

論文内容の要旨

生産・環境生物学専攻
平成 11 年度博士課程 入学
氏名 小池 淑子
指導教官 嶋田 透

論文題目 カイコの Z 染色体の構造解析

昆虫は雌雄異体の生物であり、その性は遺伝的に決定されている。昆虫の性を決める遺伝要因は、性染色体に存在する場合が多いが、性決定因子が常染色体に存在する昆虫や半倍数性によって性が決定する昆虫なども知られている。性染色体を有する昆虫の多くは、雌が XX、雄が XY という雄ヘテロ型の性染色体構成を有するのに対し、鱗翅目および近縁の毛翅目の昆虫は、雌が ZW または ZO、雄が ZZ という雌ヘテロ型の性染色体構成を持つという特徴がある。ZO/ZZ で雌雄が決定されることは、Z 染色体の数が、これら昆虫の性を決定する要因であることを示しているが、一方でカイコのように W 染色体の雌決定能力が大きい種も存在する。鱗翅目昆虫の Z 染色体は、性的形質以外に、交尾選好性、雑種の妊性、休眠性、概日時計などの生態的に重要な形質を支配することが知られている。カイコにおいても、古くから幼虫の発育速度や休眠性が伴性遺伝を示すことが報告され、実用上の観点から Z 染色体の機能が注目されてきた。性染色体を有する生物の多くでは、X 染色体上の遺伝子の転写産物の量を細胞あたり一定にするような「遺伝子量補正」が行われている。しかし、最近カイコの Z 染色体上の二つの遺伝子 *Bmkettin* および *T15.180a* において、遺伝子量補正が見られないことが報告された。これらが当該遺伝子だけの特徴であるのか、またはカイコの Z 染色体全域における遺伝子量補正機構の欠失を意味しているのか、不明であり、より広範囲にわたる発現解析が必要である。また、Z 染色体は減数分裂時に W 染色体と対合することから、両染色体の間には何ら

かの構造的な類似が予想され、両者の構造解析はこれら染色体の進化の解明にもつながる。

本研究は、以下の3点をおもな研究目的とした。(1) カイコのZ染色体上の遺伝子を同定し、個々の生物機能を推定するとともに、全体としてどのような機能的特徴があるかを明らかにする。(2) Z染色体上の反復配列の分布やGC含量などから、W染色体および常染色体との類似性を検討する。(3) Z染色体上の多数の遺伝子の細胞あたりの mRNA 蓄積量を雌雄で比較し、遺伝子量補正の有無を明らかにする。

第一章 Z染色体の BAC コンティグ作製およびショットガンシーケンス法による構造解析

1. BAC コンティグの作成

カイコの染色体は、互いに大きさが似通っているうえ、各種染色によるバンディングも不鮮明であるため、顕微鏡下での識別が困難である。また、セルソーターやパルスフィールドゲル電気泳動などによる染色体の分離も成功していない。そのため、本研究では、カイコZ染色体の構造解析のために、カイコの BAC ライブラリーからZ染色体由来のクローンを探索することにした。農業生物資源研究所の三田らによって作製されたカイコの BAC ライブラリーは、平均 168kb の挿入断片を含んでおり、カイコのゲノムサイズの 11 倍に相当する数の独立クローンで含んでいる。Z染色体に座乗することが報告されていた *Bmkettin*、*Bmper*、*T15.180a* および *Rcf96* の4遺伝子をプローブとして、カイコの BAC ライブラリーを探索し、陽性クローンを単離した。これら BAC クローンの末端の塩基配列に特異的なプローブを用いたスクリーニングを繰り返すことにより、塩基配列が重複する BAC クローンを得た。その結果、*Bmkettin* を出発点として約 320kb、*Rcf96* を出発点として約 270kb にわたる BAC コンティグをそれぞれ作製した。また、*T15.180a* および *Bmper* をプローブとして、それぞれ約 170kb の断片を含む BAC を複数個得た。これらにより、Z染色体の約 5%をカバーする BAC を得たことになる。

2. ショットガン法による塩基配列の解析

得られたZ染色体由来の BAC から DNA を抽出し、機械的剪断ののちプラスミド pUC18 にサブクローニングしてショットガンライブラリーを作製し。各ライブラリーから数千個のプラスミドの塩基配列を決定してアセンブリーした。それら塩基配列を query にして、公共の塩基配列データベースあるいはタンパク質データベースを対象に BLASTN または BLASTX による相同性検索を行った。その結果、*Bmkettin* 周辺の約 320kb において、13 個の遺伝子 *Bmfkbp13*、*Bmhig*、*Bmhpa*、*Bm6922*、*Bmlap*、*Bmprojectin*、*Bmtitin1*、*Bmtitin2*、*Bmmiple*、*Bmsyx6*、*BmPM-Scl*、*Bmtkz1*、*BmubcD4* を同定した。また *Bmper* の BAC には *Bmcpog* を、*Rcf96*

の BAC からは *Bmublz*, *Bmdod*, *BmGs2* および *Bmzyg* の 4 個の遺伝子を、*T15.180a* の BAC からは、*Bmfw9095*, *BmZn9A5* および *Bmpdhp* の 3 個の遺伝子を、それぞれ同定した。

3. 遺伝子密度

前項の結果から、*Bmkettin*, *Rcf96* および *T15.180a* それぞれの領域において、遺伝子密度は約 30kb あたり 1 個であった。W染色体には、すでに調べられている数百 kb の範囲に、機能的な遺伝子は一つも見つかっていない。カイコの遺伝子数は約 2 万個程度と考えられており、ゲノムサイズは約 530Mb であるから、平均すれば約 27kb あたり 1 個の遺伝子密度と推定される。従って、Z染色体の遺伝子密度は常染色体に類似していることになる。

4. Z染色体上の遺伝子がコードするタンパク質の機能推定

Z染色体上の遺伝子の塩基配列から推定されるアミノ酸配列から生物機能を推定したところ、ショウジョウバエにおけるオーソログは、神経機能や運動機能など行動に関わる遺伝子が若干多い傾向があった。しかし、ハウスキーピング遺伝子と思われる遺伝子も多く存在しており、Z染色体上の遺伝子に大きな機能的偏りがあるとは考えられなかった。

5. 転移因子の分布とその構造

本研究で決定した *Bmkettin*, *Rcf96* および *T15.180a* の各周辺領域の塩基配列中には、non-LTR 型レトロトランスポゾン、SINE 因子 (*Bm1*)、そして DNA 型トランスポゾンが複数個存在し、その平均含有率は、それぞれ 4.7%、2.7% および 1.5% であった。一方、LTR 型レトロトランスポゾン様配列は 1 個も発見できなかった。また、発見した non-LTR 型レトロトランスポゾン、*Bm1* および DNA 型トランスポゾンは、全て不完全な長さであり、3'側あるいは 5'側を欠失していた。non-LTR 型レトロトランスポゾンでは、約 40% から 98% の長さが、DNA 型トランスポゾン mariner 様配列では、約 10% から 97% の長さが、それぞれ欠失していた。W染色体には、LTR 型レトロトランスポゾンが多数存在すること、および各種転移因子が完全長で存在する場合が多いという特徴が知られている。Z染色体は、転移因子の構造で見ると、W染色体よりもむしろ常染色体に類似している。

6. カイコの Z染色体とショウジョウバエゲノムとの間のシンテニー

Bmkettin 周辺の約 320kb および *Rcf96* 周辺の約 170kb に存在する遺伝子の配列順序や転写の向きを明らかにし、ショウジョウバエの遺伝子地図と比較してみたところ、ショウジョウバエのオーソログは、第 2 および第 3 染色体に分散して存在し、X染色体とのシンテニーはなかった。しかし、カイコ Z染色体上の *Bmprojectin*, *Bmkettin*, *Bmtitin1*, *Bmtitin2* および *Bmmiple* と並ぶ約 130kbp の領域と、ショウジョウバエの第 3 染色体左腕の約 3Mb の領域との間で弱いシンテニーが認められた。一方、W染色体には、レトロトランスポゾンをはじめとする転移因子が極めて複雑な「入れ子」状態で蓄積されており、現在までに機能的遺伝子は見つかっていない。カイコとショウジョウバエは祖先昆虫から分岐した後で、それぞれ独自に性

染色体を進化させてきたものと推定される。

第二章 Z染色体上の遺伝子の転写産物量の雌雄間比較

1. 雌雄の mRNA 蓄積量の測定

Z染色体における遺伝子量補正の有無を調査するため、第1章で *Bmkettin* 周辺および *Rcf96* 周辺から発見した 23 種類の遺伝子について、リアルタイム RT-PCR 法により、カイコ細胞あたりの mRNA 蓄積量を雌雄で比較した。鑄型としては、4 齢 3 日の幼虫の胸部筋肉および頭部、5 齢 3 日の幼虫の胸部筋肉および翅原基、羽化 0 日目成虫の胸部筋肉および頭部から得た poly(A)RNA を用いた。その結果、さまざまな発育段階や組織において、細胞あたりの mRNA 蓄積量は、21 個の遺伝子で、雄のほうが雌よりも多かった。しかし、雄：雌の比率は必ずしも 2 : 1 であるとは限らず、雄で 2 倍を超える mRNA を蓄積している遺伝子や、逆に雌でより多くの mRNA を蓄積している遺伝子もあった。したがって、少なくともこれらの染色体領域において、遺伝子量補正は行われていないこと、ならびに個々の遺伝子に関しては個別の性依存的転写調節がなされる場合があること、の 2 点が明らかになった。

2. 遺伝子量補正の欠如の生物学的意義

Bmkettin、*Bmtitin1*、*Bmtitin2* および *Bmprojectin* の 4 遺伝子のショウジョウバエや哺乳類における相同タンパク質は、筋原線維の構造を保持する機能を果たす。これらの mRNA の蓄積量も、雄では雌の 2 倍以上検出された。このような筋肉や神経の機能を支配する mRNA 量が雄で多いことは、カイコの行動に見られる雌雄差を部分的に説明することができる可能性がある。ショウジョウバエでは、遺伝子量補正機構は、その欠損が雄特異的致死をもたらすことから、個体の生存に不可欠な機構と考えられている。一方、カイコの Z 染色体には、雄で多く発現することが有利な遺伝子および雌の発現量が少なくても問題がない遺伝子が座乗していると推定され、雌雄差が不利になる遺伝子や雌で多く発現すべき遺伝子については、個別に発現調節を行っているのであろう。

要するに、本研究は、カイコの Z 染色体の塩基配列を広範囲に決定するとともに、その転写産物量の雌雄差を解析することにより、Z 染色体の機能を推定したものである。