosomal_protein_L3</i>
TRINITY_DN15837_c0_g1_i1	TGCTGCATACGCTGGATCG	GCCGCAAAAGCGCTTCATT	458	<i>aromatic-L-amino-acid_decarboxylase</i>
TRINITY_DN25947_c0_g1_i1	TTCAGGCCCAAGTTTGCCA	CAGCTCCCAAGGGTGT	178	<i>H+_transporting_ATP_synthase_subunit_g</i>
TRINITY_DN25298_c0_g1_i1	TCTCGTCATCAAGAAGCCCG	GTGGCATACTGTCATTAGCTG	128	<i>ribosomal_protein_L19</i>
TRINITY_DN4939_c0_g1_i1	TCAACACGCCAGAAGACACC	GTAATCCAGCCAGCAGCAGC	150	<i>ribosomal_protein_L13</i>
TRINITY_DN11316_c1_g1_i1	GATGGACAACCTCGCAGTCA	CCAGTAATTCCCGCTCTGT	304	<i>Protein_naked_cuticle-like</i>
TRINITY_DN17435_c0_g1_i1	GCCAGACCGATGATGTGACT	CCTAGCCTCTGGCTTTGTC	227	<i>ribosomal_protein_L15</i>
TRINITY_DN14534_c0_g1_i1	GCAGGGAACGAGAGGAACAA	TTGAGAATATCGCCGGAGCC	148	<i>abdominal-A_transcript_variant_E</i>
TRINITY_DN17328_c0_g1_i1	AGATCGGGTGAGCATGGTTG	AACATTTACCGAGGAGCCA	142	<i>ras_protein</i>
TRINITY_DN1862_c0_g1_i1	CTCCAGCGGACTCTGTGAAC	GAAAGTGGTCTGCGCGTGT	125	<i>homeobox_protein_Hox-A1-like_partial</i>
TRINITY_DN20345_c1_g2_i1	CCAGAAACCCGATGGACCAA	TCCAGAATCGTGGTGGAGGTA	261	<i>chitinase_precursor</i>
TRINITY_DN21661_c1_g2_i4	AGATCTCGGACCTTAAGGGGG	TCAGTTCCTCCATTTGGCTTC	159	<i>Annexin_IX</i>
TRINITY_DN22244_c0_g1_i1	AACGAACACCTGGAACACC	CGATGGACTCCCGACATAC	328	<i>DE-cadherin</i>
TRINITY_DN22022_c0_g1_i1	AGTCGCTCGCACACAGTATT	CGAGAGTCAACAGCGACTGA	202	<i>kinesin-like_protein_KLP2</i>
TRINITY_DN20848_c0_g1_i1	CCTAAGTATCGCGGACGACT	GACGCAAAAGAACCCACATC	153	<i>translocation_protein_SEC62</i>
TRINITY_DN16570_c0_g1_i1	TATGGATGTCGCGGCTCTCG	ATGCAGACCAATCGTCTGG	185	<i>enolase</i>
TRINITY_DN22530_c0_g1_i1	GGGCGGAGAAAGATCAC	CGGATAGCTTGGAAAGCTG	132	<i>Ubiquitin_carboxyl-terminal_hydrolase_5</i>
TRINITY_DN20602_c0_g1_i8	CTCCGCGGTTTCTGTTTTG	TGTGATCGAGAAGTCCACC	118	<i>transformer_2</i>
TRINITY_DN14447_c0_g1_i1	GCACCCGAGAACAACAAAG	GTTCTCGTTGCGCTTTCCTG	108	<i>ribosomal_protein_L24</i>
TRINITY_DN11011_c0_g1_i1	TCAGGCTAAATCATGGCCCC	CATCACGGTCAAGCTTGACT	214	<i>40S_ribosomal_protein_S14</i>
TRINITY_DN21478_c0_g3_i1	TTGTTGTGCGTCAACTCTC	TTTACGGGTTGACGGGTTT	367	<i>laccase_2A</i>
TRINITY_DN21058_c0_g1_i1	GACTGGTGCGAGACTTAGACG	AGTTCCAGTAGGATGTGCGT	156	<i>NADPH_cytochrome_P450_reductase</i>
TRINITY_DN668_c0_g1_i1	ACAATGCCGAAAACGAGGGC	CCAAACTGTGCGAGGGCAA	253	<i>ribosomal_protein_S15A</i>
TRINITY_DN21968_c0_g2_i1	CGCGGCATTAAGCAGGTT	AACCTGCTTGATCGGGTGA	655	<i>CAD_protein</i>
TRINITY_DN22486_c1_g1_i1	GTCGCGCACTTAGGGAACAT	ATCTGGGTGTCAGTTCCTGC	159	<i>diapause_bioclock_protein</i>
TRINITY_DN19583_c1_g1_i12	GATGCGGCAAGTGTCAACG	TCTGACTAACAGACACCCG	153	<i>mitochondrial_glutamate_carrier</i>
TRINITY_DN19687_c0_g1_i1	CAGTAGCCGACCTCTTGTG	CTACGGGTGCTGGCATTCT	155	<i>ribosomal_protein_L4</i>
TRINITY_DN21468_c0_g1_i1	AACCGAGTCGGCGAACAATA	CCTCAGAAGCCAGCTACAA	306	<i>CDKALI-like_protein</i>
TRINITY_DN22917_c0_g1_i1	GTGTCGGACTCAGTGTCG	TTCCATGTGGCTCGTCAGC	603	<i>DNA_topoisomerase_2</i>
TRINITY_DN22578_c3_g2_i1	AATCAGGCGGCAAGGTA	CCTGCATACAGCTTGGCTC	171	<i>Dmc1_homolog</i>
TRINITY_DN25589_c0_g1_i1	AAACTATTGGCGGCTCCTCA	CTTCCGACTGATATGTGCT	159	<i>cysteine_sulfinic_acid_decarboxylase</i>
TRINITY_DN20175_c0_g1_i1	CCTGGCCAACCACACTATT	CTTCGAGTTCCTCATTTGC	105	<i>bifunctional_ATP-dependent_dihydroxyacetone_kinase</i> <i>/FAD-AMP_lyase_(cyclizing)-like_partial</i>
TRINITY_DN22998_c2_g1_i1	GCATCAGGTGCTGTTTTCCG	TTAGCAGCCAGTTGAGCCTG	437	<i>cytosolic_malate_dehydrogenase</i>
TRINITY_DN22909_c0_g1_i1	CTCGACGGTCTATGCAACCA	TAGGCAGACTCGGTTTCCTC	259	<i>saposin-like_protein</i>
TRINITY_DN18740_c0_g1_i1	CTACCAACGAGTGCAAGCCG	TTCCGGCTCAAATCTCTCC	206	<i>heat_shock_protein_hsp21.4</i>
TRINITY_DN12981_c0_g1_i1	TGGCCAAACCAAAAAGAGAGA	TCTCATCTCTAGACACAGA	224	<i>ribosomal_protein_L31</i>
TRINITY_DN20581_c0_g1_i4	ACAAATTCGCCAAGCTCCAA	TTGTCTTCTTCTCAAGGGTGA	100	<i>troponin_I_transcript_variant_C</i>
TRINITY_DN21622_c0_g2_i2	TATACCACGGAAGACCCGGC	CTGGCTTTCCGTTCCGTT	276	<i>ribosomal_protein_L21</i>
TRINITY_DN18554_c0_g1_i1	AAGACATAGGGCAGGATGGC	GAGCCTTCCTGTGCATCTA	101	<i>tryptophan_2,3-dioxygenase</i>
TRINITY_DN11613_c0_g1_i1	CGGAGTGACGATGTTGGGT	GCTTGCCTCAAAGTTCGC	428	<i>facilitated_trehalose_transporter_Tret1-2_homolog</i>
TRINITY_DN21589_c0_g1_i1	AAGCCAAACAGCCAACTCT	TTACGACCGAAACCCGCTAC	151	<i>ribosomal_protein_S23</i>
TRINITY_DN17905_c0_g1_i1	CAGCGTCTTCCAAGTGTGTT	TTCTGCGCTATCTCCCTAGC	154	<i>ribosomal_protein_L7A</i>
TRINITY_DN20993_c0_g1_i2	CGACCAATGGAGAGGAGC	CACAGCCACCATCCGCTAC	543	<i>nuclear_receptor_GRF</i>
TRINITY_DN32203_c0_g1_i1	CATGAAGCAATCCGTGCCG	AAAGTCTGCTGCAGCCCTG	169	<i>ribosomal_protein_L5</i>
TRINITY_DN14712_c0_g1_i1	TCACAAAACGTTCCGCAAAAG	GCAACAGTTCAGCTCATC	429	<i>ribosomal_protein_S5</i>
TRINITY_DN14597_c0_g1_i3	GAATGCTGATGAGCTCGCAC	TGGGTGTTCCCATAGTTGA	120	<i>ribosomal_protein_L10A</i>
TRINITY_DN18822_c0_g1_i1	GACAATGTGGGCTCCACCC	ACATTCGCTTGTGTTGGGG	161	<i>ribosomal_protein_P0</i>
TRINITY_DN16302_c0_g1_i2	ACAAGATCAAAAACCGCACCG	AGGTCAGTAACACAGGAGCA	170	<i>ribosomal_protein_L6</i>
TRINITY_DN19539_c0_g1_i2	CGGCGGACGACATTAAGGAA	CCGCGGCGATCATTATTCT	146	<i>sex-lethal</i>
TRINITY_DN22872_c1_g1_i6	TGCCAGATGATGGATGGCTTT	CCGGCTTATGTTGTGCGTA	125	<i>NIPSNAP_protein</i>
TRINITY_DN14917_c0_g1_i2	CTAGACCGTCTCGGGT	GTCAGATGCTGCTCCGAG	111	<i>protein_cortex-like_partial</i>
TRINITY_DN15384_c0_g1_i1	GTTCGCAATGGCAGTATG	GGGCGATGACAACTGATTG	259	<i>ribosomal_protein_L22</i>
TRINITY_DN15295_c0_g1_i1	TGGTTTGGCATGCTCTCCAC	TGGCGCACTACTTTGGATT	317	<i>ribosomal_protein_S24</i>
TRINITY_DN22023_c0_g1_i1	GTCAACCGGCAACCAAAA	GTCAGGGCTTTTCAATCGCC	564	<i>symplesin</i>
TRINITY_DN19846_c0_g1_i1	GACTGTCCACCAAAAGTT	GTCGGGTGTGATAGGGTATC	135	<i>arylalkylamine_N-acetyltransferase</i>
TRINITY_DN20930_c0_g1_i1	CTTCAAGCGGTGCTACTCCA	GAGAGCTCCTCGGGTACTT	120	<i>elongation_factor_1_gamma</i>
TRINITY_DN21876_c0_g1_i1	CAGATGTCGTCGACATGAG	CTGGGTGCTCGTGCATCGTT	423	<i>uncharacterized_protein_LOC106139612</i>
TRINITY_DN18840_c0_g1_i1	AACATCCCTTGGATCCTGGT	CCTCAAACAGCCTTTGGTTC	128	<i>probable_RNA-binding_protein_CG14230</i>
TRINITY_DN21391_c0_g1_i1	AGGTAACGGGCAAAACCC	AGTTTGGGCACATCCCATCA	173	<i>vasa-like_protein</i>
TRINITY_DN22835_c3_g1_i5	AAGAAGCCCAACTTCTGGGT	ATCAGTCTGCTTGTCTAGGT	222	<i>dihydropteridine_reductase</i>
TRINITY_DN21869_c0_g1_i1	TGACGACTTCAAGACCCGTG	GCGCACTCCTCAAGTTCT	229	<i>translation_elongation_factor_2</i>
TRINITY_DN21139_c0_g1_i1	CAAAATAACCGCAGTCTGG	TACAGTCTCCACAGCGTCC	115	<i>P-element_somatic_inhibitor</i>
TRINITY_DN20190_c0_g1_i1	GTCGTGATCCGCAAGGAGC	CTCTGCAAAATGCCAAGCCG	158	<i>eukaryotic_translation_initiation_factor_2_alpha_subunit</i>
TRINITY_DN7351_c0_g1_i1	ATCACAAACCGCAAAACTCC	CAACTTCAACACAGGCTCG	151	<i>ribosomal_protein_S20</i>
TRINITY_DN11216_c0_g1_i2	TAAAGCACTCCAAGTGGGC	AGTATCTGGCCAGGTTCCG	150	<i>sorbitol_dehydrogenase</i>

TRINITY_DN1170_c0_g1_i1	TGAGGCGTCTCAGACATTCC	GTTGAGGGTTCGCTCAGTT	199	<i>40S_ribosomal_protein_S17</i>
TRINITY_DN22094_c0_g1_i1	ATTTGTATGGGCTTCGGGCA	ATAAGTAGCCGCGAGAGTCG	160	<i>furin-like_convetase</i>
TRINITY_DN20798_c0_g1_i1	AGGATGCGAGGTTCTATGCC	TCTCTCCGTGCATGTCCTTG	168	<i>calreticulin</i>
TRINITY_DN2621_c0_g1_i1	GGGAACGTCAAGCTTCGGTA	ACGTAATTTAGCGGCTGGGT	127	<i>ribosomal_protein_L37</i>
TRINITY_DN20952_c0_g1_i1	CTTGGGTGCGTTCCTACG	TAGAGAGCAGCAAACGCTGG	163	<i>polypyrimidine_tract-binding_protein_2</i>
TRINITY_DN20453_c0_g1_i2	CTCGTTGTGGAGTACCGCAT	AGGCACAACGGTACGGAATA	110	<i>proliferating_cell_nuclear_antigen</i>
TRINITY_DN17108_c0_g1_i1	CGAGTTCGGAGACAACACCA	TCACTGCTGGCCTCAATGTT	132	<i>superoxide_dismutase_[Cu-Zn]</i>
TRINITY_DN18633_c0_g1_i1	ATCTCGGTCTGGGGATGA	ACAAGCCACTACGTGACCG	689	<i>inhibitor_of_apoptosis_protein</i>
TRINITY_DN20855_c0_g2_i1	AACGTCGGAAGGGACGAAAT	CCAGGCACCAACTCCCTAAA	395	<i>activator_of_90_kDa_heat_shock_protein_ATPase_homolog_1</i>
TRINITY_DN20215_c0_g1_i4	GCAGAACCTCATCGACTGCT	ATACGGGTAGGTCCTCTCGG	124	<i>fibronase_precursor</i>
TRINITY_DN20032_c0_g1_i1	ATGCGTCATCCGCCATAAC	TGGTGCTGGAGAAGCATCC	317	<i>wee1-like_protein_kinase</i>
TRINITY_DN16975_c0_g1_i1	GACGTTGCCAACTCTGAGC	ACCTTCCTGATGCACACGTC	122	<i>40S_ribosomal_protein_S3a</i>
TRINITY_DN22224_c0_g1_i1	TGGTAGAAGCGCAATCGGAC	TAGCGTCTCCAGTGGGTG	177	<i>puff-specific_protein_Bx42</i>
TRINITY_DN22515_c1_g1_i1	CCCGCTAAAATGAAAGTGGTCC	TGATTTAGCTTCGAGCGCCT	117	<i>heterogeneous_nuclear_ribonucleoprotein_U-like_protein_2</i>
TRINITY_DN19739_c1_g1_i1	GCAAAACCACGTACGAGGAGA	ACTGATCGTACTCAGCGTCC	123	<i>actin-depolymerizing_factor_1</i>
TRINITY_DN21161_c0_g2_i1	GGGACAACGTGATCTCGCC	ACGTCGATGCCAAGGAGTTT	108	<i>ferritin_precursor</i>
TRINITY_DN18963_c0_g1_i1	ATCGTCGACGCCTTCATCC	TCATCATGCGCCTACGGAC	559	<i>ADP/ATP_translocase</i>
TRINITY_DN14011_c0_g1_i1	GAAGCCCTCCTCTGCCTTG	GAAGTCCTGCCGTCTCCAG	512	<i>putative_phosphatidylethanolamine-binding_protein</i>
TRINITY_DN22301_c1_g4_i1	CTCTCGGCATCAACTCCACA	TGGCGGCTCCTTTGTATT	586	<i>juvenile_hormone_esterase_1_precursor</i>
TRINITY_DN16504_c0_g1_i2	TGTTGTTTCGACAAAACCCAG	CAAGGGAGCCTCGAACCTTT	108	<i>ribosomal_protein_S25</i>
TRINITY_DN20249_c0_g1_i1	TGCGTCTCGGAGAAATGGAAT	TTAGCGCTATGTCGTGTTGC	150	<i>BzArgOEtase_precursor</i>
TRINITY_DN17742_c0_g2_i1	CTTACCGCGCTCCTACAC	CGTGGAGTGATCCCGTIT	414	<i>silk_gland_factor_1</i>
TRINITY_DN20457_c0_g1_i1	CGCGAACCCGACCACTTCATA	AGCTCACCTCTCTCGGATGT	151	<i>protein_star</i>
TRINITY_DN18556_c0_g1_i1	GCGCAGACAGAGATCCAA	TGGGCAGCGGTATCTCAATC	171	<i>26S_proteasome_regulatory_ATPase_subunit_10B</i>
TRINITY_DN22710_c0_g1_i1	CTACTTCACGCACTGCAAGC	AAACTTGGCACAACCTTGCCC	344	<i>coatomer_protein_complex_subunit_alpha</i>
TRINITY_DN20865_c0_g1_i1	TCCGCAAGAAGCTCGGATAC	CATACCGCACGCTAGACACT	113	<i>nuclear_orphan_receptor</i>
TRINITY_DN17436_c0_g1_i1	GTGAAGGACTCCCCAAGTG	GGAATCTTCACTATCCTCTGGCA	92	<i>6-phosphogluconolactonase</i>
TRINITY_DN15492_c0_g1_i2	GAGGCGATCGAAGGCACATA	ACATCTCTGAAGCAAGGCGA	215	<i>ribosomal_protein_S11</i>
TRINITY_DN19794_c0_g1_i1	TTAGGGGCCACCGGGAATA	AACTGTGCCAGACTCCGTG	870	<i>serpin_5</i>

\*Identified by desConecter.py

#### 第4節 カイコオルソログを含む BAC の選抜

これまでの結果より、部分的ではあるが、カイコ遺伝子オルソログとなるモンキチョウ contigs の特定ができた。本節では、第3節で設計した STS プライマーを用いて、第1節で作製した BAC ライブラリーから目的の BAC クローンを PCR スクリーニングした。

#### 材料および方法

##### BAC スクリーニング

モンキチョウ BAC のスクリーニングは、第1節で作製済の BAC-DNA プール(プレートプール、x プール、y プール)を用いて、Yasukochi (2002)と Yoshido *et al.* (2014)に準じた2段階スクリーニングで行った。PCR のポジティブコントロールとしてモンキチョウ gDNA をテンプレートに用いたことを除いて、第II章第3節のオオモンシロチョウ BAC スクリーニングの手順と同様に行った。

#### 結果

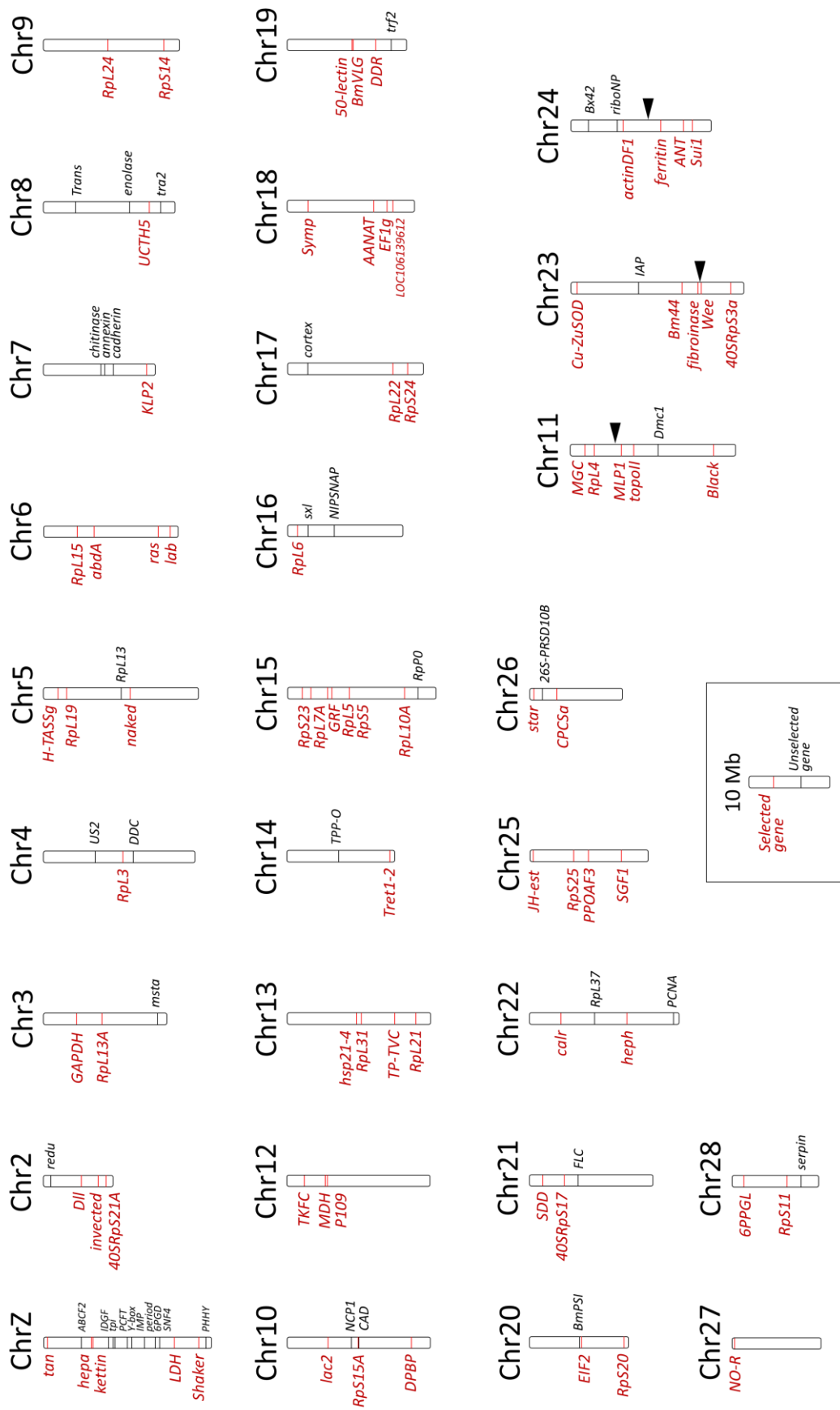
117セットのプライマーペアを PCR セレクションに使用し、78 プライマーセットで BAC クローンを選抜した (Table 3.19)。今回獲得された BACs のうち、37B07 が TRINITY\_DN18840\_c0\_g1\_i1 と TRINITY\_DN21391\_c0\_g1\_i1 の2 contigs を含んでいたため、77 クローンで 78 カイコ遺伝子オルソログを含んでいた。選抜した 77 BAC クローンを、カイコのゲノム情報(Kawamoto *et al.*, 2019)を参考に *in silico* でマッピングすると、これらはチョウ目昆虫の基本染色体(n=31)を網羅した(Fig. 3.3)。カイコ第15染色体に対応する BAC が6つで一番多く、第4, 7, 8, 14, 16, 27染色体に対応する BAC が1つのみであった。

#### 考察

本節では、カイコ遺伝子オルソログを含んだ 77 BAC クローン(78 オルソログ)をスクリーニングできた。本章に似た方法で BAC をスクリーニングした藤本 (2019)では、ヒゲナガカワトビケラ(n=13)において 81 BAC クローン(79 オルソログ)を選抜しており、BLAST 解析に頼った従来の BAC スクリーニングの流れとしては、一般的な数の BAC が特定できたと考えられる。しかし、n=31 のチョウ目昆虫染色体のマッピングでは、*Heliothis virescens* では 160 BACs をスクリーニングして FISH の単一シグナルを得られたものが 140 BACs、*Ostrinia*

*nubilalis* では 163 BACs をスクリーニングして単一シグナルを得られたものが 112 BACs であった(Sahara *et al.*, 2013; Yasukochi *et al.*, 2011; 2016)。したがって、 $n=31$  のチョウ目昆虫の FISH マッピングに必要なクローン数としては本節の研究結果だけでは不足していると考えられ、効率的な追加取得は、次章への課題となった。

BAC-FISH マッピングによる染色体比較では、1 染色体あたり 4 BACs 以上を偏り無くマップすることで、染色体の向きならびに遺伝子配置に異同が検証可能となる。本節の *in silico* mapping 結果より、FISH のシグナルが全て単一で予想通りに得られたと仮定すると、この要件が満たされるのは、第 6, 15, 18, 25 染色体ならびに性染色体(Z 染色体)に限られる(Fig. 3.3)。第 13 染色体も 4 BACs をスクリーニングできたが、カイコの染色体末端から約 9.3 Mb までの領域が未対応であることから、他の 1-3 BACs しか獲得できていない染色体同様に追加の BAC 獲得が必要であろう。モンキチョウ染色体がカイコ染色体( $n=28$ )よりも 3 染色体多いことを考慮すると、カイコ染色体がそれぞれ 2 つの染色体に対応(Ahola *et al.*, 2014; Yasukochi *et al.*, 2016)する、第 11, 23, 24 染色体については、より多くの BAC 選抜が求められる。とはいえ、本節の結果は、モンキチョウの染色体マッピングを進めるにあたり、一里塚を形成したといえる。



**Figure 3.3** Chromosomal distribution of *Bombyx mori* genes mapped *in silico* for which we isolated BAC carrying *Colias erate* orthologs. Chromosome length and gene distribution were referred from New *Bombyx mori* genome assembly (2016). Black frame box shows the *B. mori* chromosome length (Mb) and explanation samples. Arrowheads show chromosome breakpoints of n=31 species predicted from previous studies (Aholo *et al.*, 2014; Yasukochi *et al.*, 2016).

Table 3.19 Characteristics of the selected *Colias erate* BAC clones and *Bombyx mori* orthologs carried by them

<i>Colias erate</i>		<i>Bombyx mori</i>		Gene definition*	BmTOP**	
BAC code	Transcriptome ID	Chr	GeneID: KWMTBOMO			Location (bp)
28D01	TRINITY_DN15848_c0_g1_i2	1	00019	511106..545938	<i>tan_protein</i>	O
27C22	TRINITY_DN22414_c0_g1_i1	1	00186	5963213..5965045	<i>heparanase-like_protein</i>	O
15C05	TRINITY_DN21355_c0_g1_i12	1	00190	6026373..6126632	<i>kettin_protein</i>	X
26C17	TRINITY_DN13328_c0_g1_i1	1	00545	16116700..16127502	<i>lactate_dehydrogenase</i>	O
27J05	TRINITY_DN33948_c0_g1_i1	1	00614	19129809..19138152	<i>potassium_voltage-gated_channel_protein_Shaker1</i>	X
20B19	TRINITY_DN19960_c0_g1_i1	2	00857	4588760..4601918	<i>homeotic_protein_distal-less</i>	X
35B07	TRINITY_DN20784_c0_g4_i4	2	00935	6722944..6724052	<i>homeobox_protein_injected</i>	X
27F21	TRINITY_DN16853_c0_g1_i1	2	00974	7694888..7697085	<i>40S_ribosomal_protein_S21</i>	X
39N23	TRINITY_DN15621_c0_g1_i1	3	01182	4011450..4013566	<i>glyceraldehyde-3-phosphate_dehydrogenase</i>	X
39E21	TRINITY_DN13605_c0_g1_i1	3	01273	7216359..7219180	<i>ribosomal_protein_L13A</i>	X
38D16	TRINITY_DN8970_c0_g1_i1	4	02006	9808363..9812757	<i>ribosomal_protein_L3</i>	X
26G07	TRINITY_DN25947_c0_g1_i1	5	02431	1835714..1836427	<i>H+_transporting_ATP_synthase_subunit_g</i>	X
29E22	TRINITY_DN25298_c0_g1_i1	5	02477	2951013..2954098	<i>ribosomal_protein_L19</i>	X
34A20	TRINITY_DN11316_c1_g1_i1	5	02779	10696330..10703821	<i>Protein_naked_cuticle-like</i>	X
38B12	TRINITY_DN17435_c0_g1_i1	6	03314	4152757..4154920	<i>ribosomal_protein_L15</i>	X
04L13	TRINITY_DN14534_c0_g1_i1	6	03376	6294376..6295195	<i>abdominal-A_transcript_variant_E</i>	X
22J18	TRINITY_DN17328_c0_g1_i1	6	03639	14084835..14085614	<i>ras_protein</i>	X
34D02	TRINITY_DN1862_c0_g1_i1	6	03695	15669173..15669663	<i>homeobox_protein_Hox-A1-like..partial</i>	X
25G13	TRINITY_DN22022_c0_g1_i1	7	04175	12891332..12900916	<i>kinesin-like_protein_KLP2</i>	X
29M17	TRINITY_DN22530_c0_g1_i1	8	04710	13064220..13085098	<i>Ubiquitin_carboxyl-terminal_hydrolase_5</i>	O
27P12	TRINITY_DN14447_c0_g1_i1	9	05068	7038548..7041535	<i>ribosomal_protein_L24</i>	X
39F22	TRINITY_DN11011_c0_g1_i1	9	05280	12650808..12652283	<i>40S_ribosomal_protein_S14</i>	X
22I15	TRINITY_DN21478_c0_g3_i1	10	05553	5001072..5005732	<i>laccase_2A</i>	X
31L11	TRINITY_DN668_c0_g1_i1	10	05723	8805486..8808995	<i>ribosomal_protein_S15A</i>	X
37D11	TRINITY_DN22486_c1_g1_i1	10	05948	15258949..15270380	<i>diapause_bioclock_protein</i>	X
16J10	TRINITY_DN19583_c1_g1_i12	11	06171	1872326..1879300	<i>mitochondrial_glutamate_carrier</i>	X
12G13	TRINITY_DN19687_c0_g1_i1	11	06229	2982595..2993346	<i>ribosomal_protein_L4</i>	X
14L02	TRINITY_DN21468_c0_g1_i1	11	06399	6371456..6378130	<i>CDKAL1-like_protein</i>	X
14L15	TRINITY_DN22917_c0_g1_i1	11	06463	7807281..7822277	<i>DNA_topoisomerase_2</i>	O
34B21	TRINITY_DN25589_c0_g1_i1	11	06855	17663541..17671896	<i>cysteine_sulfinic_acid_decarboxylase</i>	X
10M24	TRINITY_DN20175_c0_g1_i1	12	07015	1863526..1877123	<i>bifunctional_ATP-dependent_dihydroxyacetone_kinase</i> <i>/FAD-AMP_lyase_(cyclizing)-like..partial</i>	X
27I08	TRINITY_DN22998_c2_g1_i1	12	07103	4641811..4643381	<i>cytosolic_malate_dehydrogenase</i>	O
28N11	TRINITY_DN22909_c0_g1_i1	12	07114	4811656..4853351	<i>saposin-like_protein</i>	O
21J15	TRINITY_DN18740_c0_g1_i1	13	07857	8519268..8525983	<i>heat_shock_protein_hsp21.4</i>	X
26K14	TRINITY_DN12981_c0_g1_i1	13	07888	9182960..9184684	<i>ribosomal_protein_L31</i>	X
30I10	TRINITY_DN20581_c0_g1_i4	13	08034	13284150..13300880	<i>troponin_I_transcript_variant_C</i>	X
34B02	TRINITY_DN21622_c0_g2_i2	13	08100	15952645..15955376	<i>ribosomal_protein_L21</i>	X
15L16	TRINITY_DN11613_c0_g1_i1	14	08545	12618603..12626924	<i>facilitated_trehalose_transporter_Tret1-2_homolog</i>	X
06A01	TRINITY_DN21589_c0_g1_i1	15	08666	1795667..1798974	<i>ribosomal_protein_S23</i>	O
14M02	TRINITY_DN17905_c0_g1_i1	15	08699	2869116..2873720	<i>ribosomal_protein_L7A</i>	O
02G24	TRINITY_DN20993_c0_g1_i2	15	08777	5004821..5016658	<i>nuclear_receptor_GRF</i>	X
09P05	TRINITY_DN32203_c0_g1_i1	15	08797	5475794..5480567	<i>ribosomal_protein_L5</i>	O
14F14	TRINITY_DN14712_c0_g1_i1	15	08894	7610130..7610942	<i>ribosomal_protein_S5</i>	O
25K20	TRINITY_DN14597_c0_g1_i3	15	09232	13692373..13694677	<i>ribosomal_protein_L10A</i>	O
32O24	TRINITY_DN16302_c0_g1_i2	16	09442	1283499..1288160	<i>ribosomal_protein_L6</i>	X
02G01	TRINITY_DN15384_c0_g1_i1	17	10509	13024737..13027506	<i>ribosomal_protein_L22</i>	X
35N03	TRINITY_DN15295_c0_g1_i1	17	10591	14887827..14888632	<i>ribosomal_protein_S24</i>	X
07D14	TRINITY_DN22023_c0_g1_i1	18	10761	2566411..2579429	<i>symplekin</i>	O
23F16	TRINITY_DN19846_c0_g1_i1	18	11038	10670414..10689604	<i>arylalkylamine_N-acetyltransferase</i>	X
30I15	TRINITY_DN20930_c0_g1_i1	18	11083	12385248..12390846	<i>elongation_factor_1_gamma</i>	O
25M04	TRINITY_DN21876_c0_g1_i1	18	11107	13049594..13052475	<i>uncharacterized_protein_LOC106139612</i>	X
37B07	TRINITY_DN18840_c0_g1_i1	19	11556	7995011..8011304	<i>probable_RNA-binding_protein_CG14230</i>	X
	TRINITY_DN21391_c0_g1_i1	19	11560	8046954..8056914	<i>vasa-like_protein</i>	X
39N13	TRINITY_DN22835_c3_g1_i5	19	11662	10941913..10942952	<i>dihydropteridine_reductase</i>	O
30E11	TRINITY_DN20190_c0_g1_i1	20	12057	6512174..6516599	<i>eukaryotic_translation_initiation_factor_2_alpha_subunit</i>	O
34B23	TRINITY_DN7351_c0_g1_i1	20	12287	11518093..11521394	<i>ribosomal_protein_S20</i>	X
36J15	TRINITY_DN11216_c0_g1_i2	21	12375	1695127..1699208	<i>sorbitol_dehydrogenase</i>	X
28E04	TRINITY_DN1170_c0_g1_i1	21	12460	4417937..4418422	<i>40S_ribosomal_protein_S17</i>	X
34I09	TRINITY_DN20798_c0_g1_i1	22	12902	3849823..3854601	<i>calreticulin</i>	X
16E02	TRINITY_DN20952_c0_g1_i1	22	13267	11940653..12001369	<i>polypyrimidine_tract-binding_protein_2</i>	X
39H08	TRINITY_DN17108_c0_g1_i1	23	13530	784310..788037	<i>superoxide_dismutase_[Cu-Zn]</i>	X
33B18	TRINITY_DN20855_c0_g2_i1	23	13922	13682392..13686507	<i>activator_of_90_kDa_heat_shock_protein_ATPase_homolog_1</i>	O
27D08	TRINITY_DN20215_c0_g1_i4	23	13997	15654322..15664685	<i>fibronase_precursor</i>	X
28L16	TRINITY_DN20032_c0_g1_i1	23	14019	16058041..16068078	<i>wee1-like_protein_kinase</i>	X
19C15	TRINITY_DN16975_c0_g1_i1	23	14169	19689420..19694897	<i>40S_ribosomal_protein_S3a</i>	X
09C22	TRINITY_DN19739_c1_g1_i1	24	14440	6450638..6490222	<i>actin-depolymerizing_factor_1</i>	O
30P01	TRINITY_DN21161_c0_g2_i1	24	14600	11078134..11091510	<i>ferritin_precursor</i>	X
30K07	TRINITY_DN18963_c0_g1_i1	24	14732	13846478..13847851	<i>ADP/ATP_translocase</i>	X
39O21	TRINITY_DN14011_c0_g1_i1	24	14774	14898028..14899436	<i>putative_phosphatidylethanolamine-binding_protein</i>	O
24B04	TRINITY_DN22301_c1_g4_i1	25	14919	430284..446812	<i>juvenile_hormone_esterase_1_precursor</i>	X
06A03	TRINITY_DN16504_c0_g1_i2	25	15114	5419305..5421593	<i>ribosomal_protein_S25</i>	X
21O23	TRINITY_DN20249_c0_g1_i1	25	15224	7119011..7129623	<i>BzArgOEtase_precursor</i>	X
36E24	TRINITY_DN17742_c0_g2_i1	25	15391	11258153..11259291	<i>silk_gland_factor_1</i>	X
36I01	TRINITY_DN20457_c0_g1_i1	26	15486	500159..505900	<i>protein_star</i>	X
32F13	TRINITY_DN22710_c0_g1_i1	26	15583	3384172..3400184	<i>coatomer_protein_complex_subunit_alpha</i>	X
			15584	3401434..3409134		
19O14	TRINITY_DN20865_c0_g1_i1	27	15866	337342..347825	<i>nuclear_orphan_receptor</i>	X
21D15	TRINITY_DN17436_c0_g1_i1	28	16211	1884395..1886383	<i>6-phosphogluconolactonase</i>	O
29E23	TRINITY_DN15492_c0_g1_i2	28	16357	6717554..6722641	<i>ribosomal_protein_S11</i>	X

\*Identified by desConecter.py

\*\*detected by BmTOP

## 第IV章 *Bombyx mori* tool for ortholog picking (BmTOP)を用いた

### カイコ単一遺伝子オルソログの特定

#### 序論

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)マッピングによる染色体比較に用いるゲノムライブラリー(BAC or fosmid)のスクリーニングには、全染色体を網羅するカイコ単一遺伝子オルソログ情報が必要である(Yasukochi *et al.*, 2009)。近年の次世代シーケンス技術の発達により、大量の遺伝子情報の取得は、以前に比べ格段に容易になった。第III章では RNA-seq により取得した大量の遺伝子情報から、BLAST 解析で一つずつオルソログを特定したが、これは効率的な手法とは言いがたく、遺伝子オルソログを特定するビックデータの効率的な情報処理技術が必要となった。

オルソログの特定を行うツールとして、HaMStR や OrthoFinder、SonicParanoid などが公開されている(Ebersberger *et al.*, 2009; Emms and Kelly, 2015; Cosentino and Iwasaki, 2018)。これらのツールは、主により多数のオルソログを特定することに重きを置いている。一方 BAC/fosmid-FISH mapping では、比較する種間で特に保存性が高く、似た配列情報を他に持たないオルソログの特定が求められる。この要求を満たすことで、BAC スクリーニングにおける誤った BAC クローン選抜の可能性と、選抜した BAC プローブによる FISH 結果でマルチシグナルとなる可能性を極小化できる。そこで本章では、この要求に応えうる新規アプリケーションツールを開発とその実践利用を目論んだ。

本章では、第1節でアセンブルされた RNA-seq データからカイコ単一遺伝子オルソログを効率的に選抜するアプリケーションツールである BmTOP の開発研究について記述する。第2節では、BmTOP を用いて、モンキチョウ(*Colias erate*)のトランスクリプトームデータから、カイコ単一遺伝子オルソログの特定を行った。第3節では、新規に特定したオルソログ情報をもとに、モンキチョウ BAC のスクリーニングを行った。

#### 第1節 BmTOP の開発

BAC スクリーニングを進めるにあたり、Trinity にて assemble された RNA-seq データをより効率的に解析する必要があった。しかしながら、既存ツールのアルゴリズムは、似たモチーフや配列を多数持ってもオルソログとして検出できるよう工夫されており、本研究の趣旨に合わなかった。本研究で求められる、配列の特異性の高いオルソログを検出するために、本節の研究において新たなカイコ単一遺伝子オルソログ検出ツールである *Bombyx mori* tool for ortholog picking (BmTOP)を開発した。さらに、第2節以降の解析のためのオブ



ション機能として、アノテーション情報を付与する KWMT\_desConecter.py、別々のツールによって検出されたオルソログリストを比較し共通項を選択する ListCompariser.py を開発した。これらは BmTOP でオルソログとして検出したカイコ遺伝子の染色体座乗位置を可視化させる gene\_plotter.R とともに、BmTOP 実行中のメニュー画面から選択ができるように実装した。

## 材料および方法

### 1. 開発言語と環境

BmTOP の開発には C と Python 3 のプログラム言語ならびにシェルスクリプト (bash) のスクリプトを使用した。開発環境は、富士通のノート PC LIFEBOOK SH54/K (OS: BioLinux) ならびに LIFEBOOK WS1/C2 (OS: windows10) を使用した。

### 2. BmTOP の実行に必要なデータセット

BmTOP の実行に必要なカイコの Nucleotide sequences ならびに GFF3 ファイルは、東京大学大学院農学生命科学研究科の川本宗孝博士より許諾を戴き使用した。現在は、SilkBase ホームページ (<http://silkbases.ab.a.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/index.cgi>) の New *Bombyx mori* gene models (2017) よりダウンロードが可能である。

## 結果

本研究では、対象とする種の RNA-seq アセンブルデータとカイコの New *Bombyx mori* gene models (2017) (Kawamoto *et al.*, 2019) を利用して、カイコ単一遺伝子オルソログを検出するアプリケーションである *Bombyx mori* Tool for ortholog pick-upper (BmTOP) を開発した (Ohno *et al.*, 2020b; <https://github.com/mzkohno/BmTOP>)。本ツールは、6つのステップからなる (Fig. 4.1)。

- 1) BLAST 解析による相同性検索：相同性の検定には blast+v2.2.31 (NCBI) を用いた。アセンブルデータ (contigs) をクエリーに、*Bombyx mori* gene model (2017) (<http://silkbases.ab.a.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/index.cgi>) に対して tblastx 解析を行い、 $1e^{-10}$  以下を抽出した (Threshold 1, default) Hit Table を作成した。ここでは、threshold を指定することで、e-value が一定値より大きい結果をノイズとして除去した。
- 2) プロセッシング：BLAST 結果の Hit Table にカイコの情報を追加して、Top Hit results を抽出・リスト化した。
- 3) マルチコピー遺伝子の除去：Hit Table の Top Hit Gene model ID が、リスト内に複数認められた場合、ID をリストから除外する。これにより、ホモログが複数存在する contigs を除去した。
- 4) 高ホモロジー遺伝子の選択：score が 100 より小さい、あるいは e-value が  $1e^{-80}$  より大きいものを除外した (Threshold

2, default)。5) 全てのホモログ配列を含む遺伝子の除去：Top Hit した遺伝子の e-value を Second Hit の e-value で除した値が  $1e^{-80}$  以上であった場合(Threshold 3, default)、除外した。ただし、Top Hit の e-value が 0 の場合、Second Hit が  $1e^{-50}$  以上の遺伝子を採用した。6) カイコ非単一遺伝子の除外：New *Bombyx mori* gene models (2017)の Nucleotide sequences をクエリーにして、本ステップを除いた BmTOP を実行した。結果として、理論上カイコ単一遺伝子のみが検出できるので、ここまでの解析結果と比較して、カイコで単一遺伝子と判断できなかったオルソログは除外する。なお、Threshold の設定は全て、デフォルトから変更でき、16 条件を一括処理することも可能である(Threshold 2 の e-value の上限を  $1e^{-20}$ 、 $1e^{-40}$ 、 $1e^{-60}$  もしくは  $1e^{-80}$ 、Threshold 3 の値を  $1e^{-20}$ 、 $1e^{-40}$ 、 $1e^{-60}$  もしくは  $1e^{-80}$  として、他はデフォルトの値を利用して一括処理できる)。

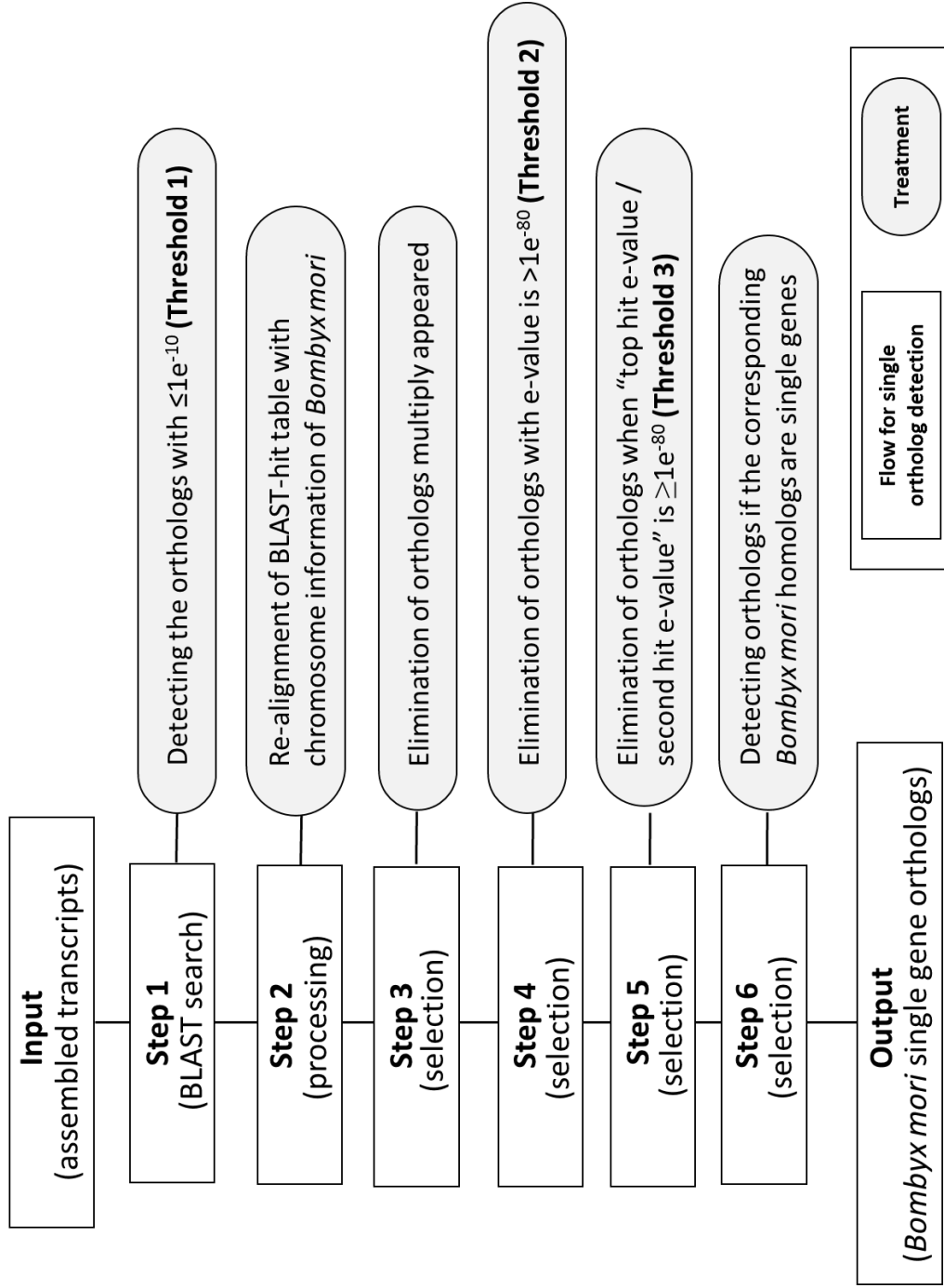
次節以降の解析のために、オプション機能として 2 つのモジュール([https://github.com/mzkohno/BmTOP/tree/master/BmTOP/BmTOP\\_ver1.0/programs\\_KWMTBOM](https://github.com/mzkohno/BmTOP/tree/master/BmTOP/BmTOP_ver1.0/programs_KWMTBOM))を追加開発した。KWMT desConecter.py は、SilkBase にアップロードされているアノテーションデータ (GFF3 file) を BmTOP の解析結果に付与できる。ListCompariser.py は、別々のツールによって検出されたオルソログリストを比較し、両方がもつ遺伝子といずれか一方がもつ遺伝子をそれぞれリスト化できる。さらに、Bioconductor の karyoploteR (<http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/karyoploteR.html>)を利用して作成された gene\_plotter.R ([https://github.com/nkimoto/gene\\_plotter](https://github.com/nkimoto/gene_plotter))は、カイコ染色体ごとの推定塩基配列長 (Kawamoto *et al.*, 2019)を利用して、BmTOP でオルソログとして検出したカイコ遺伝子の染色体座乗位置を可視化できる。これらを BmTOP 実行中のメニュー画面から選択できるよう下位モジュールとして実装した。

## 考察

チョウ目昆虫の BAC-FISH マッピングによる染色体比較研究には、全染色体に網羅的なカイコ単一遺伝子オルソログマーカーが必要である (Yasukochi *et al.*, 2009)。BAC スクリーニングに用いるプライマーは、ターゲットのみをピックアップできるものが求められるため、ゲノム全体で似たようなモチーフが特に少ないオルソログを利用することが理想的である。BmTOP は、モンキチョウの BAC-FISH マッピングを進める上でこれらのニーズに応える。カイコ単一遺伝子オルソログは、チョウ目昆虫の染色体比較に必ず用いられるだけでなく、トビケラ目昆虫の染色体比較にも用いられる (Fujiimoto *et al.*, 2018)。カイコ単一遺伝子オルソログを任意の Thresholds でリスト化できる BmTOP は、今後チョウ目昆虫のみならずトビケラ目昆虫におけるゲノム比較研究の一助となるだろう。さらに、参照する gene model の nucleotide sequence と gff3 ファイルを仕様変更することで、本アプリケーションの 6 ステップによる選抜様式は、別の生物でも利用可能である。カイコ同様あるいはカイコ以

上に整備されたゲノムデータさえあれば、生物種にこだわらない解析が本ツールの修正により実現できる。

BmTOP は、全てのオルソログを特定することではなく、「配列保存性と特異性の高い単一遺伝子オルソログを染色体上で網羅的に獲得すること」を目的に設計されている。いくつかのオルソログ解析ソフトが公表されている(Ebersberger *et al.*, 2009; Emms and Kelly, 2015; Cosentino and Iwasaki, 2018)が、上記特徴は、本アプリケーション独特のものであると考えられる。本研究では、特に BAC スクリーニングへの活用に最適な特徴をもつアプリケーションツールを開発したが、研究内容に合わせた解析ツールを開発することは、ビッグデータの解析には有効であろう。



**Figure 4.1** Six-step process in BmTOP analysis. Text in rectangle and rounded-rectangle boxes describes the flow and treatment, respectively.

## 第2節 BmTOP を用いたモンキチョウトランスクリプトームデータの解析

第1節では、BAC スクリーニングに用いるオルソログ検出に特化した BmTOP を新規に開発した。第2節では、実際にこのアプリケーションツールを利用して、モンキチョウトランスクリプトームデータの解析を行う。また、検出されたオルソログを他ツールによる解析結果との比較、ならびに *in silico mapping* を行い、BmTOP の実用性を評価した。

### 材料および方法

#### 1. モンキチョウトランスクリプトームデータ

第3章第2節で獲得した、モンキチョウのアセンブリ済 RNA-seq データを用いた。

#### 2. BmTOP により決定されたカイコ単一遺伝子オルソログの評価

BmTOP が設計どおりオルソログを特定できているのかを確認するために、SonicParanoid (Cosentino and Iwasaki, 2018, <http://iwasakilab.bs.s.u-tokyo.ac.jp/sonicparanoid/>)によるカイコ遺伝子オルソログ候補の選抜を Run mode を fast して実行した。SonicParanoid 解析用アミノ酸配列は、上記 RNA-seq データから EMBOSS getorf (<http://emboss.sourceforge.net/apps/cvs/emboss/apps/getorf.html>)を用いて予測した。解析結果の比較には、BmTOP の遺伝子リスト間を比較するオプションモジュール ListCompariser.py (本章第1節参照)を用いた(6: ListCompariser)。解析結果のうち何割が節足動物全体で保存されているオルソログであるかを確かめるために、Misof *et al.* (2014)で系統樹作成に利用されたオルソログ遺伝子群との比較も行った。

### 結果

モンキチョウ RNA-seq から得られた 64,764 contigs を BmTOP で解析した結果、1,978 contigs をカイコ単一遺伝子オルソログとして検出した。第1節に示したとおり、BmTOP は6つのステップでオルソログ候補を絞り込んでいる(Fig. 4.1)。モンキチョウトランスクリプトームデータのデフォルトセッティングによる解析では、最初の2ステップで17,448 contigs まで絞り込まれた後、ステップ3で13,624 contigs、ステップ4で1,527 contigs、ステップ5で206 contigs、ステップ6で113 contigs が候補から除外された。本解析より、各カイコ染色体に18 (Chr27)から129 (Chr11) 遺伝子のオルソログを獲得できた(Fig. 4.2)。デフォルトのセッティングに加えて、異なる15条件で解析を行った(Threshold 1:  $1e^{-10}$ ; Threshold 2: score 100, e-value  $1e^{-20}$ ,  $1e^{-40}$ ,  $1e^{-60}$ , and  $1e^{-80}$ ; Threshold 3:  $1e^{-20}$ ,  $1e^{-40}$ ,  $1e^{-60}$ , and  $1e^{-80}$ ) 結果、Threshold

の条件をデフォルト設定から緩めるほどに、検出できる候補数は多くなった(Table 4.1)。

選抜されたオルソログのカイコ染色体上の座乗位置を可視化するために、`gene_plotter.R` ([https://github.com/nkimoto/gene\\_plotter](https://github.com/nkimoto/gene_plotter))を実行した。本スクリプト実行のために、Kawamoto *et al.* (2019)の Table 2 を参考に、カイコ染色体の塩基配列長を列記したテキストファイル `Length_Silkbase.Sheet1.tsv` ([https://github.com/mzkohno/BmTOP/tree/master/BmTOP/BmTOP\\_ver1.0/workspace](https://github.com/mzkohno/BmTOP/tree/master/BmTOP/BmTOP_ver1.0/workspace))を作成した。本スクリプトは `Length_Silkbase.Sheet1.tsv` を参照してカイコ染色体の模式図を作成し、BmTOPにより選抜したオルソログに対応するカイコ遺伝子リストを *in silico* マップした(Fig. 4.3)。染色体上における分布を網羅的に可視化するために、500 kb ごとの分布をグラフ化した(Fig. 4.4)。遺伝子の存在しない最大距離は、染色体末端から 2,414,428 bp (KWMTBOMO09323 から Chr15 末端まで, Fig. 4.4, gray arrow)であり、遺伝子間が最も離れていた距離は、2,290,031 bp であった (Chr6 の KWMTBOMO03496 と KWMTBOMO03557 の間, Fig. 4.4, black arrow)。

本アプリケーションツールがカイコ遺伝子オルソログを正しく選抜できているかを確認するために、他のオルソログ解析ツールとの比較を行った。比較するオルソログ検出用解析ツールには、SonicParanoid を用いた。解析結果の比較は、ListCompariser.py (本章第 1 節参照)で行った。SonicParanoid でモンキチョウオルソログとして検出された 10,121 カイコ遺伝子と共通する BmTOP 選抜遺伝子は、1,790 (デフォルト選抜の 90.5%, 1,978 遺伝子中 1,790)であった(Fig. 4.5A)。また、BmTOP に設定される 16 条件のうち最も緩い解析(Thresholds 2 および 3 がともに  $e\text{-value } 1e^{-20}$ )結果(Table 4.1)でも、ほぼ同程度の遺伝子が重複していた (89.6%, 2,738 遺伝子中 2,453)。

節足動物全体で広く保存された遺伝子オルソログを用いた全ての昆虫を網羅する系統樹作成が行われている(Misof *et al.*, 2014)。BmTOP によって検出されたカイコとモンキチョウ 2 種間の遺伝子オルソログのうち、どの程度が節足動物全体で保存されているオルソログリストとの共通性を同様に調査した結果、デフォルトの設定で 24.8%が共通であった(490 / 1,978, Fig. 4.5B)。Table 4.1 の 16 条件のうち最も緩い解析結果では、20.5%が共通であった (561 / 2,738)。

## 考察

モンキチョウと同じシロチョウ科モンキチョウ亜科に属するワタリオオキチョウのゲノムサイズは 345 Mb 前後(Cong *et al.*, 2016)、2つの研究(Shen *et al.*, 2016; Nallu *et al.*, 2018)からシロチョウ亜科モンシロチョウのゲノムサイズは、それぞれ 246 と 272 Mb、エゾスジグロシロチョウは 299 Mb (Hill *et al.*, 2019)と推定されている。カイコのゲノムサイズは、460.3 Mb (Kawamoto *et al.*, 2019)と推定され、シロチョウ科数種のゲノムサイズは、カイコの 53-75%程度と計算される。本研究で得られたモンキチョウのカイコオルソログは、カイコ染色

体をほぼカバーした(Figs. 4.3, 4.4)ため、ゲノムサイズがオオワタリキチョウと同程度だと仮定すると、モンキチョウ(n=31)の FISH マッピングには十分な数であると考えられる。

BmTOP の解析結果より得られたオルソログ数は、染色体の配列長に必ずしも依存しなかった(Fig. 4.2)。例えば、カイコ第 15 染色体と第 22 染色体は、配列長がそれぞれ 18,440,292 bp と 18,482,526 bp とほぼ一致し、推定遺伝子数はそれぞれ 804 と 676 の約 1.19 倍にもかかわらず、本研究で取得したオルソログ数はそれぞれ 124 と 70 の約 1.77 倍の差があった。このように染色体ごとに検出されたオルソログ数が長さに比例しないケースは、同じチョウ目昆虫の祖先的なグループであるコウモリガや、複数のトビケラ目昆虫の RNA-seq data における解析でも検出されている(data not shown)。本アプリケーションの検出方法に偏りが全くないことは否定できないものの、チョウ目昆虫もトビケラ目昆虫も、染色体ごとの単一遺伝子率が異なる可能性が考えられる。

BmTOP は「hit table において top hit と同じカイコ Gene Model があつた場合に、ステップ 3 の処理で top hit を除外する」という、オーバーラップを全て除く厳しい処理を設定している。本研究においてステップ 3 でオルソログ候補が 17,448 contigs から 13,624 contigs 除外されて、3,824 contigs にまで減少したことから、これが BmTOP において最もクリティカルに影響しているステップであることが示唆される。SonicParanoid で検出したオルソログのうち、BmTOP で検出されたのは 19.5% (1,978 / 10,121)のみであったが(Fig. 4.5A)、これはステップ 3 の厳しい処理により、SonicParanoid より選ばれる遺伝子数が減少した結果であると考えられる。また、ステップ 4 の選抜でさらに相同性の高い遺伝子が選ばれている。Misof *et al.* (2014) と共通していたものが 24.8% (490 / 1,978)であった事実からも BmTOP がこれらのステップで厳しいスクリーニングを行っていることが示唆される(Fig. 4.5B)。我々の研究目的は、全てのオルソログを特定することではなく、カイコ同一染色体上にバランス良く配置する、配列保存性と特異性の高い単一遺伝子オルソログを網羅的に獲得することであるため、本アプリケーションツールはその目的に適している。

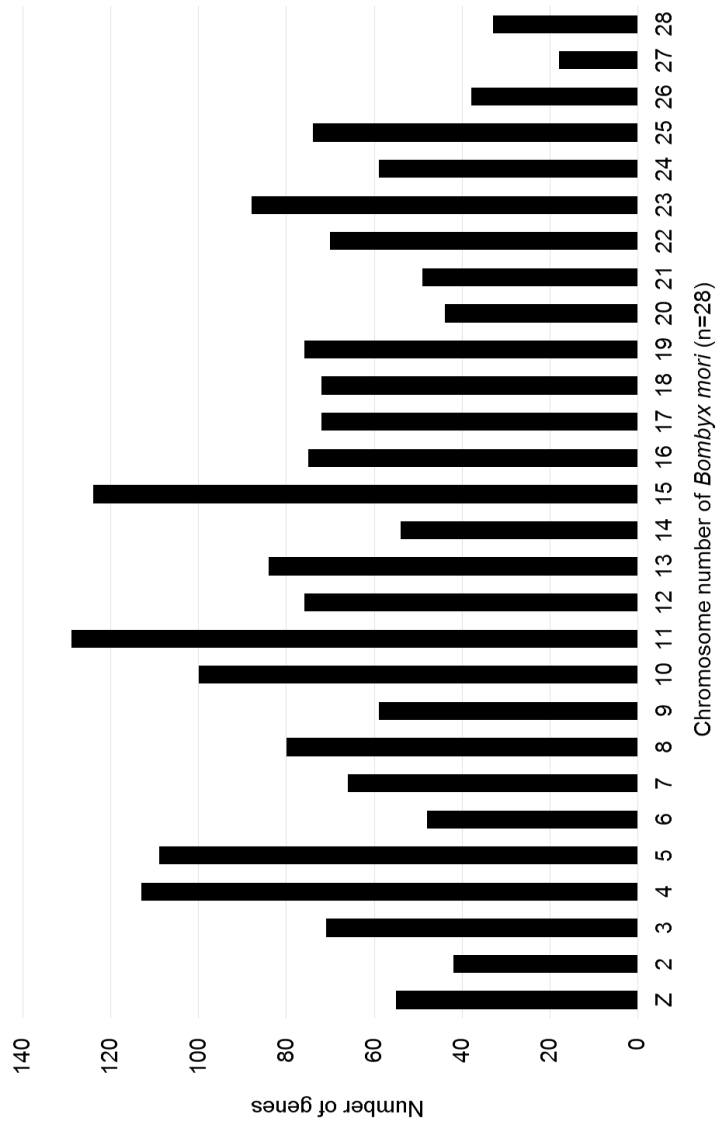
本アプリケーションは、似たようなモチーフやリピート配列をもつ遺伝子群を検出できない。例えば *Hox* 遺伝子は、*Mesobuthus martensii* などのサソリ類(Di *et al.*, 2015)を除き、単一遺伝子として節足動物において広く保存される。しかしながら、各遺伝子が 180 bp のホメオボックスをもつため、本アプリケーションでは、検出できなかった。*Hox cluster* が座上するカイコ第 6 染色体のオルソログ検出数は、配列長や推定遺伝子数に比べて相対的に少ない(Fig. 4.2)。BmTOP では、ホモロジーが高くなる要因である類似ドメインなどを持たないカイコ遺伝子オルソログを選抜する設計となっており、スクリーニングで誤ったオルソログを検出する可能性を抑えている。ホメオボックスのような一般的なモチーフを持つ遺伝子群のオルソログ検出は、これら一般モチーフのリストを利用した例外処理などによって実現するかもしれないが、我々の研究目的を考慮すると、当該機能の必要性は低かったため実装しなかった。

BmTOP は、アセンブリされた RNA-seq data を処理するように設計されているが、gene

model や cDNA、ならびに EST 配列をクエリーに解析することも可能である。したがって、配列情報が公開されている種のデータを利用して、カイコとの相同性の高い単一遺伝子検索が可能である。しかしながら、本アプリケーションの特性上、クエリーのデータ量が少ないほどその遺伝子の単一性を担保できなくなるため(ステップ 3)、これらをクエリーに用いる際は、ゲノム全体を網羅していることが望ましい。

本節では、モンキチョウのトランスクリプトームデータを利用した、BAC スクリーニングに用いるカイコ単一遺伝子オルソログの抽出に成功した。同様の解析をコウモリガならびにトビケラ目昆虫 3 種でも行ったが、同様にカイコ全染色体に網羅的に、オルソログ同士以外に類似配列を含まないカイコ単一遺伝子オルソログを検出することに成功している (data not shown)。BmTOP の実用性が評価できたため、本アプリケーションツールが BAC/fosmid FISH による研究に大きく寄与すると考えられる。





**Figure 4.2** The histogram shows the number of *Bombyx mori* genes mapped *in silico* for which the *Colias erate* orthologs were detected using BmTOP analysis with the default setting.

A

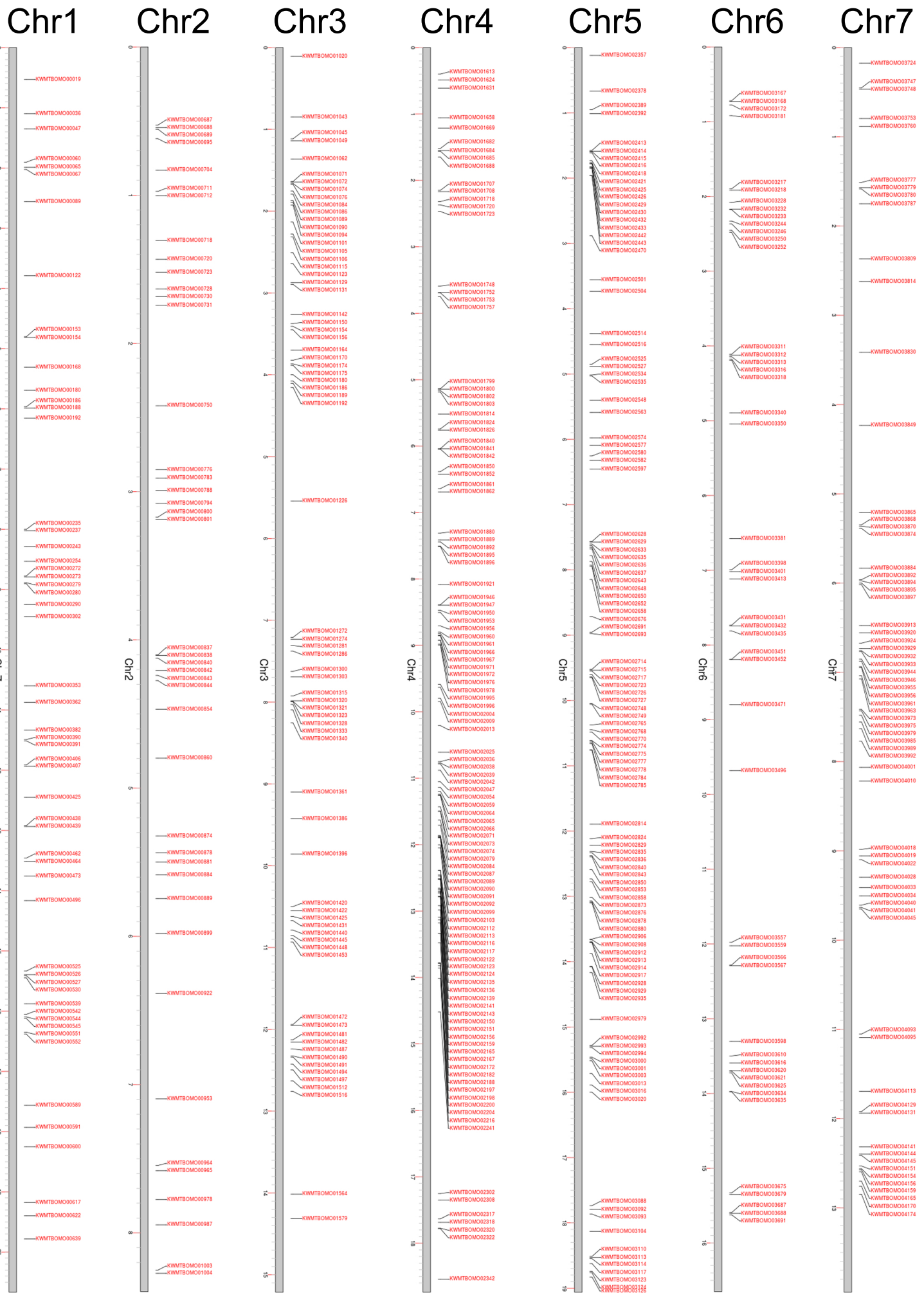


Figure 4.3A Chromosomal distribution of *Bombyx mori* genes detected by BmTOP (default setting) in *B. mori* chromosome 1-7. *B. mori* GeneModel ID (2017) show right-side of chromosomes (gray bar). *B. mori* chromosome number are shown above each figures.

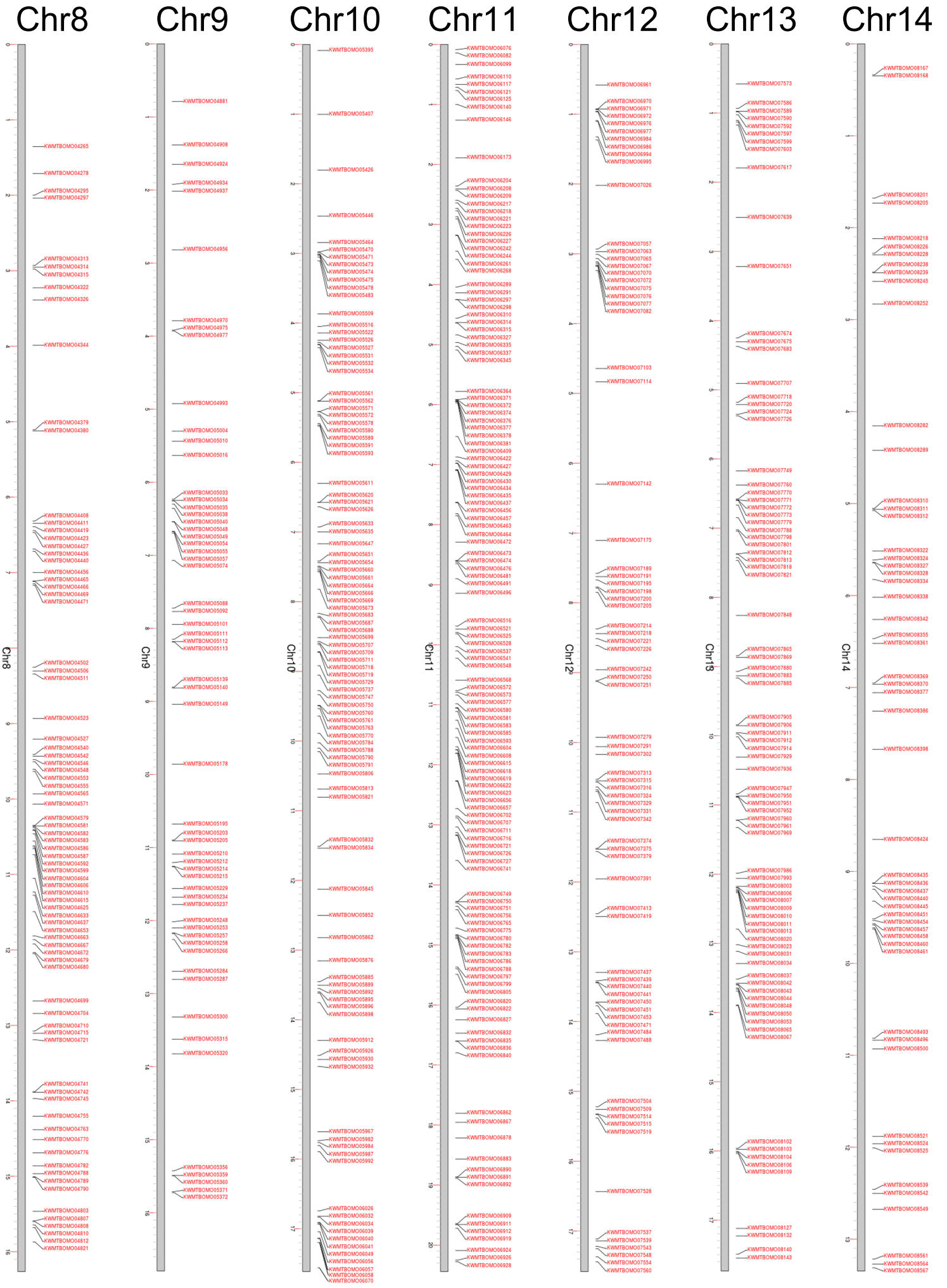
**B**

Figure 4.3B Chromosomal distribution of *Bombyx mori* genes detected by BmTOP (default setting) in *B. mori* chromosome 8-14. *B. mori* GeneModel ID (2017) show right-side of chromosomes (gray bar). *B. mori* chromosome number are shown above each figures.

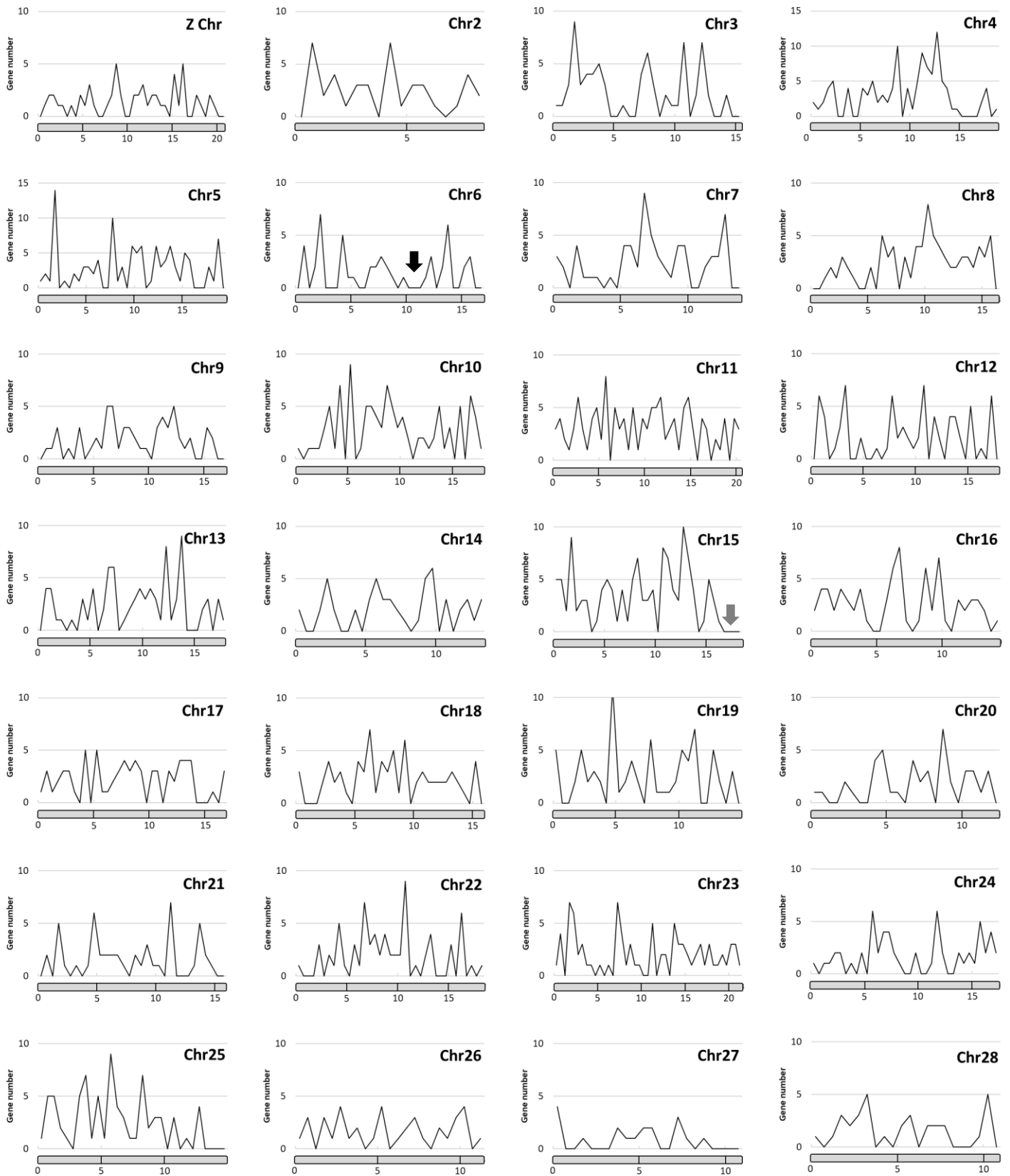
**C**

Figure 4.3C Chromosomal distribution of *Bombyx mori* genes detected by BmTOP (default setting) in *B. mori* chromosome 15-21. *B. mori* GeneModel ID (2017) show right-side of chromosomes (gray bar). *B. mori* chromosome number are shown above each figures.

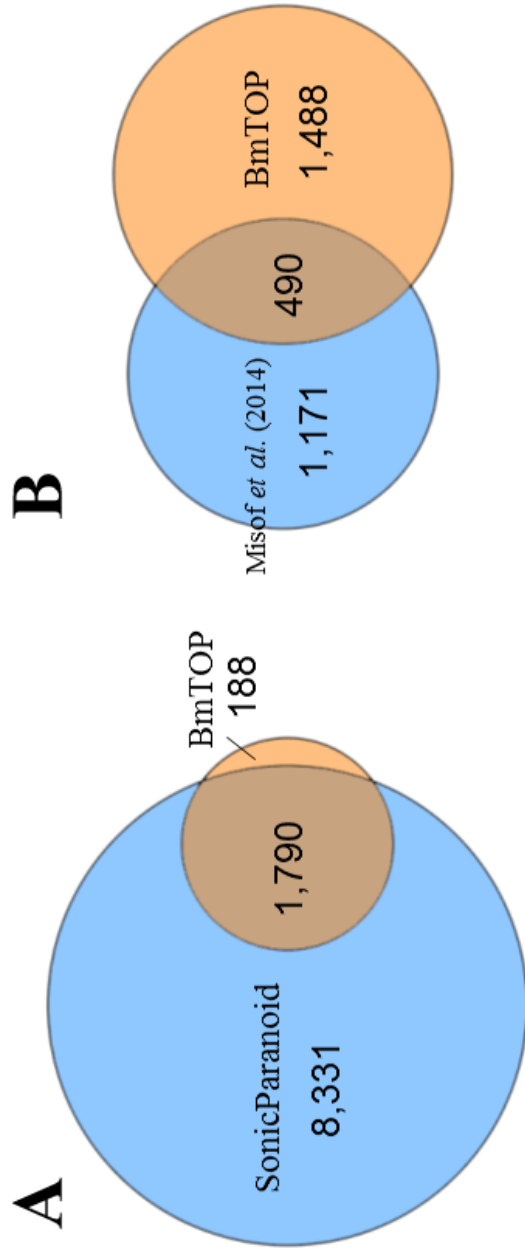


**D**

Figure 4.3D Chromosomal distribution of *Bombyx mori* genes detected by BmTOP (default setting) in *B. mori* chromosome 21-28. *B. mori* GeneModel ID (2017) show right-side of chromosomes (gray bar). *B. mori* chromosome number are shown above each figures.



**Figure 4.4** Chromosomal distribution of *Bombyx mori* genes mapped *in silico* for which the *Colias erate* orthologs were identified using BmTOP analysis with the default setting. The number of genes shown was counted at every 500 kb window. Bars below each graph represent the *B. mori* chromosome length (Mb). Black arrow indicates the region of the largest distance with no gene between two genes in a chromosome. Gray arrow indicates the region of longest distance with no genes from a chromosome end.



**Figure 4.5** Venn diagram comparison between orthologous gene numbers selected by BmTOP and by SonicParanoid (A) or by number of arthropod orthologs described in Misof *et al.* (2014) (B).

Table 4.1 Number of *Colias erate* genes picked-up by the BmTOP analysis with different combination of thresholds 2 and 3. Threshold 1 was kept at an e-value,  $1e^{-10}$ .

threshold 2 threshold 3	$1e^{-20}$	$1e^{-40}$	$1e^{-60}$	$1e^{-80}$
$1e^{-20}$	2,738	2,612	2,362	2,032
$1e^{-40}$	2,700	2,575	2,336	2,018
$1e^{-60}$	2,666	2,541	2,306	2,001
$1e^{-80}$	2,642	2,517	2,282	1,978



### 第3節 BmTOPにより抽出したカイコオルソログを含むモンキチョウ BAC の選抜

第2節では、BmTOPにより、モンキチョウトランスクリプトームデータからカイコ単一遺伝子オルソログを特定した。第III章第4節で特定したBACクローンは全染色体を網羅しておらず、BAC-FISH解析には絶対数も不足している。前節で十分な候補遺伝子配列が特定できたので、第III章第1節で構築したモンキチョウ BAC ライブラリーから、カイコ単一遺伝子オルソログを有する BAC クローンの追加選抜を行うこととした。

BAC-FISH マッピングにより染色体上の遺伝子配置解析を行う場合、染色体の先端と末端の方向を明確にした遺伝子配置決定には、各染色体に4 BAC クローン以上のマッピングが必要である。モンキチョウの染色体数  $n=31$  は、チョウ目昆虫の基本染色体数である (Robinson, 1971)。染色体数  $n=28$  のカイコと  $n=31$  のヨーロッパアワノメイガ (*Ostrinia nubilalis*) もしくはアトグロヒョウモンモドキ (*Melitaea cinxia*) それぞれとの染色体比較研究から、カイコ第11、23 および 24 染色体は、New *Bombyx mori* gene models (2017) のそれぞれ 5,115,356-5,202,437 bp, 15,803,731-15,892,909 bp および 8,560,283-11,867,249 bp の領域で  $n=31$  の種のそれぞれ2つの染色体末端に対応することが示唆される (Ahola *et al.*, 2014; Yasukochi *et al.*, 2016)。つまり、カイコ第11、23 および 24 染色体は、チョウ目昆虫で基本数 ( $n=31$ ) をもつ種のそれぞれ2染色体に対応する。仮にモンキチョウがカイコとの間に染色体上の遺伝子配置保存性があった場合、モンキチョウでもそれぞれ2本の染色体がカイコ第11、23 および 24 染色体に対応すると推測される。この仮説を元に、モンキチョウ  $n=31$  の染色体に各4 BACs 以上をマッピングできるように、追加分の STS プライマーの設計と BAC スクリーニングを行った。

#### 材料および方法

##### 1. カイコ単一遺伝子オルソログの選択

BmTOP で検出したカイコ単一遺伝子オルソログを含むモンキチョウ 1,978 contigs から、カイコ染色体上での座乗位置 (Fig. 4.3) を考慮して contig 選択を行った。また、KWMT\_desConecter.py を実行し、アノテーション情報により遺伝子機能が推定可能な(少なくとも uncharacterized 以外の)遺伝子を優先的に選択した。

##### 2. STS プライマー設計

Lepbase (<http://lepbase.org/>) でモンキチョウ contigs をクエリーにワタリオオキチョウの scaffold に blastn 解析を行い、CDS を推測した。イントロンを挟まないと推定されたエキソンのうち適切な 1 ORF の配列をクエリーとして、Primer BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>) を用いて STS プライマーを設計した。

### 3. BAC スクリーニング

第Ⅲ章第 4 節と同様に行うとともに既知の結果とあわせて、カイコ染色体 1 本につき 4 BAC クローン以上を獲得できるまでスクリーニングを続けた。カイコ第 11、23 ならびに 24 染色体は、前述した  $n=31$  のチョウ目昆虫種の先行研究(Ahola *et al.*, 2014; Yasukochi *et al.*, 2016)データを参照して、それぞれにモンキチョウ第 11 と 29、第 23 と 30 ならびに第 24 と 31 染色体の対応関係を仮定して、同様に 1 染色体当たり 4 BAC クローン以上を獲得できるまでスクリーニングを続けた。

### 結果

本節では新たに 160 プライマーペアを設計した(Table 4.2)。PCR による BAC スクリーニングの結果、110 BAC クローンを新たに獲得できた(Table 4.3)。第Ⅲ章第 4 節で得られた 77 BAC クローンと合わせると、選抜された BAC クローンは 187 となった(Fig. 4.6A)。

なお、第Ⅲ章第 4 節で選抜されたモンキチョウ 78 遺伝子(77 BACs) (Table 3.3)のうち、BmTOP で検出された 1,978 contigs に含まれたのは、20 contigs (20 BACs)であった(Fig. 4.6B, Table 3.3)。

### 考察

本節では、合成した 160 プライマーペアを用いて 110 BAC クローンを特定し(68.75%)、第Ⅲ章第 4 節では 117 プライマーペアから 78 オルソログを含む 77 BACs を特定した(66.67%)。ライブラリースクリーニングに用いた合計 277 プライマーペアうち、プライマーの問題で PCR に使用できなかったものが 52 ペアあった。実際に PCR 選抜に使用した 225 プライマーペアのうち、ライブラリー中に当たりの BAC が存在せず、選抜できなかったものは 36 ペアであった。人為的ミスで誤った BAC を拾ったものが 1 つあった。つまり、約 84%が本ライブラリーからの BAC 選抜率であった。ゲノムサイズの 2~4 倍程度をカバーするという第Ⅲ章第 1 節の想定からは、予想外であった。その要因としては、モンキチョウゲノムサイズが想定 of 4 倍程度やインサートサイズ予測に使用した BAC クローンに大きな偏りがあるなどのやや荒唐無稽な推測も棄却はできない。しかしながら、本 BAC ライブラリー構築に使用した *HindIII* サイトの分布がゲノム内に一様ではないか、サイト数が不十分か、その双方であるとの想定の高確度が高い。本研究の目的はモンキチョウ染色体の網羅的な解析であるため、1 割強のプライマーペアがスクリーニングできなかったとしても、影響はない。今後、1 つの酵素サイトのみで構築した BAC ライブラリーで十分な BAC 選抜が不可能な場合には、ライブラリーのボリュームを増やすよりも、使用する制限酵素サイトを追加すべきで

あろう。一方で、第III章第4節と本節のBAC選抜結果を合計すると、187BACクローンがスクリーニングできた(Fig. 4.6A)。Yasukochi *et al.* (2010)において、モンキチョウと同じく  $n=31$  のチョウ目昆虫3種で、比較ゲノム研究のために  $n=31$  のチョウ目昆虫種のBACが選抜されている(*Heliothis virescens* 188 BACs, *Ostrinia nubilalis* 163 BACs, *Plutella xylostella* 108 BACs)。これらを用いたBAC-FISHマッピング研究が十分な成果を上げていること (Sahara *et al.*, 2013; Yasukochi *et al.*, 2016, 加藤, 2013) からも、本研究で得られた187BACsは、モンキチョウのマッピングに十分な量であるといえる。

本研究で獲得した188カイク単一遺伝子オルソログ(187BACs)のうち、BmTOPで検出できたものは120 contigsであった(Fig. 4.6B)。残る68遺伝子にも、BmTOPの解析結果中に近傍と想定される contig がある。つまり、BmTOPで抽出した遺伝子は、モンキチョウの全染色体に広くカイク単一遺伝子オルソログを含むBACクローンを獲得できるポテンシャル (Figures 4.2, 4.4)があり、今後チョウ目昆虫の染色体比較研究を行う際には、BmTOPの解析結果をベースに *Hox* 遺伝子や一部の短い Ribosomal protein などのBmTOPのアルゴリズムの性質上除外されてしまうオルソログを第III章と同様のBLAST解析で検出し、追加する方式が良法であろう。

**Figure 4.6** Number of *Colias erate* BACs in each single chromosome. BACs were categorized by reference data for STS primer design employed in chapters 3 (blue) or 4 (gray) (A). The BACs were divided whether *C. erate* genes in the BACs also appeared in contigs extracted by BmTOP (gray) or not (blue) (B).

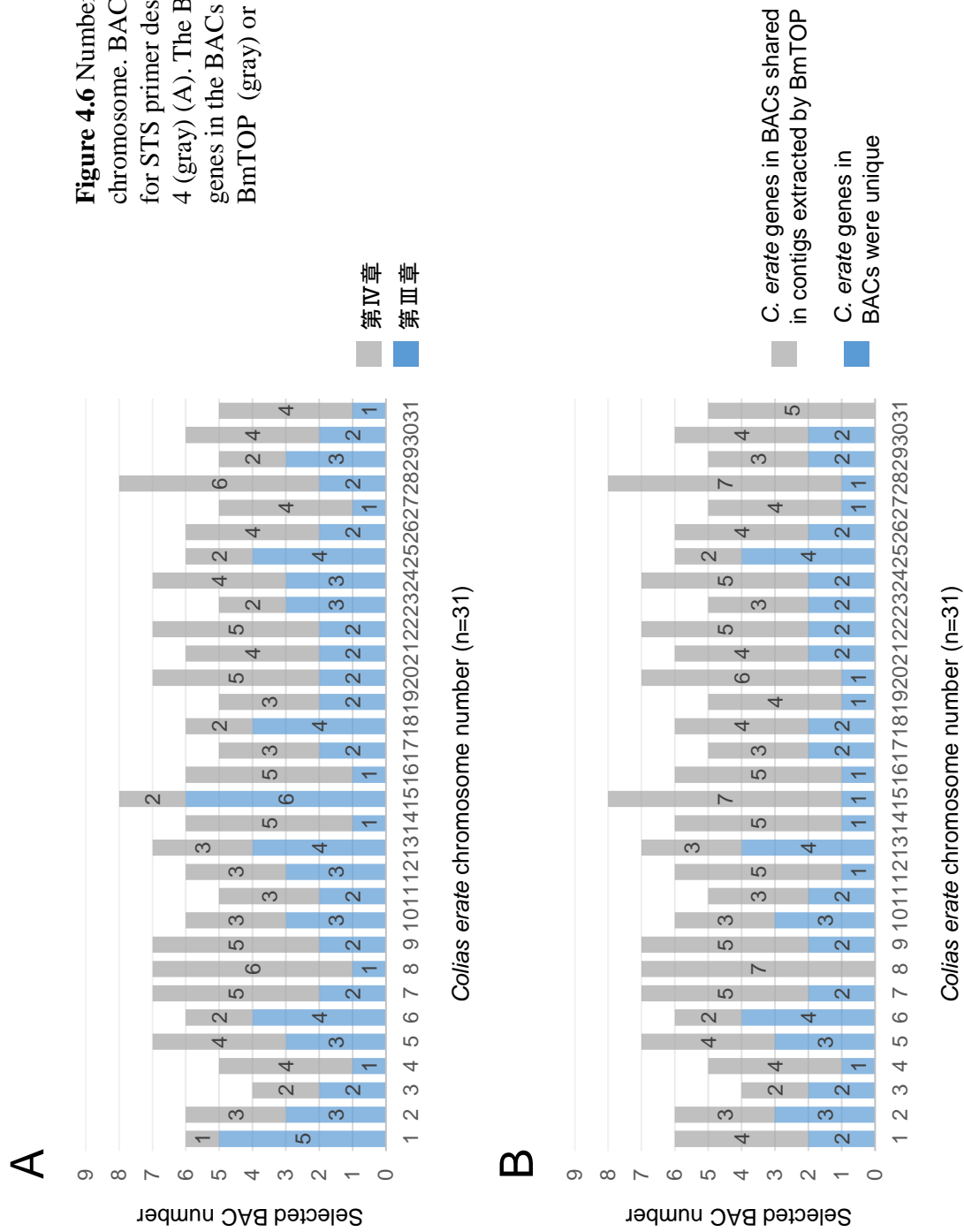


Table 4.2 *Colias erate* STS primer pairs designed by *Bombyx mori* orthologs detected by BmTOP

<i>Colias erate</i> Transcriptome ID	Forward primer	Reverse primer	Size (bp)	Gene definition*
TRINITY_DN22318_c0_g1_i1	GCGACATGGTCTCGTACTT	TGTAAGATTGTGGCTGCCGT	266	peroxisomal_membrane_protein_PEX16
TRINITY_DN16203_c0_g1_i1	CGTAGCTGCTATGCTTCCGA	CGAAGAGCCACAGTGTCTAA	156	quinone_oxidoreductase
TRINITY_DN12693_c0_g1_i1	GGTGGTGTGGACAATTTGGG	CCATTGCTGAAGCCAGTCTCT	112	LETM1_domain-containing_protein_1
TRINITY_DN22346_c0_g1_i1	CGAAGACTATGTGCGCTTGC	AGCCTCCCTTCTCATGATGGT	107	probable_nucleolar_GTP-binding_protein_1
TRINITY_DN20426_c0_g1_i1	TTTGGGAGCGCCCTACAC	CTGGTCCACTCATGGCAT	102	pyruvate_dehydrogenase_kinase
TRINITY_DN22338_c0_g1_i20	GGTCACAACGCAACCTACCA	ATAATACAGCCTCGTGCC	200	acetylglucosaminyltransferase
TRINITY_DN22627_c0_g1_i1	TACGCCGATGATTCGGAAG	GACGGCCCAATTACATTTCC	288	general_vesicular_transport_factor_p115
TRINITY_DN19662_c0_g1_i1	AGGTAGGCAAGGTTGGTGTG	TTCCATGAGAGCTGTGGAGC	100	inositol-3-phosphate_synthase
TRINITY_DN17778_c0_g1_i3	CGCCGTGGTCTAACACCTAT	ATAGACAGAGCTGACGCCAC	143	F-actin_capping_protein_beta_subunit
TRINITY_DN18281_c0_g1_i2	GGACTCATACCTGTCGGTGC	CGGTGGTATTCGCAATGGCT	110	lethal3(1)neo18
TRINITY_DN19274_c0_g1_i1	TCGATGTGCAAGAGACGAA	TCTACCGGGAACATCAGGCT	290	thioredoxin_domain-containing_protein_15
TRINITY_DN20123_c0_g1_i1	TCGAATATACCTGGCAGCGG	TGCACACTATCAGTAGGCCG	231	prolactin_regulatory_binding_element_protein
TRINITY_DN19985_c0_g1_i2	CTTTTTGCACATGGCAGCGA	AGCCACCAGCAGCTTCAAAA	169	methyltransferase-like_protein_13
TRINITY_DN21533_c1_g2_i3	ACATAGCGGTGTCGGCAAGAA	ACAATATCGAGTTCGCCGGC	241	transcription_initiation_factor_IIB
TRINITY_DN13712_c0_g1_i1	TTGATCTGCGCACACTAGCA	CAACACTCGGCTTGAGCTCA	198	cyclin-Y-like_protein_1
TRINITY_DN19615_c0_g1_i1	TGACAGAAGCTGGGTGAAGG	TGGGTGCATTTGCTAACTCG	128	nucleolar_protein_10
TRINITY_DN18486_c0_g1_i1	GTGCGTCTAGAGAAGCATCCA	TGTGCAATCTAAGCCTCCAGA	218	asparagine_synthetase_domain-containing_protein_CG17486
TRINITY_DN19348_c0_g1_i1	TGGAGGCAGTCAATTTGAGG	AGGTGCGCACCCTTCAATATC	106	group_XV_phospholipase_A2-like
TRINITY_DN11784_c0_g1_i1	CGCTACGGAGTGAACCGGT	TTGCCCTGACCCGAGCATAA	131	leucine_carboxyl_methyltransferase_5
TRINITY_DN18490_c0_g1_i1	TTGGACAAGGGCTATTCCGG	CGGTGGTCAACCTGAGTCAA	496	GPI_transamidase_component_PIG-2
TRINITY_DN20142_c0_g1_i1	ATACTGACGCTTGCTCACA	AAGCCAAGGGTCTGATGCC	457	lipoyltransferase_1_mitochondrial
TRINITY_DN20401_c0_g4_i1	TGCAACAGATGGAGTTTGGGA	CTCTCTGATGTTGGCTAAGCA	100	1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene_dioxygenase-like
TRINITY_DN19404_c0_g1_i2	CTGTTCAACATCTGCGCGCA	AGGTGCGCACCCTTCAATATC	131	SPARC_precursor
TRINITY_DN21915_c0_g1_i2	GAGTTCATAGACCAGCCGCC	GCCGATAGAAGTGGTCTCGG	104	putative_F-box_only_protein_9
TRINITY_DN15399_c0_g1_i1	CGCTCGTACAGGTCGAGAAA	AACACAAGAGATGGTCCCG	145	pre-mRNA-splicing_factor_18
TRINITY_DN11402_c0_g1_i1	TTCTGTACAACGCGGACAC	CGTGTCTCCATGCTCTTGT	120	arfaptin-2
TRINITY_DN20222_c0_g1_i1	TGAAGTACAGCGCGAAGGAG	CTTGATCAGTTGCACTCCC	143	alpha-soluble_NSF_attachment_protein
TRINITY_DN15713_c0_g1_i1	AAGGTTTAAAGCGGCTTGGC	AACGGCTCTGCGCGAATTT	150	alpha-1,3/1,6-mannosyltransferase_ALG2
TRINITY_DN19863_c0_g1_i2	GTGGTTCGCTCAAACCTGG	TGCCAGTCTTATAACCTCT	114	ras_association_domain-containing_protein_8
TRINITY_DN20599_c0_g1_i2	CGGAAGCGCTAGATCTCGTT	CGACCCACTGGACTTTGGA	231	another_transcription_unit_protein
TRINITY_DN21922_c0_g3_i1	CCGGAATGCATCAGAGTGT	CATCCGTAACGGCATTAGGC	130	tRNA_pseudouridine_synthase_A_mitochondrial
TRINITY_DN16119_c0_g1_i1	CCGGTATATTTGGGCCACGA	AGATGCGCAGCGGATGATG	350	mRNA-decapping_enzyme_1A
TRINITY_DN17848_c0_g1_i1	CTCTCGAACCACAGCGTACA	CTCGATGACCGTGTAACTCT	99	peroxisomal_membrane_anchor_protein
TRINITY_DN21397_c0_g2_i2	CAAGAGATCGCATCGGAGCA	GGTACCCGGCGTATATAGT	245	loquacious
TRINITY_DN18710_c0_g1_i1	GAGGCTTACAAAGCCAGCAC	TCAAGGGAACCTGGTCCAA	576	trafficking_protein_particle_complex_subunit_13-like
TRINITY_DN21488_c0_g1_i1	CAGCAGCTGCATCACTTGGGA	TCACCCAGCTTGTATGTCT	107	26S_proteasome_non-ATPase_regulatory_subunit_2
TRINITY_DN20766_c0_g1_i1	CAGAAGGTGCACAATGGCGC	TTCTCCAGATGGCATCCAGC	123	CCR4-NOT_transcription_complex_subunit_3
TRINITY_DN17823_c0_g1_i1	TACAGCACATCCGCAACAGT	CGTTGACAAACAGACCTGGC	360	eukaryotic_translation_initiation_factor_6
TRINITY_DN21221_c0_g1_i1	CGTTCGCGATTGGCATACT	CTGGCACTGTGACGACTGAT	123	sphingosine-1-phosphate_lyase
TRINITY_DN19797_c0_g1_i1	TGACGTGTGACAGGACACTG	CGGCTGTGTTTGGCACTGT	140	myc_box-dependent-interacting_protein_1
TRINITY_DN12035_c0_g1_i1	TTTGGGACTTGGTGTGACG	AAGTGGCGGCTTGA AAACTCG	207	PCI_domain-containing_protein_1
TRINITY_DN17909_c0_g1_i1	GGGAAAACACGAAAGACGAG	AATCCGCGGAGGAATGGTGT	121	acidic_leucine-rich_nuclear_phosphoprotein_32_family_member_A
TRINITY_DN19445_c0_g1_i1	GTGTGCTCCCAACACAGCAAG	TTCCACCCTCTTCCACACC	246	methylthioribose-1-phosphate_isomerase
TRINITY_DN19835_c0_g2_i1	ATTGTGCGAACTGCTGGAA	GGACAGGGTATGGAAGCAGC	104	dynactin_subunit_4
TRINITY_DN18049_c0_g1_i1	CGACAAGTACCTGGAGCAGAT	CTCGACGAGATGAGGTGGT	124	brahma-associated_protein_of_60_kDa
TRINITY_DN20055_c0_g1_i1	CCCGCGCTCTGAAGATAGAC	TGATGCGCACCAGCTTAAAT	334	protein_tiptop-like
TRINITY_DN21871_c0_g1_i1	TGGAGTGGTCACTGGTATGT	TGCACCAACACCCATTTGAA	147	tetratricopeptide_repeat_protein_27
TRINITY_DN18143_c0_g1_i1	GCCTCTCAAAGAGTTCAAGG	TCAAGCAGATGTCTCTCCC	108	Vesicle_transport_protein_SEC20
TRINITY_DN19199_c0_g1_i2	ATCAACGCATGTCCCAACCT	GAGAACCCTCGCGCTTCCAA	122	ran_GTPase-activating_protein_1
TRINITY_DN19312_c0_g1_i1	ACACGGTGGAGAAGCATTG	GCGGGTTTTCTCCGTC AAC	187	protein_HGH1_homolog
TRINITY_DN19118_c0_g1_i1	TCCATACCTGGGCTCTGGC	CCAGCGGCTCTTGTGATTC	101	probable_galactose-1-phosphate_uridylyltransferase
TRINITY_DN18304_c0_g1_i1	GCTAGCAAAAACGCTTACACC	ACACACTCCATCGCCAACT	112	4-hydroxybenzoate_polyprenyltransferase_mitochondrial
TRINITY_DN16311_c0_g1_i1	CAGCGCGCAATCTATACGGA	AGGAGTTCGCATTAGCCAAC	111	hypothetical_protein_KGM_15116_[Danaus_plexippus]
TRINITY_DN18911_c0_g1_i1	CCGGTGACATTTCAAAGGAG	TCCTTACAGACTCCACTCAC	114	coiled-coil_domain-containing_protein_93
TRINITY_DN22575_c1_g2_i1	TGGGAGTGGAGATGAGGAGA	AGCCAGTGTCTATGGCTTCT	187	phosducin-like_protein
TRINITY_DN16197_c0_g2_i1	TTTCAGAACACAAAGCGCGG	GTGTTCTGGTGAACCTGCGG	110	kelch-like_protein_2
TRINITY_DN17028_c0_g1_i1	CCACCGCAGCTCTAGTATGG	CAAGCAGTGAAGCAGGAGCA	143	transmembrane_protein_147
TRINITY_DN21301_c0_g1_i1	ATCAAGCCTCTACTGAGCCG	CACCTGGTGAAGGAGTTCG	312	Bm8_interacting_protein_precursor
TRINITY_DN12489_c0_g1_i1	TGCCATTGCAAAACCAACAA	TCACTGTGTGCTAGGTTGT	138	syntaxin_5A
TRINITY_DN15497_c0_g1_i1	ATTTCCGCGACATCGGCCATA	AGGCCATGGCTTCTTCTCTC	287	39S_ribosomal_protein_L4_mitochondrial
TRINITY_DN18061_c0_g1_i1	ACAATCCGGGTGTAGCAGAT	TCACCGGCTCTTGTGACAGA	108	etoposide-induced_protein_2.4_homolog
TRINITY_DN15531_c0_g1_i1	GGACAACAGTGAAGTTCCGG	CCGCAAGTCTCTGTGAGGT	257	DNA_replication_complex_GINS_protein_PSF1-like
TRINITY_DN20048_c0_g1_i2	TTCTCGACGAGTGCCACAAA	AGCGCAAGCAATAAACAGC	132	ribosomal_RNA-processing_protein_8
TRINITY_DN12383_c0_g1_i1	AACCTCCCGCAATGGCGTT	CTGTTGCTCAGCTTGCGTCC	121	protein_MAK16_homolog_A
TRINITY_DN18299_c0_g1_i1	AAGCCATACCGCGCTTACTT	ATTGCGGCTGAACCTTTTCT	131	NADH_dehydrogenase_[ubiquinone]_1_alpha_subcomplex_subunit_9_mitochondrial
TRINITY_DN15351_c0_g1_i1	AGAAGATGATGTGCCACCG	TCCTCTGCAGTTTAGCAGGC	293	aly_protein
TRINITY_DN22248_c0_g1_i1	TGCAACCAACA AAAAGCCAT	CCCTCGCCTATACGAGGAT	141	lipoyl_synthase_mitochondrial
TRINITY_DN19106_c0_g1_i1	TCTTCGGCTACACGCTGATG	CTGCCGACACACCAAGTA	130	RING_finger_protein_121
TRINITY_DN19338_c0_g1_i1	GATAATCCTGGACGACCGCG	ACTTGAAGGAGACCTTGCCC	185	glucosamine-6-phosphate_isomerase
TRINITY_DN20054_c0_g1_i1	CTGATGTGCTTCTGCCACAC	CTATGAGCGTCCACTGGCT	85	NEDD4_family-interacting_protein_2
TRINITY_DN20683_c0_g1_i1	TCCTGACGGAGCAGGATTTG	CCGAGACCGTGTGGAATCCT	146	RNA_polymerase_II-associated_factor_1_homolog
TRINITY_DN16660_c0_g1_i1	GGCCCGCCTTCTATCTATG	CCAAGCCATCTTTTGGCTT	324	NADH_dehydrogenase_[ubiquinone]_complex_1_assembly_factor_7_homolog
TRINITY_DN16146_c0_g1_i1	AACCGCAACAGCAGTAGCTT	GTACTGGAGAAGCAGGGGCT	97	ribosomal_protein_S16
TRINITY_DN19737_c0_g1_i1	ATAGGCACTGGACTTGCC	GATCCGCTGTATCCGGTCTC	134	Protein_mab-21
TRINITY_DN17206_c0_g1_i1	TTGGGACCGGTAACAACAA	ACAAGACCTTCCCTTTCCG	110	thioredoxin-like_protein_4A
TRINITY_DN16255_c0_g1_i1	ATACGGGGAGGCGTACAAGA	TGGTGTAGGTAAGTGGCTC	106	probable_tRNA_pseudouridine_synthase_2
TRINITY_DN21517_c1_g1_i1	TTAAAGCCACACCCACTCC	CGACAGGCTTACTTGGACCCG	89	beta-catenin-like_protein_1
TRINITY_DN19368_c0_g1_i3	CGAGACAGTAGCCGACAAGT	TTAGTTCCTGGTGTGGGTGC	111	2-methoxy-6-polyprenyl-1,4-benzoquinol_methylase_mitochondrial
TRINITY_DN22363_c0_g1_i1	GAGACACCAGTGGCCAAGT	ACAGCTTCAAGAGAGCAGCA	107	eukaryotic_translation_initiation_factor_3_subunit_A
TRINITY_DN8108_c0_g1_i1	CAAGTGCCTAGTTTCAACA	TCGAGTCTCCCTCATCTCCA	158	trafficking_protein_particle_complex_subunit_3
TRINITY_DN17958_c0_g1_i1	TTCCCATGGCTTGAAGAGT	CTGCCCTTACTTCTTGGCC	125	polymerase_delta-interacting_protein_2
TRINITY_DN13041_c0_g1_i1	AACCAGGAGGCCCAACAAA	GGAAAGCAAAACACAGCCCTT	126	SH2B_adapter_protein_1
TRINITY_DN18446_c0_g1_i1	GTGCACGCGAGTCAAAAACA	CTGATGTGCTTCTTCCGGT	123	BRCA1-associated_protein
TRINITY_DN22153_c0_g1_i2	GGGAGCATCATCAGCAGAA	CGCATTGATCTTGAAGCCGA	108	protein_singed
TRINITY_DN20090_c0_g1_i1	CCGACCCGGCATCTACAG	AGGATGCTTCTCCGGCTTG	133	glutamyl-peptide_cyclotransferase-like
TRINITY_DN20248_c0_g2_i1	CATTAAGTCCGGCTTAT	GTCACAGCAATGGCCGGAAC	380	transmembrane_protein_104_homolog
TRINITY_DN20990_c0_g1_i1	GAGCCGATACGGCTTTGTTC	AAACCGCTGTAGGCGACTGT	102	eukaryotic_translation_initiation_factor_3_subunit_D
TRINITY_DN8767_c0_g1_i1	AAATGGTTCAAGCGGTTGGT	ACCATGTTACCGGTGCATCT	93	NADH_dehydrogenase_[ubiquinone]_1_beta_subcomplex_subunit_10
TRINITY_DN12696_c0_g1_i1	CCGAAAACGCTGCGCCATC	CGCCTTGTATCCCTCCCTC	106	evolutionarily_conserved_signaling_intermediate_in_Toll_pathway_mitochondrial
TRINITY_DN13206_c0_g1_i1	TGGACAAGTGACCATCGCA	CGTGTGAGCCTTGTATGGC	171	apyrase
TRINITY_DN11563_c0_g1_i1	TGTTCCGGGTGTTGTCTGT	GCCGAGTGGCTGAGCAGTA	92	eukaryotic_translation_initiation_factor_3_subunit_F
TRINITY_DN16075_c0_g1_i1	AATGGGGAGCAAGCACTAGG	GCTTGTCTCAACAGGACCTT	131	REST_corepressor
TRINITY_DN11479_c0_g1_i1	CCTAGGACACCTGCAATGGT	TGTGGCTCTGTAGAGGTGG	89	transcription_initiation_factor_TFIID_subunit_8
TRINITY_DN20497_c0_g1_i1	GGCACAAAATCGTGTAGCGG	TGTGCTCAACTGACTAGCGGAT	103	26S_proteasome_non-ATPase_regulatory_subunit_8

TRINITY_DN20131_c0_g1_i2	TATCGCTGAGCTAAAGCGG	CTCAGCTCGTCGATCTTT	142	<i>myosin-7B</i>
TRINITY_DN21693_c0_g1_i1	GAAGCGTAGGCAAGAAACGC	CATTGGGCAACACCTCCCTA	201	<i>protein_KR11_homolog</i>
TRINITY_DN20197_c0_g1_i2	TCACCAAGCAGTTCTGTGGA	TCGAGAGCTTGAGCAAGGAG	158	<i>polynucleotide_5'-hydroxyl-kinase_NOL9</i>
TRINITY_DN20045_c0_g1_i1	TCCTATCGTGGCCTGTCTCA	ATGGGGAAAGTGGGCAAAAGC	114	<i>protein_VAC14_homolog</i>
TRINITY_DN22217_c0_g1_i2	GAGCGGGAAGAGAAACCAAG	CGACGCTCACTTCTCCAAT	118	<i>glycosylphosphatidylinositol_anchor_attachment_1_protein</i>
TRINITY_DN20786_c0_g1_i1	GCGTACATAGCTCAAGCGGA	TAGATTGTGGCGGTTGTTCG	264	<i>E3_ubiquitin-protein_ligase_MYL1P</i>
TRINITY_DN21431_c0_g1_i2	GACCCAGGTGGGATCGTAA	GTCTTGTCTTCTTGCCACG	150	<i>protein_CASC3</i>
TRINITY_DN20302_c0_g1_i1	TTTTACGTAACAAGTGCCTAAA	TGACTTCCACACTCTGGGTG	123	<i>partitioning_defective_protein_6</i>
TRINITY_DN22362_c0_g1_i1	CCGATGGTGGAACTCAACA	TCACCGCTTCTCATCAACGC	110	<i>protein_CIP2A_homolog</i>
TRINITY_DN18984_c0_g1_i1	AGCCCGCACCATTCGATTAT	CAACAAATGAGCCACCGCAT	377	<i>NADH_dehydrogenase_[ubiquinone]_1_alpha_subcomplex_subunit_10_mitochondrial</i>
TRINITY_DN21712_c0_g1_i2	ATGGGCAGACTGAAGGAAGC	TTAGCGCCTCCACGACATTT	205	<i>trafficking_protein_particle_complex_subunit_12</i>
TRINITY_DN23087_c5_g1_i1	GAACCCACGCTCCAGTCTAC	GGGCCAATGTTTCGTCACAAC	148	<i>conserved_oligomeric_Golgi_complex_subunit_1</i>
TRINITY_DN18943_c0_g1_i1	TGGCTTCTTAGTCAAGGCCAA	TAAGGCTTCACTTTCCCG	238	<i>28S_ribosomal_protein_S30_mitochondrial</i>
TRINITY_DN18862_c0_g1_i1	ACCCGCATACTCTATGGCTT	TGCGTGGCTTCTCTAGTCT	386	<i>ubiquitin_1_2</i>
TRINITY_DN20773_c0_g1_i3	TAGCAGCTGGTTACGCACTT	ACTCTCCGATAGACGGGTC	105	<i>fructose-1,6-bisphosphatase</i>
TRINITY_DN21491_c0_g1_i1	TGACCCGGGACAAAACGTGAC	TGCGGTGGTAGACCTGGATA	356	<i>mucin-6-like</i>
TRINITY_DN14939_c0_g1_i1	CGATCAAAATCGACACAGGGC	TCTGCGGTAGTCCAAAACGA	242	<i>putative_Syntaxin-18</i>
TRINITY_DN19289_c0_g1_i1	CGTCGCAACCTCACTATGGA	CACCGTCTGGCCGCAATTTA	123	<i>DDB1_and_CUL4-associated_factor_12</i>
TRINITY_DN16913_c0_g1_i1	TTTGCAAAATGCCACAGCTG	GGCATCCATCTTGCCACTGA	238	<i>nucleoporin_NUP53</i>
TRINITY_DN21461_c0_g1_i1	GTGACGACAGAGCAAGCAAG	CCGGCCGATTGCTTTAGAAG	141	<i>calcium_homeostasis_endoplasmic_reticulum_protein</i>
TRINITY_DN8409_c0_g1_i1	ACC GGAGAAACAGGTGAACG	ATTGGCAGGCTTCCGTACTT	216	<i>39S_ribosomal_protein_L47_mitochondrial</i>
TRINITY_DN19928_c0_g1_i1	ACCTGCGGATGAAGATGGG	TCAAAATCACTCGCACTCCG	294	<i>eIF2B-gamma_protein</i>
TRINITY_DN13389_c0_g1_i2	GAAAACATGGGTGCCACTTT	TGGAAATCGTCAAGTTCTCGA	81	<i>U2_small_nuclear_ribonucleoprotein_A'</i>
TRINITY_DN16088_c0_g1_i1	ATGTAAAGCGAGTGCCTGGAA	AGGTCAAAACGCAATGGTATC	479	<i>E3_ubiquitin-protein_ligase_NRD1_(RING_finger_protein_41)</i>
TRINITY_DN19844_c0_g1_i1	CACCTCGCTATGCGTGGAAAG	TTTGCCTCCTCCTCAGTACC	109	<i>signal_recognition_particle_subunit_SRP72</i>
TRINITY_DN23035_c6_g1_i1	TGGCCCTAAAGCATGGATGT	GCCTTCAATTCGCGTGAGC	146	<i>40S_ribosomal_protein_S4</i>
TRINITY_DN14806_c0_g1_i1	CCGTCTGACAGTGTACGA	TGGCGACTTCTCGGTTGTA	114	<i>serum_response_factor_homolog</i>
TRINITY_DN16834_c0_g1_i1	AATGGCCAGTCACTGTTCC	CTGACCGTGTGCAATGAGCA	122	<i>SET_and_MYND_domain-containing_protein_5</i>
TRINITY_DN19940_c0_g1_i1	TACTGTGCGGCTGTGATAGG	ATGGCTGATGGGAGTTACGG	126	<i>coproporphyrinogen_oxidase</i>
TRINITY_DN21234_c0_g1_i1	GGCATTAAACCGCACATCGT	CGAGTGCCTTCAACACGAGT	107	<i>26S_proteasome_non-ATPase_regulatory_subunit_13</i>
TRINITY_DN21980_c0_g1_i1	TGAACGGGATTTGTGTTCTG	TTCCGATATTCGCGTGAGC	206	<i>Sugar_phosphate_exchanger_2</i>
TRINITY_DN20575_c0_g1_i3	GTTCCCGCAGCTTTCAAAAT	TCAGTGACACTTCCCGCTGC	97	<i>NADH_dehydrogenase_[ubiquinone]_1_alpha_subcomplex_assembly_factor_5</i>
TRINITY_DN20592_c0_g1_i1	CAAACAGCTGAAAAGCCCCC	TGCGTTGAAACCGTTACGTC	183	<i>fasclitin-3</i>
TRINITY_DN21259_c0_g1_i1	ACACCAATGACGTACCACCA	CTGACAAAACGCCCCGTTCT	101	<i>GTP_cyclohydrolase_1_isoform_B</i>
TRINITY_DN20703_c0_g1_i1	CGGTCTCGTGTGAGAAGCTG	AGCTCGGCGACAAAATTCG	337	<i>putative_histidine_riavid_protein_member</i>
TRINITY_DN17804_c0_g1_i1	CAGTCACGCAATCAGACGTT	GATCTCGACTCCACAGTCAT	117	<i>Golgi_pH_regulator</i>
TRINITY_DN19679_c0_g1_i1	AGCAATATCATGGACGGTGT	AGGGTGGAGATTGGCCAGTT	266	<i>vacuolar_protein_sorting-associated_protein_26B-like</i>
TRINITY_DN21316_c0_g1_i1	GGCGCGATGGATAGTCTGAA	CGACTCCGTACCAAAATCCC	142	<i>tubulin-specific_chaperone_E</i>
TRINITY_DN20424_c0_g1_i1	AAGGGCGAACAACAACAAAGC	ATGTACAACACCGCTCCTCG	192	<i>WD_repeat-containing_protein_43</i>
TRINITY_DN22769_c0_g1_i2	GGAGTGTCTGGAAATGACACT	TTGACATAGCCCAACGAGTT	133	<i>lactoylglutathione_lyase</i>
TRINITY_DN21374_c2_g1_i1	TGCATCCACATGCTTAGGG	GTCGAAACCCGACGGGATAC	146	<i>eukaryotic_peptide_chain_release_factor_subunit_1</i>
TRINITY_DN1341_c0_g1_i1	ACAATGTCCCGCAACTGGAG	CTCTACGATGTTCTGCGGT	101	<i>ribosomal_protein_L32</i>
TRINITY_DN22174_c0_g1_i1	TTACAGCTCGAAGGTGCGTT	AAGTCTCAATGGACTGCC	98	<i>conserved_oligomeric_Golgi_complex_subunit_7</i>
TRINITY_DN21385_c2_g1_i1	ACGAACCGGTTTGGATGAA	GTTCGGCTTCCACAGATCA	372	<i>UDP-glucose_6-dehydrogenase</i>
TRINITY_DN19596_c0_g1_i1	AGGTCCGCTGAAGGACTTTCC	CTCAAAGCAGGCTCTACAC	156	<i>bromodomain_adjacent_to_zinc_finger_domain_protein_1A</i>
TRINITY_DN18467_c0_g1_i1	ACCCTACTCTAGCGACGGT	GGCCTCTGTCAATCTGGAC	105	<i>insecticyanin-A-like</i>
TRINITY_DN18437_c0_g1_i1	AGTGGATTCTTGTTCGCGG	AGCCGTCTGTTCAACATCACT	175	<i>WD_repeat-containing_protein_92</i>
TRINITY_DN18308_c0_g1_i1	CACGCAAGTGTGCTTATGGG	TCAGTCTGCGTGTGTTGTA	179	<i>WD_repeat-containing_protein_20</i>
TRINITY_DN20417_c0_g2_i1	GGTAGACGCGGTACACGAG	TCATATTCACGAGGGGCAC	258	<i>methionine--tRNA_ligase_mitochondrial</i>
TRINITY_DN23065_c2_g1_i1	AGACGATTTCCGGCTTCGACA	GGATGGTGTGTAAGGGCAT	159	<i>2-aminoethanethiol_dioxygenase</i>
TRINITY_DN19413_c0_g1_i1	GCTCAAATGCGTCAAAGGCT	GCCAATCTAAACGTAGCGGC	147	<i>protein_C12orf4_homolog</i>
TRINITY_DN21652_c0_g2_i1	TCTACGCATCACTCATCGGT	ACCAAAAATGAACCCCGAGT	89	<i>alpha-sarcoglycan</i>
TRINITY_DN19365_c0_g1_i1	GGCCCTGATGCCTTTCGTTA	TTGGTATGCCGTTCTCTCTC	120	<i>nuclear_factor_1_B-type</i>
TRINITY_DN21932_c0_g1_i1	CACCGCATTACCCCATGGAC	GGACTTGTATCACACGCTCGT	375	<i>vriille</i>
TRINITY_DN22760_c0_g1_i2	ATCAAGCAAGTGGTTCGCAA	TTGAGCTCAAAGTGGGTCT	114	<i>dihydropyrimidinase</i>
TRINITY_DN22830_c0_g2_i1	CTCCCGGAGTTGATTTGCTT	AATCACAGCTCCGTTACCG	134	<i>plastin-2</i>
TRINITY_DN23094_c0_g1_i1	CCTATAGGTGCAGCGCAAGT	CGACCACAGAAGGCTCAAA	136	<i>calysyntenin-1</i>
TRINITY_DN22337_c0_g1_i1	TCGTACAAGCACACTGGCAA	GCGGCTCCTGATGTTCTGTA	144	<i>protein-methionine_sulfoxide_oxidase_mical3a</i>
TRINITY_DN22747_c0_g1_i1	ACCATAAACAACCTCAGCG	TAGACGATGACGTACCCGGA	244	<i>flocculation_protein_FLO11</i>
TRINITY_DN19697_c0_g1_i1	CCCGCAAGAAGTCCGTTTT	TCTCCAACAGGCTCAACGAA	109	<i>probable_39S_ribosomal_protein_L24_mitochondrial</i>
TRINITY_DN20501_c0_g1_i1	AGCATCGGCATAGAGATGT	AGACTGCCAAAAATGGCTGA	288	<i>exuperantia</i>
TRINITY_DN16858_c0_g1_i1	GTGCGGCCATGAACCAATA	GCCCTCCAACGGAATTCACTA	117	<i>heme_oxygenase</i>
TRINITY_DN20213_c0_g1_i1	CGGGAGTTCGTCTCAAGAA	CTGTGCTTTGATGGGCAGGA	109	<i>uncharacterized_protein_LOC106132000_[Amyeloid_transitella]</i>
TRINITY_DN3119_c0_g1_i1	AAACAACCTCCGCACCACAAT	GACACTTTAGCCATGCCGGT	116	<i>checkpoint_protein_HUS1</i>
TRINITY_DN18660_c0_g1_i1	ACCAACCAGCCAAAACCTCCA	ATGTGGCGGTTATAGAGGG	281	<i>RNA-binding_protein_5-A-like</i>
TRINITY_DN20639_c0_g1_i4	ATATCTGGTGTGACGTGCGG	CACGCTTGTGCTTCACTTC	236	<i>nicotinamide_riboside_kinase_1</i>

\*Identified by desConecter.py

Table4.3 Characteristics of the selected *Colias erate* BAC clones and *Bombyx mori* orthologs carried by them

<i>Colias erate</i>		<i>Bombyx mori</i>		Gene definition*	
BAC code	Transcriptome ID	Chr	GeneID: KWMTBOMO		Location (bp)
37G02	TRINITY_DN16203_c0_g1_i1	1	00065	1983567..1991877	<i>quinone_oxidoreductase</i>
37B13	TRINITY_DN22346_c0_g1_i1	2	00687	520856..532998	<i>probable_nucleolar_GTP-binding_protein_1</i>
30F20	TRINITY_DN20426_c0_g1_i1	2	00723	1509657..1530205	<i>pyruvate_dehydrogenase_kinase</i>
21P08	TRINITY_DN22238_c0_g1_i20	2	00788	2983846..2999164	<i>acetylglucosaminyltransferase</i>
36O19	TRINITY_DN22627_c0_g1_i1	3	01072	1641006..1649875	<i>general_vesicular_transport_factor_p115</i>
28E03	TRINITY_DN18281_c0_g1_i2	3	01420	10498906..10500769	<i>lethal(3)neo18</i>
21J17	TRINITY_DN19985_c0_g1_i2	4	01684	1543403..1556541	<i>methyltransferase-like_protein_13</i>
38K01	TRINITY_DN21533_c1_g2_i3	4	01748	3588411..3592983	<i>transcription_initiation_factor_IIB</i>
29C05	TRINITY_DN13712_c0_g1_i1	4	01841	6040392..6041725	<i>cyclin-Y-like_protein_1</i>
19M07	TRINITY_DN19348_c0_g1_i1	4	02302	17248818..17255314	<i>group_XV_phospholipase_A2-like</i>
40P07	TRINITY_DN11784_c0_g1_i1	5	02357	119956..122303	<i>leucine_carboxyl_methyltransferase_1</i>
36M07	TRINITY_DN18490_c0_g1_i1	5	02633	7602678..7604763	<i>GPI_transamidase_component_PIG-T</i>
40C19	TRINITY_DN20142_c0_g1_i1	5	02906	13651631..13655196	<i>lipoyltransferase_1_mitochondrial</i>
39G18	TRINITY_DN20401_c0_g4_i1	5	03093	17864200..17867603	<i>1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene_dioxygenase-like</i>
36F20	TRINITY_DN19404_c0_g1_i2	6	03172	765333..784414	<i>SPARC_precursor</i>
37I11	TRINITY_DN15399_c0_g1_i1	6	03496	9677421..9681619	<i>pre-mRNA-splicing_factor_18</i>
38J22	TRINITY_DN20222_c0_g1_i1	7	03780	1580618..1590032	<i>alpha-soluble_NSF_attachment_protein</i>
37E22	TRINITY_DN15713_c0_g1_i1	7	03874	5386819..5388412	<i>alpha-1,3/1,6-mannosyltransferase_ALG2</i>
27D11	TRINITY_DN19863_c0_g1_i2	7	03913	6472785..6479954	<i>ras_association_domain-containing_protein_8</i>
29L22	TRINITY_DN20599_c0_g1_i2	7	04033	9407163..9416680	<i>another_transcription_unit_protein</i>
28E20	TRINITY_DN21922_c0_g3_i1	7	04129	11917795..11925039	<i>tRNA_pseudouridine_synthase_A_mitochondrial</i>
33A13	TRINITY_DN16119_c0_g1_i1	8	04297	2036970..2038515	<i>mRNA-decapping_enzyme_1A</i>
24C10	TRINITY_DN17848_c0_g1_i1	8	04313	2922806..2936344	<i>peroxisomal_membrane_anchor_protein</i>
27O13	TRINITY_DN21397_c0_g2_i2	8	04413	6361945..6367183	<i>loquacious</i>
25N11	TRINITY_DN18710_c0_g1_i1	8	04540	9407607..9409190	<i>trafficking_protein_particle_complex_subunit_13-like</i>
18B19	TRINITY_DN21488_c0_g1_i1	8	04610	10651485..10662826	<i>26S_proteasome_non-ATPase_regulatory_subunit_2</i>
33A06	TRINITY_DN17823_c0_g1_i1	8	04821	15870509..15871371	<i>eukaryotic_translation_initiation_factor_6</i>
37A15	TRINITY_DN21221_c0_g1_i1	9	04881	782876..794891	<i>sphingosine-1-phosphate_lyase</i>
40N06	TRINITY_DN19797_c0_g1_i1	9	04937	1984226..2047584	<i>myc_box-dependent-interacting_protein_1</i>
31O01	TRINITY_DN12035_c0_g1_i1	9	04975	3917868..3920229	<i>PCI_domain-containing_protein_2_homolog</i>
33H24	TRINITY_DN17909_c0_g1_i1	9	05149	9037428..9043622	<i>acidic_leucine-rich_nuclear_phosphoprotein_32_family_member_A</i>
28I22	TRINITY_DN19445_c0_g1_i1	9	05229	11560271..11564281	<i>methylthioribose-1-phosphate_isomerase</i>
28A14	TRINITY_DN18049_c0_g1_i1	10	05395	86362..88245	<i>brahma-associated_protein_of_60_kDa</i>
40D21	TRINITY_DN20055_c0_g1_i1	10	05407	1002046..1006626	<i>protein_tiptop-like</i>
25L16	TRINITY_DN18143_c0_g1_i1	10	05885	13452642..13456095	<i>Vesicle_transport_protein_SEC20</i>
29A10	TRINITY_DN19312_c0_g1_i1	11	06140	1001255..1002661	<i>protein_HGH1_homolog</i>
24A03	TRINITY_DN19118_c0_g1_i1	11	06289	4036925..4042060	<i>probable_galactose-1-phosphate_uridylyltransferase</i>
31I02	TRINITY_DN18304_c0_g1_i1	11	06327	4834117..4840872	<i>4-hydroxybenzoate_polyprenyltransferase_mitochondrial</i>
37E06	TRINITY_DN16311_c0_g1_i1	11	06364	5777011..5781021	<i>hypothetical_protein_KGM_15116_[Danaus_plexippus]</i>
16M14	TRINITY_DN22575_c1_g2_i1	11	06786	14875972..14876882	<i>phosducin-like_protein</i>
40F05	TRINITY_DN12489_c0_g1_i1	12	07329	10678162..10682341	<i>syntaxin_5A</i>
39F06	TRINITY_DN18061_c0_g1_i1	12	07488	14267919..14275312	<i>etoposide-induced_protein_2.4_homolog</i>
25E15	TRINITY_DN15531_c0_g1_i1	12	07537	17113224..17115176	<i>DNA_replication_complex_GINS_protein_PSF1-like</i>
34A02	TRINITY_DN20048_c0_g1_i2	13	07586	932592..936515	<i>ribosomal_RNA-processing_protein_8</i>
26C08	TRINITY_DN15351_c0_g1_i1	13	07961	11221764..11223909	<i>aly_protein</i>
26A05	TRINITY_DN22248_c0_g1_i1	13	08127	17116622..17124160	<i>lipoyl_synthase_mitochondrial</i>
29J22	TRINITY_DN19106_c0_g1_i1	14	08167	334020..339621	<i>RING_finger_protein_121</i>
37P11	TRINITY_DN20054_c0_g1_i1	14	08245	2580481..2588853	<i>NEDD4_family-interacting_protein_2</i>
27C08	TRINITY_DN16660_c0_g1_i1	14	08369	6948814..6952996	<i>NADH_dehydrogenase_[ubiquinone]_complex_I_assembly_factor_7_homolog</i>
26P08	TRINITY_DN16146_c0_g1_i1	14	08440	9191382..9195678	<i>ribosomal_protein_S16</i>
33E13	TRINITY_DN19737_c0_g1_i1	14	08549	12674603..12676140	<i>Protein_mab-21</i>
19D09	TRINITY_DN16255_c0_g1_i1	15	08591	523008..525314	<i>probable_tRNA_pseudouridine_synthase_2</i>
21G07	TRINITY_DN21517_c1_g1_i1	15	09068	10803295..10810907	<i>beta-catenin-like_protein_1</i>
37J22	TRINITY_DN19368_c0_g1_i3	16	09389	339327..344326	<i>2-methoxy-6-polyprenyl-1,4-benzoquinol_methylase_mitochondrial</i>
25L15	TRINITY_DN22363_c0_g1_i1	16	09542	3576807..3596290	<i>eukaryotic_translation_initiation_factor_3_subunit_A</i>
35M15	TRINITY_DN17958_c0_g1_i1	16	09818	9797599..9811630	<i>polymerase_delta-interacting_protein_2</i>
26E12	TRINITY_DN13041_c0_g1_i1	16	09899	11489848..11501943	<i>SH2B_adapter_protein_1</i>
38A13	TRINITY_DN18446_c0_g1_i1	16	09982	14085622..14102297	<i>BRCA1-associated_protein</i>
11D18	TRINITY_DN22153_c0_g1_i2	17	10023	533189..588099	<i>protein_singed</i>
26A07	TRINITY_DN20090_c0_g1_i1	17	10112	2357015..2380005	<i>glutaminy-peptide_cyclotransferase-like</i>
23G06	TRINITY_DN12696_c0_g1_i1	17	10370	8883405..8885988	<i>evolutionarily_conserved_signaling_intermediate_in_Toll_pathway_mitochondrial</i>
23D23	TRINITY_DN16075_c0_g1_i1	18	10848	5355190..5359927	<i>REST_corepressor</i>
40L04	TRINITY_DN20497_c0_g1_i1	18	11161	15208615..15211682	<i>26S_proteasome_non-ATPase_regulatory_subunit_8</i>
35E11	TRINITY_DN20131_c0_g1_i2	19	11178	90227..118355	<i>myosin-7B</i>
34F10	TRINITY_DN20197_c0_g1_i2	19	11352	3954174..3965631	<i>polynucleotide_5'-hydroxyl-kinase_NOL9</i>
09G05	TRINITY_DN20045_c0_g1_i1	19	11774	14477971..14485469	<i>protein_VAC14_homolog</i>
12F07	TRINITY_DN22217_c0_g1_i2	20	11791	110263..116395	<i>glycosylphosphatidylinositol_anchor_attachment_1_protein</i>
35K04	TRINITY_DN21431_c0_g1_i2	20	11857	2165156..2189882	<i>protein_CASC3</i>
32K21	TRINITY_DN22362_c0_g1_i1	20	11956	4033320..4055916	<i>protein_CIP2A_homolog</i>
35L18	TRINITY_DN18984_c0_g1_i1	20	12166	8636299..8640956	<i>NADH_dehydrogenase_[ubiquinone]_1_alpha_subcomplex_subunit_10_mitochondrial</i>
37E17	TRINITY_DN21712_c0_g1_i2	20	12239	10275951..10287669	<i>trafficking_protein_particle_complex_subunit_12</i>
22D15	TRINITY_DN18862_c0_g1_i1	21	12611	9244330..9253384	<i>ubiquitin_1_2</i>
26C01	TRINITY_DN21491_c0_g1_i1	21	12679	11467213..11475843	<i>mucin-6-like</i>
04L02	TRINITY_DN14939_c0_g1_i1	21	12736	13552485..13554189	<i>putative_Syntaxin-18</i>
27K06	TRINITY_DN19289_c0_g1_i1	21	12776	14220215..14227163	<i>DDB1_and_CULA-associated_factor_12</i>

27M16	TRINITY_DN16913_c0_g1_i1	22	12862	2357572..2359336	<i>nucleoporin_NUP53</i>
39B19	TRINITY_DN21461_c0_g1_i1	22	12966	5815065..5823002	<i>calcium_homeostasis_endoplasmic_reticulum_protein</i>
30B02	TRINITY_DN13389_c0_g1_i2	22	13201	10075437..10079107	<i>U2_small_nuclear_ribonucleoprotein_A'</i>
28J11	TRINITY_DN19844_c0_g1_i1	22	13370	15337807..15347838	<i>signal_recognition_particle_subunit_SRP72</i>
27E23	TRINITY_DN23035_c6_g1_i1	22	13455	17431561..17436755	<i>40S_ribosomal_protein_S4</i>
40E18	TRINITY_DN16834_c0_g1_i1	23	13646	4091949..4096153	<i>SET_and_MYND_domain-containing_protein_5</i>
32G10	TRINITY_DN19940_c0_g1_i1	23	13991	15390684..15396826	<i>coproporphyrinogen_oxidase</i>
36J12	TRINITY_DN21234_c0_g1_i1	23	14041	16522999..16528552	<i>26S_proteasome_non-ATPase_regulatory_subunit_13</i>
40N21	TRINITY_DN21980_c0_g1_i1	23	14055	16988713..17002782	<i>Sugar_phosphate_exchanger_2</i>
33B22	TRINITY_DN20575_c0_g1_i3	23	14128	18470642..18475309	<i>NADH_dehydrogenase_[ubiquinone]_1_alpha_subcomplex_assembly_factor_5</i>
31O22	TRINITY_DN20592_c0_g1_i1	23	14238	21175584..21260272	<i>fasciclin-3</i>
37M03	TRINITY_DN21259_c0_g1_i1	24	14318	1792152..1820360	<i>GTP_cyclohydrolase_I_isoform_B</i>
28C14	TRINITY_DN21316_c0_g1_i1	24	14470	7356049..7371754	<i>tubulin-specific_chaperone_E</i>
19N07	TRINITY_DN20424_c0_g1_i1	24	14477	7537479..7548883	<i>WD_repeat-containing_protein_43</i>
31G17	TRINITY_DN22769_c0_g1_i2	24	14500	8445099..8449796	<i>lactoylglutathione_lyase</i>
11K18	TRINITY_DN21374_c2_g1_i1	24	14530	9646466..9669005	<i>eukaryotic_peptide_chain_release_factor_subunit_1</i>
05G11	TRINITY_DN1341_c0_g1_i1	24	14639	11749700..11752688	<i>ribosomal_protein_L32</i>
35J24	TRINITY_DN22174_c0_g1_i1	24	14825	15853147..15873798	<i>conserved_oligomeric_Golgi_complex_subunit_7</i>
30G20	TRINITY_DN21385_c2_g1_i1	24	14868	16737260..16738695	<i>UDP-glucose_6-dehydrogenase</i>
38A07	TRINITY_DN19596_c0_g1_i1	25	14955	1081163..1086279	<i>bromodomain_adjacent_to_zinc_finger_domain_protein_1A</i>
31E10	TRINITY_DN18308_c0_g1_i1	25	15426	12868870..12873676	<i>WD_repeat-containing_protein_20</i>
37K08	TRINITY_DN20417_c0_g2_i1	26	15525	1825356..1836590	<i>methionine--tRNA_ligase_mitochondrial</i>
31E04	TRINITY_DN23065_c2_g1_i1	26	15630	4720765..4721882	<i>2-aminoethanethiol_dioxygenase</i>
35F11	TRINITY_DN19413_c0_g1_i1	26	15716	7214820..7222661	<i>protein_C12orf4_homolog</i>
12C05	TRINITY_DN21652_c0_g2_i1	26	15787	10131261..10141030	<i>alpha-sarcoglycan</i>
28P11	TRINITY_DN19365_c0_g1_i1	27	15864	253631..265641	<i>nuclear_factor_1_B-type</i>
39J21	TRINITY_DN21932_c0_g1_i1	27	15943	3373021..3382150	<i>vrille</i>
31A08	TRINITY_DN22830_c0_g2_i1	27	16000	5723527..5775746	<i>plastin-2</i>
17P13	TRINITY_DN22337_c0_g1_i1	27	16064	7923629..7962674	<i>protein-methionine_sulfoxide_oxidase_mical3a</i>
30B05	TRINITY_DN22747_c0_g1_i1	28	16166	371406..377097	<i>flocculation_protein_FLO11</i>
32C11	TRINITY_DN19697_c0_g1_i1	28	16195	1118477..1120706	<i>probable_39S_ribosomal_protein_L24_mitochondrial</i>
18E08	TRINITY_DN20501_c0_g1_i1	28	16261	3220258..3231743	<i>exuperantia</i>
33P10	TRINITY_DN20213_c0_g1_i1	28	16378	7537217..7561545	<i>uncharacterized_protein_LOC106132000_[Amyloid_transitella]</i>
27E19	TRINITY_DN3119_c0_g1_i1	28	16432	9691338..9695544	<i>checkpoint_protein_HUS1</i>
30C23	TRINITY_DN18660_c0_g1_i1	28	16454	10385335..10390457	<i>RNA-binding_protein_5-A-like</i>

\*Identified by desConecter.py



## 第V章 モンキチョウ BAC-FISH マッピングと種間比較

チョウ目昆虫では、カイコのゲノム情報が最も早く公開された(Mita *et al.*, 2004; Xia *et al.*, 2004)。その後も現在に至るまでバージョンアップが繰り返され(International Silkworm Genome Consortium, 2008; Lu *et al.*, 2019; Kawamoto *et al.*, 2019)、カイコはモデルチョウ目昆虫の位置を占めるに至っている。チョウ目昆虫における染色体比較研究は、カイコゲノム情報を基準データとして、対象種との遺伝子オルソログ配置比較により行われてきた(Pringle *et al.*, 2007; Beldade *et al.*, 2009; Yasukochi *et al.*, 2009; Baxter *et al.*, 2011; Yoshido *et al.*, 2011b; The Heliconbius genome consortium, 2012; Sahara *et al.*, 2013; Van't Hof *et al.*, 2013; You *et al.*, 2013; Ahola *et al.*, 2014; Yasukochi *et al.*, 2016; Wan *et al.*, 2019)。その結果、シロチョウ科を除いて、研究対象とした全ての種で染色体コリニアリティーが確認された。染色体比較研究の手法として、分子連関解析や次世代シーケンサーによる染色体レベルのゲノムアセンブリなどが挙げられるが、中でも BAC-FISH マッピングは、対象種間の網羅的な遺伝子配置比較を行う場合に効果的な手法である。

第II章に記述した通り、シロチョウ亜科3種は、カイコ型の染色体タイプとは異なる独自の染色体構成を保っている。しかし、シロチョウ型の独自の染色体の進化要因も分岐も未解明である。そこで我々は、モンキチョウ亜科の染色体比較研究により、シロチョウ科における染色体進化に迫ることを着想した(第III章参照)。この着想を具現化するため、第III章ならびに第IV章において、カイコ遺伝子オルソログを内部配列に含むモンキチョウ 187 BAC クローンを獲得した。前章までの研究により準備が整ったため本章では、モンキチョウ染色体の BAC-FISH マッピングによる比較研究を行った。

第1節では、モンキチョウ全染色体の BAC-FISH マッピングを行い、カイコ染色体との遺伝子配置を比較した。第2節では、シロチョウ亜科の2種(エゾスジグロシロチョウとモンシロチョウ)と、モンキチョウ亜科のワタリオオキチョウのゲノムデータを利用して、モンキチョウとの遺伝子配置の比較を行った。さらに、第2章3~4節で再精査を行ったオオモンシロチョウ染色体のマッピング結果もふまえて考察を深めた。第3節では、モンキチョウとカイコ染色体間に逆転が認められたモンキチョウ第9染色体(*Ce* Chr9)について、ナミアゲハのゲノムデータを参照してその進化推定を行った。第4節では、モンキチョウ第29染色体(*Ce* Chr29)に認められた逆位について報告する。

### 第1節 モンキチョウ遺伝子マッピングならびにカイコオルソログとの配置比較

第III章において、リストアップされたカイコ単一遺伝子の配列情報を用いてモンキチョウオルソログを特定した。さらに、第IV章では、新規開発した BmTOP (*Bombyx mori* tool for

ortholog picking)を用いたモンキチョウのカイコ単一遺伝子オルソログを追加特定した。これらの配列情報から、STS プライマーを設計し両章において、カイコ遺伝子オルソログを含む合計 187 BAC クローンを特定した。本節では、オオモンシロチョウ染色体の網羅的なマッピングを行った。さらに獲得したマッピングデータについて、カイコとの遺伝子配置の比較を行った。

## 材料および方法

### 1. 供試昆虫

本研究のモンキチョウ(*Colias erate*)は、2015 年に川原果樹園(岩手県盛岡市)、2016 年と 2017 年には岩手大学にて雌成虫を採集し、強制採卵法で獲得した子供集団を飼育して使用した。食草には、シロツメクサ(*Trifolium repens*)およびアカツメクサ(*T. pratense*)を用いた。

### 2. 染色体標本作製

第 II 章第 2 節に記載した方法に従い、染色体標本作製した。

### 3. ゲノム DNA 抽出、精製ならびにコンペティター作製

第 II 章第 2 節に記載した方法に従い、ゲノム DNA 抽出、精製ならびにコンペティター作製を行った。

### 4. モンキチョウ BAC ライブラリー

第 III 章第 1 節で作製したモンキチョウ BAC ライブラリーを使用した。

### 5. モンキチョウ BAC クローン

第 III 章ならびに第 IV 章で選抜したカイコ単一遺伝子オルソログを含むモンキチョウ BAC を使用した(Tables 3.20, 4.3)。

### 6. BAC-DNA の抽出・精製

目的の BAC クローンを第 II 章第 2 節に記載した方法に従い、10 µg/ml クロラムフェニコール入り LB 培地(Table 2.20) 3 ml で 12~18 時間振盪培養後、菌体を遠心分離 (6,000×g, 10 min, 4°C)にて集菌した。QIAGEN Plasmid Midi Kit (12245, QIAGEN K.K.)のプロトコルを簡略化し、カラムを使用せずに BAC-DNA を抽出・精製した。つまり、菌体を 250 µl の RNaseA 入り P1 buffer (50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA (pH 8.0))に懸濁し、250 µl の P2 buffer (200mM 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た。250 µl の P3 buffer (3M 酢酸カリウム(pH 5.5)) 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。0.1 倍量の 3M 酢酸ナトリウムと 0.7 倍量のイソプロパノールを加え、混合した上で遠心(10,000 rpm, 30 min, 4°C)を行い、上清を捨てた。70%エタノールを 500 µl 加えリンスして遠心(10,000 rpm, 15 min, 4°C)後、上清を完全に除去し、50 µl 程度の TE に溶解させた。

#### 7. Nick Translation による DNA のダイレクト標識

第 II 章第 2 節に記載の自作 Nick translation enzyme mix を使用方法に従って、BAC-DNA のラベリングを行い、FISH プローブを作製した。

#### 8. FISH (fluorescence *in situ* hybridization)

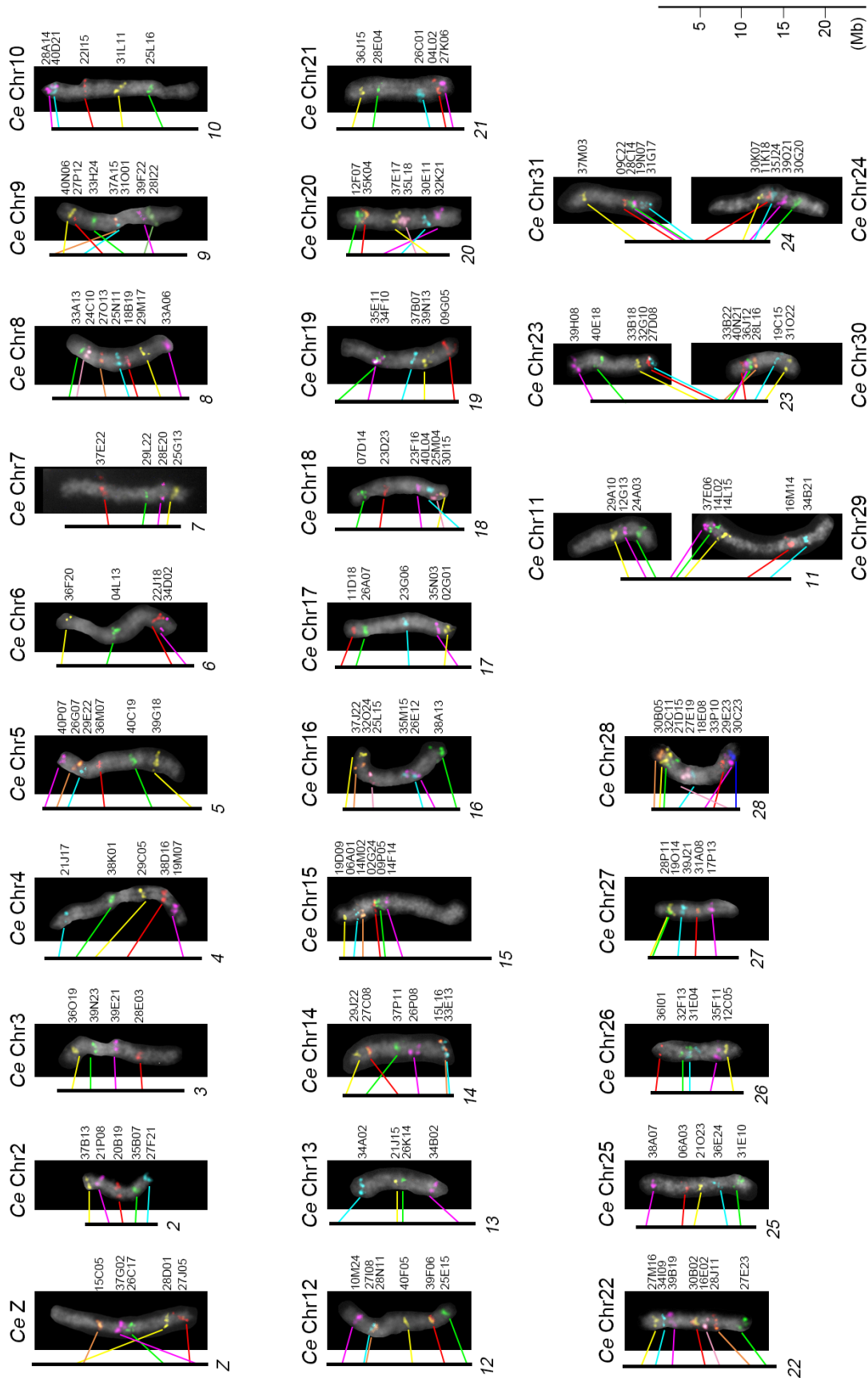
第 II 章第 2 節に記述した方法に従った。プローブとして用いた BAC-DNA と標識に用いた dye は、Table 5.1 に示した。

### 結果

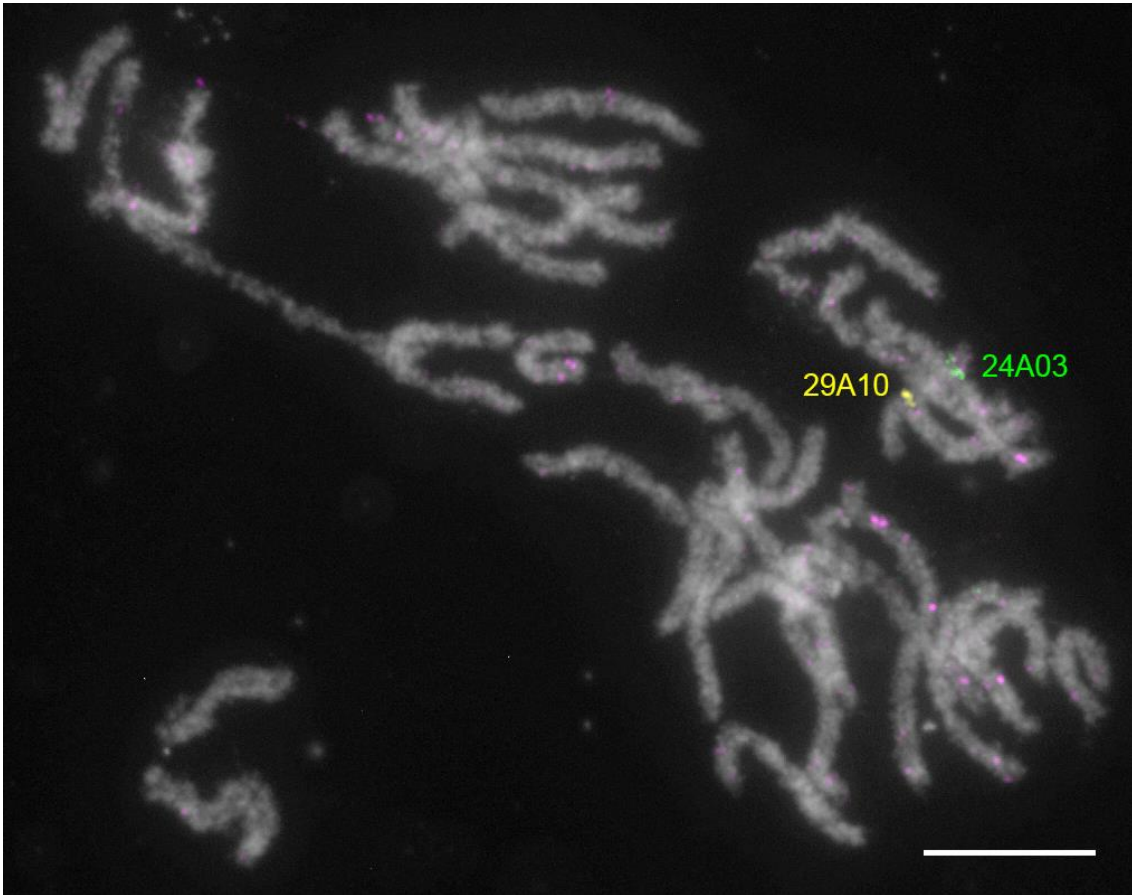
第 III 章ならびに第 IV 章で獲得した 187 BAC クローンのうち、166 BAC-DNA プローブをモンキチョウ染色体にマッピングできた(Fig. 5.1, Table 5.1)。マップできなかった 21 BAC-DNA プローブは、複数の染色体もしくは全ての染色体にシグナルが認められた(Fig. 5.2)。これら 21 BAC にはリピート配列が含まれたため、マルチシグナルが認められたと考えられる。166 マップデータとカイコゲノム情報との比較を行った結果(Table 5.1)、モンキチョウ染色体は、カイコ染色体とのコリニアリティーが認められ、染色体間のリアレンジメントをしている BAC は確認されなかった。

カイコの 25 染色体がそれぞれモンキチョウ染色体に 1 本ずつ対応していた一方で、カイコ第 11、23、24 染色体は、それぞれモンキチョウ染色体 2 本ずつに対応していた。この結果と過去の染色体番号対応を参照し、モンキチョウの染色体番号を Fig. 5.1 のように決定した。

本研究でカイコとモンキチョウ染色体間のリアレンジメントは検出されなかったが、対応関係の逆転は、Z、Ce Chr9, 14, 17, 18, 20, 24, 28 ならびに 30 の計 9 染色体に認められた(Fig. 5.1)。また、第 19 染色体にも、対応関係の逆転を示唆する部分を認めた。



**Figure 5.1** Comparison of orthologs between individual chromosomes of *Colias erate* and *Bombyx mori*. Black vertical bars represent orthologous *B. mori* chromosomes (italic black numbers) based on locations taken from SilkBase (<http://silkbases.ab.a.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/index.cgi>). Black ruler show *B. mori* chromosome length. The *C. erate* chromosomes (*Ce Chr*) images do not reflect true relative sizes because they were taken from different preparations. The *C. erate* BAC number are shown on the right of each chromosome image.



**Figure 5.2** BAC-FISH multi-signals by 31I02 BAC probe in *Colias erate* pachytene complement stained with DAPI (gray). Three BAC probes 24A03 (green) and 29A10 (yellow) were detected single signals in *C. erate* chromosome 11 whereas 31I02 (magenta) were detected multi-signals. A white bar indicates 10  $\mu\text{m}$ .

Table 5.1 *Colias erate* BACs, labeled dyes and corresponded *Bombyx mori* orthologues used for the FISH mapping.

<i>Colias erate</i>			<i>Bombyx mori</i>		
Chr	BAC code	FISH probe dye (pseudocolor)	Chr	Gene ID: KWMTBOMO	Location (bp)
1	28D01	O (yellow)	1	00019	511,106..545,938
1	37G02	Cy5 (magenta)	1	00065	1,983,567..1,991,877
1	15C05	O (red orange)	1	00190	6,026,373..6,126,632
1	26C17	G (green)	1	00545	16,116,700..16,127,502
1	27J05	Cy5 <sup>a</sup> (red)	1	00614	19,129,809..19,138,152
2	37B13	O (yellow)	2	00687	520,856..532,998
2	21P08	Cy5 <sup>a</sup> (magenta)	2	00788	2,983,846..2,999,164
2	20B19	O <sup>a</sup> (red)	2	00857	4,588,760..4,601,918
2	35B07	G (green)	2	00859	4,690,761..4,744,558
2	27F21	G <sup>a</sup> (cyan)	2	00935	6,722,944..6,724,052
2	27F21	G <sup>a</sup> (cyan)	2	00974	7,694,888..7,697,085
3	36O19	O (yellow)	3	01072	1,641,006..1,649,875
3	39N23	G <sup>a</sup> (green)	3	01182	4,011,450..4,013,566
3	39E21	Cy5 (magenta)	3	01273	7,216,359..7,219,180
3	28E03	O <sup>a</sup> (red)	3	01420	10,498,906..10,500,769
4	21J17	Cy5 (magenta)	4	01684	1,543,403..1,556,541
4	38K01	Cy5 <sup>a</sup> (red)	4	01748	3,588,411..3,592,983
4	29C05	O <sup>a</sup> (yellow)	4	01841	6,040,392..6,041,725
4	38D16	G (green)	4	02006	9,808,363..9,812,757
4	19M07	G <sup>a</sup> (cyan)	4	02302	17,248,818..17,255,314
5	40P07	Cy5 (magenta)	5	02357	119,956..122,303
5	26G07	O <sup>a</sup> (red orange)	5	02431	1,835,714..1,836,427
5	29E22	Cy5 <sup>b</sup> (cyan)	5	02477	2,951,013..2,954,098
5	36M07	G <sup>b</sup> (red)	5	02633	7,602,678..7,604,763
5	40C19	G (green)	5	02906	13,651,631..13,655,196
5	39G18	O (yellow)	5	03093	17,864,200..17,867,603
6	36F20	O <sup>b</sup> (yellow)	6	03172	765,333..784,414
6	04L13	G (green)	6	03376	6,294,376..6,295,195
6	22J18	O (red)	6	03639	14,084,835..14,085,614
6	34D02	O <sup>a</sup> (magenta)	6	03695	15,669,173..15,669,663
7	37E22	Cy5 (red)	7	03874	5,386,819..5,388,412
7	29L22	G <sup>a</sup> (green)	7	04033	9,407,163..9,416,680
7	28E20	Cy5 <sup>a</sup> (magenta)	7	04129	11,917,795..11,925,039
7	25G13	O (yellow)	7	04175	12,891,332..12,900,916
8	33A13	O (green)	8	04297	2,036,970..2,038,515
8	24C10	G <sup>a</sup> (pastel magenta)	8	04313	2,922,806..2,936,344
8	27O13	Cy5 <sup>a</sup> (red orange)	8	04413	6,361,945..6,367,183
8	25N11	G (cyan)	8	04540	9,407,607..9,409,190
8	18B19	R (red)	8	04610	10,651,485..10,662,826
8	29M17	O <sup>a</sup> (yellow)	8	04710	13,064,220..13,085,098
8	33A06	Cy5 (magenta)	8	04821	15,870,509..15,871,371
9	37A15	O <sup>a</sup> (red orange)	9	04881	782,876..794,891
9	40N06	O (yellow)	9	04937	1,984,226..2,047,584
9	31O01	G <sup>a</sup> (cyan)	9	04975	3,917,868..3,920,229
9	27P12	R <sup>a</sup> (red)	9	05068	7,038,548..7,041,535
9	33H24	G (green)	9	05149	9,037,428..9,043,622
9	28I22	Cy5 (yellow green)	9	05229	11,560,271..11,564,281
9	39F22	Cy5 <sup>a</sup> (magenta)	9	05280	12,650,808..12,652,283
10	28A14	Cy5 (magenta)	10	05395	86,362..88,245
10	40D21	Oa (cyan)	10	05407	1,002,046..1,006,626
10	22I15	Ga (red)	10	05553	5,001,072..5,005,732
10	31L11	O (yellow)	10	05723	8,805,486..8,808,995
10	25L16	G (green)	10	05885	13,452,642..13,456,095
11	29A10	O (yellow)	11	06140	1,001,255..1,002,661
11	12G13	O <sup>a</sup> (magenta)	11	06229	2,982,595..2,993,346
11	24A03	G (green)	11	06289	4,036,925..4,042,060
29	37E06	Cy5 (magenta)	11	06364	5,777,011..5,781,021
29	14L02	G (green)	11	06399	6,371,456..6,378,130
29	14L15	O (yellow)	11	06463	7,807,281..7,822,277
29	16M14	G <sup>a</sup> (red)	11	06786	14,875,972..14,876,882
29	34B21	O <sup>a</sup> (cyan)	11	06855	17,663,541..17,671,896

12	10M24	Cy5 (magenta)	12	07015	1,863,526..1,877,123
12	27I08	O <sup>a</sup> (cyan)	12	07103	4,641,811..4,643,381
12	28N11	G <sup>a</sup> (red orange)	12	07114	4,811,656..4,853,351
12	40F05	O (yellow)	12	07329	10,678,162..10,682,341
12	39F06	R (red)	12	07488	14,267,919..14,275,312
12	25E15	G (green)	12	07537	17,113,224..17,115,176
13	34A02	G (cyan)	13	07586	932,592..936,515
13	21J15	O <sup>a</sup> (yellow)	13	07857	8,519,268..8,525,983
13	26K14	G <sup>a</sup> (green)	13	07888	9,182,960..9,184,684
13	34B02	Cy5 (magenta)	13	08100	15,952,645..15,955,376
14	29J22	O (yellow)	14	08167	334,020..339,621
14	37P11	G (green)	14	08245	2,580,481..2,588,853
14	27C08	R (red)	14	08369	6,948,814..6,952,996
14	26P08	Cy5 (magenta)	14	08440	9,191,382..9,195,678
14	15L16	O <sup>a</sup> (red orange)	14	08545	12,618,603..12,626,924
14	33E13	G <sup>a</sup> (cyan)	14	08549	12,674,603..12,676,140
15	19D09	O <sup>b</sup> (yellow)	15	08591	523,008..525,314
15	06A01	G <sup>a</sup> (cyan)	15	08666	1,795,667..1,798,974
15	14M02	O (red orange)	15	08699	2,869,116..2,873,720
15	02G24	O <sup>a</sup> (red)	15	08777	5,004,821..5,016,658
15	09P05	G (green)	15	08797	5,475,794..5,480,567
15	14F14	Cy5 (magenta)	15	08894	7,610,130..7,610,942
16	37J22	O (yellow)	16	09389	339,327..344,326
16	32O24	G <sup>a</sup> (red orange)	16	09442	1,283,499..1,288,160
16	25L15	O <sup>a</sup> (pastel magenta)	16	09542	3,576,807..3,596,290
16	35M15	Cy5 <sup>a</sup> (cyan)	16	09818	9,797,599..9,811,630
16	26E12	Cy5 (magenta)	16	09899	11,489,848..11,501,943
16	38A13	G (green)	16	09982	14,085,622..14,102,297
17	11D18	Cy5 <sup>a</sup> (red)	17	10023	533,189..588,099
17	26A07	G (green)	17	10112	2,357,015..2,380,005
17	23G06	G <sup>a</sup> (cyan)	17	10370	8,883,405..8,885,988
17	02G01	O <sup>a</sup> (yellow)	17	10509	13,024,737..13,027,506
17	35N03	Cy5 (magenta)	17	10591	14,887,827..14,888,632
18	07D14	G (green)	18	10761	2,566,411..2,579,429
18	23D23	Cy5 <sup>a</sup> (red)	18	10848	5,355,190..5,359,927
18	23F16	Cy5 (magenta)	18	11038	10,670,414..10,689,604
18	30I15	O <sup>a</sup> (yellow)	18	11083	12,385,248..12,390,846
18	25M04	G <sup>a</sup> (pastel magenta)	18	11107	13,049,594..13,052,475
18	40L04	O (cyan)	18	11161	15,208,615..15,211,682
19	35E11	G <sup>a</sup> (green)	19	11178	90,227..118,355
19	34F10	Cy5 <sup>a</sup> (magenta)	19	11352	3,954,174..3,965,631
19	37B07	Cy5 (cyan)	19	11556	7,995,011..8,011,304
19	39N13	O (yellow)	19	11560	8,046,954..8,056,914
19	09G05	G (red)	19	11662	10,941,913..10,942,952
19	09G05	G (red)	19	11774	14,477,971..14,485,469
20	12F07	G (green)	20	11791	110,263..116,395
20	35K04	R (red)	20	11857	2,165,156..2,189,882
20	32K21	Cy5 (magenta)	20	11956	4,033,320..4,055,916
20	30E11	O <sup>a</sup> (cyan)	20	12057	6,512,174..6,516,599
20	35L18	Cy5 <sup>a</sup> (pastel magenta)	20	12166	8,636,299..8,640,956
20	37E17	O (yellow)	20	12239	10,275,951..10,287,669
21	36J15	O <sup>a</sup> (yellow)	21	12375	1,695,127..1,699,208
21	28E04	G <sup>a</sup> (green)	21	12460	4,417,937..4,418,422
21	26C01	Cy5 (cyan)	21	12679	11,467,213..11,475,843
21	04L02	G (red)	21	12736	13,552,485..13,554,189
21	27K06	Cy5 <sup>a</sup> (magenta)	21	12776	14,220,215..14,227,163
22	27M16	O <sup>a</sup> (yellow)	22	12862	2,357,572..2,359,336
22	34I09	G <sup>a</sup> (cyan)	22	12902	3,849,823..3,854,601
22	39B19	Cy5 (magenta)	22	12966	5,815,065..5,823,002
22	30B02	R (red)	22	13201	10,075,437..10,079,107
22	16E02	Cy5 <sup>a</sup> (pastel magenta)	22	13267	11,940,653..12,001,369
22	28J11	O <sup>a</sup> (red orange)	22	13370	15,337,807..15,347,838
22	27E23	G (green)	22	13455	17,431,561..17,436,755

23	39H08	Cy5 (magenta)	23	13530	784,310..788,037
23	40E18	G <sup>a</sup> (green)	23	13646	4,091,949..4,096,153
23	33B18	O <sup>a</sup> (yellow)	23	13922	13,682,392..13,686,507
23	32G10	O (red)	23	13991	15,390,684..15,396,826
23	27D08	G (cyan)	23	13997	15,654,322..15,664,685
30	28L16	O <sup>a</sup> (red orange)	23	14019	16,058,041..16,068,078
30	36J12	G (green)	23	14041	16,522,999..16,528,552
30	40N21	Cy5 (magenta)	23	14055	16,988,713..17,002,782
30	33B22	R (red)	23	14128	18,470,642..18,475,309
30	19C15	G <sup>a</sup> (cyan)	23	14169	19,689,420..19,694,897
30	31O22	O (yellow)	23	14238	21,175,584..21,260,272
31	37M03	O (yellow)	24	14318	1,792,152..1,820,360
31	09C22	R (red)	24	14440	6,450,638..6,490,222
31	28C14	Cy5 (magenta)	24	14470	7,356,049..7,371,754
31	19N07	G (green)	24	14477	7,537,479..7,548,883
31	31G17	G <sup>a</sup> (cyan)	24	14500	8,445,099..8,449,796
24	11K18	O <sup>a</sup> (red)	24	14530	9,646,466..9,669,005
24	30K07	O (yellow)	24	14732	13,846,478..13,847,851
24	39O21	Cy5 (magenta)	24	14774	14,898,028..14,899,436
24	35J24	Cy5 <sup>a</sup> (cyan)	24	14825	15,853,147..15,873,798
24	30G20	G (green)	24	14868	16,737,260..16,738,695
25	38A07	Cy5 (magenta)	25	14955	1,081,163..1,086,279
25	06A03	G <sup>a</sup> (red)	25	15114	5,419,305..5,421,593
25	21O23	Cy5 <sup>a</sup> (yellow)	25	15224	7,119,011..7,129,623
25	36E24	O <sup>a</sup> (cyan)	25	15391	11,258,153..11,259,291
25	31E10	G (green)	25	15426	12,868,870..12,873,676
26	36I01	O <sup>a</sup> (red)	26	15486	500,159..505,900
26	32F13	G <sup>a</sup> (green)	26	15583	3,384,172..3,400,184
26	31E04	Cy5 <sup>a</sup> (cyan)	26	15584	3,401,434..3,409,134
26	35F11	Cy5 (magenta)	26	15630	4,720,765..4,721,882
26	35F11	Cy5 (magenta)	26	15716	7,214,820..7,222,661
26	12C05	O (yellow)	26	15787	10,131,261..10,141,030
27	28P11	O (yellow)	27	15864	253,631..265,641
27	19O14	G (green)	27	15866	337,342..347,825
27	39J21	Oa (cyan)	27	15943	3,373,021..3,382,150
27	31A08	R (red)	27	16000	5,723,527..5,775,746
27	17P13	Cy5 (magenta)	27	16064	7,923,629..7,962,674
28	30B05	G (red orange)	28	16166	371,406..377,097
28	32C11	O <sup>a</sup> (yellow)	28	16195	1,118,477..1,120,706
28	21D15	G <sup>a</sup> (green)	28	16211	1,884,395..1,886,383
28	18E08	R (cyan)	28	16261	3,220,258..3,231,743
28	29E23	Cy5 <sup>a</sup> (magenta)	28	16357	6,717,554..6,722,641
28	33P10	R <sup>a</sup> (red)	28	16378	7,537,217..7,561,545
28	27E19	Cy5 (pastel magent)	28	16432	9,691,338..9,695,544
28	30C23	O (RGB blue)	28	16454	10,385,335..10,390,457

a: reprobated FISH

b: 2nd reprobated FISH



## 考察

本節では、モンキチョウ BAC-FISH マッピングにより、カイコ染色体との間にコリニアリティーがあることを明らかにした。染色体の方向や遺伝子配置の保存性を正確に比較するには、染色体 1 本につき最低 4 BACs 以上が座乗する必要がある。本節の研究では、31 染色体中短い第 11 染色体を除いたモンキチョウ 30 染色体について 4 BAC クローン以上を用いたマップ情報を提示できた。

本研究で確認されたモンキチョウ染色体のカイコとの対応関係は、染色体数  $n=31$  のチョウ目昆虫 4 種とカイコ染色体の対応関係の解析結果(Sahara *et al.*, 2013; Ahola *et al.*, 2014; Yasukochi *et al.*, 2016)と一致した。このうち、ヨーロッパアワノメイガとアトグロヒョウモンモドキどちらも共通してカイコ第 11 染色体の 5,115,356-5,202,437 bp、カイコ第 23 染色体の 15,803,731-15,892,909 bp、カイコ第 24 染色体の 8,560,283-11,867,249 bp で対応する 2 染色体が分かれている(Ahola *et al.*, 2014; Yasukochi *et al.*, 2016)。モンキチョウ染色体は、少なくともカイコ第 11 染色体の 4,042,060-5,777,011 bp、カイコ第 23 染色体の 15,664,685-16,058,041bp、カイコ第 24 染色体の 8,449,796-9,646,466 bp の間で対応する染色体が分かっていた(Table 5.1, Fig. 5.1)。これらの結果より、モンキチョウ染色体は、チョウ目昆虫の中で広く保存された  $n=31$  のカイコタイプの染色体構成を維持していることが確認された。

カイコとモンキチョウ染色体間の染色体を異とするリアレンジメントは検出されなかった一方で、同一染色体内部での逆転は、10 染色体で確認もしくは推測された(Fig. 5.1)。これらのうち 4 染色体は少なくとも 1 回、*Ce* Chr24 と 28 は少なくとも 2 回、Z 染色体は最低 3 回の逆転が、カイコと共通祖先の分岐後に生じたと推定される。さらに、*Ce* Chr9 は、カイコ第 9 染色体を基準として、最低 5 回の逆転が考えられた。カイコとコリニアリティーならびに遺伝子配置の保存性が確認されたコベニモンドクチョウでも、カイコとの間に染色体の逆転は複数カ所確認されている(The Heliconius Genome Consortium, 2012)。シロチョウ亜科の種を除いて、チョウ目昆虫では染色体コリニアリティーは認められるが、同一染色体内の配置の逆転は比較的頻繁に発生しているのかもしれない。

## 第2節 シロチョウ科昆虫との比較

第1節では、モンキチョウの染色体マッピングにより、カイコとの染色体コリニアリティーの存在を明らかにした。そこで本節では、より近縁なシロチョウ科モンキチョウ亜科に属するワタリオオキチョウ(Cong *et al.*, 2016)と、シロチョウ科シロチョウ亜科に属するエゾスジグロシロチョウ(Hill *et al.*, 2019)ならびにモンシロチョウのゲノム情報(Nallu *et al.*, 2018)を用いた、モンキチョウ染色体マッピング結果との比較を行った。

### 材料および方法

#### シロチョウ科3種のゲノムデータとの比較解析

BAC-FISH マッピングで単一シグナルが得られた BAC クローンの内部配列に含まれるモンキチョウトランスクリプトームデータをクエリーに、Lepbase (<http://lepbase.org/>)のシロチョウ科昆虫3種(ワタリオオキチョウ、エゾスジグロシロチョウ、モンシロチョウ)に対して tblastx 検索を行った。

### 結果

モンキチョウの近縁種3種に対して、BAC-FISH マッピングに使用した BAC に含まれる遺伝子についてオルソログを特定し、Table 5.2 にまとめた。モンキチョウ染色体の BAC-FISH マッピング結果と比較した結果、モンキチョウ染色体1本あたり平均2.26のエゾスジグロシロチョウの scaffold が対応していた(Table 5.2)。モンシロチョウは、平均3.06 scaffolds が対応した。ワタリオオキチョウのオルソログは、scaffold サイズの N50 length が約257 kbで、染色体レベルの比較を行うには小さかったため、同一 scaffold にほとんど座乗しなかった。2つ以上の遺伝子が座乗していたのは、37G02 と 26C17 (Z), 25N11 と 18B19 (Ce Chr8), 15L16 と 33E13 (Ce Chr14), 02G24 と 09P05 (Ce Chr15), 35M15 と 26E12 (Ce Chr16)ならびに 37B07 (Ce Chr19)に含まれる配列オルソログが座乗する、scaffold802\_cov111、scaffold624\_cov106、scaffold212\_cov99、scaffold1095\_cov104、scaffold4411\_cov99 ならびに scaffold198\_cov97 の6つのみであり、ゲノムレベルでの比較は不可能であった。

Table 5.2 *Colitis erate* coding sequence (CDS) contained in the BACs and its orthologous GeneIDs in *Phoebeis senmae*, *Pieris napi* and *Pieris rapae*.

BAC code	Chr	Transcriptome ID	<i>Phoebeis senmae</i>				<i>Pieris napi</i>				<i>Pieris rapae</i>							
			GeneID: pse	Location (bp)	Chr/ Mod-Scaffold	GeneID: PIENAPG	Location (bp)	scaffold (ScG6Pog)	GeneID: PIERAPG	Location (bp)	GeneID: pse	Location (bp)	Chr/ Mod-Scaffold	GeneID: PIENAPG	Location (bp)	scaffold (ScG6Pog)	GeneID: PIERAPG	Location (bp)
			1902.1	7,489..65,590	95_1	0000006482	424,399..438,043	27	00000004452	8,245,102..8,344,321								
15C05	Z	TRINITY_DN21355_c0_g1_i12	1902.1	7,489..65,590	95_1	0000006482	424,399..438,043	27	00000004452	8,245,102..8,344,321								
37G02	Z	TRINITY_DN16203_c0_g1_i1	802.6	65,713..67,334	1	0000000802	6,270,867..6,274,819	27	00000003194	6,886,442..6,889,481								
26C17	Z	TRINITY_DN13328_c0_g1_i1	802.37	1,000,394..1,006,061	1	00000011096	5,311,846..5,321,800	27	00000006327	6,049,658..6,060,366								
28D01	Z	TRINITY_DN15848_c0_g1_i2	1226.4	259,765..269,770	17_1	00000003672	1,722,951..1,725,660	27	00000007494	2,429,341..2,461,623								
27I05	Z	TRINITY_DN33948_c0_g1_i1	429.1	14,719..52,793	17_1	00000004835	574,255..582,768	27	00000000241	3,288,737..3,460,644								
37B13	2	TRINITY_DN22346_c0_g1_i1	24.4	181,271..194,362	107_1	00000012365	9,498..14,015	19	00000005780	1,263,104..1,266,812								
21P08	2	TRINITY_DN22238_c0_g1_i20	4277.7	111,236..120,534	99_1	00000012506	200,472..210,633	19	00000001319	777,755..810,505								
20B19	2	TRINITY_DN19960_c0_g1_i1	3137.2	162,555..244,036	19	00000007078	10,635,454..10,642,592	19	00000009580	94,424..173,305								
35B07	2	TRINITY_DN20784_c0_g4_i4	3060.8	110,368..111,856	1	00000001306	1,339,494..1,342,727	27	00000006800	893,911..940,389								
27E21	2	TRINITY_DN16853_c0_g1_i1	293.11	148,234..150,589	1	00000009125	25,856..30,606	27	00000004225	741,683..743,839								
36O19	3	TRINITY_DN22627_c0_g1_i1	2973.19	311,854..318,598	22	00000010755	585,793..592,940	243	00000009912	509,210..516,667								
39N23	3	TRINITY_DN15621_c0_g1_i1	119.32	551,566..552,564	22	00000011958	2,278,889..2,280,008	87	00000007379	990,457..993,866								
39E21	3	TRINITY_DN13605_c0_g1_i1	67.21	284,326..287,566	22	00000013432	6,609,637..6,611,585	8	00000012101	573,703..576,352								
28E03	3	TRINITY_DN18281_c0_g1_i2	444.4	82,826..83,978	4	00000004336	7,081,090..7,082,709	128	00000002490	3,119,335..3,129,033								
21J17	4	TRINITY_DN19985_c0_g1_i2	94.8	121,163..130,773		none		61	00000005544	2,881,249..2,886,656								
38K01	4	TRINITY_DN21533_c1_g2_i3	185.15	328,707..334,112	14	00000013230	7,850,899..7,854,619	61	00000011898	883,623..888,038								
29C05	4	TRINITY_DN13712_c0_g1_i1	988.12	241,766..242,776	8	00000004923	6,149,077..6,150,087	196	00000012372	1,774,009..1,776,163								
38D16	4	TRINITY_DN8970_c0_g1_i1	480.35	722,857..725,420	20	00000009884	6,203,305..6,205,776	80	00000005041	4,536,573..4,539,071								
19M07	4	TRINITY_DN19348_c0_g1_i1	747.2	8,741..17,044	7	00000011636	881,825..887,075	7	00000005209	8,953,601..8,954,315								
40P07	5	TRINITY_DN11784_c0_g1_i1	none		15	00000010972	3,201..4,704	44	00000002983	21,775..24,221								
26G07	5	TRINITY_DN25947_c0_g1_i1	2576.12	111,681..112,107	15	00000011709	623,470..624,141	44	00000006121	618,650..618,871								
29E22	5	TRINITY_DN25298_c0_g1_i1	679.9	56,222..59,373	15	00000005653	1,280,617..1,283,665	44	00000011729	1,885,176..1,886,590								
36M07	5	TRINITY_DN18490_c0_g1_i1	289.122	1,629,987..1,631,803	2	00000013518	10,169,280..10,171,906	1294	00000011692	4,172..7,513								
40C19	5	TRINITY_DN20142_c0_g1_i1	1004.9	172,055..175,047	2	00000009848	6,325,650..6,330,111	1359	00000011951	618,287..619,291								
39G18	5	TRINITY_DN20401_c0_g4_i1	446.19	338,266..340,650	15	00000012478	6,778,876..6,782,420	138	00000007088	3,483,787..3,487,562								
36F20	6	TRINITY_DN19404_c0_g1_i2	565.1	222,689..223,731	9	00000002922	1,358,096..1,369,194	128	00000004904	9,901,142..9,912,058								
04L13	6	TRINITY_DN14534_c0_g1_i1	1249.41	954,094..954,513	9	0000000705	3,952,974..3,962,161	77	00000014038	1,987,874..2,026,901								
22I18	6	TRINITY_DN17328_c0_g1_i1	3855.1	114,490..115,047	17	0000000700	7,124,697..7,125,254	52	00000007437	6,809,283..6,809,840								
34D02	6	TRINITY_DN1862_c0_g1_i1	2567.6	50,571..50,948	17	00000013118	8,158,070..8,158,444	52	00000006779	7,853,310..7,853,603								
37E22	7	TRINITY_DN15713_c0_g1_i1	3095.2	11,868..13,133	6	0000000303	7,682,870..7,684,132	69	00000008231	2,030,419..2,031,681								
29L22	7	TRINITY_DN20599_c0_g1_i2	414.7	77,082..83,937	12	00000009127	7,645,581..7,653,858	58	00000008630	2,854,296..2,866,834								
28E20	7	TRINITY_DN21922_c0_g3_i1	923.1	26,409..30,269	12	00000006212	7,854,363..7,862,893	58	00000014444	3,061,562..3,066,196								
25G13	7	TRINITY_DN22022_c0_g1_i1	2221.3	39,692..52,759	12	00000008541	9,400,887..9,406,150	291	00000001389	506,837..522,072								
33A13	8	TRINITY_DN16119_c0_g1_i1	759.6	86,170..87,447		none			none									
24C10	8	TRINITY_DN17848_c0_g1_i1	345.6	156,412..164,852	18	00000012108	7,710,717..7,717,794	9	00000004160	4,195,413..4,201,695								
27O13	8	TRINITY_DN21397_c0_g2_i2	153.11	303,456..311,917	12	00000007686	9,649,464..9,652,740	55	00000003748	1,356,182..1,362,577								
25N11	8	TRINITY_DN18710_c0_g1_i1	624.13	154,324..155,532	12	00000005191	12,371,562..12,372,770	55	00000013239	4,111,058..4,112,378								

18B19	8	TRINITY_DN21488_c0_g1_i1	624_cov106	624.66	852,517..859,749	18	00000011572	8,745,707..8,746,614	9	00000007183	5,202,999..5,208,153
29M17	8	TRINITY_DN22530_c0_g1_i1	265_cov109	265.2	77,057..88,325		none		9	00000005730	6,934,392..6,941,952
33A06	8	TRINITY_DN17823_c0_g1_i1	1943_cov94	1943.13	200,651..201,388	18	00000011969	11,540,903..11,541,640	3	00000006133	83,070..83,807
40N06	9	TRINITY_DN19797_c0_g1_i1	588_cov99	588.6	252,746..289,536		none		75	00000014554	2,132,181..2,180,396
27P12	9	TRINITY_DN14447_c0_g1_i1	28633_cov105	28633.25	554,266..556,269	4	00000006672	9,617,800..9,619,565	128	00000001976	5,648,586..5,650,107
33H24	9	TRINITY_DN17909_c0_g1_i1	2416_cov102	2416.24	423,371..427,944	4	00000011010	8,125,867..8,136,242	128	00000004335	4,208,129..4,213,228
37A15	9	TRINITY_DN21221_c0_g1_i1	3364_cov94	3364.11	163,638..171,822	8	00000009603	2,314,594..2,325,272	75	00000005374	1,119,979..1,143,188
31O01	9	TRINITY_DN12035_c0_g1_i1	2515_cov96	2515.3	44,679..47,092	8	00000001449	2,241,241..2,243,016	75	00000002929	1,213,809..1,215,709
39F22	9	TRINITY_DN11011_c0_g1_i1	13318_cov97	13318.5	53,396..54,250	670_1	00000008735	1..1,301	128	00000006086	6,886,199..6,887,429
28I22	9	TRINITY_DN19445_c0_g1_i1	123_cov103	123.3	16,624..26,436	4	00000011638	12,983,024..12,988,970	128	00000011536	8,241,316..8,250,041
28A14	10	TRINITY_DN18049_c0_g1_i1	4155_cov91	4155.2	103,018..105,306	13	00000006268	5,094,121..5,098,088	122	00000013269	775,577..779,689
40D21	10	TRINITY_DN20055_c0_g1_i1	1204_cov95	1204.2	119,187..123,352		none		122	00000012632	143,636..410,623
22I15	10	TRINITY_DN21478_c0_g3_i1	1816_cov101	1816.36	641,806..646,347	13	00000006972	1,866,746..1,873,018	172	00000008646	1,590,245..1,595,723
31L11	10	TRINITY_DN668_c0_g1_i1	1230_cov97	1230.19	307,183..311,086	8	00000004987	10,809,387..10,811,241	59	00000007429	2,488,469..2,490,290
25L16	10	TRINITY_DN18143_c0_g1_i1	1126_cov102	1126.8	223,781..230,797	9	00000012614	10,793,664..10,795,151	60	00000006248	1,178,877..1,188,455
29A10	11	TRINITY_DN19312_c0_g1_i1	87399_cov92	87399.3	78,258..79,346	25	00000002144	2,791,175..2,792,257	49	00000004105	1,070,612..1,071,694
12G13	11	TRINITY_DN19687_c0_g1_i1	59_cov86	59.7	183,876..193,027	25	00000003158	1,639,311..1,643,173	49	00000003901	2,031,495..2,037,036
24A03	11	TRINITY_DN19118_c0_g1_i1	1449_cov82	1449.2	64,874..82,328	10	00000003938	13,790,414..13,793,751	164	00000001417	17,310..25,312
10M24	12	TRINITY_DN20175_c0_g1_i1	4378_cov103	4378.3	35,570..46,313	14	00000000143	813,854..822,617	38	00000013193	646,687..648,795
27I08	12	TRINITY_DN22998_c2_g1_i1	1790_cov80	1790.2	116,427..117,416	19	00000013100	7,793,864..7,795,578	713	00000001907	11,905..12,885
28N11	12	TRINITY_DN22909_c0_g1_i1	1051_cov106	1051.34	1,191,121..1,200,119	19	00000013385	7,620,320..7,642,584	16	00000014201	780,696..801,570
40F05	12	TRINITY_DN12489_c0_g1_i1	1329_cov96	1329.2	3,430..3,324	1	00000010512	10,794,847..10,797,436		none	
39F06	12	TRINITY_DN18061_c0_g1_i1	1090_cov102	1090.6	146,926..152,684	10	00000010307	6,895,037..6,900,827	26	00000004498	6,525,186..6,535,052
25E15	12	TRINITY_DN15531_c0_g1_i1	6217_cov95	6217.4	58,252..59,185	10	00000009830	8,131,672..8,134,016	26	00000009800	8,099,012..8,112,641
34A02	13	TRINITY_DN20048_c0_g1_i2	716_cov87	716.8	69,780..72,840	45_1	00000002016	168,109..171,674	28	00000008549	432,430..435,851
21J15	13	TRINITY_DN18740_c0_g1_i1	1348_cov102	1348.21	317,789..322,037	21	00000004067	10,094,486..10,095,028	33	00000013840	238,223..248,149
26K14	13	TRINITY_DN12981_c0_g1_i1	1402_cov106	1402.5	37,868..39,384	40_1	00000011717	1,153,552..1,155,106	23	00000001685	102,330..103,336
34B02	13	TRINITY_DN21622_c0_g2_i2	1133_cov91	1133.19	354,098..354,850	17	00000002156	984,298..985,306	52	00000014874	993,919..995,476
29I22	14	TRINITY_DN19106_c0_g1_i1	3303_cov99	3303.7	76,834..82,431	20	00000007361	765,355..769,894	51	00000009967	1,795,188..1,797,109
27C08	14	TRINITY_DN16660_c0_g1_i1	5180_cov75	5180.2	10,363..12,792	20	00000005763	2,180,619..2,183,077	1326	00000013830	393..2,437
37P11	14	TRINITY_DN20054_c0_g1_i1	6436_cov91	6436.7	59,535..64,306	6	00000009400	11,153,271..11,164,868	47	00000004027	4,777,689..4,786,239
26P08	14	TRINITY_DN16146_c0_g1_i1	827_cov91	827.5	71,189..74,146	6	00000002142	12,958,625..12,960,574	68	00000005748	725,418..727,284
15L16	14	TRINITY_DN11613_c0_g1_i1	212_cov99	212.6	56,843..66,155	15	00000011823	11,308,697..11,311,007	223	00000014667	320,930..366,619
33E13	14	TRINITY_DN19737_c0_g1_i1	212_cov99	212.7	81,638..83,089	15	00000005994	11,277,116..11,278,213	223	00000001309	386,490..387,989
19D09	15	TRINITY_DN16255_c0_g1_i1	2149_cov96	2149.22	364,810..366,920	4	00000004761	2,915,326..2,918,037	33	00000011055	1,386,998..1,389,961
06A01	15	TRINITY_DN21589_c0_g1_i1	152_cov91	152.3	22,582..24,902	4	00000010932	2,189,386..2,191,447	33	00000012865	2,292,110..2,294,258
14M02	15	TRINITY_DN17905_c0_g1_i1	1387_cov96	1387.1	272,155..276,162	4	00000012509	1,305,691..1,310,173	53	00000013372	968,352..972,001
02G24	15	TRINITY_DN20993_c0_g1_i2	1095_cov104	1095.66	1,036,254..1,054,558	7	00000009179	6,742,467..6,762,267	7	00000009308	3,854,328..3,922,781
09P05	15	TRINITY_DN32203_c0_g1_i1	1095_cov104	1095.56	822,863..825,197	7	00000007858	6,504,803..6,506,453	7	00000007137	4,086,846..4,089,558
14F14	15	TRINITY_DN14712_c0_g1_i1	3377_cov108	3377.6	76,800..77,459	1361_1	00000013564	1,994..3,005	7	00000008723	3,244,019..3,245,086

37J22	16	TRINITY_DN19368_c0_g_l_i3	138.1	1,279,3597	3	00000012348	5,268,017..5,270,498	2	00000014656	6,698,337..6,701,160
32O24	16	TRINITY_DN16302_c0_g_l_i2	527.2	13,634..17,285	3	00000005301	4,624,560..4,626,846	2	00000001076	7,242,103..7,244,395
25L15	16	TRINITY_DN22363_c0_g_l_i1	2688.6	154,803..164,894	3	00000011778	6,354,927..6,360,181	2	00000002765	5,717,063..5,747,783
35M15	16	TRINITY_DN17958_c0_g_l_i1	4411.4	477,947..484,489	12	00000004520	3,016,773..3,020,356	95	00000011184	2,759,870..2,762,337
26E12	16	TRINITY_DN13041_c0_g_l_i1	4411.51	547,677..552,895	12	00000004362	2,937,131..2,941,641	95	00000000507	2,864,978..2,870,585
38A13	16	TRINITY_DN18446_c0_g_l_i1	3107.4	44,662..46,431	12	00000012636	358,788..361,033	95	00000000093	5,164,337..5,168,939
11D18	17	TRINITY_DN22153_c0_g_l_i2	257.3	50,686..67,949	17	00000013272	11,682,296..11,712,683	31	00000005982	1,962,050..1,980,670
26A07	17	TRINITY_DN20090_c0_g_l_i1	402.22	215,823..230,647	17	00000009003	10,408,706..10,424,969	31	00000005367	739,753..746,744
23G06	17	TRINITY_DN12696_c0_g_l_i1	162.14	329,578..331,653	9	00000001975	9,861,369..9,864,652	60	00000011685	190,432..192,647
35N03	17	TRINITY_DN15295_c0_g_l_i1	1698.6	37,437..37,943	9	00000010866	8,454,233..8,455,232	77	00000013142	6,529,368..6,529,860
02G01	17	TRINITY_DN15384_c0_g_l_i1	87396.1	2,902..3,942	14	00000001742	10,513,552..10,514,742		note	
07D14	18	TRINITY_DN22023_c0_g_l_i1	5810.2	19,361..31,084	6	00000010099	1,410,504..1,416,935	65	00000005592	1,193,280..1,196,919
23D23	18	TRINITY_DN16075_c0_g_l_i1	2357.11	98,431..100,014	6	00000007902	3,944,739..3,953,228	54	00000013334	368,376..381,899
23F16	18	TRINITY_DN19846_c0_g_l_i1	863.4	187,341..215,996	11	00000013219	13,575,648..13,582,967	125	00000006549	1,524,21,550
40L04	18	TRINITY_DN20497_c0_g_l_i1	2436.5	158,983..160,919	16	00000002726	9,308,138..9,311,101	96	00000003501	1,260,475..1,262,198
25M04	18	TRINITY_DN21876_c0_g_l_i1	2212.9	13,085..14,744	16	00000010391	11,414,789..11,417,540		note	
30I15	18	TRINITY_DN20930_c0_g_l_i1	1136.5	184,305..189,724	16	00000004456	11,777,082..11,780,582	58	00000009786	61,720..65,975
35E11	19	TRINITY_DN20131_c0_g_l_i2	1526.3	46,123..61,858	3	00000003336	308,819..313,774	2	00000005976	11,329,896..11,339,468
34F10	19	TRINITY_DN20197_c0_g_l_i2	1619.3	23,068..30,721	3	00000008266	244,196..251,896	2	00000010482	11,379,908..11,389,408
37B07_A	19	TRINITY_DN18840_c0_g_l_i1	198.9	74,549..77,634	3	00000005457	865,170..868,183	2	00000001075	10,839,858..10,844,434
37B07_B	19	TRINITY_DN21391_c0_g_l_i1	198.4	21,447..30,881	14	00000004240	4,747,927..4,750,434	2	00000002449	7,729,400..7,740,121
39N13	19	TRINITY_DN22835_c3_g_l_i5	9401.6	38,868..39,572		note		78	00000002275	1,448,072..1,448,776
09G05	19	TRINITY_DN20045_c0_g_l_i1	5031.2	9,389..15,077	2	00000003295	11,723,662..11,727,300	238	00000006460	83,946..92,334
12F07	20	TRINITY_DN22217_c0_g_l_i2	798.8	65,544..74,976	15	00000001811	11,475,275..11,482,111	271	00000005158	1,722,273..1,728,589
35K04	20	TRINITY_DN21431_c0_g_l_i2	1014.2	3,141..24,868	15	00000013397	10,482,259..10,498,738	271	00000009493	379,590..401,138
37E17	20	TRINITY_DN21712_c0_g_l_i2	1614.6	114,611..121,755	5	00000009102	13,951,175..13,957,915	426	00000001196	21,605..27,267
35L18	20	TRINITY_DN18984_c0_g_l_i1	2010.3	49,885..52,559	5	00000008222	14,329,054..14,335,986	394	00000014795	103,366..105,281
30E11	20	TRINITY_DN20190_c0_g_l_i1	836.5	127,014..131,486	5	00000007968	13,789,950..13,792,942	426	00000010884	157,734..207,944
32K21	20	TRINITY_DN22362_c0_g_l_i1	1777.5	22,705..36,637	5	00000003379	12,467,651..12,477,184	71	00000008080	524,034..545,969
36I15	21	TRINITY_DN11216_c0_g_l_i2	11627.6	71,814..88,034	5	00000013612	760,319..767,270	8	00000005482	3,055,446..3,063,037
28E04	21	TRINITY_DN1170_c0_g_l_i1	102.14	534,048..535,488	5	00000006828	5,628,220..5,635,539	8	00000004923	7,953,710..7,955,466
26C01	21	TRINITY_DN21491_c0_g_l_i1	7878.2	22,864..30,079	5	00000005597	7,174,218..7,181,769	8	00000006658	9,466,143..9,466,557
04L02	21	TRINITY_DN14939_c0_g_l_i1	1974.14	228,809..230,152	5	00000011072	8,642,271..8,643,859	8	00000004546	10,850,074..10,851,840
27K06	21	TRINITY_DN19289_c0_g_l_i1	1561.1	28,069..37,362	10	00000011933	10,004,999..10,006,946		note	
27M16	22	TRINITY_DN16913_c0_g_l_i1	5.8	163,571..173,600	16	00000000937	1,381,250..1,384,023		note	
34I09	22	TRINITY_DN20798_c0_g_l_i1	6193.14	377,216..382,660	16	00000008621	2,673,047..2,679,052	418	00000012993	1,128..4,331
39B19	22	TRINITY_DN21461_c0_g_l_i1	1870.16	332,440..339,775	14	00000004066	12,547,095..12,549,688	230	00000009147	487,122..496,347
30B02	22	TRINITY_DN13389_c0_g_l_i2	1181.11	115,567..118,636	130_1	00000002079	18,626..21,133	7	00000007373	564,296..567,301
16E02	22	TRINITY_DN20952_c0_g_l_i1	1727.1	235,512..265,676	7	00000006067	13,372,844..13,381,809	81	00000005752	720,139..755,735
28I11	22	TRINITY_DN19844_c0_g_l_i1	2426.2	59,875..66,525	20	00000003580	9,810,424..9,811,117	80	00000000603	903,031..909,997

27E23	22	TRINITY_DN23035_c6_g_l_i	8312_cov74	8312.3	31.102...32.331	20	00000007105	10,742,584..10,745,832	82	00000014721	33,778..36,407
39H08	23	TRINITY_DN17108_c0_g_l_i	1268_cov104	1268.29	673,307..674,514	3	00000010425	15,274,420..15,276,272	231	00000004223	86,267..88,427
40E18	23	TRINITY_DN16834_c0_g_l_i	906_cov105	906.2	133,477..136,387	3	0000000707	10,535,105..10,552,051	2	00000008292	1,608,232..1,679,436
33B18	23	TRINITY_DN20855_c0_g2_i	1456_cov87	1456.5	185,913..188,147	10	00000002859	3,050,298..3,053,961	26	00000009457	2,744,523..2,747,864
32G10	23	TRINITY_DN19940_c0_g_l_i	7548_cov78	7548.1	15,931..23,151	10	00000012059	4,221,503..4,225,700	26	00000014575	3,852,669..3,855,746
27D08	23	TRINITY_DN20215_c0_g_l_i4	86766_cov88	86766.9	283,275..293,409	10	00000003546	4,373,955..4,380,575	26	00000000493	4,032,841..4,038,495
30K07	24	TRINITY_DN18963_c0_g_l_i	1221_cov82	1221.5	83,550..84,458	23	00000001423	2,292,153..2,293,058	208	00000002831	446,245..447,156
11K18	24	TRINITY_DN21374_c2_g_l_i	770_cov74	770.3	89,530..113,539	23	00000012717	780,827..793,908	39	00000004200	1,193,062..1,197,794
35I24	24	TRINITY_DN22174_c0_g_l_i	2805_cov69	2805.7	70,854..85,737	23	00000007492	3,342,939..3,356,483	27	00000007573	10,303,461..10,310,292
39O21	24	TRINITY_DN14011_c0_g_l_i	5252_cov91	5252.4	79,809..80,978		none			none	
30G20	24	TRINITY_DN21385_c2_g_l_i	4108_cov89	4108.3	9,312..10,751	23	00000012653	4,940,919..4,942,358	27	00000008784	11,723,661..11,796,846
38A07	25	TRINITY_DN19596_c0_g_l_i	613_cov88	613.1	193,787..219,474	13	00000005057	12,108,795..12,119,749	30	00000005705	7,264,254..7,278,367
06A03	25	TRINITY_DN16504_c0_g_l_i2	548_cov106	548.8	31,177..39,346	13	00000005738	9,506,385..9,508,026	30	00000007452	4,397,758..4,398,908
21O23	25	TRINITY_DN20249_c0_g_l_i	1123_cov101	1123.21	225,003..232,502	13	00000003898	9,013,839..9,032,270	30	00000002706	3,839,314..3,851,478
36E24	25	TRINITY_DN17742_c0_g2_i	5384_cov97	5384.3	111,199..112,257	2	00000011205	2,390,538..2,391,575	93	00000007942	74,236..75,273
31E10	25	TRINITY_DN18308_c0_g_l_i	875_cov94	875.8	396,932..403,981	2	00000009107	4,279,188..4,281,806	47	00000013096	1,251,422..1,254,730
36I01	26	TRINITY_DN20457_c0_g_l_i	1180_cov76	1180.5	43,517..48,965	4	00000008311	5,731,231..5,739,822	128	00000003880	1,860,769..1,864,576
32F13	26	TRINITY_DN22710_c0_g_l_i	1565_cov91	1565.4	85,403..98,983	4	00000000710	3,729,344..3,730,936	277	00000008695	1,928..5,751
31E04	26	TRINITY_DN23065_c2_g_l_i	363_cov94	363.2	581,031..581,801		none			none	
35F11	26	TRINITY_DN19413_c0_g_l_i	730_cov100	730.3	23,110..28,197	13	00000003869	6,859,564..6,864,672		none	
12C05	26	TRINITY_DN21652_c0_g2_i	10676_cov83	10676.1	688..2,657	13	00000005016	7,666,396..7,675,513	30	00000005307	2,448,367..2,457,069
28P11	27	TRINITY_DN19365_c0_g_l_i	1179_cov97	1179.4	121,432..180,294	11	00000000191	5,588,908..5,593,595	72	00000003231	230,620..273,549
19O14	27	TRINITY_DN20865_c0_g_l_i	12668_cov93	12668.5	29,022..32,977	7	00000009179	6,742,467..6,762,267	72	00000010542	210,333..219,535
39I21	27	TRINITY_DN21932_c0_g_l_i	361_cov100	361.3	206,550..207,949	11	00000000269	6,867,546..6,870,255	72	00000008307	1,334,403..1,343,748
31A08	27	TRINITY_DN22830_c0_g2_i	1485_cov93	1485.13	433,346..482,875	11	00000006846	7,519,556..7,520,552	72	00000013801	1,978,696..2,016,456
17P13	27	TRINITY_DN22337_c0_g_l_i	2241_cov96	2241.7	181,555..209,520	21	00000011426	8,610,657..8,613,340	376	00000012724	11,822..44,151
30B05	28	TRINITY_DN22747_c0_g_l_i	1699_cov95	1699.1	43,170..48,580	8	00000005863	9,651,527..9,657,454	59	00000000396	1,245,247..1,279,235
32C11	28	TRINITY_DN19697_c0_g_l_i	1159_cov86	1159.1	233,811..237,644	435_1	00000008968	605..2,191	59	00000001912	858,916..861,925
21D15	28	TRINITY_DN17436_c0_g_l_i	2048_cov93	2048.9	178,379..180,133	8	00000010343	8,164,220..8,167,153	196	00000002541	163,931..165,415
27E19	28	TRINITY_DN3119_c0_g_l_i	396_cov89	396.11	228,715..231,195	55_1	00000008432	396,598..400,560	191	00000004439	676,095..678,945
18E08	28	TRINITY_DN20501_c0_g_l_i	3455_cov89	3455.3	9,591..15,838	8	00000009417	7,583,486..7,588,578	196	00000008645	710,453..715,625
33P10	28	TRINITY_DN20213_c0_g_l_i	6438_cov82	6438.5	45,828..47,684	21	00000004842	1,224,142..1,225,992	613	00000012936	2..6,322
29E23	28	TRINITY_DN15492_c0_g_l_i2	903_cov97	903.5	73,415..76,376	21	00000004622	306,066..308,690	119	00000011301	426,442..429,128
30C23	28	TRINITY_DN18660_c0_g_l_i	18688_cov78	18688.3	7,747..9,915	102_1	00000000654	106,261..110,279	119	00000004722	90,207..95,699
37E06	29	TRINITY_DN16311_c0_g_l_i	1635_cov83	1635.3	62,236..64,863	11	00000013244	74,929..77,885	169	00000002523	76,929..80,950
14L02	29	TRINITY_DN21468_c0_g_l_i	7272_cov75	7272.2	24,152..31,493	11	00000007037	593,861..598,375	169	00000001495	555,503..564,336
14L15	29	TRINITY_DN22917_c0_g_l_i	547_cov73	547.2	7,964..24,554	11	00000003728	2,332,228..2,346,945	169	00000012628	1,526,341..1,541,250
16M14	29	TRINITY_DN22575_c1_g2_i	2216_cov101	2216.2	27,999..28,802	18	00000005272	2,304,536..2,305,330	92	00000009051	1,720,968..1,721,762
34B21	29	TRINITY_DN25589_c0_g_l_i	42_cov106	42.3	30,890..34,905	18	00000002753	4,198,915..4,202,128	92	00000014417	115,855..119,234
33B22	30	TRINITY_DN20575_c0_g_l_i3	509_cov73	509.3	118,700..123,934	19	00000000152	440,594..442,375	37	00000013928	3,604,116..3,610,233

40N21	30	TRINITY_DN21980_c0_g_l_ii	5656_cov69	5656.1	2,541..9,585	19	00000001288	294,333..306,791	2303	00000011412	21,936..36,079
36I12	30	TRINITY_DN21234_c0_g_l_ii	1620_cov82	1620.8	82,067..92,454	19	00000004402	260,983..264,683	37	00000009428	3,766.335..3,769,492
28L16	30	TRINITY_DN20032_c0_g_l_ii	307_cov101	307.14	338,600..352,915	19	00000011407	987,035..995,247	37	00000002990	2,952,123..2,964,598
19C15	30	TRINITY_DN16975_c0_g_l_ii	6590_cov87	6590.5	85,273..91,576	19	00000012804	3,548,462..3,552,033	37	00000004218	57,229..60,413
31O22	30	TRINITY_DN20592_c0_g_l_ii	8320_cov64	8320.1	2,415..3,983	19	00000002785	2,818,687..2,836,706	37	00000005125	750,402..842,763
37M03	31	TRINITY_DN21259_c0_g_l_ii	2729_cov97	2729.3	133,075..139,539	10	00000012316	8,488,957..8,503,487	26	00000014271	8,406,906..8,419,013
09C22	31	TRINITY_DN19739_c1_g_l_ii	2053_cov92	2053.12	206,602..208,194	10	00000009206	12,161,592..12,170,247	164	00000007035	1,548,911..1,556,409
28C14	31	TRINITY_DN21316_c0_g_l_ii	225_cov78	225.4	106,475..114,983	10	00000008823	12,776,458..12,787,680		none	
19N07	31	TRINITY_DN20424_c0_g_l_ii	2529_cov77	2529.1	971..3,346	10	00000009691	12,680,639..12,685,660	164	00000007309	1,121,937..1,128,983
31G17	31	TRINITY_DN22769_c0_g_l_ii	21_cov82	21.2	99,727..106,173	10	00000011001	13,508,279..13,510,245	164	00000004228	337,938..340,568

## 考察

シロチョウ科の種でゲノム情報が公開されているのはワタリオオキチョウ、エゾスジグロシロチョウならびにモンシロチョウの3種である(<http://lepbase.org/>)。中でもエゾスジグロシロチョウは、染色体レベルの scaffold アセンブリが行われており、染色体レベルでの比較も可能である。ゆえにモンシロチョウのゲノム情報よりもデータ精度が高いと考えられたため、この結果をもとに議論する。BAC シグナルが染色体上で近傍に座乗したオルソログ間にはマイクロシンテニックな領域が認められたが、離れた位置に座乗するオルソログでは、モンキチョウとエゾスジグロシロチョウで互いに異なる染色体に座乗している場合がほとんどであった(Table 5.2)。これは、シロチョウ亜科の種においてブロック単位の染色体リアレンジメントが生じたとの報告と一致する(大野, 2017; Hill *et al.*, 2019)。この結果より、シロチョウとモンキチョウ亜科で染色体上の遺伝子配置が大きく変化していることが決定的となった。

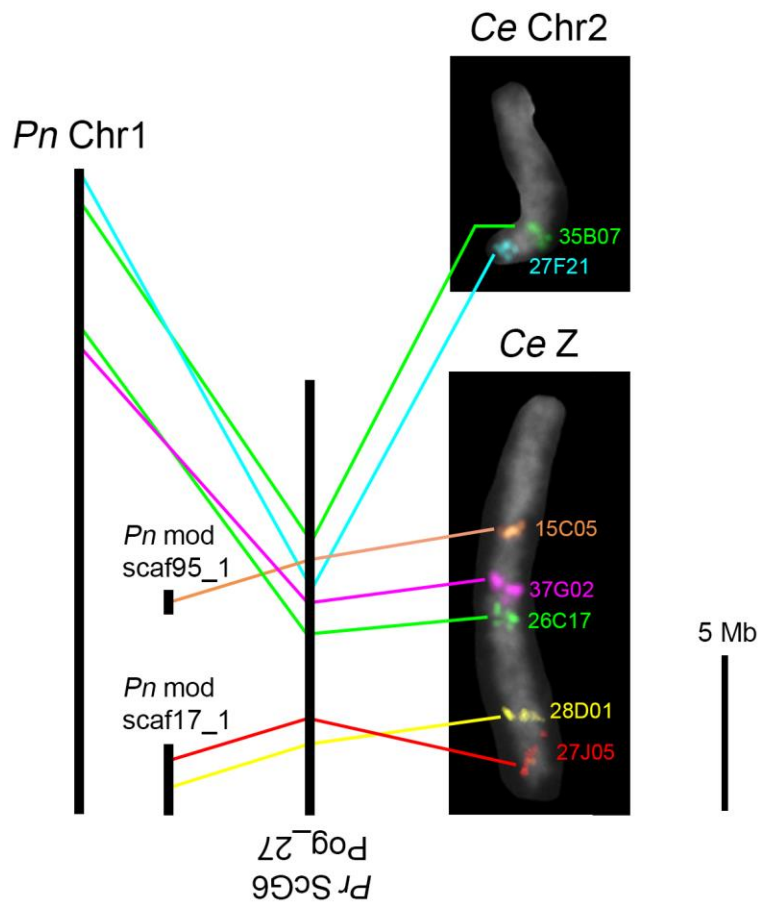
BAC-FISH マッピングにより明らかとなったモンキチョウ Z 染色体の遺伝子配置は、モンシロチョウのゲノム情報と比較すると全て scaffold ScG6Pog27 と対応しており、遺伝子配置も1カ所の逆転のみが検出されるに留まった(Fig. 5.3)。エゾスジグロシロチョウのゲノム情報と比較すると、全て Z 染色体(*Pn* Chr1)もしくは染色体情報にアセンブリされていない scaffold と対応した(Fig. 5.3)。一方で、モンキチョウ第2染色体の35B07と27F21の内部配列のエゾスジグロシロチョウならびにモンシロチョウオルソログについても、それぞれ Z 染色体に対応する scaffold に座乗していた(Fig. 5.3)。35B07の内部配列に含まれる *invected* は、オオモンシロチョウでも性染色体に FISH マッピングされているため、カイコタイプの第2染色体の一部末端部に対応する染色体は、シロチョウでは Z に対応することがゲノム情報だけでなく実験的にも示されている(Fig. 2.10)。さらに、27F21の内部配列に含まれる *RpS21* と *invected* の間には、モンシロチョウの scaffold ScG6Pog27 において、モンキチョウ15C05の内部配列に含まれる *kettin* が座乗していた(Fig. 5.3)。エゾスジグロシロチョウのゲノム情報では *kettin* は染色体にマップできていなかった。*kettin* はチョウ目昆虫で広く Z 染色体に座乗することが知られており、Z 染色体のマーカーとしても使われる(Kageyama *et al.*, 2017)。このことから、モンキチョウの染色体が祖先的な配置であるとする、モンシロチョウの染色体は第2染色体の一部が性染色体に融合し、一部逆転するリアレンジメントを生じたと考えるのが自然である。予想外に、エゾスジグロシロチョウのアセンブリデータでは3オルソログ遺伝子が染色体にマップできていなかったものの、モンシロチョウ染色体との間で2回の逆転が生じていることがゲノム情報間の比較により示唆された(Fig. 5.3)。これらはアセンブリミスの可能性も考えられるが、エゾスジグロシロチョウ特異的な逆転である可能性もある。

ワタリオオキチョウは、モンキチョウと最も近縁種であるため、遺伝子配置の保存性の検出に期待が持たれた。しかしながら、N50 length が約 257 kb しかないことが災いし、オルソ

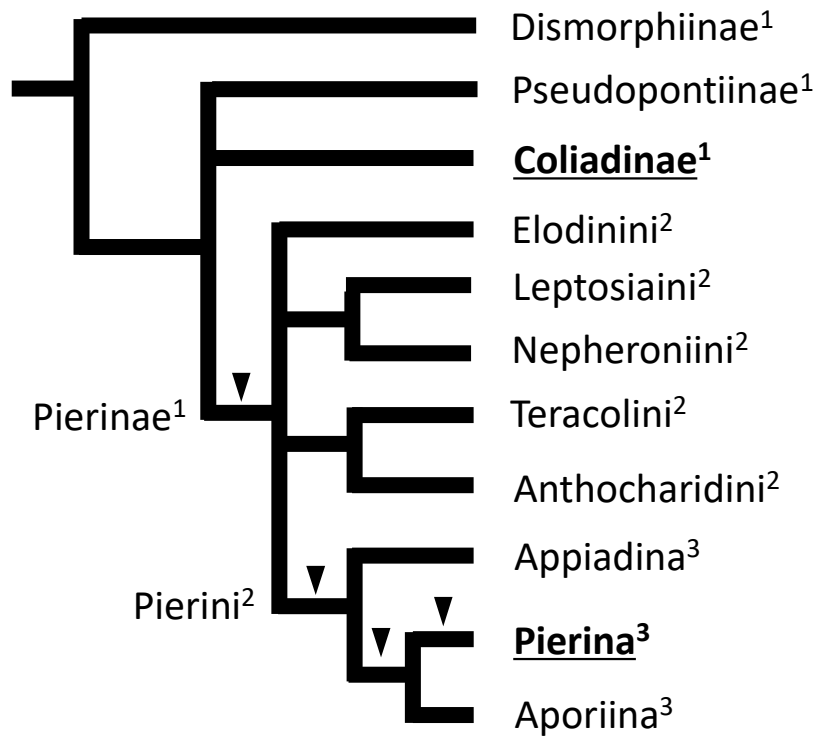


ログが同一 scaffold にほとんど座乗しなかった(Table 5.2)。解析に用いた遺伝子のオルソログが2つ座乗した scaffold は6つのみであったが、そのうち scaffold624\_cov106 に乗る2つの遺伝子 pse624.13 と pse624.66 のエゾスジグロシロチョウオルソログは、別染色体に座乗していた(*Pn* Chr12, *Pn* Chr18)。なお、それぞれのモンシロチョウオルソログをもつ 25N11 と 18B19 は *Ce* Chr8 に近接して BAC シグナルが認められた(Fig. 5.1)。つまりこれら2オルソログは、モンキチョウ亜科の種とシロチョウ亜科種で異なる染色体に座乗すると推測された。これら2遺伝子は、カイコでは KWMTBOMO04540 と KWMTBOMO04610 に対応しており、どちらも第8染色体に座乗する(Table 4.3)。遺伝子間の距離もワタリオオキチョウで約 0.7 Mb、カイコで約 1.2 Mb と保存性が高いことから、この2 BAC クローン間の領域は *Pieris* 属の共通祖先において染色体分断が生じた部位である可能性が示唆された。

第II章において、オオモンシロチョウ染色体の BAC-FISH マッピングによるエゾスジグロシロチョウの遺伝子配置の比較を行ったが、本節のモンキチョウ BAC-FISH での比較はそれと大きく異なる結果となった。モンキチョウは、同じシロチョウ科の *Pieris* 属の種とは異なり、カイコタイプの染色体構成を持つ。つまり、第II章で記述した *Pieris* タイプの染色体構成は、シロチョウ科内の種分化にパラレルな現象であると言える。本研究結果と分子系統樹(Wahlberg *et al.*, 2014)を照らし合わせた結果、シロチョウ亜科(*Pierinae*)の分岐、シロチョウ族(*Pierini*)の分岐、シロチョウ亜族(*Pierina*)+ミヤマシロチョウ亜族(*Aporiina*)とトガリシロチョウ亜族(*Appiadina*)の分岐、シロチョウ亜族とミヤマシロチョウ亜族の分岐のいずれかで染色体の大規模な構成変化が生じた可能性が高い(Fig. 5.4, arrowheads)。したがって、これらの分岐で分化した各姉妹クレードの種における解析を行うことで、染色体構成変化の起源がほぼ確実になるだろう。



**Figure 5.3** Comparison of orthologs between Z and chromosome 2 of *Colias erate* (*Ce Z*, *Ce Chr2*), *Pieris rapae* and *Pieris napi*. These orthologs mapped on one scaffold ScG6Pog\_27 in *P. rapae* (*Pr ScG6Pog\_27*), whereas chromosome 1 and two modscaffolds in *P. napi* (*Pn Chr1*, *Pn modscf17\_1* and *Pn modscf95\_1*). Scale bar on the right-side is for *P. napi* and *P. rapae* scaffold length.



**Figure 5.4** Schematic representation of the modified phylogeny of Pieridae after Wablberg *et al.* (2014). Colialinae and Pierina (written in Bold/underlined) were described in Wablberg *et al.* (2014). Arrowheads show candidate clades where the drastic chromosome rearrangements occurred. 1: Subfamily 2: Tribe 3: Subtribe

### 第3節 モンキチョウ染色体の進化予測

本章第1節のBAC-FISHマッピング結果より、モンキチョウゲノムは、カイコとの間に染色体対応関係と多くの遺伝子配置の保存性が認められるカイコタイプの構成を持つことが明らかになった。一方、対応する9染色体においてモンキチョウとカイコ染色体との間に遺伝子順序の逆転が認められた(Fig. 5.1)。これらの逆転がどのクレードで生じたのか推定するためには、両者の分子系統にもとづく比較が必要となる。モンキチョウは、アゲハチョウ上科に属しており、最近の分子系統解析から、アゲハチョウ上科は最初にアゲハチョウ科が分化し、シャクガモドキ科とセセリチョウ科が分化した後にシロチョウ科が分化したとされている(Heikkilä *et al.*, 2012; Espeland *et al.*, 2018; ButterflyNet <https://www.butterflynet.org/>)。アゲハチョウ科は、数種でゲノム解析が行われており、いずれもカイコタイプの染色体構成を持つと予測される。ナミアゲハ(*Papilio xuthus*, n=30)は、アゲハチョウ上科で最も祖先的なクレードに属する。そのゲノムデータは、N50 lengthが約6.2 Mbの長さがあり(Li *et al.*, 2015)、部分的には染色体対応関係の解析に利用できる。つまり、モンキチョウとナミアゲハのオルソログについて、BAC-FISHマッピング結果とナミアゲハの scaffold data を比較解析することで、カイコとモンキチョウの染色体変化の進化的な推定が可能であると考えられた。

本節では、対応するカイコとナミアゲハ染色体間で遺伝子配置の変化が認められた9染色体について、ナミアゲハ遺伝子オルソログの配置を scaffold data 上で特定し、3種間のオルソログ配置を比較した。なお、本研究では、カイコとモンキチョウならびにナミアゲハの共通祖先は、カイコと同一の遺伝子配置であると仮定して、アゲハチョウ上科における遺伝子配置の逆転について議論した。

#### 材料および方法

##### ナミアゲハのゲノムデータとの比較解析

BAC-FISHマッピングで単一領域にダブルドットシグナルが得られたBACクローン(Fig. 5.1)の内部配列モンキチョウトランスクリプトームデータ(Table 5.2)をクエリーに、Lepbase (<http://lepbase.org/>)の *Papilio xuthus* Pxut 1.0 に対して tblastx 検索を行った。

#### 結果

遺伝子順序の対応関係の逆転がカイコとの間で確認されたモンキチョウの9染色体について、BAC-FISHマッピングに使用したBACに含まれる遺伝子(Trinity Transcriptome ID)とナミアゲハ(GeneID: PxuthusGene)ならびにカイコオルソログ(GeneID: KWMTBOMO)を Table

5.3 にまとめた。それらの gene models が座乗するナミアゲハ scaffolds とカイコ染色体を模式化し、モンキチョウ染色体 BAC-FISH マッピング結果との対応関係をナミアゲハ染色体とモンキチョウ染色体のシンテニー領域が最大となるよう Fig. 5.5 に図示した。その結果、カイコナミアゲハモンキチョウの染色体対応関係は、1)ナミアゲハとモンキチョウにシンテニー（オルソログの配置が全て一致）が認められるタイプに属するモンキチョウ染色体 Z, 14, 17, 18 および 28、2)カイコとナミアゲハにシンテニーが認められるモンキチョウ染色体 24、ならびに 3)カイコとナミアゲハ、ナミアゲハとモンキチョウのいずれにもオルソログ配置の逆転が認められるモンキチョウ染色体 9, 20 および 30 に分類された。Fig. 5.5 に従って対応を以下に記述する。1)のグループのうち、モンキチョウ第 14 染色体(*Ce* Chr14)は、ナミアゲハ scaffold 2456 (*Px* scaf2456)に全てのモンキチョウ遺伝子が対応した。*Ce* Z、*Ce* Chr17 ならびに *Ce* Chr18 に座乗する遺伝子のナミアゲハオルソログはそれぞれ、*Px* scaf524 と 3684、*Px* scaf2452 と 3049、*Px* scaf2445 と 3684 にマップされた。*Ce* Chr28 に座乗する遺伝子のナミアゲハオルソログは、*Px* scaf3077、3377 と 5167 にマップされた。2)の *Ce* Chr24 に座乗する遺伝子のカイコオルソログは、*Px* scaff2283 と 3377 にシンテニックにマップされ、30K07 の持つオルソログと 11K08 に含まれるオルソログ間ならびに 35J24 に含まれるオルソログと 39O21 が持つ TRINITY\_DN14011\_c0\_g1\_i1 オルソログ(Table 4.3 参照)の間でモンキチョウでは座乗に逆転が生じていた。3)にグルーピングされた *Ce* Chr30 は、*Px* scaf1453 に対応し、カイコとモンキチョウで同一順に座乗する 19C15 と 31O22 にあるオルソログ (Table 4.3 参照)のマッピングがナミアゲハでは逆順となっていた。また、28L16 の持つオルソログ(Table 4.3 参照)の座乗は、3 者で異なった。*Ce* Chr9 と *Ce* Chr20 には、*Px* scaf3284 と 4636 ならびに *Px* scaf3263 と 5265 が対応した。それぞれのオルソログのマッピング順は、3 者で大きく異なった。

なお、35J24 (*Ce* Chr24) の持つ遺伝子 TRINITY\_DN22174\_c0\_g1\_i1 (conserved\_oligomeric\_Golgi\_complex\_subunit\_7) と 27E19 (*Ce* Chr28) の持つ遺伝子 TRINITY\_DN3119\_c0\_g1\_i1 (checkpoint\_protein\_HUS1) (Table 4.3)のナミアゲハオルソログ *Px*thusGene0008654 と 0008696 は、いずれも *Px* scaf3377 にアセンブルされる(Fig. 5.5; Table 5.3)。アセンブルミスの可能性は排除できないが、ナミアゲハとモンキチョウの共通祖先種での部分転移を伴う染色体リアレンジメントの可能性はある。

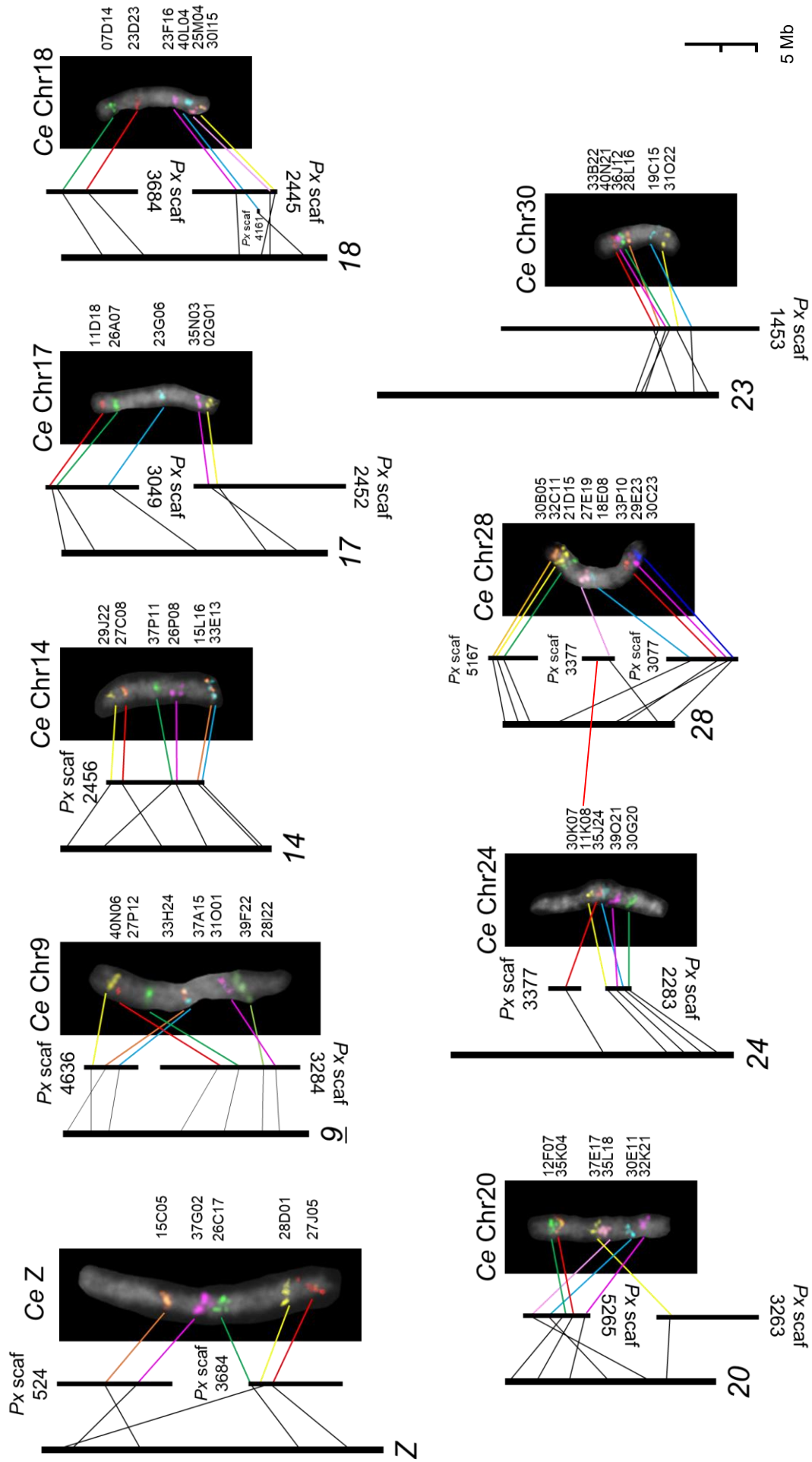
## 考察

本研究では、カイコとの間に逆転が確認されたモンキチョウ染色体について、アゲハチョウ上科の祖先的なクレードに分布するナミアゲハのゲノム情報との比較を行った(Fig. 5.5)。その結果、3 グループに分類された。それぞれを図解すると、1)ナミアゲハとモンキチョウの分岐においてのみ共通祖先との間に染色体の逆転が生じた(Fig. 5.6)、2)カイコとアゲハチ

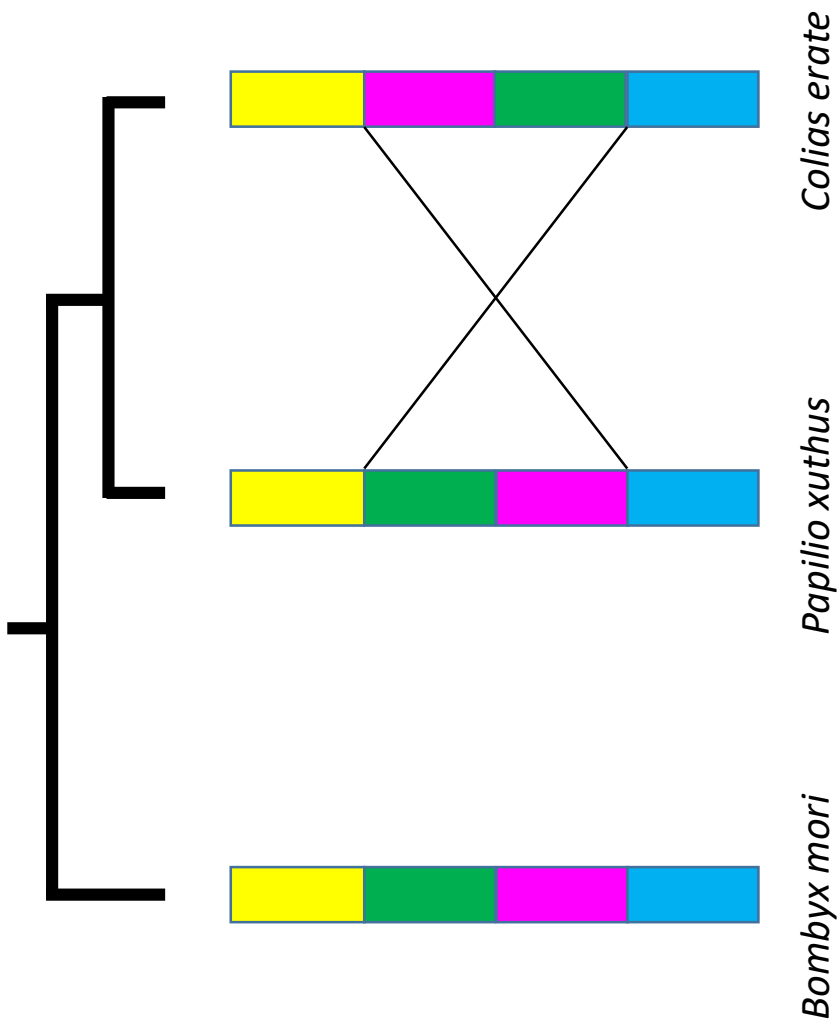
ヨウ上科の分岐においてのみ共通祖先との間に染色体の逆転が生じた(Fig. 5.7)ならびに 3) カイコとアゲハチョウ上科の分岐ならびにナミアゲハとモンキチョウの分岐の双方において共通祖先との間に染色体の逆転が生じた(Fig. 5.8)となる。gene models が座乗するナミアゲハ scaffolds の向きを逆転して考えると、より多くのリアレンジメントが推測されるケースもあるが、本研究では、染色体進化を最節約的に考える一般的にコンセンサスが得られている方法論を採用した。こうして、9 染色体におけるカイコ-ナミアゲハ-モンキチョウの染色体進化を 3)に分類された *Ce* Chr9 を例としてエゾスジグロシロチョウ染色体も考慮した考察を行った(Figs. 5.9, 5.10)。 *Ce* Chr9 に対応するカイコとナミアゲハ染色体の共通祖先で、proximal end 側の染色短末端近傍内部で逆位が起こり、カイコ Chr9 とナミアゲハ Chr9 へと分岐した(Fig. 5.9, 1st inv)。 *Ce* Chr9 でマッピングされたオルソログ 7 個をカイコに 1~7 として配置して考察を行うと、ナミアゲハでは、逆転部が 2-1-3 の順となる(Fig. 5.10, *Px* Chr9)。それぞれナミアゲハとシロチョウ科クレードとの分岐に際し、共通祖先で distal end 側内部に 2 箇所の逆位が生じ(Fig. 5.9, 2nd inv)、2-1-3-5-4-7-6 のオルソログ配置をもつシロチョウ科の共通祖先種型 Chr9 となる。これがモンキチョウに至るクレードでは、その祖先種で 2-1 の間と 4-7 の間ならびに 3-5 の間に生じた二重鎖切断により 2 ヶ所の逆位が生ずる(Fig. 5.9, 3rd inv)と *Ce* Chr へと変化する(Figs. 5.10, *Ce* Chr9)。他方、3 と 5 の間に二重鎖切断が生じ、2-1-3 を含む染色体断片と 5-4-7-6 の染色体断片が別染色体断片へそれぞれ転座した子孫が、エゾスジグロシロチョウ *Pn* Chr8 と *Pn* Chr4 に相当する(Fig. 5.10)。シロチョウ亜科の染色体構成は、カイコ型のモンキチョウ染色体とは大きく異なり、染色体によってはさらなるリアレンジメントが認められる(第 II 章第 3 節参照)。

35J24 (*Ce* Chr24, Fig. 5.5)の内部配列のオルソログは、ナミアゲハにおいて *Px* scaff3377 に座乗するが、*Px* scaff3377 には *Ce* Chr28 の 27E19 の内部配列のオルソログも座乗する。*Px* scaff3377 にマッピングされた遺伝子のオルソログを、カイコとナミアゲハゲノムデータならびにモンキチョウトランスクリプトームデータと比較することで、ミスアSEMBLと共通祖先での転座のいずれの蓋然性が高いのかについて検証できる可能性があり、今後の課題としたい。また、エゾスジグロシロチョウやモンシロチョウとの比較も行ってみたい。

本節ではチョウ目昆虫複数種のオルソログ配置の比較を行い、カイコからモンキチョウに至るまでの染色体進化の推定を行った。ナミアゲハ scaffold は N50 が約 6.2 Mb あり、相当長くアSEMBLされているが、それでも比較対象とした 9 染色体部位の 7 つのモンキチョウ染色体について、対応するオルソログが 2 scaffolds 以上に分かれた(Fig. 5.5)。アゲハチョウ上科の解析種数を増やすことやナミアゲハのリシーケンスが、本研究で遺伝子配置の比較が困難であった部分のさらなる検証を行うための方策である。しかしながら、バイオインフォマティクスによるアSEMBLには一定のミスが生ずる。よって、バイオインフォマティクスによるアSEMBLに加えて、FISH などによる物理的な染色体アSEMBL (Session *et al.*, 2016)を加味して今後ゲノムデータを再整備し、アSEMBLミスやノイズを極小化することが望まれる。

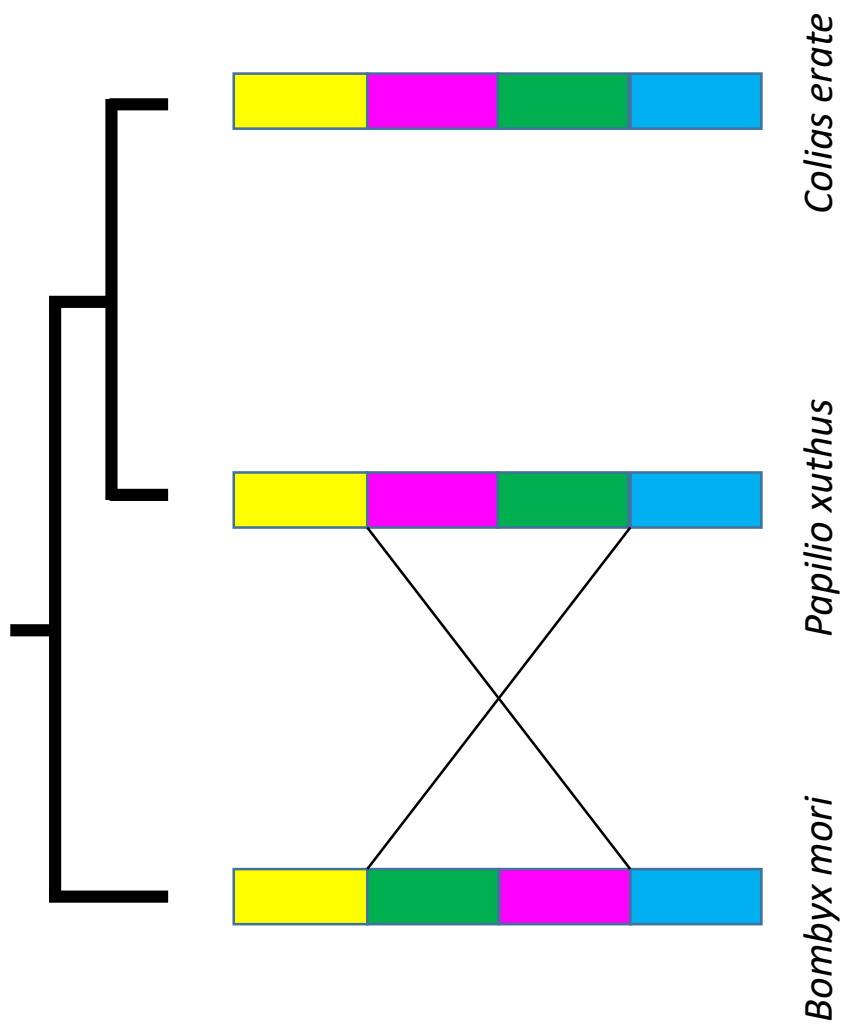


**Figure 5.5** Comparison of individual chromosomes whose gene order has changed from *Bombyx mori* in *Colias erate*, *Papilio xuthus* (Pxut) and *B. mori*. Black bars on the left and italic numbers represent *B. mori* chromosome information. Black bars on the right and numbers represent *P. xuthus* scaffold information (Px scf). Black ruler show *P. xuthus* scaffold and *B. mori* chromosome length.

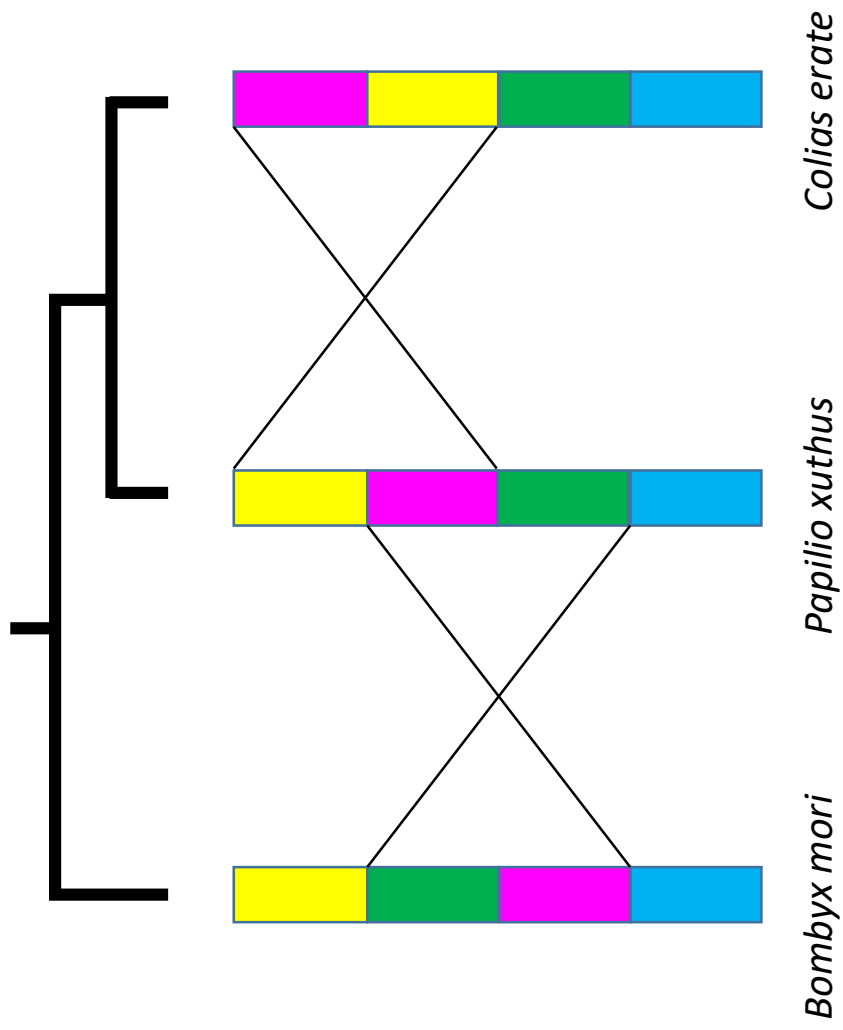


**Figure 5.6** Schematic diagram of chromosome evolution: inverted order occurred between *Papilio xuthus* and *Colias erate*.

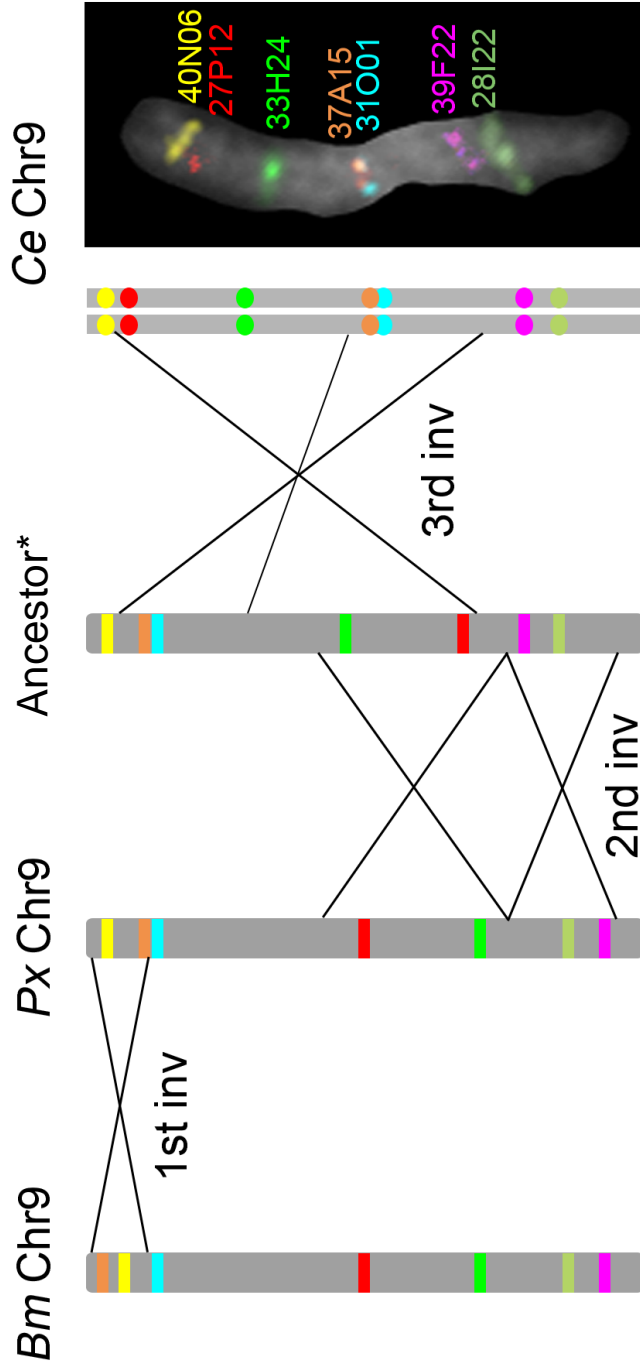




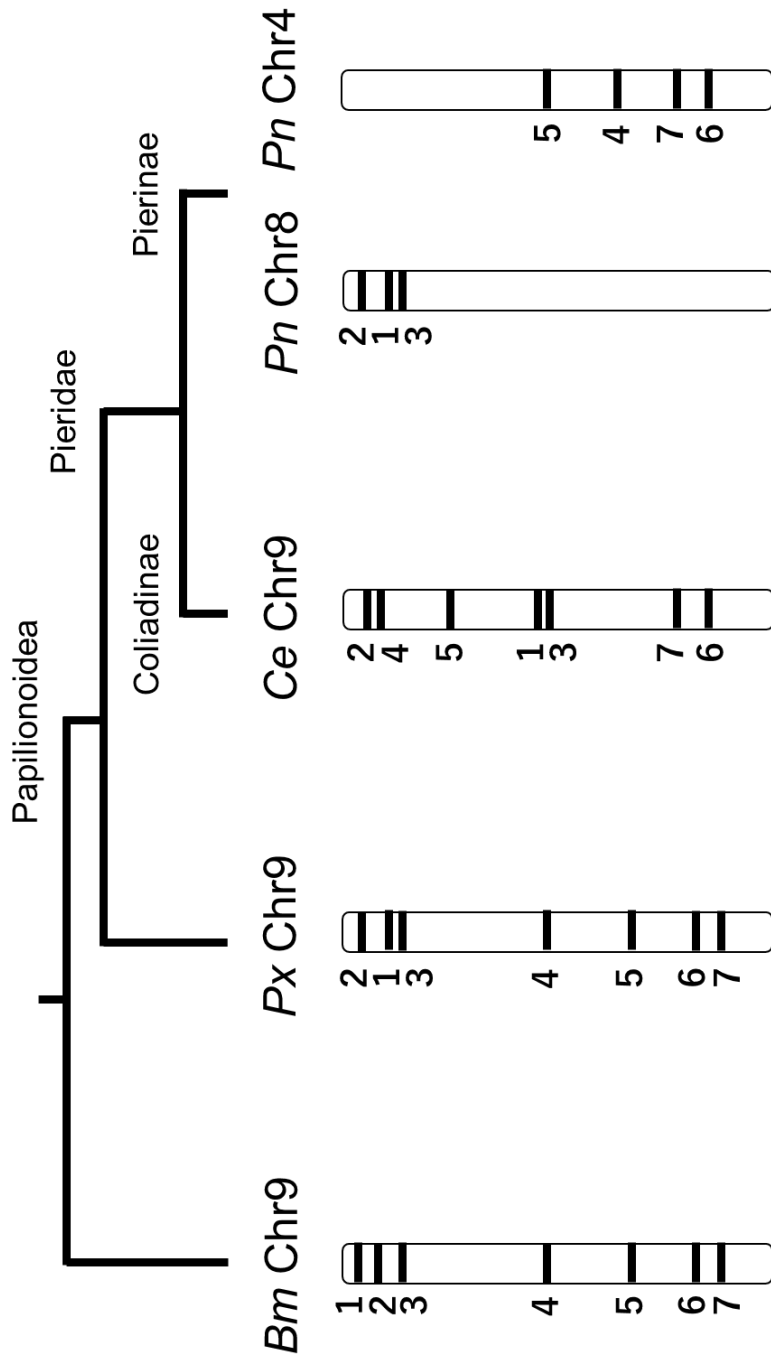
**Figure 5.7** Schematic diagram of chromosome evolution: inverted order occurred between *Bombyx mori* and *Papilio xuthus*.



**Figure 5.8** Schematic diagram of chromosome evolution: inverted order occurred in both branches between *Bombyx mori* and *Papilio xuthus* and between *Papilio xuthus* and *Colias erate*.



**Figure 5.9** Schematic diagram of chromosome evolution in *Colias erate* chromosome 9 (*Ce Chr9*). Gray bars plotted double color dots show diagram of the FISH mapping result in *Ce Chr9*. Gray rounded box indicate chromosome models. These color bars indicate orthologs of *C. erate* genes that contained in the BAC clone. inv: inverted order. \*putative common ancestor at chromosome in Pierid species.



**Figure 5.10** Schematic diagram of chromosomal evolution in chromosome 9. The order of orthologs on chromosomes *Bombyx mori* (*Bm*), *Papilio xuthus* (*Px*), *Colias erate* (*Ce*) and *Pieris napi* (*Pn*) is shown (number 1~7). A lepidopteran phylogenetic tree is drawn on the schematic diagram of the chromosome.

Table5.3 *Colias erate* coding sequence (CDS) contained in the BACs and their orthologous GeneIDs in *Papilio xuthus* and *B. mori*

<i>Colias erate</i>			<i>Papilio xuthus</i> (Pxut)			<i>Bombyx mori</i>		
BAC code	Chr	Transcriptome ID	scaffold	GeneID: PxuthusGene	Location	Chr	GeneID: KWMTBOMO	Location (bp)
15C05	Z	TRINITY_DN21355_c0_g1_i12	524	0012492	2,665,008..2,692,108	1	00190	6026373..6126632
37G02	Z	TRINITY_DN16203_c0_g1_i1	524	0012600	5,080,891..5,088,971	1	00065	1983567..1991877
26C17	Z	TRINITY_DN13328_c0_g1_i1	3684	0009501	122,148..130,649	1	00545	16116700..16127502
28D01	Z	TRINITY_DN15848_c0_g1_i2	3684	0009504	203,137..222,224	1	00019	511106..545938
27J05	Z	TRINITY_DN33948_c0_g1_i1	3684	0009559	1,887,973..2,057,690	1	00614	19129809..19138152
40N06	9	TRINITY_DN19797_c0_g1_i1	4636	0011459	433,238..467,532	9	04937	1984226..2047584
27P12	9	TRINITY_DN14447_c0_g1_i1	3284	0008270	4,788,316..4,790,014	9	05068	7038548..7041535
33H24	9	TRINITY_DN17909_c0_g1_i1	3284	0008208	3,678,674..3,686,109	9	05149	9037428..9043622
37A15	9	TRINITY_DN21221_c0_g1_i1	4636	0011489	1,070,327..1,079,323	9	04881	782876..794891
31O01	9	TRINITY_DN12035_c0_g1_i1	4636	0011521	1,671,492..1,673,398	9	04975	3917868..3920229
39F22	9	TRINITY_DN11011_c0_g1_i1	3284	0008103	1,732,647..1,735,826	9	05280	12650808..12652283
28I22	9	TRINITY_DN19445_c0_g1_i1	3284	0008141	2,387,400..2,390,357	9	05229	11560271..11564281
29J22	14	TRINITY_DN19106_c0_g1_i1	2456	0004351	329,117..336,728	14	08167	334020..339621
27C08	14	TRINITY_DN16660_c0_g1_i1	2456	0004375	1,019,061..1,049,281	14	08369	6948814..6952996
37P11	14	TRINITY_DN20054_c0_g1_i1	2456	0004487	4,082,785..4,086,695	14	08245	2580481..2588853
26P08	14	TRINITY_DN16146_c0_g1_i1	2456	0004499	4,241,747..4,244,713	14	08440	9191382..9195678
15L16	14	TRINITY_DN11613_c0_g1_i1	2456	0004566	5,814,535..5,819,663	14	08545	12618603..12626924
33E13	14	TRINITY_DN19737_c0_g1_i1	2456	0004567	5,835,980..5,837,538	14	08549	12674603..12676140
11D18	17	TRINITY_DN22153_c0_g1_i2	3049	0005833	5,875,663..5,889,975	17	10023	533189..588099
26A07	17	TRINITY_DN20090_c0_g1_i1	3049	0005778	5,028,602..5,035,779	17	10112	2357015..2380005
23G06	17	TRINITY_DN12696_c0_g1_i1	3049	0005590	1,940,989..1,944,638	17	10370	8883405..8885988
35N03	17	TRINITY_DN15295_c0_g1_i1	2452	0004258	8,678,839..8,679,823	17	10591	14887827..14888632
02G01	17	TRINITY_DN15384_c0_g1_i1	2452	0004219	7,949,958..7,950,896	17	10509	13024737..13027506
07D14	18	TRINITY_DN22023_c0_g1_i1	3684	0009707	4,653,382..4,662,581	18	10761	2566411..2579429
23D23	18	TRINITY_DN16075_c0_g1_i1	3684	0009639	3,244,482..3,251,185	18	10848	5355190..5359927
23F16	18	TRINITY_DN19846_c0_g1_i1	2445	0003633	2,339,418..2,364,585	18	11038	10670414..10689604
40L04	18	TRINITY_DN20497_c0_g1_i1	4161	0010389	1,281..2,737	18	11161	15208615..15211682
25M04	18	TRINITY_DN21876_c0_g1_i1	2445	0003574	360,970..364,203	18	11107	13049594..13052475
30I15	18	TRINITY_DN20930_c0_g1_i1	2445	0003554	81,964..86,161	18	11083	12385248..12390846
12F07	20	TRINITY_DN22217_c0_g1_i2	5265	0012797	1,755,059..1,768,357	20	11791	110263..116395
35K04	20	TRINITY_DN21431_c0_g1_i2	5265	0012775	1,184,241..1,207,335	20	11857	2165156..2189882
37E17	20	TRINITY_DN21712_c0_g1_i2	3263	0007958	5,391,071..5,395,876	20	12239	10275951..10287669
35L18	20	TRINITY_DN18984_c0_g1_i1	5265	0012912	3,506,574..3,588,940	20	12166	8636299..8640956
30E11	20	TRINITY_DN20190_c0_g1_i1	5265	0012856	2,541,912..2,545,045	20	12057	6512174..6516599
32K21	20	TRINITY_DN22362_c0_g1_i1	5265	0012746	374,992..382,310	20	11956	4033320..4055916
30K07	24	TRINITY_DN18963_c0_g1_i1	2283	0002831	1,564,381..1,565,283	24	14732	13846478..13847851
11K18	24	TRINITY_DN21374_c2_g1_i1	3377	0008654	1,010,129..1,025,565	24	14530	9646466..9669005
35J24	24	TRINITY_DN22174_c0_g1_i1	2283	0002761	557,068..588,102	24	14825	15853147..15873798
39O21	24	TRINITY_DN14011_c0_g1_i1	2283	0002776	734,989..736,212	24	14774	14898028..14899436
30G20	24	TRINITY_DN21385_c2_g1_i1	2283	0002730	230,003..242,998	24	14868	16737260..16738695
30B05	28	TRINITY_DN22747_c0_g1_i1	5167	0012132	195,821..204,703	28	16166	371406..377097
32C11	28	TRINITY_DN19697_c0_g1_i1	5167	0012158	604,383..611,813	28	16195	1118477..1120706
21D15	28	TRINITY_DN17436_c0_g1_i1	5167	0012173	987,966..991,390	28	16211	1884395..1886383
27E19	28	TRINITY_DN3119_c0_g1_i1	3377	0008696	1,826,550..1,830,211	28	16432	9691338..9695544
18E08	28	TRINITY_DN20501_c0_g1_i1	3077	0005950	1,680,675..1,689,617	28	16261	3220258..3231743
33P10	28	TRINITY_DN20213_c0_g1_i1	3077	0006023	3,528,859..3,620,107	28	16378	7537217..7561545
29E23	28	TRINITY_DN15492_c0_g1_i2	3077	0006039	4,063,454..4,066,870	28	16357	6717554..6722641
30C23	28	TRINITY_DN18660_c0_g1_i1	3077	0006064	4,488,928..4,491,485	28	16454	10385335..10390457
33B22	30	TRINITY_DN20575_c0_g1_i3	1453	0001153	6,582,491..6,584,464	23	14128	18470642..18475309
40N21	30	TRINITY_DN21980_c0_g1_i1	1453	0001098	5,648,993..5,658,441	23	14055	16988713..17002782
36J12	30	TRINITY_DN21234_c0_g1_i1	1453	0001093	5,489,578..5,494,187	23	14041	16522999..16528552
28L16	30	TRINITY_DN20032_c0_g1_i1	1453	0001111	5,909,411..5,917,105	23	14019	16058041..16068078
19C15	30	TRINITY_DN16975_c0_g1_i1	1453	0001021	4,222,740..4,225,603	23	14169	19689420..19694897
31O22	30	TRINITY_DN20592_c0_g1_i1	1453	0001066	4,960,401..5,125,586	23	14238	21175584..21260272

#### 第4節 モンキチョウ第29染色体のインバージョン

同一種内における染色体逆位は、形態や生殖行動に大きな変化をもたらす事例がこれまで複数報告されている。例えばチョウ目昆虫では、シロオビアゲハ(*Papilio polytes*)の雌ベイツ型の擬態は、第25染色体にある *H* 遺伝子座の逆位によって制御されている(Nishikawa *et al.*, 2015)。ヨーロッパアワノメイガ(*Ostrinia nubilalis*)のフェロモン型による生殖隔離にも、染色体逆位が影響している(Kozak *et al.*, 2017)。鳥類のエリマキシギでは、染色体逆位のパターンによって、形態と生殖行動の戦略が大きく代わる例が報告されている(Küpper *et al.*, 2016; Lamichhane *et al.*, 2016)。逆位領域では相同組み換えが抑制されるため、これらの種内変異は有害でなければ維持され続ける。染色体逆位による変化は、種内での多型に始まり、最終的に種分化につながると考えられている(Wellemremther and Bernathez, 2018)。

本研究では、第1節のモンキチョウのBAC-FISHマッピングの過程で、第29染色体の数Mbに渡る領域に染色体逆位を検出したので報告する。

#### 材料および方法

##### 1. 供試昆虫

本節の研究に用いたモンキチョウ(*Colias erate*)は、2015年春に川原果樹園(岩手県盛岡市)、2016年の初夏と秋ならびに2017年春に岩手大学にて雌成虫を採集し、強制採卵法で獲得した子供集団を飼育して使用した。2015年は、白い翅の雌個体(Alba)を、2016年以降は黄色い翅の雌個体(orange)を採卵に使用した。食草には、シロツメクサ(*Trifolium repens*)およびアカツメクサ(*T. pratense*)を用いた。

##### 2. 染色体標本作製

第II章第2節に記載した方法に従い、染色体標本作製した。

##### 3. ゲノムDNA抽出、精製ならびにコンペティター作製

第II章第2節に記載した方法に従い、ゲノムDNA抽出、精製ならびにコンペティター作製を行った。

##### 4. モンキチョウBACライブラリー

第III章第1節で作製したモンキチョウBACライブラリーを使用した。

##### 5. モンキチョウBACクローン

第29染色体に座乗する5BACクローン(37E06, 14L02, 14L15, 16M14ならびに34B21)を

使用した。

## 6. BAC-DNA の抽出・精製

第 V 章第 1 節に記載した方法に従い、目的の BAC クローンからプラスミド DNA を抽出・精製した。

## 7. Nick Translation による DNA のダイレクト標識

第 II 章第 2 節に記載の自作 Nick translation enzyme mix を使用する方法に従って、BAC-DNA のラベリングを行い、FISH プローブを作製した。

## 8. FISH (fluorescence in situ hybridization)

第 II 章第 2 節に記述した方法に従った。プローブには 37E06, 14L02, 14L15, 16M14 ならびに 34B21 の BAC-DNA を、Table 5.1 と同様にラベルして用いた。本節では、2015 年 5 月 25 日、2016 年 7 月 8 日、2016 年 11 月 5 日、2017 年 6 月 13 日に作製した染色体標本を 1 枚ずつ使用した。各染色体標本の情報は Table 5.4 に記載する。

## 結果

川原果樹園で採集した Alba 個体の子供集団の雄から、2015 年 5 月 25 日に作製した染色体標本では、*Ce* Chr29 pachytene bivalent マップされる 14L15 シグナル(yellow)位置が chromatid 毎に異なる逆位が検出された(Fig. 5.11B)。本研究で得られた第 29 染色体に座乗する残り 4 BAC の FISH シグナルは、Fig 5.1 と同様で、逆位領域に含まれていたのは 14L15 のみであった(Fig. 5.11)。FISH マッピングに使用した *Ce* Chr29 (2016 年 7 月に標本作製)では、14L15 のシグナルもその他の 4 プローブシグナルも、それぞれの chromatid の同位置にマップされた(Fig. 5.1)。岩手大学で採集した orange 個体の F<sub>1</sub> 集団から、2016 年 7 月 8 日(雄)、2016 年 11 月 5 日(雌)、2017 年 6 月 13 日(雌)に作製した染色体標本についても同様の BAC-FISH を行ったが、これらの染色体から逆位領域は見つけられなかった(Fig. 5.12)。

## 考察

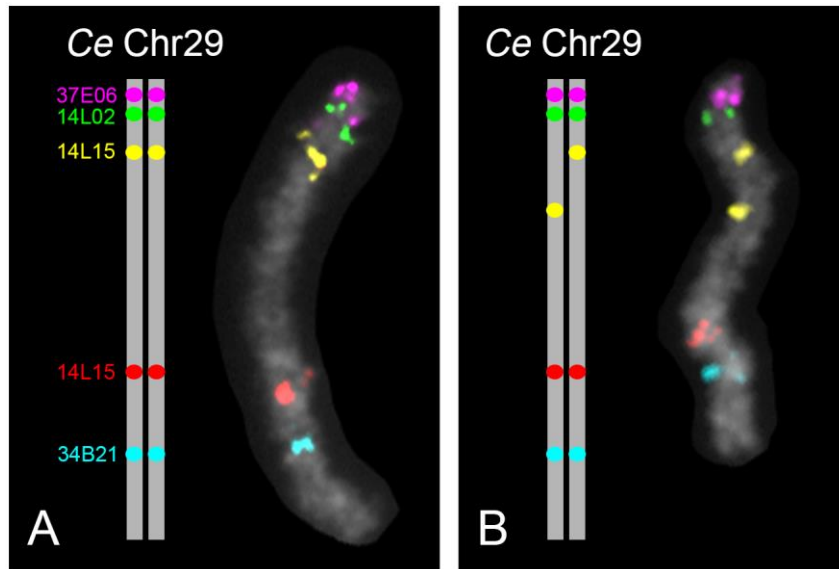
採集時期、雌雄、成虫体色の異なる個体から作製した *Ce* Chr29 に対して BAC-FISH を行ったところ 2015 年 5 月に川原果樹園で採集した雄のみにおいて、二価染色体対の一方が逆位した例を発見した(Fig. 5.11A)。染色体対においてヘテロな形で検出される逆位は、チョウ目の姉妹系統であるトビケラ目昆虫のヒゲナガカワトビケラでも報告されている(藤本,

2019)。現状は、分散動原体型染色体をもつ両者で発見されたとの関連や盛岡という同一地域での発見の共通性と逆位の維持の関連性については全く不明である。

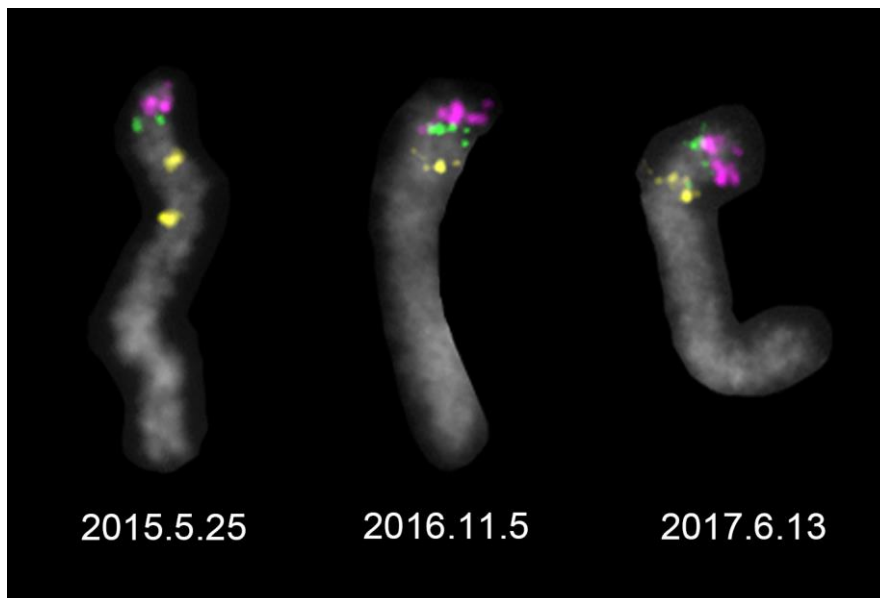
モンキチョウの染色体逆位が関連する形質候補に、雌成虫の翅色の多型があげられる。モンキチョウを含むモンキチョウ亜科の昆虫には、雌の翅色に多型が存在し、白いものを Alba、黄色いものを orange と呼ぶ(Watt *et al.*, 1973)。原因遺伝子は明らかにされていないが、1 遺伝子座に座乗し、Alba が顕性形質であり、常染色体上でメンデル遺伝に従うことが確認されている(Gerould, 1923; Komai and Ae, 1953)。Alba 多型の表現形質が見られるのは雌のみであり、モンキチョウ亜科の特に *Colias* 属の所属するクレードに Alba 多型をもつ種が多数確認されている(Limeri and Morehouse, 2016)。Woronik and Wheat (2017)は、モンキチョウと同族別種の *Colias croceus* を用いて、Alba 型の雌成虫と orange 型の雌成虫を 21 ずつ、ならびにそれらの雌親個体(Alba)をまとめて次世代シークエンスを行った。この研究では、SNPs 量を Alba と orange で比較し、特に第 15 染色体の~3.6 Mb に SNPs が多いことから、周辺領域の逆位を示唆している。本研究において、第 15 染色体の対応する領域の BAC が獲得できているため、Alba と orange それぞれの雌個体に BAC-FISH を行うことで、視覚的にこの領域をマッピングできる(Table 5.1)。しかし、染色体標本の作成時期が終齢幼虫であるため、Alba と orange を判別した標本への FISH はできない。そこで、2017 年 6 月に orange の雌親から獲得した染色体標本作成用の F1 集団の一部を、無作為に抽出して羽化まで育成し、翅色ごとに個体数をカウントした結果、雄 : Alba (雌) : orange (雌)が 25:11:9 の比率で発生した。したがって、2017 年に作製した染色体標本は Alba 型と orange 型が半々程度となると考えられた。これまでに、2017 年 6 月に作製した 2 標本に対して、第 15 染色体の~3.6 Mb に座乗する 14M02、その外側に座乗する 09P05 と 14F14 の 3 BAC クローンを FISH マッピングしたが、逆位は確認できていない(data not shown)。シークエンス解析により逆位が示唆されても、物理マッピングで検出できない変異もある(Kost *et al.*, 2016)。しかしながら、検討する標本数を増やしての検討は必須であり、本研究で確認された第 29 染色体の逆位の検証と合わせて早急に取り組むつもりである。

本節では、モンキチョウで新たに発見された同種内の逆位について報告したが、シーズンごとに 1 枚ずつの染色体標本にしか FISH できていない点が問題である。また、本研究で検出された逆位はヘテロであることから、逆位をホモで持っている個体もある可能性がある。本節のテーマはまだまだ萌芽段階であるが、実際の形態や生殖行動との関連を見いだすことができれば、非常に興味深いトピックとなる可能性も秘めている。





**Figure 5.11** Chromosomal inversion in *Colias erate* chromosome 29 (*Ce* Chr29). Gray bars show diagram of pachytene chromosome bivalents. Double color dots show BAC-FISH signals. (A) typical bivalent chromosome. This picture was also used in Fig. 5.2. (B) inversion detected in one chromatid of a *Ce* Chr29 bivalent.



**Figure 5.12** A *Ce* Chr29 bivalent (Fig. 5.11B) and 2 other *Ce* Chr29 from independent preparations. Date below the bivalents show when chromosome specimens were prepared.

Table 5.4 Information of *Colias erate* individuals used for chromosome preparation to detect the inversion in Chr29.

date*	2015.5.25	2016.7.8	2016.11.5	2017.6.13
sex	male	male	female	female
sampling site	Kawahara orchard	IWATE Univ.	IWATE Univ.	IWATE Univ.
Wing color of mother	Alba	orange	orange	orange
chromosome	inversion**	normal	normal	normal

\*date of chromosome specimens prepared

\*\*inversion in one chromatid of a bivalent (see Fig. 5.11)

## 第VI章 総合考察

ゲノムデータベース情報と FISH マッピング結果から、シロチョウ 3 種の *labial* は、すべてほかの *Hox* 遺伝子群とは別染色体に転座していることが確認された(Figs. 2.7, 2.8)。チョウ目昆虫には、染色体数がカイコの 2 倍を超える種が、いくつかのクレードで報告されている(Robinson, 1971)。特に、シジミチョウ科には  $n=100$  を超える種が複数存在しており(Robinson, 1971)、*Polyommatus atlanticus* は、動物界最多の  $n=217-223$  (de Lesse, 1970)および  $n=224-226$  の個体が報告されている(Lukhtanov, 2015)。これらのゲノムサイズがカイコと同程度と仮定すると、*labial* が他の *Hox* 遺伝子群と異なる染色体に座乗している可能性が高い。今後の研究で、シロチョウ科以外の種で *labial* の転移リアレンジメントを確認することができれば、チョウ目昆虫の *Hox* 遺伝子群の配置は、空間共線性を維持していない可能性が高まる。最も実験が行いやすいカイコにおいて、二重鎖切断により実験的に *labial* 座上部位を他の *Hox* 遺伝子群が座乗する第 6 染色体から分断させた個体の胚発生を観察することで、空間共線性の喪失の有無を証明できる可能性もある。キイロショウジョウバエでは、*Hox* 遺伝子群は同一染色体上で ANT-C と BX-C の 2 つのクラスターに分かれている(Duncan *et al.*, 1987; Kaufman *et al.*, 1990)。これら 2 つの *Hox* 遺伝子クラスターは、細胞内で局所的に集まって予定された体節以外での発現を抑制する (Lanzuolo *et al.*, 2007, Bantignies *et al.*, 2011)。オオモンシロチョウのように *Hox* 遺伝子が別染色体に座乗する場合でも、同様の発現抑制機構が存在するのか非常に興味深い。

第 II 章第 3 節の研究では、オオモンシロチョウ BAC-FISH マッピングの再評価と対応付けを行った(Figs. 2.9, 2.10, Tables 2.36, 2.37)。その結果、これらシロチョウに共通する染色体構造は、シロチョウ科が他のアゲハチョウ上科と分化した後に、大規模な染色体リアレンジメントのイベントを経て成立したものと考えられる。オオモンシロチョウの染色体数は  $n=15$  であり、 $n=25$  程度の種で構成されるシロチョウ族(Pierini)においては異端であることから、同族別種間の染色体比較を議論する上でオオモンシロチョウのデータは重要である。本研究では、エゾスジグロシロチョウのゲノムデータを、マッピング結果を再評価したオオモンシロチョウにマップすることで、2 種間の網羅的な比較を試みた。第 II 章第 4 節の研究における 73 BAC クローンの FISH マッピングと比較解析により、*Pieris* 属 3 種がカイコと大きく異なる染色体構造を共通して持っていることが確認された(Figs. 2.10, 2.11, Tables 2.41, 2.42)。これらの結果を最新の分子系統解析(Okamura *et al.*, 2019)を参考にして考察すると、オオモンシロチョウ  $n=15$  の染色体は、*Pieris* 属の共通祖先のもつ  $n=25$  の単純な染色体の融合により生じたと推測される。ヤママユガ科のエリサン(*Samia cynthia*)の染色体  $n=14$  は、カイコの染色体数  $n=28$  から大きく染色体数が減少しているが、全て単純な染色体の切断と融合により説明できる(Yoshido *et al.*, 2011a; b)。オオモンシロチョウとエゾスジグロシロチョウの染色体の対応関係は、カイコとエリサンの関係に近いといえる。したがって、*Pieris* 属

3種の属するクレードは、大きな染色体の再構成イベントを経た後に、共通祖先において染色体融合が10組生じた結果、オオモンシロチョウの  $n=15$  が形成されたと推測できる。

染色体の大規模な再構成が、シロチョウに与えた変化の関連性を調査することは興味深い。シロチョウ科における蛹形態は、シロチョウ亜科(Pierini)の種では、腹側の平らな部分が大きく、頭部に棘のような突起があり、胸部の背側に顕著な隆起が認められるのに対して、それ以外の種では、なめらかで腹側が細く、頭部も先細い鋭い形である (Braby *et al.*, 2006)。食草について、シロチョウ亜科の種はアブラナ科を利用するが、それ以外の種は、マメ科植物を利用する (Wheat *et al.*, 2007)。すなわち、アブラナ科の生体防御機構であるミロシナーゼ-グルコシノレートシステムをシロチョウ亜科の種は克服している。こうしたシロチョウ亜科の種の特異性に関わる遺伝子について解明が進めば、大規模な染色体リアレンジメントとの関連性の理解につながる。シロチョウ科の種は、細胞のアポトーシスを誘導する Pierisin というタンパク質を産生する (Matsumoto *et al.*, 2008)。Pierisin タンパク質は、染色体の1カ所に集中して座乗する *pierisin* 遺伝子のパラログによって転写翻訳され、寄生蜂に対する生体防御の働きを持つことが示唆されている (Shen *et al.*, 2016)。*pierisin* はシロチョウ族で突然現れた遺伝子であり、大規模な染色体リアレンジメントに合わせた配列情報の変化が、その誘発に関わった可能性も捨てきれない。

第III章では、モンキチョウ亜科で初となる BAC ライブラリーの構築を行った。第III章と第IV章を通じて、次世代シーケンシングにより獲得した配列データを BAC のスクリーニングに利用し、最終的に 187 BACs のスクリーニングに成功した (Table 3.20, 4.3)。特に第IV章では、カイコ単一遺伝子オルソログの選抜に自作のアプリケーションツールを開発して取り組んだ (Ohno *et al.*, 2020b)。本ツールは、トランスクリプトームデータをクエリーとして、カイコ単一遺伝子オルソログを選抜する。ゆえに、カイコを基準にした染色体研究、特にチョウ目昆虫ならびにトビケラ目昆虫の染色体比較研究を進める上で活躍が期待される。近年はゲノムシーケンシング技術の進歩がめざましく、比較的安価にゲノムの解読もできるようになってきている。今後は、BAC-FISH マッピングについても、次世代シーケンサーを利用した効率化が重要となる。本研究のトランスクリプトームデータの BAC スクリーニングへの活用は、その答えの1つである。FISH マッピングは、次世代シーケンシングにより得られた scaffold をさらに連結できる (Session *et al.*, 2016)。長い配列データの scaffolding 手法である Chicago and HiRise methods (Putnam *et al.*, 2016) よりも確実であり、分子関連地図を利用する方法 (The Heliconius genome consortium, 2012; Ahola *et al.*, 2014) のように系統を安定飼育する必要も無い。したがって、バックグラウンド統一のための兄妹交配による子孫の取得やそもそも飼育が困難な生物への活用が期待される。

第V章のモンキチョウ BAC-FISH マッピングの結果より、モンキチョウは *Pieris* 属3種の染色体とオルソログ配置が大きく異なっていた一方で、カイコとの間で染色体の網羅的な対応関係が確認された (Fig. 5.1, Tables 5.1, 5.2)。マッピングしたモンキチョウ 166 BAC プローブは、カイコとの間で染色体間の転座が検出されなかったことから、モンキチョウ染色

体は、カイコ型染色体タイプのなかでもカイコとの間に高い染色体コリニアリティーを持つと言える。モンキチョウ *labial* は、*Hox* 遺伝子の *abdA* と同じ第 6 染色体に座乗した (Fig. 5.1) ので、*Pieris* 属の種における *labial* の発現ならびに機能と比較することで、さらに *labial* のリアレンジメント転移の影響の有無を知ることができるかもしれない。モンキチョウ亜科では、キタキチョウ (*Eurema mandarina*) で *kettin* cDNA fragments と雌 gDNA をプローブにした FISH により、Z ならびに W 染色体の識別は行われているが (Kageyama *et al.*, 2017)、BAC-FISH を行った例、全染色体が同定された例は本研究が初となる。

シロチョウ科が含まれるアゲハチョウ上科では、アゲハチョウ科が最も祖先的なクレードとされている (Li *et al.*, 2015; Cong *et al.*, 2016)。カイコとの遺伝子配置が逆転もしくは逆転が予測されるモンキチョウ染色体は 10 本認められた (Fig. 5.1)。このうち、逆転のあった 9 染色体のうち、5 染色体はモンキチョウとナミアゲハとの間にシンテニーが示唆された (Fig. 5.5)。つまり、この 5 染色体は、カイコとナミアゲハの共通祖先種において、逆位が生じたと考えられる。一方で、カイコとナミアゲハの間でシンテニーが示唆されたのは第 14 染色体のみであった。したがって、モンキチョウが特に染色体の逆転が多いわけではなく、カイコが祖先的なチョウ目の染色体構造を持つと仮定すると、アゲハチョウ上科に分化した時点でカイコとの染色体の逆転が複数生じ、変異が累積してきたものと考えられる。3 染色体については、カイコとナミアゲハ、ナミアゲハとモンキチョウのいずれにもオルソログ配置の逆転が認められた (Fig. 5.5)。そのうち *Ce Chr9* について、本解析結果より染色体進化を最節約的に推測することができた (Figs. 5.9, 5.10)。このように、近年のゲノム情報とマッピング結果の拡充により、染色体進化の過程がより高解像度で推測できるようになってきた。将来的に、例えばシロチョウ科で、各クレードの染色体進化の遍歴をまとめて図示することができれば、表現形質をはじめとした他の研究結果との対応付けによる議論ができるだろう。

本研究結果より、モンキチョウではカイコと染色体の対応関係があり、*Pieris* 属 3 種はこれら *Pieris* 属のみで共通した染色体の対応関係を保っていることが確認された (Figs. 2.9, 2.10, 2.11, 5.1, Tables 2.41, 2.42, 5.1, 5.2)。シロチョウ科の分子系統樹は、Braby *et al.* (2006) で始めて体系化され、Wahlberg *et al.* (2014) で改訂された (略図を Fig. 5.4 に記載)。本研究結果と分子系統樹を照らし合わせると、少なくともモンキチョウ亜科とシロチョウ亜科が分化するまでは、シロチョウ科でもカイコとの染色体の対応関係は維持されていたと考えられる。したがって、*Pieris* 属の染色体の大規模な構成変化は、シロチョウ亜科 (*Pierinae*) の分岐、シロチョウ族 (*Pierini*) の分岐、シロチョウ亜族 (*Pierina*) + ミヤマシロチョウ亜族 (*Aporiina*) とトガリシロチョウ亜族 (*Appiadina*) の分岐、シロチョウ亜族とミヤマシロチョウ亜族の分岐のいずれかに対応して生じた可能性がある (Fig. 5.4, arrowheads)。なお、シロチョウ科のコバネシロチョウ亜科に属する *Leptidea* 属は、同種内ですら多様な染色体数を持ち、性染色体構成も種によって大きく異なる (Lukhtanov *et al.*, 2011, Šichová *et al.*, 2015; 2016)。*Pieris* 属の種と *Leptidea* 属種の染色体構成を明らかにできればさらなる推定が可能となるだろう。シロチョウ亜族 3 種では、カイコタイプとは異なる染色体構成が維持されている (*Pieris* タイプ

染色体)ので、今後、最も近縁なミヤマシロチョウのゲノム解析や FISH など物理マッピング解析が望まれる。日本国内で入手の可能性のある種としては、ミヤマシロチョウ(*Aporia hippia*)、エゾシロチョウ(*A. crataegi*)、ウスムラサキシロチョウ(*Cepora nandina*)、タイワンスジグロチョウ(*C. nerissa*)もしくはマダラシロチョウ(*Prioneris thestylis*)が挙げられる。エゾシロチョウでの染色体標本作製は非常に困難(私信)であることから、FISH マッピングには残り4種を対象とするのが妥当かもしれない。

さらなる展開としては、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だろう。全てのクレードの網羅的な染色体マッピングを行うには、多大な労力が必要となる。そこで、モンキチョウ亜科では隣接しているが、*Pieris* 属では隣接していないオルソログの配置について検証することで、染色体構成の推定の可能性を探った。本研究結果より、隣接して座乗するモンキチョウ BAC の 25N11 と 18B19 の内部配列に含まれる遺伝子のオルソログは、ワタリオオキチョウでは同一の scaffold に座乗する一方で、*Pieris* 属2種では別の染色体ならびに scaffold に座乗していた(Table 5.2)。推定法の1つとして、ワタリオオキチョウ(Cong *et al.*, 2016)に匹敵する程度のクオリティの次世代シーケンズならびにアセンブリーを各クレードの代表種で行い、上記のようなワタリオオキチョウでは隣接するが、*Pieris* 属では別染色体に座乗する領域を比較検討し、カイコタイプもしくは *Pieris* タイプのいずれのタイプの染色体構成を持つか判定する方法が考えられる。さらに簡易的な方法としては、ワタリオオキチョウでは数 kb 程度の距離に座乗するがエゾスジグロシロチョウでは別染色体に座乗する2遺伝子を検索し、遺伝子間領域をまたぐ DOP を設計して、PCR により染色体構成を推測する方法も考えられる。一例として、ワタリオオキチョウの遺伝子である pse363.7 と pse363.8 は約 6.4 kb の距離に隣接して座乗していることを確認しており、これらはエゾスジグロシロチョウでは別々の染色体(*PnChr4* と *PnChr13*)に分かれて座乗することがわかっている。このような場所をターゲットに実験を進めることも可能かもしれない。

逆位はヘテロな2価染色体対間での乗り換えを抑制するので、変異が蓄積し、種内での多型を誘発することで最終的に種分化につながる可能性があると考えられる(Wellenreuther and Bernatchez, 2018)。体色の違うナナフシ目昆虫の一種(*Timema cristinae*)のモルフならびに形態や生息域の違うアフリカのセイヨウミツバチの亜種間でも、染色体の逆位が疑われる領域が見つかっている(Lindtke *et al.*, 2017; Wallberg *et al.*, 2017)。植物のセイタカミゾホオズキ(*Mimulus guttatus*)はアメリカの東海岸に広く分布しているが、一カ所の大きな染色体の逆位によって一年性か多年性かが変化し、それぞれの土地に適応的な特徴となっている(Lowry and Willis, 2010; Oneal *et al.*, 2014; Twyford and Friedman, 2015)。また動物では、同種内の変異ではあるが、エリマキシギのモルフは1カ所の染色体逆位に制御され、染色体の構造の違いで形態や行動が変わる(Küpper *et al.*, 2016; Lamichhaney *et al.*, 2016)。モンキチョウの染色体マッピングを進める中で、2015年5月に川原果樹園で採集した雌のF1個体から、第29染色体において、二価染色体対の一方が数 Mb に渡り逆位した例を発見した (Fig. 5.11)。

一方で、岩手大学で2016年と2017年に採集した雌のF1個体では逆位は確認できていない(Fig. 5.11, 5.12)。果樹園という環境から、この逆位が殺虫剤抵抗性に関わる可能性などもある。一方で、モンキチョウには、雌成虫にのみAlbaとorangeの成虫体色多型が存在する(Watt *et al.*, 1973)。モンキチョウと同属別種の*Colias croceus*について、第15染色体の~3.6 Mbが多型間のSNPが特に多いことより、Albaとorange多型間でこの領域の逆位が示唆されている(Woronik and Wheat, 2017)。シロオビアゲハのベイツ型擬態(Nishikawa *et al.*, 2015)では、*doublesex (dsx)*を含む~130 kbの常染色体逆位が擬態を制御していることが示されていることから、逆位が翅色に影響するシナリオは蓋然性が高いように思える。しかし本研究では、未だ第15染色体では逆位が確認できていない。サンプル数が絶対的に足りないためまだ明確なことはいえないが、この領域にはFISHで確認できるような逆位はないかもしれない。さらに、Woronik and Wheat (2017)の研究では第29染色体(カイコ第11染色体に対応)にはSNPが1つもなかった。これらの逆位ならびに逆位が示唆される領域について、本研究はまだ萌芽段階であるため、今後のサンプル数を増やした解析結果に期待が持たれる。

本研究では、シロチョウ科昆虫のBAC-FISHマッピングと染色体比較研究によって、シロチョウ科の種における染色体進化の一端を明らかにすることができた。モンキチョウならびに*Pieris*属の染色体構成が明確に異なると明らかになったことにより、詳細な解明を進めるうえでのシロチョウ亜科のターゲットやその手法の理論基盤が整った。特に、本研究で開発したカイコの単一オルソログを選抜するツールであるBmTOPは、チョウ目昆虫の物理マッピングによる染色体進化研究の大きな戦力なることが期待される。

## 第Ⅶ章 摘要

真核生物の二本鎖 DNA は、高次構造を形成して染色体とよばれる構成単位をとる。染色体の構造は、動原体の局在する集中動原体型と散在する分散動原体型の 2 種類に大別できる。チョウ目昆虫は、分散動原体型染色体をもつ生物の中で最も種数が多いグループで、南極大陸を除いた全世界に分布している。分散動原体型染色体の特徴として、体細胞分裂中期に一次狭窄がなく丸く凝集した形態をもつことから、長い間核型分析が困難であった。

21 世紀に入ってから、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、チョウ目昆虫の染色体研究は飛躍的な成果をあげてきた。モデルチョウ目昆虫のカイコとのオルソログ配置の比較は、1) BAC-FISH、2) fosmid-FISH、3) 分子連関解析もしくは 4) ゲノムの染色体レベルの次世代シーケンス解析の各手法により行われている。それらの結果から、染色体の対応関係と遺伝子配置の保存性は、チョウ目昆虫全体に及ぶことが強く示唆された。つまり、チョウ目昆虫の多くは、種分化に大きな染色体変異を伴わないと考えられる。一方、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最近確認された。本研究は、こうした例外で生じた染色体進化について調査するため、シロチョウ科複数種の染色体マッピングと比較解析を行った。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。

本研究の第Ⅱ章では、*Pieris* 属の種に生じた遺伝子配置の大規模な変化による影響が、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。カイコ *labial* 遺伝子は、他の *Hox* 遺伝子群と同一染色体に座乗するものの、他の *Hox* 遺伝子群とは約 10 Mb の距離があることから、*Pieris* 属では *labial* が転座している可能性がある。しかし、その発現はシロチョウ科の種でもモデルチョウ目昆虫のカイコですらも解析されていなかった。そこで、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、チョウ目昆虫で初めて *labial* の発現時期と発現位置を明らかにした。カイコでの *labial* mRNA の発現は、少なくとも胚発生 Stage16~20 において他の昆虫と同様、間挿節特異的な発現が検出された。これにより、チョウ目昆虫の *labial* が胚発生時の *Hox* 遺伝子としての発現を維持していると考えられた。さらに、オオモンシロチョウ(*Pieris brassicae*) *Hox* 遺伝子の *labial*, *proboscipedia*, *abdominal-A* を内部配列に含む BAC を選抜、BAC-FISH マッピングすることで、*labial* がオオモンシロチョウでは、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* が大きな染色体の再構成に合わせて座乗する染色体を転移したが、機能は維持している可能性が示唆された。また、先行研究のオオモンシロチョウ染色体の BAC-FISH マッピング結果に一部不正確な部分が見受けられたため、本研究において結果を再精査し、カイコとの染色体比較を行った。その結果、カイコ遺伝子オルソログを含む 81



BAC-DNA プローブをオオモンシロチョウ染色体にマッピングできた。さらに、オオモンシロチョウにマップされた BAC が持つ遺伝子とエゾスジグロシロチョウ(*Pieris napi*)とモンシロチョウ(*P. rapae*)オルソログの遺伝子座乗に関してそれぞれのゲノム情報をもとに比較を行った。その結果、*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あると判断された。

シロチョウ科は、4 つの亜科に分類され、*Pieris* 属はシロチョウ亜科に属する。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して、BAC-FISH マッピング研究に必要な基盤構築を行った。高分子核 DNA をモンキチョウ雄蛹 3 個体より抽出し、モンキチョウの BAC ライブラリーを、切り出したゲノム断片のサイズ別に 2 種類作製した。これらゲノム DNA 断片を用いて、平均インサート長が 75.4 kb と 90.3 kb の BAC ライブラリーを構築した。それぞれのライブラリーは、8,832 ならびに 6,528 BAC クローンから成る。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 による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 検索を行うことで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。さらに、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。BmTOP により、カイコ単一遺伝子のオルソログとしてモンキチョウ 1,978 contigs を特定した。この情報に基づき STS primer を新たに 160 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 110 BAC クローンを追加獲得した。

本研究で特定されたカイコ遺伝子オルソログを内部配列に含む合計 187 BAC-DNA をプローブに、モンキチョウ染色体に FISH マッピングした。単一領域にダブルドットシグナルが得られた 166 BAC-DNA プローブのマッピング結果より、モンキチョウとカイコとの染色体コリアリティーが明らかとなった。つまり、モンキチョウのオルソログ配置は、*Pieris* 属の種とは異なることが示された。モンキチョウ染色体へのカイコオルソログマッピング結果より、カイコと染色体の逆転が 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 染色体にコリアリティーをもつアゲハチョウ上科のナミアゲハ(*Papilio xuthus*)染色体のゲノムデータを加味して、3 者の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 月に作製した染色体標本特異的に、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。

これらの研究成果より、*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。

## 第八章 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., Hornett, A.E., Ferguson, C.L., Luo, S., Cao, Z., De Jong, A.M., Duploux, A., Smolander, O-P., Vogel, H., McCoy, C.R., Qian, K., Chong, WS., Zhang, Q., Ahmad, F., Haukka, K.J., Joshi, A., Salojärvi, J., Wheat, W.C., Grosse-Wilde, E., Hughes, D., Katainen, R., Pitkänen, E., Ylinen, J., Waterhouse, M.R., Turunen, M., Vähärautio, A., Ojanen, P.S., Schulman, H.A., Taipale, M., Lawson, D., Ukkonen, E., Mäkinen, V., Goldsmith, R.M., Holm, L., Auvinen, P., Frilander, J.M. and Hanski, I. (2014) The Glanville fritillary genome retains an ancient karyotype and reveals selective chromosomal fusions in Lepidoptera. *Nature Communication* **5**, 4737. <https://www.nature.com/articles/ncomms5737>
- Avery, O.T., Macleod, C.M. and McCarty, M. (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of Pneumococcal types: Induction of transformation of a deoxyribonucleic acid fraction isolated from Pneumococcus type III. *Journal of Experimental Medicine* **79**, 137-158. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2135445/pdf/137.pdf>
- Bantignies, F., Roure, V., Comet, I., Leblanc, B., Schuettengruber, B., Bonnet, J., Tixier, V., Mas, A. and Cavalli, G. (2011) Polycomb-dependent regulatory contacts between distant Hox loci in *Drosophila*. *Cell* **144**(2), 214-226. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867410014856>
- Baxter, S.W., Davey, J.W., Johnston, J.S., Shelton, A.M., Heackel, D.G., Jiggins, C.D. and Blaxter, M.L. (2011) Linkage mapping and comparative genomics using next-generation RAD sequencing of a non-model organism. *PloS ONE* **6**(4), e19315. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0019315>
- Beldade, P., Saenko, S.V., Pul, N. and Long, A.D. (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. <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1000366>
- Blin, N. and Stafford, D.W. (1976) A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Research* **3**, 2303-2308. <https://academic.oup.com/nar/article-abstract/3/9/2303/2359437>
- Bolger, A.M., Lohse, M. and Usadel, B. (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**, 2114-2120. <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/30/15/2114/2390096>
- Braby, M.F., Vila, R. and Pierce, N.E. (2006) Molecular phylogeny and systematics of the Pieridae (Lepidoptera: Papilionoidea): higher classification and biogeography. *Zoological Journal of the*

- Linnean Society* **147**(2), 239-275.  
<https://academic.oup.com/zoolinnean/article/147/2/239/2631026>
- Bureš, P., Zedek, F. and Marková, M. (2013) Holocentric chromosomes. *In: Plant Genome Diversity Volume 2.* (Greilhuber, J., Dolezel, J. and Wendel, J.F. eds.) pp. 187-208. Springer, Vienna.  
[https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-7091-1160-4\\_12](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-7091-1160-4_12)
- Cameron, R.A., Rowen, L., Nesbitt, R., Bloom, S., Rast, J.P., Berney, K., Arenas-Mena, C., Martinez, P., Lucas, S., Richardson, P.M., Davidson, E.H., Peterson, K.J. and Hood L. (2006) Unusual gene order and organization of the sea urchin Hox cluster. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular Development Evolution* **306**(1), 45-58.  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jez.b.21070>
- Carnoy, J.B. (1895) La cytodierèse chez les arthropods. *La Cellule* **1**, 191-440.
- Cong, Q., Shen, J., Warren, A.D., Borek, D., Otwinowski, Z. and Grishin, N.V. (2016) Speciation in Cloudless Sulphurs gleaned from complete genomes. *Genome Biology and Evolution* **8**, 915-931.  
<https://academic.oup.com/gbe/article/8/3/915/2574147>
- Cosentino, S. and Iwasaki, W. (2018) SonicParanoid: fast, accurate and easy orthology inference. *Bioinformatics* **35**, 149-151. <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/35/1/149/5056041>
- de Lesse, H. and Condamin, M. (1962) Formules chromosomiques de quelques Lépidoptères Rhopalocères du Sénégal. *Bulletin de L'Institut Français d'Afrique Noire. Série A Sciences Naturelles* **24**(2), 464-473.
- de Lesse, H. (1968) Formules chromosomiques de Lépidoptères Rhopalocères d'Uganda et du Kenya. *Annales de la Societe Entomologique de France (NS)* **4**, 581-599.
- de Lesse, H. (1970) Les nombres de chromosomes dans le groupe de *Lysandra argester* et leur incidence sur sa taxonomie [Lep. Lycaenidae]. *Bulletin de la Société Entomologique de France* **75**, 64-68. [https://www.persee.fr/doc/bsef\\_0037-928x\\_1970\\_num\\_75\\_3\\_21116](https://www.persee.fr/doc/bsef_0037-928x_1970_num_75_3_21116)
- Di, Z., Yu, Y., Wu, Y., Hao, P., He, Y., Zhao, H., Li, Y., Zhao, G., Li, X., Li, W. and Cao, Z. (2015) Genome-wide analysis of homeobox genes from *Mesobuthus martensii* reveals Hox gene duplication in scorpions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **61**, 25-33.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0965174815000697>
- Doncaster, L. (1914) On the relations between chromosomes, sex-limited transmission and sex determination in *Abraxas grossulariata*. *Journal of Genetics* **4**, 1-21.  
<https://www.ias.ac.in/public/Volumes/jgen/004/01/0001-0021.pdf>
- Duncan, I. (1987) The bithorax complex. *Annual review of Genetics* **21**(1), 285-319.  
<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.ge.21.120187.001441>
- Ebersberger, I., Strauss, S. and von Haeseler, A. (2009) HaMStR: profile hidden markov modelbased search for orthologs in ESTs. *BMC Evolutionary Biology* **9**, 157.  
<https://bmcevolbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2148-9-157>

- Emms, D.M. and Kelly, S. (2015) OrthoFinder: solving fundamental biases in whole genome comparisons dramatically improves orthogroup inference accuracy. *Genome Biology* **16**, 157.  
<https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-015-0721-2>
- Espeland, M., Breinholt, J., Willmott, K. R., Warren, A.D., Vila, R., Toussaint, E.F., Maunsell, S.C., Aduse-Poku, K., Talavera, G., Eastwood, R., Jarzyna, M.A., Guralnick, R., Lohman, D.J., Pierce, N.E. and Kawahara, A.Y. (2018) A comprehensive and dated phylogenomic analysis of butterflies. *Current Biology* **28**(5), 770-778.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982218300940>
- Fujimoto, T., Okumura, A., Yoshido, A., Yasukochi, Y., Suzuki, G. and Sahara, K. (2018) Construction of a BAC library and selection of BACs containing orthologs of *Bombyx mori* genes in *Stenopsyche marmorata* (Trichoptera: Stenopsychidae). *Journal of Insect Biotechnology and Sericology* **87**(2), 61-69. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jibs/87/2/87\\_2\\_061/article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jibs/87/2/87_2_061/article)
- 藤本章晃 (2019) 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 博士論文 99pp.  
[https://iwate-u.repo.nii.ac.jp/?action=pages\\_view\\_main&active\\_action=repository\\_view\\_main\\_item\\_detail&item\\_id=14748&item\\_no=1&page\\_id=13&block\\_id=21](https://iwate-u.repo.nii.ac.jp/?action=pages_view_main&active_action=repository_view_main_item_detail&item_id=14748&item_no=1&page_id=13&block_id=21)
- 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.
- Gerould, J.H. (1923) Inheritance of white wing color, a sex-limited (sex-controlled) variation in yellow pierid butterflies. *Genetics* **8**, 495-551.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1200764/>
- Gu, J.L., Chen, S.X., Dou, T.H., Xu, M.J., Xu, J.X., Zhang, L., Hu, W., Wang, S.Y. and Zhou, Y. (2012) *Hox* genes from the parasitic flatworm *Schistosoma japonicum*. *Genomics* **99**, 59-65.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0888754311002448>
- Haas, M.S., Brown, S.J. and Beeman, R.W. (2001) Pondering the procephalon: the segmental origin of the labrum. *Development Genes Evolution* **211**, 89-95.  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s004270000129>
- Heikkilä, M., Kaila, L., Mutanen, M., Pena, C. and Wahlberg, N. (2012) Cretaceous origin and repeated tertiary diversification of the redefined butterflies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **279**(1731), 1093-1099.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3267136/>
- Hershey, A.D. and Chase, M. (1952) Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *Journal of General Physiology* **36**, 39-56.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2147348/pdf/39.pdf>
- Higuchi, M., Sakai, H. and Goto, A. (2014) A new threespine stickleback, *Gasterosteus nipponicus* sp. nov. (Teleostei: Gasterosteidae), from the Japan Sea region. *Ichthyological Research* **61**(4),

- 341-351. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10228-014-0403-1>
- Hill, J.A., Rastas, P., Hornett, E.A. Neethiraj, R., Clark, N., Morehouse, N., de la Paz Celorio-Mancera, M., Cols, J.C., Dircksen, H., Meslin, C., Keehnen, N., Prusscher, P., Sikkink, K., Vives, M., Vogel, H., Wiklund, C., Woronik, A., Boggs, C.L., Nylin, S. and Wheat, C. (2019) Unprecedented reorganization of holocentric chromosomes provides insights into the enigma of lepidopteran chromosome evolution. *Science Advances* **5**, eaau3648. <https://advances.sciencemag.org/content/5/6/eaau3648.abstract>
- Hu, Y., Linz, D.M., and Moczek, A.P. (2019) Beetle horns evolved from wing serial homologs. *Science* **366**(6468), 1004-1007. <https://science.sciencemag.org/content/366/6468/1004.abstract>
- Hughes, C.L. and Kaufman, T.C. (2002a) Exploring the myriapod body plan: expression patterns of the ten *Hox* genes in a centipede. *Development* **129**(5), 1225-1238. <https://dev.biologists.org/content/129/5/1225.short>
- Hughes, C.L. and Kaufman, T.C. (2002b) *Hox* genes and the evolution of the arthropod body plan. *Evolution and Development* **4**(6), 459-499. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1046/j.1525-142X.2002.02034.x>
- Ikuta, T., Yoshida, N., Satoh, N. and Saiga, H. (2004) *Ciona intestinalis Hox* gene cluster: Its dispersed structure and residual colinear expression in development. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **101**(42), 15118-15123. <https://www.pnas.org/content/101/42/15118.short>
- International Silkworm Genome Consortium (2008) The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **38**(12), 1036-1045. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0965174808002099>
- 市川信一 (1952) 蚕の *E* 複対立遺伝子群に関する遺伝学的並びに発生学的研究. *蠶絲試験場報告* **14**(2), 23-91. <https://ci.nii.ac.jp/naid/120004591011>
- Jankowska, M., Fuchs, J., Klocke, E., Fojtová, M., Polanská, P., Fajkus, J., Schubert, V. and Houben, A. (2015) Holokinetic centromeres and efficient telomere healing enable rapid karyotype evolution. *Chromosoma* **124**(4), 519-528. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00412-015-0524-y>
- 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. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/evl3.28>
- Kamimura, M., Tateishi, K., Tanaka-Okuyama, M., Okabe, T., Shibata, F., Sahara, K. and Yasukochi, Y. (2012) EST sequencing and fosmid library construction in a non-model moth, *Mamestra brassicae*, for comparative mapping. *Genome* **55**(10), 775-781. [https://www.nrcresearchpress.com/doi/full/10.1139/g2012-063?url\\_ver=Z39.88-](https://www.nrcresearchpress.com/doi/full/10.1139/g2012-063?url_ver=Z39.88-)

[2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed#.Xe4aXuj7Q2w](https://doi.org/10.1003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed#.Xe4aXuj7Q2w)

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部農学研究科 修士論文 38pp.

Kaufman, T.C., Seeger, M.A. and Olsen, G. (1990) Molecular and genetic organization of the antennapedia gene complex of *Drosophila melanogaster*. *Advances in Genetics* **27**, 309-362.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0065266008600292>

Kawamoto, M., Jouraku, A., Toyoda, A., Yokoi, K., Minakuchi, Y., Katsuma, S., Fujiyama, A., Kiuchi, T., Yamamoto, K. and Shimada, T. (2019) High-quality genome assembly of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **107**, 53-62.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0965174818304752>

Kawazoé, A. (1987a) The chromosome in the primitive or microlepidopterous moth-groups. I. *Proceedings of the Japan Academy, Ser. B, Physical and Biological Sciences* **63**, 25-28.

<https://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&lang=en&idt=8146878>

Kawazoé, A. (1987b) The chromosome in the primitive or microlepidopterous moth-groups. II. *Proceedings of the Japan Academy, Ser. B, Physical and Biological Sciences* **63**, 87-90.

<https://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&lang=en&idt=8207979>

Kawazoé, A. (1987c) The chromosome in the primitive or microlepidopterous moth-groups. III. *Proceedings of the Japan Academy, Ser. B, Physical and Biological Sciences* **63**, 25-28.

<https://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&lang=en&idt=7410723>

Kawazoé, A. (1987d) The chromosome in the primitive or microlepidopterous moth-groups. IV. *Proceedings of the Japan Academy, Ser. B, Physical and Biological Sciences* **63**, 257-260.

<https://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&lang=en&idt=7622708>

Kawazoé, A. (1991a) Chromosomes of some univoltine moths in the cold season (1). *Chromosome Information Service* **51**, 25-29.

Kawazoé, A. (1991b) Chromosomes of some univoltine moths in the cold season (2). *Chromosome Information Service* **52**, 21-24.

Kawazoé, A. (1992) Chromosomes of some univoltine moths in the cold season (3). *Chromosome Information Service* **53**, 27-30.

Kim, U.J., Birren, B.W., Slepak, T., Mancino, V., Boysen, C., Kang, H.L., Simon, M.I. and Shizuya, H. (1996) Construction and characterization of a human bacterial artificial chromosome library.

*Genomics* **34**, 213-218. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0888754396902682>

Kimoto, M., Tsubota, T., Uchino, K., Sezutsu, H. and Takiya, S. (2014) Hox transcription factor Antp regulates *sericin-1* gene expression in the terminal differentiated silk gland of *Bombyx mori*. *Developmental Biology* **386**(1), 64-71.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160613006477>

北沢敏男・高見丈夫 (1963) 家蚕の胚子発生段階表. II. 越年交雑種および人工ふ化種. 蚕



- 系試験場彙報 **81**, 1-3. <https://agriknowledge.affrc.go.jp/RN/2010842037.pdf>
- Kitano, J., Ross, J.A., Mori, S., Kume, M., Jones, F.C., Chan, Y.F., Absher, D.M., Grimwood, J., Schmutz, J., Myers, R.M., Kingsley, D.M. and Peichel, C.L. (2009) A role for a neo-sex chromosome in stickleback speciation. *Nature* **461**(7267), 1079. <https://www.nature.com/articles/nature08441>
- Komai, T. and Ae, A.S. (1953) Genetic studies of the pierid butterfly *Colias hyale* poliographus. *Genetics* **38**, 65-72. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1209587/>
- Kost, S., Heckel, D.G., Yoshido, A., Marec, F. and Groot, A.T. (2016) A Z-linked sterility locus causes sexual abstinence in hybrid females and facilitates speciation in *Spodoptera frugiperda*. *Evolution* **70**(6), 1418-1427. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/evo.12940>
- Kozak, G.M., Wadsworth, C.B., Kahne, S.C., Bogdanowicz, S.M., Harrison, R.G., Coates, B.S. and Dopman, E.B. (2017) A combination of sexual and ecological divergence contributes to rearrangement spread during initial stages of speciation. *Molecular Ecology* **26**(8), 2331-2347. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/mec.14036>
- Küpper, C., Stocks, M., Risse, J.E., dos Remedios, N., Farrell, L.L., McRae, S.B., Morgan, T.C., Karlionova, N., Pinchuk, P., Verkuil, Y.I., Kitaysky, A.S., Wingfield, J.C., Piersma, T., Zeng, K., Slate, J., Blaxter, M., Lank, D.B. and Burke, T. (2016) A supergene determines highly divergent male reproductive morphs in the ruff. *Nature Genetics* **48**(1), 79. <https://www.nature.com/articles/ng.3443>
- Lamichhaney, S., Fan, G., Widemo, F., Gunnarsson, U., Thalmann, D.S., Hoepfner, M.P., 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. <https://www.nature.com/articles/ng.3430>
- Lanzuolo, C., Roure, V., Dekker, J., Bantignies, F. and Orlando, V. (2007) Polycomb response elements mediate the formation of chromosome higher-order structures in the bithorax complex. *Nature Cell Biology* **9**(10), 1167. <https://www.nature.com/articles/ncb1637>
- Lemons, D. and McGinnis, W. (2006) Genomic evolution of *Hox* gene clusters. *Science* **313**(5795), 1918-1922. <https://science.sciencemag.org/content/313/5795/1918>
- Li, H. and Durbin, R. (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**, 1754-1760. <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/25/14/1754/225615>
- Li, X., Fan, D., Zhang, W., Liu, G., Zhang, L., Zhao, L., Fang, X., Chen, L., Dong, Y., Chen, Y., Ding, Y., Zhao, R., Feng, M., Zhu, Y., Feng, Y., Jiang, X., Zhu, D., Xiang, H., Feng, X., Li, S., Wang, J., Zhang, G., Kronforst, M.R. and Wang, W. (2015) Outbred genome sequencing and CRISPR/Cas9 gene editing in butterflies. *Nature Communications* **6**, 8212.



- <https://www.nature.com/articles/ncomms9212>
- Limeri, L.B. and Morehouse, N.I. (2016) The evolutionary history of the ‘alba’ polymorphism in the butterfly subfamily Coliadinae (Lepidoptera: Pieridae). *Biological journal of the Linnean Society* **117**(4), 716-724. <https://academic.oup.com/biolinnean/article/117/4/716/2440196>
- Lindtke, D., Lucek, K., Soria-Carrasco, V., Villoutreix, R., Farkas, T.E., Riesch, R., Dennis, S.R., Gompert, Z. and Nosil, P. (2017) Long-term balancing selection on chromosomal variants associated with crypsis in a stick insect. *Molecular Ecology* **26**, 6189-6205. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/mec.14280>
- Lowry, D.B. and Willis, J.H. (2010) A widespread chromosomal inversion polymorphism contributes to a major life-history transition, local adaptation, and reproductive isolation. *PLoS Biology* **8**, 2227. <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.1000500>
- Lu, F., Wei, Z., Luo, Y., Guo, H., Zhang, G., Xia, Q. and Wang, Y. (2019) SilkDB 3.0: visualizing and exploring multiple levels of data for silkworm. *Nucleic Acids Research* **gkz919** <https://academic.oup.com/nar/advance-article/doi/10.1093/nar/gkz919/5603220>
- Luo, R., Liu, B., Xie, Y., Li, Z., Huang, W., Yuan, J., He, G., Chen, Y., Pan, Q., Liu, Y., Tang, J., Wu, G., Zhang, H., Shi, Y., Liu, Y., Yu, C., Wang, B., Lu, Y., Han, C., Cheung, D.W., You, S-M., Peng, S., Xiaoqian, X., Liu, G., Liao, X., Li, Y., Yang, H., Wang, J., Lam, T.W. and Wang, J. (2012) SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read *de novo* assembler. *GigaScience* **1**, 2047-217X-1-18. <https://academic.oup.com/gigascience/article/1/1/2047-217X-1-18/2656146>
- Lukhtanov, V.A. (1991) Evolution of the karyotype and system of higher taxa of the Pieridae (Lepidoptera) of the world fauna. *Entomologicheskoe Obozrenie* **70**(3), 619-641. <https://eurekamag.com/research/002/377/002377277.php>
- Lukhtanov, V.A., Dincă, V., Talavera, G. and Vila, R. (2011). Unprecedented within-species chromosome number cline in the Wood White butterfly *Leptidea sinapis* and its significance for karyotype evolution and speciation. *BMC Evolutionary Biology* **11**(1), 109. <https://bmcevolbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2148-11-109>
- Lukhtanov, V.A. (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**(4), 683. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4698580/>
- Lutz, B., Lu, H.C., Eichele, G., Miller, D. and Kaufman, T.C. (1996) Rescue of *Drosophila labial* null mutant by the chicken ortholog *Hoxb-1* demonstrates that the function of *Hox* genes is phylogenetically conserved. *Genes and Development* **10**(2), 176-184. <http://genesdev.cshlp.org/content/10/2/176.full.pdf+html>

- Manuel, M., Jager, M., Muriene, J., Clabaut, C. and Le Guyader, H. (2006) *Hox* genes in sea spiders (Pycnogonida) and the homology of arthropod head segments. *Development Genes and Evolution* **216**(7-8), 481-491. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00427-006-0095-2>
- 間瀬啓介・原和二郎・山本俊雄・土井良宏 (1996) サザン法を用いた *E* 群突然変異系統におけるカイコのアンテナペディア遺伝子変異の探索. *日本蚕糸学雑誌* **65**, 428-435. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/kontyushigen1930/65/6/65\\_6\\_428/article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/kontyushigen1930/65/6/65_6_428/article/-char/ja/)
- Matsumoto, Y., Nakano, T., Yamamoto, M., Matsushima-Hibiya, Y., Odagiri, K.I., Yata, O., Koyama, K., Sugimura, T. and Wakabayashi, K. (2008) Distribution of cytotoxic and DNA ADP-ribosylating activity in crude extracts from butterflies among the family Pieridae. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **105**(7), 2516-2520. <https://www.pnas.org/content/105/7/2516.short>
- Masumoto, M., Yaginuma, T. and Niimi, T. (2009) Functional analysis of *Ultrabithorax* in the silkworm, *Bombyx mori*, using RNAi. *Development Genes and Evolution* **219**(9-10), 437-444. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00427-009-0305-9>
- Melters, D.P., Paliulis, L.V., Korf, I.F. and Chan, S.W. (2012) Holocentric chromosomes: convergent evolution, meiotic adaptations, and genomic analysis. *Chromosome Research* **20**(5), 579-593. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs10577-012-9292-1.pdf>
- Misof, B., Liu, S., Meusemann, K., Peters, S.R., Donath, A., Mayer, C., Frandsen, B.P., Ware, J., Flouri, T., Beutel, G.R., Niehuis, O., Petersen, M., Izquierdo-Carrasco, F., Wappler, T., Rust, J., Aberer, J.A., Aspöck, U., Aspöck, H., Bartel, D., Blanke, A., Berger, S., Böhm, A., Buckley, R.T., Calcott, B., Chen, J., Friedrich, F., Fukui, M., Fujita, M., Greve, C., Grobe, P., Gu, S., Huang, Y., Jermini, S.L., Kawahara, Y.A., Krogmann, L., Kubiak, M., Lanfear, R., Letsch, H., Li, Y., Li, Z., Li, J., Lu, H., Machida, R., Mashimo, Y., Kapli, P., McKenna, D.D., Meng, G., Nakagaki, Y., Navarrete-Heredia, L.J., Ott, M., Ou, Y., Pass, G., Podsiadlowski, L., Poh, H., Reumont, M.B., Schütte, K., Sekiya, K., Shimizu, S., Slipinski, A., Stamatakis, A., Song, W., Su, X., Szucsich, U.N., Tan, M., Tan, X., Tang, M., Tang, J., Timelthaler, G., Tomizuka, S., Trautwein, M., Tong, X., Uchifune, T., Walz, G.M., Wiegmann, M.B., Wilbrandt, J., Wipfler, B., Wong, K.F.T., Wu, Q., Wu, G., Xie, Y., Yang, S., Yang, Q., Yeates, K.D., 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, M.K. and Zhou, W. (2014) Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science* **346**(6210), 763-767. <https://science.sciencemag.org/content/346/6210/763>
- 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.

- <https://pdfs.semanticscholar.org/e12f/97de6506e07e09d4ce29f87762b6654474e1.pdf>
- Mitter, K.T., Larsen, T.B., de Prins, W., de Prins, J., Collins, S., Weghe, G.V., Sáfián, S., Zakharov, E.V., Hawthorne, D.J., Kawahara, A.Y. and Regier, J.C. (2011) The butterfly subfamily Pseudopontiinae is not monobasic: marked genetic diversity and morphology reveal three new species of *Pseudopontia* (Lepidoptera: Pieridae). *Systematic Entomology* **36**(1), 139-163.  
<https://www.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-3113.2010.00549.x>
- Morgan, T.H. (1922) Croonian lecture: On the mechanism of heredity. *Proceedings of the Royal Society B* **94**, 162-197. <https://royalsocietypublishing.org/doi/pdf/10.1098/rspb.1922.0053>
- Moritz, C., Schneider, C.J. and Wake, D.B. (1992) Evolutionary relationships within the *Ensatina eschscholtzii* complex confirm the ring species interpretation. *Systematic Biology* **41**, 273-291.  
<https://doi.org/10.1093/sysbio/41.3.273>
- Nallu, S., Hill, J. A., Don, K., Sahagun, C., Zhang, W., Meslin, C., Snell-Rood, E., Clark, N.L., Morehouse, N.I., Bergelson, J., Wheat, C.W. and Kronforst, M.R. (2018) The molecular genetic basis of herbivory between butterflies and their host plants. *Nature Ecology and Evolution* **2**, 1418. <https://www.nature.com/articles/s41559-018-0629-9>
- 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.
- Negre, B., Ranz, J.M., Casals, F., Cáceres, M. and Ruiz, A. (2003) A new split of the *Hox* gene complex in *Drosophila*: relocation and evolution of the gene labial. *Molecular Biology and Evolution* **20**(12), 2042-2054. <https://academic.oup.com/mbe/article/20/12/2042/978601>
- Negre, B., Casillas, S., Suzanne, M., Sánchez-Herrero, E., Akam, M., Nefedov, M., Barbadilla, A., Pieter, D.J. and Ruiz, A. (2005) Conservation of regulatory sequences and gene expression patterns in the disintegrating *Drosophila Hox* gene complex. *Genome Research* **15**(5), 692-700.  
<https://genome.cshlp.org/content/15/5/692.short>
- Nijalingappa, B.H.M. (1974) Cytological studies in *Scirpus* (Cyperaceae). *Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Section B* **80**(3), 134-138.  
<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F03052372.pdf>
- 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. <https://www.nature.com/articles/ng.3241>
- 小田康弘 (2016) 北海道産 *Pieris* 属 3 種の形態上の差違について (1):-春型と *nesis* タイプ標本-. *蝶と蛾* **67**(2), 41-57. <https://ci.nii.ac.jp/naid/130006181238/>
- 小田康弘 (2018) 国内産 *napi* 群の発香鱗の形態比較. *Butterfly science= バタフライ・サイエンス* **10**, 52-66. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/lepid/70/1/70\\_1/article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/lepid/70/1/70_1/article/-char/ja/)
- 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研究科

修士論文 130pp.

- Ohno, M., Fujimoto, T., Naito, Y., Jouraku, A., Yasukochi, Y. and Sahara, K. (2020a) BAC selection of the large white butterfly, *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pieridae) containing orthologs of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Applied Entomology and Zoology* **55**(1), 159-174. <https://link.springer.com/article/10.1007/s13355-019-00665-7>
- Ohno, M., Kawamoto, M. and Sahara K. (2020b) Development of an application, *Bombyx mori* tool for ortholog picking (BmTOP). *Journal of Insect Biotechnology and Sericology* **89**(1) in press.
- Okamura, Y., Sato, A., Tsuzuki, M., Murakami, M., Heidel-Fischer, H. and Vogel, H. (2019) Molecular signatures of selection associated with host plant differences in *Pieris* butterflies. *Molecular Ecology* **28**, 4958-4970. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/mec.15268>
- Okumura, A., Kobayashi, M., Kitajima, H., Yasukochi, Y., Suzuki, G., and Sahara, K. (2019) Construction of a bacterial artificial chromosome library of *Endoclitia excrescens* as a tool for comparative gene mapping in Lepidoptera. *Entomological Science* **22**(2), 167-172. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ens.12350>
- Oneal, E., Lowry, D.B., Wright, K.M., Zhu, Z. and Willis, J.H. (2014) Divergent population structure and climate associations of a chromosomal inversion polymorphism across the *Mimulus guttatus* species complex. *Molecular Ecology* **23**, 2844-2860. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/mec.12778>
- Pace, R.M., Grbić, M. and Nagy, L.M. (2016) Composition and genomic organization of arthropod *Hox* clusters. *EvoDevo* **7**(1), 11. <https://evodevojournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13227-016-0048-4>
- Parthasarathy, R. and Gopinathan, K.P. (2005) Comparative analysis of the development of the mandibular salivary glands and the labial silk glands in the mulberry silkworm, *Bombyx mori*. *Gene Expression Patterns* **5**(3), 323-339. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567133X04001711>
- Pascual-Anaya, J., Sato, I., Sugahara, F., Higuchi, S., Paps, J., Ren, Y., Takagi, W., Ruiz-Villalba, A., Ota, K.G., Wang, W. and Kuratani, S. (2018) Hagfish and lamprey *Hox* genes reveal conservation of temporal colinearity in vertebrates. *Nature Ecology & Evolution* **2**(5), 859. <https://www.nature.com/articles/s41559-018-0526-2>
- Pierce, R.J., Wu, W., Hirai, H., Ivens, A., Murphy, L.D., Noël, C., Johnston, A.D., Artiguenave, F., Adams, M., Cornette, J., Viscogliosi, E., Capron, M. and Balavoine, G. (2005) Evidence for a dispersed *Hox* gene cluster in the platyhelminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Molecular Biology and Evolution* **22**(12), 2491-2503. <https://academic.oup.com/mbe/article/22/12/2491/1009548>
- Posnien, N. and Bucher, G. (2010) Formation of the insect head involves lateral contribution of the intercalary segment, which depends on Tc-labial function. *Developmental Biology* **338**(1), 107-116. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160609013566>

- Posnien, N., Schinko, J.B., Kittelmann, S. and Bucher, G. (2010) Genetics, development and composition of the insect head - A beetle's view. *Arthropod Structure and Development* **39**(6), 399-410. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1467803910000678>
- Pringle, E.G., Baxter, S.W., Webster, C.L., Papanicolaou, A., Lee, S.F. and Jiggins, C.D. (2007) Synteny and chromosome evolution in the Lepidoptera: Evidence from mapping in *Heliconius melpomene*. *Genetics* **177**, 417-426. <https://www.genetics.org/content/177/1/417.short>
- Putnam, N.H., O'Connell, B.L., Stites, J.C., Rice, B.J., Blanchette, M., Calef, R., Troll, C.J., Fields, A., Hartley, P.D., Sugnet, C.W., Haussler, D., Rokhsar, D.S. and Green, R.E. (2016) Chromosome-scale shotgun assembly using an *in vitro* method for long-range linkage. *Genome Research* **26**(3), 342-350. <https://genome.cshlp.org/content/26/3/342.short>
- Robinson, R. (1971) Karyology of Lepidoptera. In: *Lepidoptera genetics*. Pergamon Press, Oxford, UK., pp. 557-598. <https://www.sciencedirect.com/book/9780080066592/lepidoptera-genetics>
- 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. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0965174813000702>
- Saura, A., Schoultz, B.V., Saura, A.O. and Brown, K.S. (2013) Chromosome evolution in Neotropical butterflies. *Hereditas* **150**(2-3), 26-37. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1601-5223.2013.00008.x>
- Schrader, F. (1935) Notes on the mitotic behavior of long chromosomes. *Cytologia* **6**(4), 422-430. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/cytologia1929/6/4/6\\_4\\_422/pdf-char/en](https://www.jstage.jst.go.jp/article/cytologia1929/6/4/6_4_422/pdf-char/en)
- Session, A.M., Uno, Y., Kwon, T., Chapman, J.A., Toyoda, A., Takahashi, S., Fukui, A., Hikosaka, A., Suzuki, A., Kondo, M., van Heeringen, S.J., Quigley, I., Heinz, S., Ogino, H., Ochi, H., Hellsten, U., Lyons, J.B., Simakov, O., Putnam, N., Stites, J., Kuroki, Y., Tanaka, T., Michiue, T., Watanabe, M., Bogdanovic, O., Lister, R., Georgiou, G., Paranjpe, S.S., van Kruijsbergen, I., Shu, S., Carlson, J., Kinoshita, T., Ohta, Y., Mawaribuchi, S., Jenkins, J., Grimwood, J., Schmutz, J., Mitros, T., Mozaffari, S.V., Suzuki, Y., Haramoto, Y., Yamamoto, T.S., Takagi, C., Heald, R., Miller, K., Haudenschild, C., Kitzman J., Nakayama, T., Izutsu, Y., Robert, J., Fortriede, J., Burns, K., Lotay, V., Karimi, K., Yasuoka, Y., Dichmann, D.S., Flajnik, M.F., Houston, D.W., Shendure, J., DuPasquier, L., Vize, P.D., Zorn, A.M., Ito, M., Marcotte, E.M., Wallingford, J.B., Ito, Y., Asashima, M., Ueno, N., Matsuda, Y., Veenstra, G.J., Fujiyama, A., Harland, R.M., Taira, M. and Rokhsar, D.S. (2016) Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. *Nature* **538**(7625), 336-343. <https://www.nature.com/articles/nature19840>
- Shelby, K.S. and Popham, H.J. (2009) Analysis of ESTs generated from immune-stimulated hemocytes of larval *Heliothis virescens*. *Journal of Invertebrate Pathology* **101**(2), 86-95. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201109000792>

- Shen, J., Cong, Q., Kinch, L.N., Borek, D., Otwinowski, Z., and Grishin, N.V. (2016) Complete genome of *Pieris rapae*, a resilient alien, a cabbage pest, and a source of anti-cancer proteins. *F1000Research* **5**, 2631. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5247789.1/>
- Shibata, F., Sahara, K., Naito, Y. and Yasukochi, Y. (2009) Reprobing of multicolour FISH in preparations of lepidopteran chromosomes. *Zoological Science* **26**, 187-190. <https://bioone.org/journals/Zoological-Science/volume-26/issue-3/zsj.26.187/Reprobing-Multicolor-Fish-Preparations-in-Lepidopteran-Chromosome/10.2108/zsj.26.187.full>
- Šichová, J., Voleníková, A., Dincă, V., 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. <https://bmcevolbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12862-015-0375-4>
- Šichová, J., Ohno, M., Dincă, 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**, 457-471. <https://doi.org/10.1111/bij.12756>
- Sutton, W.S. (1902) On the morphology of the chromosome group in *Brachystola magna*. *Biological Bulletin* **4**, 24-39. <http://www.esp.org/foundations/genetics/classical/wss-02.pdf>
- Sutton, W.S. (1903) Chromosomes in heredity. *Biological Bulletin* **4**, 231-251. <http://www.esp.org/foundations/genetics/classical/holdings/s/wss-03.pdf>
- Suzuki, G., Watanabe, M., Toriyama, K., Isogai, A. and Hinata, K. (1997) Direct cloning of the *Brassica* S locus by using a P1-derived artificial chromosome (PAC) vector. *Gene* **199**(1-2), 133-137. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378111997003582>
- Suzuki, G., Ogaki, Y., Hokimoto, N., Xiao, L., Kikuchi-Taura, A., Harada, C., Okayama, R., Tsuru, A., Onishi, M., Saito, N., Do, G.S., Lee, S.H., Ito, T., Kanno, A., Yamamoto, M. and Mukai, Y. (2012) Random BAC FISH of monocot plants reveals differential distribution of repetitive DNA elements in small and large chromosome species. *Plant Cell Reports* **31**(4), 621-628. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00299-011-1178-8>
- Suzuki, Y. and Palopoli, M.F. (2001) Evolution of insect abdominal appendages: are prolegs homologous or convergent traits? *Development Genes and Evolution* **211**(10), 486-492. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00427-001-0182-3>
- Tadokoro, T. (2015) Taxonomic status of *Pieris (napi) nesis* Fruhstorfer, 1909 (Lepidoptera, Pieridae). *Lepidoptera Science* **66**(3-4), 104-108. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/lepid/66/3-4/66\\_KJ00010133351/article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/lepid/66/3-4/66_KJ00010133351/article/-char/ja/)
- 高見丈夫・北沢敏男 (1960) 家蚕の胚子発生段階表. I. 日 122 号, 日 124 号, 支 122 号, 支 124 号. *蚕糸試験場彙報* **75**, 1-31. <https://iss.ndl.go.jp/books/R000000004-I9061905-00>
- 田中正弘 (1968) モンシロチョウ *Pieris rapae crucivora* BOISDUVAL の胚子発生段階および



- 胚子発生に及ぼす温度の影響について. *蝶と蛾* **19**, 41-53.  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/lepid/19/1-2/19\\_KJ00006596602/article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/lepid/19/1-2/19_KJ00006596602/article/-char/ja/)
- The Heliconius Genome Consortium (2012) Butterfly genome reveals promiscuous exchange of mimicry adaptations among species. *Nature* **487**, 94-98.  
<https://www.nature.com/articles/nature11041>
- 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.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0965174808002099?via%3Dihub>
- Tomita, S. and Kikuchi, A. (2009) *Abd-B* suppresses lepidopteran proleg development in posterior abdomen. *Developmental Biology* **328**(2), 403-409.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160609000943>
- Traut, W. (1976) Pachytene mapping in the female silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera). *Chromosoma* **58**(3), 275-284. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00292094>
- Tsubota, T., Tomita, S., Uchino, K., Kimoto, M., Takiya, S., Kajiwara, H., Yamazaki, T. and Sezutsu, H. (2016) A *Hox* gene, *Antennapedia*, regulates expression of multiple major silk protein genes in the silkworm *Bombyx mori*. *The Journal of Biological Chemistry* **291**(13), 7087-7096.  
<http://www.jbc.org/content/291/13/7087.short>
- Twyford, A.D. and Friedman, J. (2015) Adaptive divergence in the monkey flower *Mimulus guttatus* is maintained by a chromosomal inversion. *Evolution* **69**, 1476-1486.  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/evo.12663>
- Van't Hof, A.E., Nguyen, P., Dalíková, M., Edmonds, N., Marec, F. and Saccheri, I.J. (2013) Linkage map of the peppered moth, *Biston betularia* (Lepidoptera, Geometridae): a model of industrial melanism. *The Journal of Heredity* **110**(3), 283-295. <https://www.nature.com/articles/hdy201284>
- Wahlberg, N., Rota, J., Braby, M.F., Pierce, N.E. and Wheat, C.W. (2014) Revised systematics and higher classification of pierid butterflies (Lepidoptera: Pieridae) based on molecular data. *Zoologica Scripta* **43**(6), 641-650. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/zsc.12075>
- Wallberg, A., Schoening, C., Webster, M. T. and Hasselmann, M. (2017) Two extended haplotype blocks are associated with adaptation to high altitude habitats in East African honey bees. *PLoS Genetics* **13**(5), e1006792.  
<https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1006792>
- Wan, F., Yin, C., Tang, R., Chen, M., Wu, Q., Huang, C., Qian, W., Rota-Stabelli, O., Yang, N., Wang, S., Wang, G., Zhang, G., Guo, J., Gu, L., Chen, L., Xing, L., Xi, L., Liu, F., Lin, K., Guo, M., Liu, W., He, K., Tian, R., Jacquín-Joly, E., Franck, P., Siegwart, M., Ometto, L., Anfora, G., Blaxter, M., Meslin, C., Nguyen, P., Dalíková, M., Marec, F., Olivares, J., Maugin, S., Shen, J., Liu, J., Guo, J., Luo, J., Liu, B., Fan, W., Feng, L., Zhao, X., Peng, X., Wang, K., Liu, L., Zhan, H., Liu, W., Shi, G., Jiang, C., Jin, J., Xian, X., Lu, S., Ye, M., Li, M., Yang, M., Xiong, R.,

- Walters J.R. and Li, F. (2019) A chromosome-level genome assembly of *Cydia pomonella* provides insights into chemical ecology and insecticide resistance. *Nature communications*, **10**(1), 1-14. <https://www.nature.com/articles/s41467-019-12175-9>
- Warren, R.W., Nagy, L., Selegue, J., Gates, J. and Carroll, S. (1994) Evolution of homeotic gene regulation and function in flies and butterflies. *Nature*, **372**, 458-461. <https://www.nature.com/articles/372458a0>
- Watt, W. (1973) Adaptive significance of pigment polymorphisms in *Colias* butterflies. III. Progress in the study of the 'alba' variant. *Evolution* **27**, 537-548. <https://www.jstor.org/stable/2407188?seq=1>
- Wellenreuther, M. and Bernatchez, L. (2018) Eco-evolutionary genomics of chromosomal inversions. *Trends in ecology & evolution* **33**(6), 427-440. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169534718300788?via%3Dihub>
- Wheat, C.W., Vogel, H., Wittstock, U., Braby, M.F., Underwood, D. and Mitchell-Olds, T. (2007) The genetic basis of a plant-insect coevolutionary key innovation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **104**(51), 20427-20431. <https://www.pnas.org/content/104/51/20427.short>
- Wolpert, L. (2011) Developmental biology: A very short introduction (Vol. 280). *Oxford University Press*, Oxford, UK., pp. 14-22. <https://global.oup.com/academic/product/developmental-biology-a-very-short-introduction-9780199601196?cc=jp&lang=en&>
- Woronik, A. and Wheat, C.W. (2017) Advances in finding Alba: the locus affecting life history and color polymorphism in a *Colias* butterfly. *Journal of Evolutionary Biology* **30**(1), 26-39. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jeb.12967>
- 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. <https://link.springer.com/article/10.1007/s004380050013>
- 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, G.K. and Yang, H. (2004) A draft sequence for the genome of domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science* **306**, 1937-1940.



<https://science.sciencemag.org/content/306/5703/1937.long>

Yasukochi, Y. (1998) A dense genetic map of the silkworm, *Bombyx mori*, covering all chromosomes based on 1018 molecular markers. *Genetics* **150**, 1513-1525.

<https://www.genetics.org/content/150/4/1513.long>

Yasukochi, Y. (2002) PCR-based screening for bacterial artificial chromosome libraries. *Methods in Molecular Biology* **192**, 401-410. <https://link.springer.com/protocol/10.1385/1-59259-177-9:401>

Yasukochi, Y., Ashakumary, L.A., 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.

<https://link.springer.com/article/10.1007/s00427-004-0441-1>

Yasukochi, Y., Tanaka-Okuyama, M., Shibata, F., Yoshido, A., Marec, F., Wu, C., Zhang, H-B., Goldsmith, M.R. 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. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0007465>

Yasukochi, Y., Tanaka-Okuyama, M., Kamimura, M., Nakano, R., Naito, Y., Ishikawa, Y. and Sahara, K. (2010) Isolation of BAC clones containing conserved genes from libraries of three distantly related moths: a useful resource for comparative genomics of Lepidoptera. *BioMed Research International*, 2011. <http://downloads.hindawi.com/journals/biomed/2011/165894.pdf>

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. *Heredity* **116**, 75-83.

<https://www.nature.com/articles/hdy201572>

Yoshida, K., Makino, T., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., Hasebe, M., Kawata, M., Kume, M., Mori, S., Peichel, C.L., Toyoda, A., Fujiyama, A. and Kitano, J. (2014) Sex chromosome turnover contributes to genomic divergence between incipient stickleback species. *PLoS Genetics* **10**(3), e1004223. <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1004223>

Yoshido, A., Bando, H., Yasukochi, Y. and Sahara, K. (2005) The *Bombyx mori* karyotype and the assignment of linkage groups. *Genetics* **170**, 675-685.

<https://www.genetics.org/content/170/2/675>

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**, 614-624. <https://www.nature.com/articles/hdy201094>

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.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0965174811000531>

- Yoshido, A., Sahara, K. and Yasukoch, Y. (2014) Silk moths (Lepidoptera). *In*: Protocols for cytogenetic mapping of arthropod genomes (Sharakhov, I.V. ed.), pp. 219-256, CRC Press, Boca Raton, FL. <https://www.crcpress.com/Protocols-for-Cytogenetic-Mapping-of-Arthropod-Genomes/Sharakhov/p/book/9781138374874>
- You, M., Yue, Z., He, W., Yang, X., Yang, G., Xie, M., Zhan, D., Baxter, S.W., Vasseur, L., Gurr, G.M., Douglas, C.J., 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, J.W., Smith, S.M., 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. <https://www.nature.com/articles/ng.2524>
- Zhang, Z.Q. (2013) Phylum Arthropoda. *In*: Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness (Addenda 2013). (Zhang, Z.-Q. ed.), *Zootaxa* **3703**(1), 17-26. <https://biotaxa.org/Zootaxa/article/view/zootaxa.3703.1.6/53167>