

鱗翅目昆虫における染色体同定法の開発

佐原 健 (北海道大学大学院農学研究院)

sahara@abs.agr.hokudai.ac.jp

100年近くも染色体を特定する術がなかった蝶と蛾の仲間(鱗翅目昆虫)において、カイコを材料として染色体同定法を開発した。ゲノムクローンを直接、染色体に視覚化する方法は、遺伝子マッピング、染色体変異の検出、ゲノム情報の連結および染色体進化の解明などに利用できる。また、蝶とカイコに広い染色体相同領域(シンテニー)を見だし、本法を介した鱗翅目昆虫のゲノム比較研究への道を拓いた。

はじめに

カイコを代表とする鱗翅目昆虫(チョウとガの仲間)は多動原体型染色体と呼ばれる“奇妙な”染色体構造を有している。多動原体型染色体とは、分裂時に紡錘糸が付着する部位が染色体の至る所に分散している分散型動原体タイプの染色体であり、アブラムシの仲間や線虫などに同様の染色体が認められる。このタイプの染色体は、よく目にするようなヒトの中部動原体型染色体やマウスの端動原体型の染色体とは装いを全く異にする。従って、これらの生物の分裂中期に認められる一次狭窄はなく、鱗翅目昆虫の中期分裂像は非常に凝集した球状に近い構造として観察される(図1参照)。大きさに格段の違いがなく、構造的な特徴も持たない鱗翅目昆虫染色体においては、染色体の個別同定をしようとする場合、非常な困難は容易に予想できる。更に悪条件は重なるもので、染色体の塩基配列の違いなどにより濃淡に染め分けできる様々な方法(分染法やバンディング法)の何れも鱗翅目昆虫染色体に適応できるものは見つかっていない。よって、この昆虫グループにおける染色体同定は世界中の科学者の挑戦を長年に渡って拒み続けてきたのである。

W染色体同定法の開発

そこで私たちは通常使用されているような染め分け方法による染色体同定を諦め、はじめに中部動原体型(ヒトタイプ)の染色体を持ち、染色体数が比較的少ないことから大部分の染色体同定は行えるものの、決定的な手法としてrDNA(リボソームDNA)やリピート配列をプローブとしたFISH(Fluorescence *in situ* hybridization)法により成功を納めたミツバチの同定法を手本として研究を進めることとした。しかしながら、カイコのrDNAは単数ゲノム中に一箇所しかなく、既知のリピート配列は余りにもコピー数が多すぎて各染色体を個別に同定することは不可能であった。

この結果から、発想を180度転換させ、染色体のある程度の領域をカバーしたクローンであるBAC(Bacterial artificial chromosome)をプローブとしたFISHにより同定することを着想した。しかしながら、この方法を確立する上で必要不可欠な「確実に判定できる染色体」は、この時点で判明しておらず、雌雄で異なる性染色体をターゲットとすることとした。実は、カイコでは雌特異的な性染色体のW染色体判別方法すらも確立していなかったことから、まずは、W染色体を同定する手法開発に着手することとした。雌雄のゲノムDNAに別々の蛍光ラベルを施したプローブを用いたFISH(Comparative

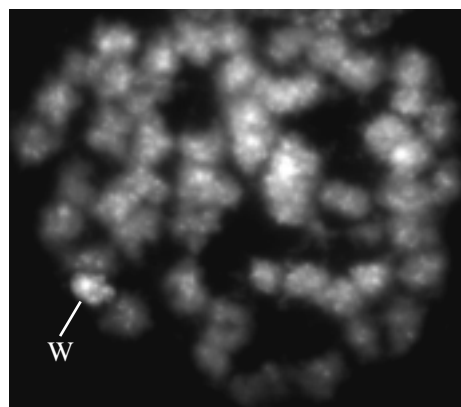


図 1. CGH により同定された有糸分裂中期における W 染色体

genomic hybridization: CGH) により ZZ 性染色体構成を持つ雄では認められず、WZ 構成の雌のみで 1 つの染色体全体に非常に強いシグナルが観察された(図 1)¹⁾。このことからほぼ確実に W 染色体がゲノム DNA プローブにより同定できるとの確信を得た。この CGH 法は分子レベルで分化したヘテロタイプの性染色体構成を持つ生物(雄ヘテロ型 XY ならびに雌ヘテロ型 WZ)何れに対して適応可能な手法であると考えられる¹⁾とともに鱗翅目昆虫における W 染色体の Z 染色体からの分化のレベルも数値化可能な方法である²⁾。さらには、染色体末端に存在するテロメア反復配列³⁾とゲノム DNA を同時にプローブとして用いた FISH では、複数の性染色体をもつ鱗翅目昆虫の性染色体構成特定にも非常に有効な手段であることをこれまでに明らかにしてきた⁴⁾。

カイコにおける BAC-FISH 法の開発

BAC を用いた同定を行う上でメルクマールとなる染色体が明らかにできたため、W 染色体特異配列をプライマーとして W 染色体由来の BAC (W-BAC) クローンを PCR スクリーニングにより獲得した。カイコに対する CGH の結果は雌雄いずれのゲノム DNA プローブにおいても W 染色体が特定できることを強く示唆していたために、雌ゲノム DNA プローブのみを用いた GISH (Genomic *in situ* hybridization) と W 由来の BAC プローブを同時に用いた FISH を W 染色体転座系統の一つである ZWII 系統雌染色体に対して行い、BAC-FISH 法の確立とゲノムプローブによる W 特定の確認を得る実験を同時に行った。双方のプローブは転座断片を除く W 染色体部位をそっくり同じに染め上げ(図 2) 上記二つの目的が達成された。特に、BAC-FISH 法の確立は鱗翅目昆虫では初めての成果となった⁵⁾。

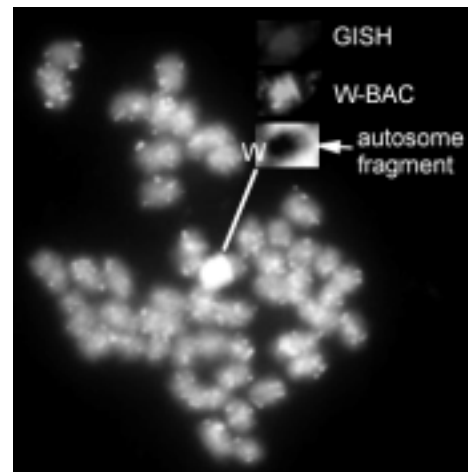


図 2. GISH/W-BAC-FISH により同定された ZWII 系統の W 染色体。W 染色体のうち転座染色体部分は双方のプローブでハイライトとされない。

BAC-FISH 法を用いたカイコ染色体同定

カイコの染色体は $2n=56$ で前述の通り雌が WZ、雄が ZZ の性染色体構成を有する。染色体全体を一括して認識することを目標として研究を進めるにあたり、27 対の相同染色体染色体と WZ 染色体が対をなす減

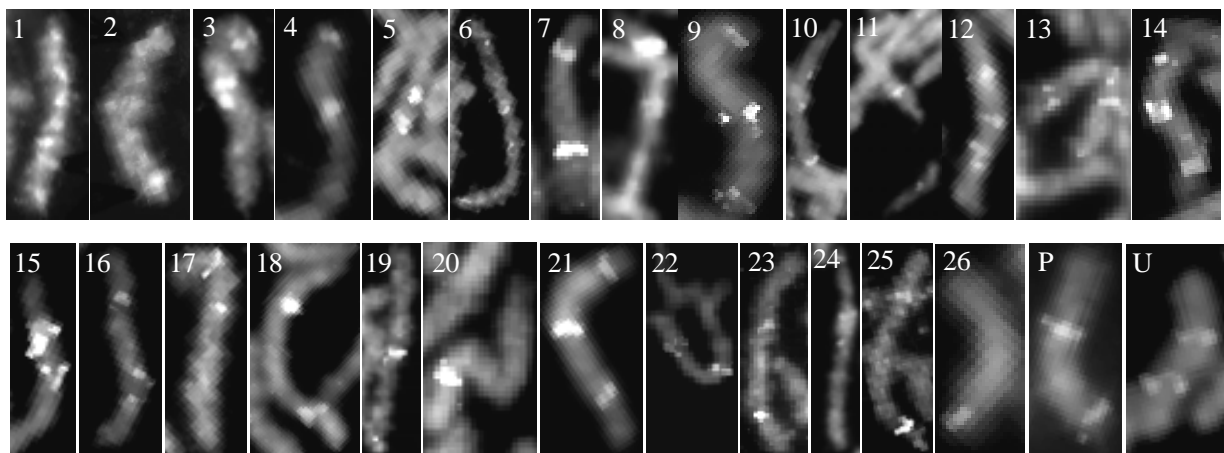


図 3. BAC-FISH により個別認識されたカイコ染色体。数字ならびに P と U は染色体番号を示し、突然変異地図に統合されている。ただし、P と U は分子連関地図にのみ統合。第 1 染色体は WZ 染色体対を示すし緑色部分が W。

数分裂前期のパキテン期を染色体同定の対象として用いた。雌のこのステージを選んだ理由は染色体数が有糸分裂中期に比べ半数であることと、染色体の乗り換えが起こらないために染色体の判別がやや容易である点にあった。カイコの BAC ライブラリーはこの時点までに作製されており、共同研究者の安河内祐二博士により分子連関地図上に BAC の座位が徐々に明らかにされてきていた。そこで、マーカーを獲得した W の対合相手である Z 染色体に座乗が確認された 3 つの BAC クローンをプローブにして、本当にこのシステムで染色体同定ができるのかどうかを確かめるためのパイロット実験を行った。結果は、何れのクローンも Z を特定できることを示すものであった(図 3-1)。よって、残り 27 常染色体についても連関群の判明したクローンによる BAC-FISH を行い、全ての染色体について連関群に対応した染色体同定を完成させた(図 3)。次に、最終目的であるカイコ染色体の一括認識には 2 色にラベルした 62 個の BAC プローブを用いて成功した(図 4)⁶⁾。

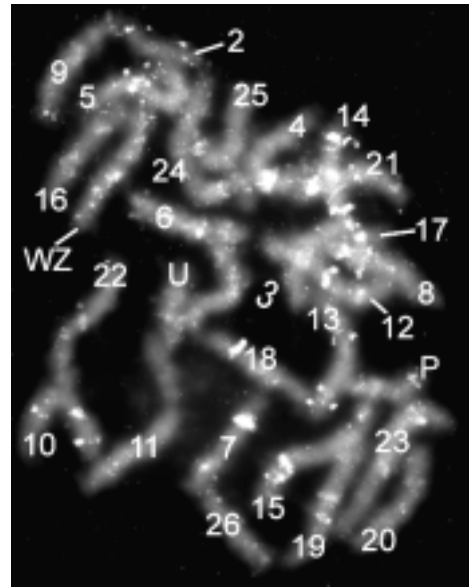


図 4. BAC-FISH により一括同定されたカイコ染色体。染色体番号(P と U を含む)はカイコ連関群と統合されており WZ は性染色体対を示す。

BAC-FISH 法を用いた研究の現在とこれから

BAC-FISH によるカイコ染色体同定法は染色体上にアンカーポイントを作製することとなる。この方法とゲノム情報を組み合わせ、カイコで目的とする遺伝子の物理的な位置を染色体上で知ることができるようになった^{7),8)}。その上、染色体突然変異を特定することやゲノム解読の最終段階で生ずるであろうギャップを物理的に連結させることも可能である。さらに最近、他の鱗翅目昆虫で発表された分子連関地図とカイコ BAC-FISH で得られる遺伝子配置の比較が可能であることを示した。つまり、カイコと遠縁の鱗翅目昆虫であるコベニモンドクチョウとの間で比較可能な全ての組み合わせで染色体の相同領域(シンテニー)の存在すること、ならびに染色体上の遺伝子配置順序も保存されていることを明らかにした⁹⁾。これらの結果より、鱗翅目昆虫間におけるシンテニー解明研究が現実のものとなり、これからは、カイコでのゲノムおよび染色体情報を基盤データとした BAC-FISH によるゲノムワイドな遺伝マッピングを行って行く予定である。

謝辞

本研究の遂行にご協力いただいた生物資源研究所の安河内祐二博士、卒論から博士取得、さらには現在も一緒に研究にあたってくれている吉戸敦生博士に感謝申し上げます。また、この研究の端緒となったリューベック医科大学での研究において御指導いただいた Walther Traut ならびに Frantisek Marec 両教授にお礼申し上げます。所属研究室にてご指導ご鞭撻をいただきました川村直子博士、飯塚敏彦先生、中田徹先生、伴戸久徳先生、浅野真一郎先生にあらためまして感謝いたしますとともに、これまで共に研究に励んでくれた研究農場養蚕室の山田恭裕技官をはじめ卒業生、学生諸君に謝意を送りたいと思います。なお、日本農学進歩賞のご推薦をいただきました北海道大学大学院農学研究院長の諏訪正明教授に心よりお礼申し上げます。最後に、毎日の生活を支えてくれる妻、多江子と、休みの日にカイコの世話を手伝ってくれる二人の子供達、就と慶に「いつも有り難う」の言葉を捧げます。

引用文献

- 1) Traut W, Sahara K, Otto TD and Marec F (1999) Molecular differentiation of sex chromosomes probed by comparative genomic hybridization. *Chromosoma* 108: 173-180.
- 2) Sahara K, Marec F and Traut W (1999) TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. *Chromosome Res.* 7: 449-460.
- 3) Sahara K, Marec F, Eickhoff U and Traut W (2003) Moth sex chromatin probed by comparative genomic hybridization (CGH). *Genome* 46: 339-342.
- 4) Yoshido A, Marec F and Sahara K (2005) Resolution of sex chromosome constitution by genomic in situ hybridization and fluorescence in situ hybridization with (TTAGG)_n telomeric probe in some species of Lepidoptera. *Chromosoma* 114: 193-202.
- 5) Sahara K, Yoshido A, Kawamura N, Ohnuma A, Abe H, Mita K, Oshiki T, Shimada T, Asano S, Bando H and Yasukochi Y (2003) W-derived BAC probes as a new tool for identification of the W chromosome and its aberrations in *Bombyx mori*. *Chromosoma* 112: 48-55.
- 6) Yoshido A, Bando H, Yasukochi Y and Sahara K (2005) The *Bombyx mori* karyotype and the assignment of linkage groups. *Genetics*, 170: 675-685.
- 7) Yasukochi Y, Ashakumary LA, Wu C, Yoshido A, Nohata J, Mita K and Sahara K (2004) Organization of the Hox gene cluster of the silkworm, *Bombyx mori*: a split of the Hox cluster in a non-*Drosophila* insect. *Dev. Genes Evol.* 214: 606-614.
- 8) Niimi T, Sahara K, Oshima H, Yasukochi Y, Ikeo K and Traut W (2006) Molecular cloning and chromosomal localization of the *Bombyx Sex-lethal* gene. *Genome* 49: 263-268.
- 9) Yasukochi Y, Ashakumary LA, Baba K, Yoshido A and Sahara K (2006) A second generation integrated map of the silkworm reveals synteny and conserved gene order between lepidopteran insects. *Genetics* 173: 1319-1328.

Development of chromosome identification in Lepidoptera

Ken Sahara (Hokkaido University, Graduate school of Agriculture)

sahara@abs.agr.hokudai.ac.jp