

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 号	氏 名	Wej Choochote
審査委員会委員	主査氏名	川本文彦 (印)	
	副査氏名	西園晃 (西園)	
	副査氏名	長谷川英司 (長)	
論文題目			
Evidence to support karyotypic variation of <i>Anopheles peditaeniatus</i> in Thailand (タイにおける <i>Anopheles peditaeniatus</i> の核型変異を支持する証拠)			
論文掲載誌名			
Journal of Insect Science			
論文要旨			
<p>【緒言】 <i>Anopheles peditaeniatus</i> はタイに広く分布し、三日熱マラリアの媒介者として疑われている。これまでの研究では <i>An. peditaeniatus</i> は X 染色体で 3 タイプ、Y 染色体が 5 タイプの性染色体を持つことが知られているが、異なる性染色体を持つ核型間の遺伝的關係は不明であった。今回、タイで確立した 4 つの核型からなる 8 つのアイソラインを用いて、交配実験と DNA 配列の比較を行い、異なる核型間の遺伝的違いを検討した。</p>			
<p>【方法】 (1) アイソラインの確立：水牛囃法により <i>An. peditaeniatus</i> をタイの 8 カ所で採集し、実験室内で 8 つのアイソラインとして確立した。(2) 染色体観察：羽化後 6~12 時間の雄の腹部にグロリオサ・エタノール抽出液を注入し、3 時間後に精巢を取り出してカルノア液で固定し、10%ギムザ液で染色して性染色体のタイプを同定した。(3) 交配実験：8 つのアイソライン間で交雑後の生殖隔離の有無を調べるために交配実験を行い、孵化率、蛹化率、羽化率、性比を調べた。また、各交配で生じた 4 齢幼虫の唾液腺染色体の接合を調査した。(4) 塩基配列解析：各アイソラインの雌 1 匹から DNA を抽出し、rDNA の ITS2 とミトコンドリアの COI と COII の領域を PCR で増幅後、DNA シークエンサーにより塩基配列を決定して比較検討した。</p>			
<p>【結果】 (1) F<sub>1</sub> の染色体観察から 8 つのアイソラインの中に 2 つの X 染色体のタイプ (X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>) と 4 つの Y 染色体のタイプ (Y<sub>2</sub>, Y<sub>3</sub>, Y<sub>4</sub>, Y<sub>5</sub>) が見られた。Y 染色体の違いにより核型 B、C、D、E とした。(2) 交配実験を行い孵化率、蛹化率、羽化率、性比を調べた結果、全ての交配の F<sub>2</sub> で正常な子孫が生まれ、遺伝的不和合や生殖隔離は見られなかった。全ての四齢幼虫の唾液腺染色体で完全な接合が見られた。(3) ITS2 は全てのアイソラインで同じ配列であったが、同じサブグループに属する <i>Anopheles lesteri</i> と比較すると 34.5% の違いがあった。COI と COII はアイソライン間で各々 0.0-1.1% と 0.0-0.8% の違いがあった。<i>An. lesteri</i> との比較では COI と COII でそれぞれ 3.6-4.0% と 3.1-3.5% の違いがあった。</p>			
<p>【考察】 8 つのアイソライン間の交配の結果、正常な子孫が生まれ、唾液腺染色体で完全な接合が見られたことは、交雑後の生殖隔離は無く、8 つのアイソラインは異なる核型を持つが同種であることを示唆した。さらに ITS2、COI、COII の塩基配列の比較で 0.0-1.1% と変異が少ないことも、これらが同種であることを支持している。今回調べた <i>An. peditaeniatus</i> は異なる核型でも同じ ITS2 の長さと同配列であったが、このような現象は他の <i>Anopheles</i> 種でも見られている。</p>			
<p>【結語】 <i>An. peditaeniatus</i> は異なる核型を持つが、交配実験と DNA 配列の比較により、それらは同種であり、核型の変異は種内変異であることを示した。</p>			
<p>本研究は、タイに分布する <i>An. peditaeniatus</i> の 4 つの異なる核型において、核型間の交配実験結果と遺伝子解析結果を初めて明らかにし、これらの核型変異が種内変異であることを証明した意義深い論文である。審査委員の合議により、本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 Wej Choochote

## 論 文 題 目

Evidence to support karyotypic variation of *Anopheles peditaeniatus* in Thailand(タイにおける *Anopheles peditaeniatus* の核型変異を支持する証拠)

## 要 旨

*Anopheles peditaeniatus* はタイに広く分布し、三日熱マラリアの媒介者として疑われている。タイでは明らかになっていないが、中国やインドでは日本脳炎の媒介者である。さらに激しく水牛に吸血するので経済的害虫としても考えられている。これまでの研究で *An. peditaeniatus* はヘテロクロマチンの数や量が異なる X 染色体で3タイプ、Y 染色体が5タイプの性染色体を持つことが知られているが、それらの異なる性染色体を持つ核型間の遺伝的關係は調べられていない。今回、タイで確立した4つ核型からなる8つのアイソラインを用いて、交配実験と DNA 配列の比較を行い、異なる核型間の遺伝的違いを検討した。

【方法】(1) 野外採集とアイソラインの確立：水牛厩により吸血している *An. peditaeniatus* をタイの8カ所で2007年11月から2008年9月に採集し、Kimら(2003)の方法により実験室内でそれぞれ8つのアイソラインとして確立した。(2) 染色体メタフェーズ標本の作成：羽化後6~12時間の雄の腹部に0.3 $\mu$ lの1%のグロリオサ・エタノール抽出液を注入し、3時間室温で静置した。精巢を取り出

し、1%の低張のクエン酸ナトリウムに浸し、カルノア液で固定し、10%ギムザ液（リン酸緩衝液 pH7.2）で染色した。性染色体タイプの同定は Baimai ら（1993）に従った。（3）交配実験：8つのアイソラインが交雑後の生殖隔離を起こしているかどうかを決定するために、Thongsahuan ら（2009）の方法により交配実験を行った。各交配で生じた第4期幼虫の唾腺染色体は Kanda（1979）の方法により調べた。（4）塩基配列解析：各アイソラインの雌一匹から RED-N-Amp Tissue PCR Kit で DNA を抽出した。rDNA の ITS2 とミトコンドリアの COI と COII の領域を Park ら（2003、2008）の方法により PCR で増幅した。PCR 産物を精製した後、ABI PRISM 3700 DNA Analyzer により塩基配列を決定した。両鎖の配列を決定し、ClustalX を使って配列を揃えて並べた。

【結果】（1） $F_1$  の染色体を観察した結果、確立した8つのアイソラインの中に2つの X 染色体のタイプ ( $X_2$ ,  $X_3$ ) と4つの Y 染色体のタイプ ( $Y_2$ ,  $Y_3$ ,  $Y_4$ ,  $Y_5$ ) が見られた。Y 染色体の違いにより核型 B、C、D、E とした。（2）8つのアイソライン間で交配実験を行い孵化率、蛹化率、羽化率、性比を調べた結果、全ての交配の  $F_2$  で正常な子孫が生まれ、遺伝的不和合や交雑後の生殖隔離は見られなかった。全ての交配の第四期幼虫の唾腺染色体は常染色体と X 染色体で完全な接合が見られた。（3）それぞれのアイソラインの ITS2、COI、COII の塩基配列を決定し、比較した。ITS2 は全てのアイソラインで同じ配列であったが、同じサブグループに属する *Anopheles lesteri* と比較すると 34.5%の違いがあった。COI と COII はアイソライン間でそれぞれ 0.0-1.1%と 0.0-0.8%の違いがあった。*An. lesteri* との比較では COI と COII でそれぞれ 3.6-4.0%と 3.1-3.5%の違いがあった。

【考察】4つの核型をもつ8つのアイソライン間の交配の結果、正常な子孫が生まれ、唾腺染色体で完全な接合が見られたことは、交雑後の生殖隔離は見られなかったということであり、これら8つのアイソラインは異なる核型を持つが同種であることを示している。さらに ITS2、COI、COII の塩基配列の比較で 0.0-1.1%と変異が少ないことも、これらの異なる核型が同種であることを支持する証拠となる。今回調べた *An. peditaeniatus* は異なる核型でも同じ ITS2 の長さと同配列であったが、このような現象は他の *Anopheles* 種でも見られている。

【まとめ】*An. peditaeniatus* は異なる核型を持つが、交配実験と DNA 配列の比較により、それらは同種であり、核型の変異は種内変異であることを示した。