

カブラハバチにおける FISH 法を用いた遺伝子のマッピング

松本 耕平・李 載旼・畠山 正統・大石 陸生

Kouhei MATSUMOTO¹⁾, Jae Min LEE²⁾, Masatsugu HATAKEYAMA³⁾ and Kugao OISHI^{1,3)}: FISH analysis of a single copy gene in the sawfly, *Athalia rosae ruficornis* (Hymenoptera)*

¹⁾ Department of Biology, Graduate School of Science and Technology, Kobe University, Nada, Kobe, Hyogo 657-8501, Japan

²⁾ Bioengineering Department, National Institute of Bioscience and Human-Technology, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan

³⁾ Department of Biology, Faculty of Science, Kobe University, Nada, Kobe, Hyogo 657-8501, Japan

膜翅目昆虫のカブラハバチ *Athalia rosae ruficornis* は雄産生単為発生を行なう。カブラハバチでは成熟未受精卵を取り出して蒸留水中に浸すだけで人為的に発生を開始させることができ、これらはすべて半数体 ($n = 8$) の雄になる。カブラハバチは昆虫で唯一、卵細胞質内精子注入法 (ICSI: Intracytoplasmic sperm injection) により、体外人工授精が可能な種である (Oishi *et al.*, 1993, 1995, 1998)。このような特長を利用して、カブラハバチを発生学研究の新しいモデル生物として開発しようとしているが、他のモデル生物と比べると遺伝的バックグラウンドに乏しい。現在までに、RAPD (Random amplified polymorphic DNA) 法を用いた 16 の連鎖群からなる遺伝子連鎖地図が得られているのみである (Nishimori *et al.*, 2000)。

キイロショウジョウバエなど多糸染色体をもつ昆虫では FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) 法により、単一コピー遺伝子を多糸染色体上にマッピングできる。一方、多糸染色体をもたない昆虫では、分裂中期の染色体上に、rRNA 遺伝子やテロメアなどの複数コピー遺伝子をマッピングすることは可能であるが (Hirai *et al.*, 1994; Beye and Moritz, 1995; Meyne *et al.*, 1995)、単一コピー遺伝子のマッピングはまだ行われていない。したがって、カブラハバチで単一コピー遺伝子を染色体上にマッピングできれば、連鎖群を染色体に対応させることが可能になり、非常に有効である。そこで本研究では、FISH 法による単一コピー遺伝子のカブラハバチ体細胞分裂中期の染色体上へのマッピングが可能かどうかを検討した。

染色体標本は成熟未受精卵を蒸留水中に浸して、人為的に付活させた発生開始 48 時間後の半数体の雄の胚を用いて、air dry 法で作製した。プローブ DNA 断片は nick translation 法を用いて biotin-14-dCTP で標識し、染色体標本上にハイブリダイズさせた後に、FITC-Avidin D を用いてさらに蛍光で標識し、シグナルを増幅させた。染色体は propidium iodide で対比染色した。この標本を蛍光顕微鏡下で観察した。

複数コピー遺伝子である rRNA 遺伝子について、18S rRNA 遺伝子と 28S rRNA 遺伝子の一部の領域をプローブに用いてマッピングを行ったところ、rRNA 遺伝子は 4 本の染色体上に存在していることがわかった。カブラハバチの 8 本の染色体は分染法による区別ができないものの、その大きさにより 2 本の大型染色体、5 本の中型染色体と 1 本の小型染色体の三つのグループに区別できる。rRNA 遺伝子は 2 本の大型染色体のうちの 1 本、5 本の中型染色体のうちの 3 本に分布しており、小型染色体には存在しないことがわかった。

つぎに、カブラハバチでは単一コピー遺伝子である、卵黄蛋白質 (vitellogenin) の遺伝子についてのマッピングを行った。プローブには全長約 5.8 kb の vitellogenin cDNA 配列を用いた。その結果、5 本の中型染色体のうちの 1 本に存在することがわかった。また、vitellogenin cDNA 配列のうちの 3' 側の半分の約 3.3 kb の断片をプローブとして使用した場合にも同様の結果が得られた。vitellogenin cDNA 配列の約 3.3 kb の断片はカブラハバチゲノム DNA 中において約 300-400 bp のイントロンを含む、約 3.7 kb の領域である。このように、ゲノム中で

* Abstract of paper read at the 36th Annual Meeting of Arthropodan Embryological Society of Japan, June 2-3, 2000 (Ome, Tokyo).

少なくとも約 3.7 kb 以上の領域をもつ配列について、単一コピー遺伝子でも染色体上にマッピングできることがわかった。

引用文献

- Beye, M. and R.F.A. Moritz (1995) *J. Hered.*, **86**, 145–150.
- Hirai, H., M.-T. Yamamoto, K. Ogura, Y. Satta, M. Yamada, R.W. Taylor and H.T. Imai (1994) *Chromosoma*, **103**, 171–178.
- Meyne, J., H. Hirai and H.T. Imai (1995) *Chromosoma*, **104**, 14–18.
- Nishimori, Y., J.M. Lee, M. Sumitani, M. Hatakeyama and K. Oishi (2000) *Genes Genet. Syst.*, **75**, 159–166.
- Oishi, K., M. Sawa, M. Hatakeyama and Y. Kageyama (1993) *Genetica*, **88**, 119–127.
- Oishi, K., M. Sawa and M. Hatakeyama (1995) *Proc. Arthropod. Embryol. Soc. Jpn.*, **30**, 1–8.
- Oishi, K., M. Hatakeyama and M. Sawa (1998) In R.N. Chatterjee and L. Sanchez (eds.), *Genome Analysis in Eukaryotes: Developmental and Evolutionary Aspects*, pp. 51–64. Narosa Publishing House, New Delhi.