

RAPD 法によるカブラハバチの DNA 多型の検出と連鎖解析

西森 善克・畠山 正統・大石 陸生

Yoshikatsu NISHIMORI¹⁾, Masatsugu HATAKEYAMA²⁾ and Kugao OISHI^{1,2)}: Detection of RAPD (random amplified polymorphic DNA) markers and linkage analysis in the sawfly, *Athalia rosae* (Hymenoptera)*

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

²⁾Department of Biology, Faculty of Science, Kobe University, Nada, Kobe, Hyogo 657–8501, Japan

わたしたちは、膜翅目昆虫のカブラハバチ *Athalia rosae* の様々な利点、例えば、成熟未受精卵を蒸留水に浸すだけで単為発生を開始させることができる (Naito, 1982)、昆虫で唯一卵内への精子注入により人工授精が可能である (Sawa and Oishi, 1989)、などを用いて発生生物学的な研究を行ってきた。発生生物学の代表的なモデル生物 (昆虫) の一つはショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* であるが、これを用いた研究は確立された遺伝学的バックグラウンドを利用することにより発展してきた。一方、カブラハバチは遺伝学的バックグラウンドに乏しく、可視突然変異は現在のところ 3 種類 (*yfb*, *cec*, *sw*) のみである。そこで、カブラハバチの遺伝学的バックグラウンドを得る一端として、まず、DNA 多型を検出し、得られた DNA 多型マーカーについて連鎖解析を行った。

カブラハバチの DNA 多型の検出は、RAPD (random amplified polymorphic DNA) 法を用いた。これは、ゲノム DNA と任意の塩基配列をもつプライマーを用いて PCR (polymerase chain reaction) を行った場合、ゲノム DNA 中に存在するプライマー結合部位における塩基置換を多型 (RAPD マーカー) として検出するという方法である (Williams *et al.*, 1990) (Fig. 1)。プライマー 44 種類を用いて、カブラハバチ雌 1 個体から得た雄 40 個体 (G_1) について DNA 多型を検出した。その結果、44 種類のうち 23 種類のプライマーで 29 の RAPD マーカーを得た。これらの RAPD マーカーを連鎖解析ソフト MAPMAKER ver. 2.0 (Lander *et al.*, 1987) で解析したところ、得られた 29 マーカーのうち 10 マーカーで四つの連鎖群ができた。また、可視突然変異遺伝子座 *yfb* に連鎖しているマーカーも得られた (Fig. 2)。

RAPD マーカーは再現性に多少の問題があり、連鎖解析の精度に影響を与えるという指摘がある。そのため、RAPD マーカーをゲノム中の同定標識 (STS: sequence tagged sites) 化する必要がある (Olson *et al.*, 1989)。STS 化は、RAPD マーカーの塩基配列を決定した後、RAPD マーカーを特異的に増幅するようなプライマーを設定して PCR を行い、RAPD マーカーと同一の断片が増幅されることにより、RAPD マーカーの再現性を確認するものである (Hunt and Page, 1994; Kurata *et al.*, 1995)。

今後、さらに多くの RAPD マーカーを検出し、主なマーカーについては STS 化を行えば、詳細な遺伝子連鎖地図を作成することが可能であると思われる。また、他の昆虫では、rDNA、テロメアなどの繰り返し配列が、FISH (fluorescence *in situ* hybridization) によって染色体上にマップされている (Okazaki *et al.*, 1993; Beyreuther and Moritz, 1995; Meyne *et al.*, 1995)。同様の方法で、カブラハバチですでに単一コピー遺伝子としてクローン化されている卵黄蛋白質 (Vg) 遺伝子 (Nose *et al.*, 1997) や RAPD マーカーを染色体上に位置づけ、染色体遺伝子マッピングの可能性を検討したい。

* Abstract of paper read at the 33rd Annual Meeting of Arthropodan Embryological Society of Japan, May 21–22, 1998 (Mikawa, Aichi).

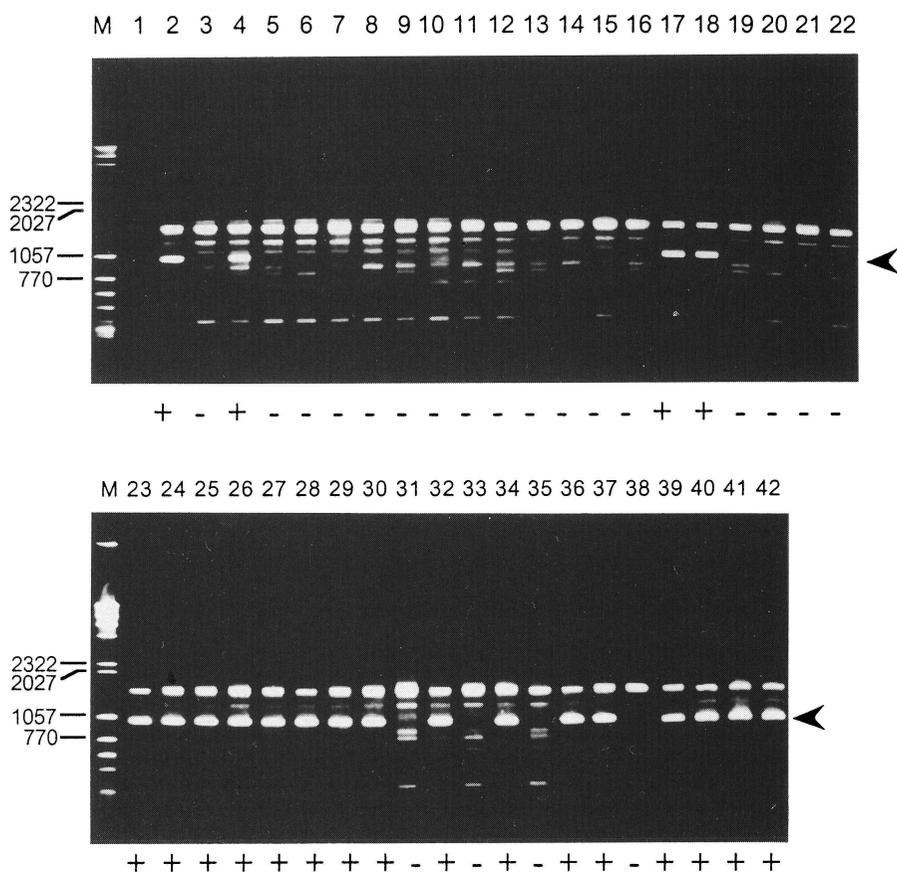


Fig. 1 An example of DNA polymorphism in *Athalia rosae*. PCR products were obtained by using the primer, OPD-04 (Operon Technology, Alameda, CA), individually from template DNA samples of a diploid female parent heterozygous for *yellow fat body* (lane 2) and her 40 haploid sons (wild type: lanes 3–22, *yellow fat body*: lanes 23–42, size marker: M, negative control: lane 1), and were separated on a 1.4% agarose gel. Arrowheads: RAPD marker, +: RAPD marker present, -: RAPD marker absent.

引用文献

- Beye, M. and R.F.A. Moritz (1995) *J. Hered.*, **86**, 145–150.
 Hunt, G.J. and R.E. Page Jr. (1994) *Mol. Gen. Genet.*, **244**, 512–518.
 Kurata, N. and 27 others (1995) *Nature Genet.*, **8**, 365–372.
 Lander, E.S., P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow, M.J. Dary, S.E. Lincoln and L. Newburg (1987) *Genomics*, **1**, 174–181.
 Meyne, J., H. Hirai and H. Imai (1995) *Chromosoma*, **104**, 14–18.
 Naito, T. (1982) *Kontyu, Tokyo*, **50**, 569–587.
 Nose, Y., J.M. Lee, T. Ueno, M. Hatakeyama and K. Oishi (1997) *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **27**, 1047–1056.
 Okazaki, S., K. Tsuchida, H. Maekawa, H. Ishikawa and H. Fujiwara (1993) *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 1424–1432.
 Olson, M., L. Hood, C. Cantor and D. Botstein (1989) *Science*, **245**, 1434–1435.
 Sawa, M. and K. Oishi (1989) *Zool. Sci.*, **6**, 557–563.
 Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey (1990) *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6531–6535.

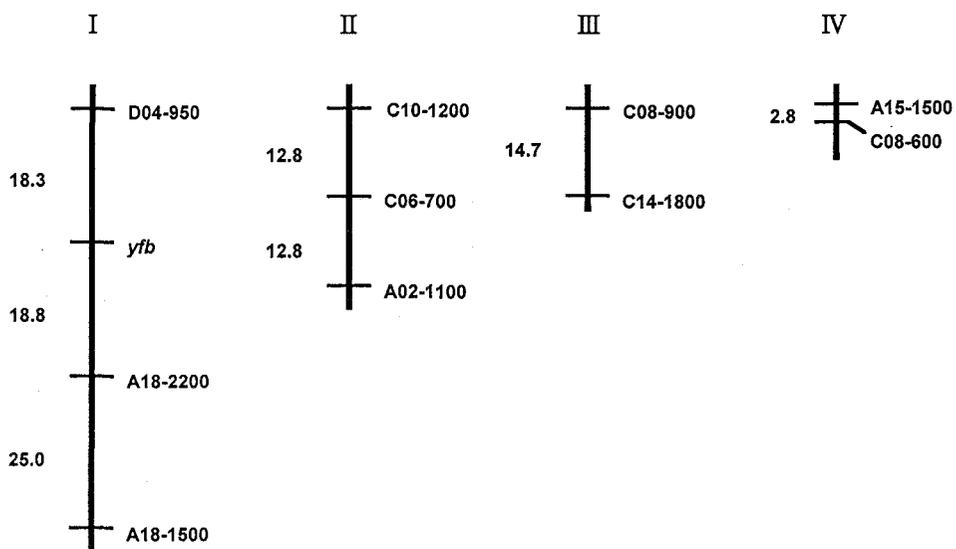


Fig. 2 Linkage groups of 10 RAPD loci and the *yellow fat body* (*yfb*) locus in *Athalia rosae*. Markers are named by primer designation of the supplier (a letter followed by a number for primers from Operon Technologies) followed by a dash and approximate size of the amplified fragment in base pairs. All of the markers were mapped with a minimum LOD score for linkage of 3.0. Marker distances are given in centimorgans.