

(19)日本国特許庁 (J P)

(12)特許公報 (B 1)

(11)特許番号

特許第3138736号

(P 3 1 3 8 7 3 6)

(45)発行日 平成13年 2月26日 (2001.2.26)

(24)登録日 平成12年12月15日 (2000.12.15)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I
C12N 15/09	ZNA	C12N 15/00 ZNA A
C12Q 1/68		C12Q 1/68 Z
// A01K 67/033	501	A01K 67/033 501

請求項の数 1 (全16頁)

(21)出願番号	特願平11 - 277498	(73)特許権者	391030284 農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所長 茨城県つくば市大わし 1 - 2
(22)出願日	平成11年 9月29日 (1999.9.29)	(72)発明者	原 和二郎 茨城県つくば市東 2丁目16 - 23
審査請求日	平成11年 9月29日 (1999.9.29)	(72)発明者	奥田 敬子 茨城県つくば市下広岡702 - 15
		(72)発明者	小瀬川 英一 茨城県つくば市春日 1 - 12 - 2 - 201 - 308
		(72)発明者	間瀬 啓介 長野県松本市県 1 - 9 - 1 公務員宿舍
		(74)代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔 (外 1名)
		審査官	上條 肇

最終頁に続く

(54)【発明の名称】各染色体に座乗する c D N A クローンによる蚕の遺伝子型同定法

1

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】 カイコ染色体DNAの制限酵素断片長多型を、配列番号 1 から配列番号 3 1 のいずれか一つの配列番号に記載された塩基配列により表されるcDNAをプローブとして用いて検出することを特徴とする、カイコの遺伝子型同定法。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】本発明は、カイコcDNAをプローブとして用いてカイコ染色体DNAの制限酵素断片長多型を検出し、カイコの遺伝子型を同定する方法に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】カイコには、400種あまりもの突然変異系統や、数多くの保存系統・地理的品種が存在する他、

2

経済的に重要な実用品種やその素材系統が存在する。従来、それらの系統や品種は、形態上の特徴、飼育、繰糸の成績等の実用形質を指標として識別されてきた。

【 0 0 0 3 】しかし、これらの実用形質は環境の影響が大きいため、必ずしも客観的な指標とはいえなかった。また、これらの実用形質を指標とした場合、類似した実用形質を有する系統や品種を識別することは困難であった。

【 0 0 0 4 】一方、遺伝子レベルにおける品種、系統、個体等の識別は、ヒトや野外昆虫等の様々な動植物において行われている。例えば、RAPDやマイクロサテライトをDNAマーカーとして用いることによりゲノムDNAの多型を検出し、その検出結果に基づいて遺伝子レベルで品種、系統、個体等を識別することが行われている (例えば、Akagi,H.ら,Theoretical and Applied Genetics,9

10

2 : 955-962 (1996) ; Akagi, H. ら, Theoretical and Applied Genetics, 94 : 61-67 (1997) ; Simon, C. ら, Ann. Entomol. Soc. Am., 87 : 651-701 (1994) ; Brower, A. ら, Ann. Entomol. Soc. Am., 87 : 702-716 (1994) ; Kashi, Y. ら, Mammalian Genome 5(9) : 525-530 (1994) ; Hermans, P. ら, Journal of Clinical Microbiology 33(6) : 1606-1612 (1995) ; Wolff, K. ら, Theoretical and Applied Genetics, 91(3) : 439-447 (1995)) 。

【 0 0 0 5 】しかし、これらの識別方法は、簡便であるという利点がある一方、再現性の低いという問題点や、同じ長さのバンドであっても異なる領域由来のものである危険性があるという問題点を有している。また、これらの識別方法は、数種類の特定の遺伝子のみが多型に基づいて識別を行うため、その識別結果が品種や系統を反映しているとは必ずしもいえず、これらの識別結果はあくまでも傍証として用いられるにすぎないのが現状である。

【 0 0 0 6 】カイコにおいても、RFLPやRAPD等を用いた遺伝子レベルでの品種、系統及び個体の識別が行われているものの、これらのマーカーは、カイコの28対の全染色体に確実に対応するようなものではなく、上記と同様に、再現性及び精度の面で問題がある。そこで、客観的な指標に基づいて、カイコの品種、系統、個体等を再現性及び精度よく識別できる方法の開発が望まれている。

【 0 0 0 7 】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、客観的な指標に基づいて、カイコの品種、系統、個体等を再現性及び精度よく識別する方法を提供することを目的とする。

【 0 0 0 8 】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究した結果、カイコcDNAをプローブとして用いてカイコ染色体DNAの制限酵素断片長多型 (RFLP) を検出することにより、カイコの遺伝子型を再現性及び精度よく同定でき、このように同定したカイコの遺伝子型を客観的な指標として、カイコの品種、系統、個体等を再現性及び精度よく識別できることを見出した。すなわち、カイコ染色体DNAのうち、機能している領域の変異は、機能していない領域の変異に比べて、その個体の生存や特徴の変化に関連している可能性が高く、カイコの品種、系統、個体等の差は、そのような変化によって生じたものであると考えられる。そこで、本発明者らは、カイコ染色体DNAのうち、機能している領域 (すなわち、タンパク質をコードする部分) から構成されるカイコcDNAをプローブとして用いて、カイコ染色体DNAの制限酵素断片長多型を検出したところ、カイコの遺伝子型を再現性及び精度よく同定することに成功し、さらには、この遺伝子型に基づいてカイコの品種、系統、個体等の差を再現性及び精度よく識別することに成功したのである。

【 0 0 0 9 】また、本発明者らは、カイコ染色体DNAの

制限酵素断片長多型を検出する際のプローブとして、カイコの全ての染色体上に一対しか存在しない遺伝子 (シングルコピー遺伝子) に由来するcDNAを用いれば、検出されるバンドが1~数本程度となるため共優性形質であるRFLPパターンが極めて単純となり、遺伝子型の同定を容易かつ迅速に行うことができることを見出した。

【 0 0 1 0 】さらに、本発明者らは、カイコの28対の各染色体上には少なくとも1対のシングルコピー遺伝子が存在することを見出し、カイコの28対の染色体のうち、どの染色体に由来するDNAの制限酵素断片長多型も、シングルコピー遺伝子に由来するcDNAをプローブとして用いて容易かつ迅速に検出できることを見出した。

【 0 0 1 1 】さらに、本発明者らは、カイコの28対の染色体のうち、10~28対の各染色体に座乗する遺伝子 (特にシングルコピー遺伝子) に由来するcDNAをプローブとして用いれば、微細な遺伝子型の相違も検出でき、カイコの遺伝子型をより一層再現性及び精度よく識別できることを見出した。以上の知見により、本発明は完成されるに至った。

【 0 0 1 2 】すなわち、本発明は、以下の発明を包含する。

(1) カイコ染色体DNAの制限酵素断片長多型を、カイコcDNAをプローブとして用いて検出することを特徴とする、カイコの遺伝子型同定法。

(2) 前記プローブとして、シングルコピー遺伝子に由来するカイコcDNAを用いることを特徴とする、前記

(1) 記載の遺伝子型同定法。

(3) 前記プローブとして、カイコの28対の染色体のうち、10~28対の各染色体に座乗する遺伝子に由来するカイコcDNAを用いることを特徴とする、前記 (1) 又は (2) 記載の遺伝子型同定法。

【 0 0 1 3 】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明のカイコ遺伝子型同定法は、カイコの各染色体DNAの制限酵素断片長多型を、カイコcDNAをプローブとして用いて検出することを特徴とする。カイコ染色体DNAの制限酵素断片は、カイコ染色体DNAを適当な制限酵素で切断することによって得ることができる。

【 0 0 1 4 】カイコ染色体DNAは、カイコから常法に従って抽出することができる。この際、染色体DNAを抽出するカイコの品種、性別、年齢等は特に限定されない。カイコの品種としては、例えば、大造、日02号、c108号、中02号、日203号等の品種を使用することができる。また、カイコ染色体DNAは、カイコの28対の染色体のうち、どの染色体に由来するDNAであってもよく、2種以上の染色体に由来するDNAの混合物であってもよい。

【 0 0 1 5 】カイコ染色体DNAの制限酵素断片を得るために使用する制限酵素は、カイコ染色体DNAを1ヶ所以上切断し得る限り、特に限定されない。使用する制限酵素は、カイコ染色体DNAの塩基配列、カイコ染色体DNAが

由来するカイコの品種等に応じて適宜選択することができる。例えば、「大造」、「日02号」等のカイコ品種に由来する染色体DNAを使用する場合には、例えば、Kpn 1、SacI、EcoRI、HindIII、BglII、BmHI等の制限酵素を使用することができる。制限酵素によるカイコ染色体DNAの切断は、常法に従って行うことができる。

【0016】カイコ染色体DNAの制限酵素断片長多型は、カイコcDNAをプローブとして用いて検出する。ここで、カイコcDNAとは、カイコmRNAと同一又は相補的な塩基配列を有する一本鎖DNAを意味する。プローブとして用いるカイコcDNAの塩基配列は、カイコmRNAと同一又は相補的な塩基配列である限り、特に限定されない。また、プローブとして用いるカイコcDNAの塩基数は、カイコ染色体DNAの制限酵素断片長多型を検出し得る限り、特に限定されないが、通常200～15000塩基であり、好ましくは300～10000塩基であり、さらに好ましくは500～5000塩基である。

【0017】カイコcDNAは、常法に従ってカイコからmRNAを抽出し、カイコmRNAを鋳型とし、オリゴ(dT)をプライマーとして、逆転写酵素によって合成することができる。この際、mRNAを抽出するカイコの品種、性別、年齢等は特に限定されない。mRNAを抽出するカイコの品種としては、例えば、大造、日02号、c108号、中02号、日203号等を例示できる。また、プローブとして使用するカイコcDNAは、その塩基配列に従ってホスホロアミダイド法等の常法に従って、化学合成することもできる。さらに、常法に従って作製したカイコcDNAライブラリーから適当なcDNAクローンを選別し、このcDNAクローンからcDNAプローブを調製することもできる。

【0018】カイコcDNAが由来するカイコ品種とカイコ染色体DNAが由来するカイコ品種とは、同一品種であっても、異なる品種であってもよい。また、カイコcDNAが由来するカイコ個体とカイコ染色体DNAが由来するカイコ個体とは、同一個体であっても、異なる個体であってもよい。

【0019】本発明でプローブとして使用するcDNAは、カイコの28対の染色体のうち、どの染色体に座乗するどの遺伝子に由来するcDNAであってもよいが、カイコ的全染色体上に一対しか存在しない遺伝子、すなわちシングルコピー遺伝子に由来するcDNAであるのが好ましい。例えば、シングルコピー遺伝子に由来するcDNAプローブとしては、例えば、配列番号1～31に記載の塩基配列からなるcDNAを例示することができる。

【0020】シングルコピー遺伝子に由来するcDNAは、例えば、カイコcDNAライブラリーから選別したcDNAクローンをプローブとして、カイコ染色体DNAに対してサザンブロットハイブリダイゼーション法を行い、該cDNAクローンがシングルコピーか否かを判定し、シングルコピーであるcDNAクローンを選別することにより得ることができる。

【0021】本発明でプローブとして使用するcDNAの種類は、カイコの遺伝子型を同定し得る限り特に限定されず、1種類であってもよいし、2種類以上であってもよい。複数のcDNAをプローブとして使用する場合、cDNA同士は同一の染色体に座乗する遺伝子に由来するものであってもよいが、異なる染色体に座乗する遺伝子に由来するものが好ましい。すなわち、複数のcDNAをプローブとして使用する場合、カイコの28対の染色体のうち、10～28対の各染色体に座乗する遺伝子（特にシングルコピー遺伝子）に由来するcDNAを使用するのが好ましく、28対の各染色体に座乗する遺伝子（特にシングルコピー遺伝子）に由来するcDNAを使用するのがさらに好ましい。また、cDNA同士は同一の遺伝子に由来するものであってもよいが、異なる遺伝子に由来するものであるのが好ましい。

【0022】カイコ染色体DNAの制限酵素断片長多型の検出は、常法に従って行うことができる。例えば、カイコcDNAをプローブとしたサザンブロットングにより制限酵素断片長多型を検出することができる。カイコcDNAをプローブとしたサザンブロットングは、例えば、以下のように行うことができる。まず、制限酵素で切断したカイコ染色体DNA断片を電気泳動（例えばアガロース電気泳動）し、該DNA断片をアルカリ変性させた後、電気泳動パターンをそのままニトロセルロース又はナイロン膜に吸着、固定させる。次いで、ニトロセルロース又はナイロン膜に固定したDNA断片に標識したカイコcDNAをハイブリダイズさせ、カイコcDNAの標識を指標として制限酵素断片長多型を検出することができる。この際、カイコcDNAの標識としては、例えば、³²P等の放射性同位体による放射性標識、ビオチンやジゴキシゲニン等による非放射性標識等が挙げられ、これらの標識化は常法に従って行うことができる。

【0023】カイコ染色体DNAの制限酵素断片長多型を、カイコcDNAをプローブとして用いて検出することにより、カイコの遺伝子型を同定することができる。カイコの遺伝子型の同定をより一層精度よく行うためには、カイコの28対の染色体のうち、1～28対、好ましくは10～28対、さらに好ましくは28対の各染色体に由来するDNAについて、その制限酵素断片長多型を検出し、カイコの遺伝子型を同定することが好ましい。

【0024】本発明により同定したカイコの遺伝子型に基づいて、カイコの品種、系統、個体等の識別を再現性及び精度よく行うことができる。例えば、カイコcDNAをプローブとして用いて検出したカイコ染色体DNAの制限酵素断片長多型パターンをカイコの各個体間、各品種間、各系統間で比較することにより、カイコの個体、品種、系統を識別することができる。カイコの個体、品種、系統の識別をより一層精度よく行うためには、カイコの28対の染色体のうち、1～28対、好ましくは10～28対、さらに好ましくは28対の各染色体に由来するDNAに

ついて、その制限酵素断片長多型パターンを比較するのが好ましい。

【 0 0 2 5 】

【実施例】〔実施例 1〕二化性中国種系統で標準的な形蚕である「大造」、及び一化性日本種系統で広食性である「日02号」のカイコ 2 品種に関し、以下のようにして遺伝子型の同定した。

(1) 染色体DNAの調製

5 令 3 日幼虫のカイコを雌雄関係なく、「大造」4 個体、「日02号」4 個体を選別し、これらのカイコから以下のようにして染色体DNAを抽出、調製した。

【 0 0 2 6 】 5 令盛食期のカイコを解剖し、後部絹糸腺を取り出した。後部絹糸腺を液体窒素を入れた乳鉢中で磨細した後、組織重量 (100-200mg) の 10 ~ 20 倍量 (1.0 ~ 1.5ml) の溶液 (50mM EDTA、0.5% SDS 及び 200 µg/ml Protinase K を含む) 中に懸濁し、50 で 1 時間放置した。蒸留水で飽和したフェノール溶液を等量加えて処理し (1 回)、20 分間攪拌した後、冷却遠心分離機によって 1200rpm で 10 分間遠心分離し、上清を回収した。2-ブタノール処理により 0.5ml 以下に濃縮し、1/10 容量の 3M NaOAc を加えた後、2 倍量以上のエタノールを加えて DNA を巻き取った。得られた DNA を 1ml の緩衝液 (組成 : 10mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM EDTA) 中によく溶かした後、RNAse A 5 µg 及び RNase T1 3 µg を加えて RNA を分解した。等量のフェノール - クロロホルム液を加えて 10 分間攪拌した後、微量冷却遠心分離機によって 12000rpm で 10 分間遠心分離し、水層 (DNA を含む) を回収する操作を 2 回繰り返した。得られた水層を 2-ブタノールで 400 µl 程度まで濃縮し、1/10 容量の 3M NaOAc を加えた後、2 倍量のエタノールを加えて DNA を回収した。回収した DNA を 200-400 µl の緩衝液 (組成 : 10mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM EDTA) を加えて良く溶かした後、得られた DNA 量を定量した。その結果、「大造」及び「日02号」の各染色体 DNA がそれぞれ 20 ~ 50 µg、30 ~ 80 µg 得られた。

【 0 0 2 7 】 (2) 制限酵素による染色体DNAの切断と制限酵素断片の電気泳動

「大造」及び「日02号」の各染色体 DNA 1 µg を、EcoRI 20 ユニットで 37 °C、1 時間酵素処理した。また、「大造」及び「日02号」の各染色体 DNA 1 µg を、HindIII 20 ユニットで 37 °C、1 時間酵素処理した。制限酵素で処理した各染色体 DNA 1 µg (10 µl) をアガロースゲルの各レーンに入れ、分子量マーカー及び DIG (ジゴキシゲニン) マーカーを含む溶液 5 µl を一番端のレーンに入れた。電気泳動システム (宝酒造社) を用いて 50-75V (50-80mA) で約 2 ~ 3 時間電気泳動した。

【 0 0 2 8 】 (3) プロットング

電気泳動後、DNA のプリン塩基を部分的に切断するために、DNA を 0.1 ~ 0.2N HCl と 15 ~ 30 分間 (BPB が青から黄色に変わる前ぐらいまで) 反応させた。さらに、DNA を二本鎖から一本鎖へと変性させるために、DNA を十分量

の 0.5N NaOH 及び 1.5M NaCl と反応させた (15 分間で 2 回又は 30 分間で 1 回) 。

【 0 0 2 9 】 事前に 20 × SSC に浸しておいたフィルター上へ電気泳動後のゲルを乗せ、Vacuoblot system (LKB 社) を用いて 60 分間以上吸引することによりフィルター上に DNA をトランスファーした。その後、紫外線で 3 ~ 5 分間処理するか又は 120 °C で 1 時間処理するか、あるいはその両方の処理を施すことにより DNA を固定化した。塩を除くため 2 × SSC 及び 0.1% SDS を含む溶液中で、フィルターを 37 °C で 30 分間インキュベートした。

【 0 0 3 0 】 (4) cDNA プロブの調製

胚発生 3 日目のカイコに由来する cDNA ライブラリーを以下のように作製した。胚発生 3 日目のカイコからフェノール法により核酸を調製した後、LiCl を用いた沈殿により RNA を調製した。次いで、oligo(dT) カラムにより mRNA を調製し、これを出発材料として Promega 社の cDNA 合成キットにより cDNA を合成し、ファージをベクターとして cDNA ライブラリーを作製した。

【 0 0 3 1 】 cDNA ライブラリーから cDNA クローンを無差別に選択した。ゲノム DNA を用いたサザンプロット法により、無差別に選択した cDNA クローンがシングルコピー遺伝子であるか否かを確認した。そして、シングルコピー遺伝子由来の cDNA クローンから ジゴキシゲニン標識リボプロブを調製した。cDNA クローンからのプロブの調製は、以下のように行った。

【 0 0 3 2 】 目的の cDNA を含むファージを培養液 20ml 中で一晚培養した後、ポリエチレングリコールを加えファージを沈殿させて回収した。回収したファージを 0.6g/ml の CsCl 密度勾配液中で超遠心により精製した。精製したファージを 0.5% SDS 及び 100mg/ml Protinase K を用いて 65 °C で 1 時間処理して破壊した後、溶液中のファージ DNA を 1g/ml の CsCl 密度勾配液中で超遠心して精製した。得られたファージ DNA を EcoRI で酵素処理して、ファージ DNA に組み込まれているカイコの cDNA を切り出した。切り出したカイコ cDNA をプラスミド pGEM3Zf (+) に組み込み、該プラスミドを大腸菌に導入して培養した後、プラスミド DNA を精製した。プラスミド DNA を HindIII で処理して得られる DNA 断片を鋳型とし、DNA ラベリングキット (ベーリンガー社) を用いて (又は T7, T3 SP6 ポリメラーゼによる in vitro transcription により) ジゴキシゲニン標識リボプロブ (プロブ E17) を調製した。プロブ E17 の塩基配列を配列番号 1 に示す。

【 0 0 3 3 】 (5) RFLP の検出

以下のようなプレハイブリダイゼーション溶液を調製した。

【 0 0 3 4 】

		最終濃度
20×SSC	2.5ml	5×SSC
ホルムアミド	5.0ml	50%
10%SDS	0.5ml	0.5%
ブロッキング溶液	1.0ml	0.1%
DD Water	1.0ml	
Total	10ml	

【0035】なお、ブロッキング溶液は市販のDNA検出キットに含まれているものを使用した。このプレハイブリダイゼーション溶液をフィルター1cm²あたり0.1~0.2ml (フィルター1つあたり約10ml) を用いて、上記(3)でDNAをプロットしたフィルターを37~42℃で1時間以上インキュベーションし、プレハイブリダイゼーションを行った。

【0036】その後、プレハイブリダイゼーション溶液1mlあたり50ng以下のプローブE17を加え、42℃で5時間以上、ストリンジントな条件下で反応させ、プローブE17をハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後、2×SSC及び0.1% SDSを含む250mlの溶液を用いて室温で20分間の洗浄を2回行い、次いで、0.1×SSC及び0.1% SDSを含む250mlの溶液を用いて65℃で20分間の洗浄を2回行った。

【0037】その後、少量の洗浄用緩衝液(組成:0.1M maleic Acid-NaOH, 0.15M NaCl, pH 7.5, 0.3% tween 20)で洗浄し、緩衝液2(組成:0.1M maleic Acid-NaOH, 0.15M NaCl, pH 7.5, 0.3% tween20)と1/10量の緩衝液2に溶かした10%ブロッキング試薬を混合した溶液100ml/100cm²とを用いて30分間洗浄した。

【0038】1/10000抗体(Anti-DIG-Alkaline phosphatase conjugate:抗DIG抗体とアルカリホスファターゼとを結合させたもの)、緩衝液2で希釈した溶液100mlのうちの10µl、をフィルターと反応させた後、洗浄用緩衝液100ml/100cm²を用いてフィルターを2×15分間洗浄し、洗浄したフィルターを40~50mlの緩衝液3(組成:100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, pH9.5)に3~5分間浸し平衡化した。

【0039】そして、10ml/100cm²の基質溶液、CSPDを100倍量の緩衝液3に溶かし、これをフィルターと反応させた。空気乾燥させるか、又はプラスチックフィルム内の液を除去した。37℃で15分間放置した後、カセットに置いてX線フィルムに露光し、現像した。

【0040】(6) 結果

得られたRFLPパターンを図1に示す。なお、図1中、Mは分子量マーカを表す。図1に示すように、いずれのRFLPパターンも、明瞭な1本又は2本のバンドとして検出することができ、「大造」及び「日02号」の両品種ともほとんど個体間差はなかった。

【0041】また、図1に示すように、制限酵素EcoRIを使用した場合には、両品種とも同じRFLPパターンを示

し、両品種を区別できなかったが、制限酵素HindIIIを使用した場合には、両品種のRFLPパターンは異なり、両品種を区別できた。以上の結果から、カイコcDNAをプローブとして用いることによりカイコ染色体DNAのRFLPパターンを精度よく検出することができ、このRFLPパターンに基づいてカイコの各個体の遺伝子型を同定できることが判明した。さらに、このように同定したカイコの遺伝子型に基づいて、カイコの品種を精度よく識別できることが判明した。

【0042】〔実施例2〕

(1) 染色体DNAの調製

「大造」及び「日02号」とその「F₁」の混合試料から実施例1と同様の方法により染色体DNAを調製した。使用したカイコの性別、年齢等は実施例1と同様であり、各試料は10個体分の混合試料である。

(2) 制限酵素による染色体DNAの切断と制限酵素断片の電気泳動

カイコ染色体DNAを実施例1と同様の条件下で制限酵素(EcoRI, HindIII)処理し、制限酵素断片を実施例1と同様の方法により電気泳動した。

(3) プロットング

電気泳動後、実施例1と同様の方法によりプロットングした。

【0043】(4) プローブの調製

実施例1で調製したカイコ胚発生3日目のcDNAライブラリーからcDNAクローンを無差別に選択し、ゲノムDNAを用いたサザン法により、無差別に選択したcDNAクローンがシングルコピー遺伝子であるか否かを確認した。そして、シングルコピー遺伝子由来のcDNAクローンからジゴキシゲニン標識リボプローブ(プローブE61、プローブE96)を調製した。プローブE61の塩基配列を配列番号2に、プローブE96の塩基配列を配列番号3に示す。

(5) RFLPの検出

「大造」及び「日02号」とその「F₁」の染色体DNAのRFLPを、プローブE61及びプローブE96を用いて実施例1と同様の方法により検出した。

【0044】(6) 結果

得られたRFLPパターンを図2に示す。図2中、Mは分子量マーカ、レーン1は大造のRFLPパターン、レーン2は日02号のRFLPパターン、レーン3はF₁のRFLPパターンを示す。図2Aに示すように、ある遺伝子座では、両品種とも遺伝子型がホモであるため、F₁のRFLPパターンは両品種のRFLPパターンが合わさったものとなった。

【0045】一方、図2Bに示すように、別の遺伝子座では、「大造」が示すバンドのすべてがF₁でも見られるが、「日02号」の示すバンドの一部はF₁では見られなかった。すなわち、「日02号」には高分子量の1本のバンドを示すタイプと低分子量の2本のバンドを示すタイプの2種類の対立遺伝子が存在し、この個体の遺伝子型はヘテロであることが判明した。

【 0 0 4 6 】この結果から、カイコcDNAをプローブとして用いることによりカイコ染色体DNAのRFLPパターンを精度よく検出することができ、カイコ染色体DNAのRFLPパターンに基づいてカイコの各個体の遺伝子型を同定できることが判明した。さらに、このように同定したカイコの遺伝子型に基づいて、カイコの品種や系統を識別できることが判明した。

【 0 0 4 7 】〔実施例 3〕大造と日02号の両品種について、28本の染色体のそれぞれに座乗する遺伝子座のRFLPを検出した。

(1) カイコ染色体の調製

「大造」及び「日02号」の各品種のカイコから、実施例 1 と同様の方法により28対の染色体DNAを調製した。

(2) 制限酵素による染色体の切断と制限酵素断片の電気泳動

各染色体DNA 1 µgを制限酵素 (EcoRI、HindIII、BamHI、KpnI又はSacI) 20ユニットと37 °Cで1時間処理し、制限酵素断片を実施例 1 と同様の方法により電気泳動した。なお、各染色体DNAを処理した制限酵素の種類は以下に示す表 1 の通りである。

【 0 0 4 8 】 (3) プロットティング

電気泳動後、実施例 1 と同様の方法によりプロットティングした。

(4) cDNAプローブの調製

実施例 1 で作製したカイコ胚発生3日目のcDNAライブラリーから、28対の各染色体DNA上に座乗し、かつ全染色体上に一対しか存在しないシングルコピー遺伝子に由来するcDNAクローンを選別した。

【 0 0 4 9 】これらのcDNAクローンから実施例 1 と同様にしてジゴキシゲニン標識リボプローブを調製した。調製したプローブは、プローブE61 (配列番号 4)、プロ

ーブE76 (配列番号 5)、プローブE52 (配列番号 6)、プローブE23 (配列番号 7)、プローブE48 (配列番号 8)、プローブ3L (配列番号 9)、プローブE53 (配列番号10)、プローブE29 (配列番号11)、プローブE73 (配列番号12)、プローブE89 (配列番号13)、プローブE20 (配列番号14)、プローブE64 (配列番号15)、プローブE47 (配列番号16)、プローブE88 (配列番号17)、プローブM016 (配列番号18)、プローブE101 (配列番号19)、プローブM251 (配列番号20)、プローブE24 (配列番号21)、プローブM289 (配列番号22)、プローブE96 (配列番号23)、プローブM268 (配列番号24)、プローブM248 (配列番号25)、プローブE49 (配列番号26)、プローブE10 (配列番号27)、プローブEp40 (配列番号28)、プローブM017 (配列番号29)、プローブM291 (配列番号30)及びプローブM275 (配列番号31)である。なお、配列番号 1 の67番目、91番目及び96番目、配列番号 7 の109番目、配列番号13の58番目、配列番号18の51番目及び124番目、並びに配列番号19の80番目における「n」で表される塩基は、「a」、「c」、「g」、「t」及び「u」のいずれかの塩基を表す。

【 0 0 5 0 】 (5) RFLPの検出

「大造」及び「日02号」の28本の各染色体のRFLPを、上記プローブを用いて実施例 1 と同様の方法により検出した。各染色体のRFLPの検出に使用したプローブ及び制限酵素の種類は、以下に示す表 1 の通りである。

(6) 結果

検出された各染色体のRFLPのバンドサイズを表 1 に示す。

【 0 0 5 1 】

30 【表 1】

蚕品種における各染色体の cDNA プローブによって検出される RFLP の
バンドサイズ (Kb)

染色体	プローブ	制限酵素	品 種	
			大造 p50	日2号
1	E61	<i>KpnI</i>	3.0	2.5
2	E76	<i>KpnI</i>	7.0	8.0
3	E52	<i>SacI</i>	3.3	1.5+1.8
4	E23	<i>SacI</i>	2.0+2.5	5.0
5	E48	<i>EcoRI</i>	2.5	3.0
6	3L	<i>EcoRI</i>	5.5+3.0	5.5+2.5
7	E53	<i>KpnI</i>	6.0	3.0
8	E29	<i>EcoRI</i>	8.5	9.0
9	E73	<i>EcoRI</i>	9.0	6.5
10	E89	<i>HindIII</i>	10.0	2.5
11	E20	<i>EcoRI</i>	3.0+8.5	9.0
12	E64	<i>KpnI</i>	9.0	8.0
13	E47	<i>EcoRI</i>	8.0	3.8
14	E88	<i>HindIII</i>	9.0	7.0
15	M016	<i>BglII</i>	12.0	7.0
16	E101	<i>KpnI</i>	2.0	1.5
17	M251	<i>HindIII</i>	9.0	4.0
18	E24	<i>SacI</i>	2.0+10.0	4.0+6.0
19	M289	<i>EcoRI</i>	3.0	4.4
20	E96	<i>SacI</i>	2.0+2.5	6.5
21	M268	<i>HindIII</i>	3.0	2.0
22	M248	<i>EcoRI</i>	7.0	10.0
23	E49	<i>HindIII</i>	2.0	2.5
24	E10	<i>EcoRI</i>	8.0	15.0
25	Ep40	<i>HindIII</i>	7.0	5.0
26	M017	<i>KpnI</i>	15.0	5.0
27	M291	<i>HindIII</i>	8.0	3.0
28	M275	<i>EcoRI</i>	15.0	18.0

【0052】表1に示すように、両品種とも各遺伝子座において1又は2本のバンドを示し、品種間の差を検出できた。従って、両品種は28本の全ての染色体において異なる遺伝子構成をもっており、明らかに異なる品種であると識別できた。

【0053】この結果から、カイコcDNAをプローブとして用いることにより、カイコの各染色体に由来するDNAのRFLPパターンを精度よく検出できることが判明した。また、カイコの各染色体上には少なくとも1対のシングルコピー遺伝子が存在しており、このシングルコピー遺伝子に由来するcDNAをプローブとして用いることにより、各染色体のRFLPパターンが単純なパターンとして容易かつ迅速に検出できることが判明した。さらに、より多くのカイコ染色体DNAのRFLPを検出することにより、カイコの遺伝子型をより一層精度よく検出でき、これによってカイコの品種をより一層精度よく識別できることが判明した。

【0054】

【発明の効果】本発明で使用するcDNAプローブは、生物

にとって意味のあるマーカーである。従って、カイコ染色体DNAのRFLP検出にcDNAプローブを使用する場合には、従来から使用されているRAPD、マイクロサテライト、ジェノミックプローブ、反復配列等のマーカーを使用する場合よりも、客観的な指標に基づいて、カイコの品種、系統、個体等を再現性及び精度よく識別できる。

【0055】また、cDNAプローブとして、シングルコピー遺伝子に由来するcDNAを使用する場合には、単純なRFLPとして検出されるので、カイコの品種、系統、個体等を容易かつ迅速に識別できる。このようなシングルコピー遺伝子に由来するcDNAは、カイコの各染色体上に少なくとも1対は存在するので、カイコの28対の染色体のうち、どの染色体に由来するDNAの制限酵素断片長多型も容易かつ迅速に検出できる。異なる品種や系統間で全染色体のRFLPが一致する可能性は極めて少ないので、全染色体のRFLPを検出すれば、微細な遺伝子型の相違をも検出でき、特定の遺伝子や染色体に偏ることなく、品種や系統を分類・識別できる。

【0056】さらに、cDNAプローブを用いたRFLPの検出

により、カイコの遺伝子型を共優性形質として解析で
き、カイコの遺伝子型がヘテロ型であるかホモ型である
かを区別できる。

【 0 0 5 7 】

【配列表】

Sequence Listing

<110> Director General, National Institute of Sericultural And
Entomological Science

<120> Method for identifying genotype of the silkworm by using cDNA clones on every chromosome

<130> P98-0574

<160> 31

<210> 1

<211> 141

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> n

<222> 67

<223> a,c,g,t or u

<220>

<221> n

<223> 91

<220> a,c,g,t or u

<220>

<221> n

<223> 96

<220> a,c,g,t or u

<220>

<223> probe E17

<400> 1

atgccgtttc tgaaggaac atccagaagg acaacattgc cattaattc cagggtaact 60

ccaaggnat tggcatgaa aaactatc ntcganatca gcagtaaaga cgctgtagt 120

ggaaagagat tgaattcca t 141

<210> 2

<211> 143

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> probe E61

<400> 2

aattccgga actctgtgt cgatctctac tcggataca agaacaaaa gctccgctg 60

aatataaaca taccgttgaa gacggagctt aaagttgaac aagaggctac acacaaacac 120

attgaggagg acagaaagat gct 143

<210> 3

<211> 144

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> probe E96

<400> 3

atgtcaggca aagacattga gaaacccag gcagaggtct cccctattca ccgcatcagg 60

17
 atcactctta cttctcgcaa tgtgcgctca ctcgagaagg tctgtgctga cctaatacaat 120
 ggagccaaga aacagaagct gcgt 144
 <210> 4
 <211> 143
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> probe E61
 <400> 4
 aattccggga actctgttgt cgatctctac tcgggataca agaacaaaaa gctccgcgtg 60
 aatataaaca taccgttgaa gacggagcct aaagttgaac aagaggctac acacaaacac 120
 attgaggagg acagaaagat gct 143
 <210> 5
 <211> 144
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> probe E76
 <400> 5
 cggcgccgat gtcacatgct atgcgaaacc ggggttcgag actggccgtg tttgctttta 60
 gactcgctat aactcacgag cgctcacgag tgctcatagt caaactgggt tactcacgcg 120
 gcaatataag tcgatacgtg agcg 144
 <210> 6
 <211> 143
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> probe E52
 <400> 6
 cgcgaaatagg acttatttat ttgaatttcc tgcgaattat aagtcgcctt ctacgccagt 60
 gtgtgtaaag gcttgactta tacaactact gctttcacga gcacatattt ttttgaatat 120
 cgtcaaagaa tctgtgatta taa 143
 <210> 7
 <211> 144
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <221> n
 <223> 109
 <220> a,c,g,t or u
 <220>
 <223> probe E23
 <400> 7
 cggttttttt cgccattttt cgccgaaagt ttggtatcag atttaggtca cgtatctttt 60
 cgtggccttt aaatcgctga attaataact gttcaacatg gtcgagaana agcctaagaa 120
 gaaggtaggg aagaaagtag ccgc 144
 <210> 8
 <211> 143
 <212> DNA
 <213> Artificial

19

20

<220>

<223> probe E48

<400> 8

ccagctgagc gccggctgct accattacca gttggctctgg tgtcaaaatt ccggaacaa 60
 ttgggaacc atcgcaaat ctggactaa agctttcatg gaggctcttc aagcaggctc 120
 cgacatcagc atgattggac agt 143

<210> 9

<211> 142

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> probe 3L

<400> 9

atcgaacaag atagatggcc gagaacaaat gaggagacac cgtccgtcaa caacgcgtaa 60
 atcgacagtg agttcagcaa acgtcattta gtgaatggat tcggaagtgt ttgtgtgtg 120
 actgaattgt gataacgtag tg 142

<210> 10

<211> 138

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> probe E53

<400> 10

cagtacaaca gaagatttgt caacgttgtg cagaccttcg gacgtcgtcg cggacccaac 60
 tccaattcat agatttataa gtaaataaaa tgcaaaagta acatcaattt tgcaaaaaaa 120
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 138

<210> 11

<211> 143

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> probe E29

<400> 11

gggtttccag gtgtacgacg ggtagcaatt gctccactta ataggaagca ttactattca 60
 cgccccgcct cccagtgca cccgcgatga tccctcagcc gccccgcaga acaggctttt 120
 tcgaacatta cgaagagtgt atc 143

<210> 12

<211> 144

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> probe E73

<400> 12

cgggtgaaaa tgacgggctt tagcaataag gccatagtga tcgatggccg tggatcatctg 60
 ctgggccgtc tggcggcagt catcgccaag gtccttctcg aaggaacaa agttgtgtg 120
 gttcgctgcg aacaaatcaa catc 144

<210> 13

<211> 143

<212> DNA

<213> Artificial

21

22

<220>
 <221> n
 <223> 58
 <220> a,c,g,t or u
 <220>
 <223> probe E89
 <400> 13
 cgtatagtct gtcaatctcc ggggaattgg tttgtgaga tttgcgacaa aacgttntc 60
 cagaaggaag ggcttgtcgt ctcaattggt gtttcattcg tcaacagctt catacgaatg 120
 cgactattgc ggaagaat tta 143
 <210> 14
 <211> 142
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> probe E20
 <400> 14
 cggctaacc gtttacta gataagtaa tagaaaaga gattaggaat actcgatttg 60
 gtcgctggta gctccagtct agacaatttc ctcatatcta aagctcgctt aactctcatt 120
 gctttcaatt cactatgcac tt 142
 <210> 15
 <211> 145
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> probe E64
 <400> 15
 taccactaa tgggatggt gatgacctg ggcggctgcc ttcctcatct gagcgagcac 60
 gttgctaagt ccttcacgct tcctcttggc gcggatgtgt gtgccaatc gtcgcttcaa 120
 gaacttcaga gcacgcttgt ctttt 145
 <210> 16
 <211> 145
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> probe E47
 <400> 16
 ctcttttaa aacctctcat tgcgcaatct tctacaattc caatactatt gtcatttgtt 60
 tttagcactg tgcgtgtgtt tggctcgaat ttaccgatt cgtagggaca tgttgtgtgt 120
 aagtaaataat ggtccgttg tttcg 145
 <210> 17
 <211> 142
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> probe E88
 <400> 17
 catcaaac tcttatagga gaaaaattc agagatttct aaaccattat acaggtcgct 60
 tacataagat ttaatcaata taagtttaa tcgagagaaa ttcgcataat atatttgtca 120
 cacaaagcga ttgaatatta cc 142

23
 <210> 18
 <211> 143
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <221> n
 <223> 51
 <220> a,c,g,t or u
 <220>
 <221> n
 <223> 124
 <220> a,c,g,t or u
 <220>
 <223> probe M016
 <400> 18
 aaatatagca tacaacagta tcttgattaa tttactaac tttccacca nagcttgag 60
 ttacctgcat ttgcttatat gtcgtcagtt cactgttact gtaaaatctg catttctata 120
 cttnngtittg ttgtgtgtaa atg 143

<210> 19
 <211> 144
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <221> n
 <223> 80
 <220> a,c,g,t or u
 <220>
 <223> probe E101
 <400> 19
 ataggagttt gctggtggct gaccccgctc gctgcgagcc caagaagttc ggtgggccag 60
 gtgcccgctc cagataccan aaatcttacc gttaagcctt caacgaaacc atcgggtggt 120
 atcgtcggcg cggctctgtg tcat 144

<210> 20
 <211> 141
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> probe M251
 <400> 20
 atgacaatag tttctattta ttatattgat tgttaccat atcacaaga gtgccgacag 60
 actaatcgtg taaagctata attataaaat cacatcttac tgatatggga tctagctaac 120
 tcgtgagttc gcacgagatt t 141

<210> 21
 <211> 145
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> probe E24
 <400> 21
 tcaaggacc acctccacca gaagaaggat tgctctgtgt tcccttaccg ggagctatgg 60

25
 gcgggcctgg aagtgctcgt gctgctggta gaggcactgg cccgggcgga gtacctccgg 120
 gtcttcaagg tcctgccaga ggagt 145
 <210> 22
 <211> 142
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> probe M289
 <400> 22
 atcctgtttc ataaatcaat ttgatcagca tccaagagct agcacacacg aatgtattat 60
 gcaaaccggc tttgaattga gtattcactt gcaaccgtca tattgtgtta taaccctatt 120
 ttaatgacag atcggttcca tc 142
 <210> 23
 <211> 144
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> probe E96
 <400> 23
 atgtcaggca aagacattga gaaaccccag gcagaggctt cccctattca ccgcatcagg 60
 atcactctta cttctcgcaa tgtgcgctca ctcgagaagg tctgtgctga cctaatacaat 120
 ggagccaaga aacagaagct gcgt 144
 <210> 24
 <211> 142
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> probe M268
 <400> 24
 ataaatttgt tttattttat tcaaattaa taattcataa caactagcaa acatcaatta 60
 ctactactag tagcagtact aggtgcacac tcctgttcga cagcatgtga aggaggatgc 120
 tctaacacag tgtctattat ac 142
 <210> 25
 <211> 141
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> probe M248
 <400> 25
 gcttgaattc atttattagt cattgaacag caattataag tgataagttt tctctttcaa 60
 gtactacaa taaacagtac aatcaatata aataattctc aatccgaaaa atagaatgtt 120
 ggtgttccag catgaatcgt g 141
 <210> 26
 <211> 142
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> probe E29
 <400> 26

27 28

aagaaccagg tggcgatgaa ccccaacaac acaatattcg atgccaaacg tctcatcgga 60
 cgtaagtctg aagatgctac tgtgcaagcc gacatgaagc actggccttt cgaggttgtc 120
 agtgatggag gcaaaccctaa ga 142

<210> 27
 <211> 143
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> probe E10
 <400> 27

cggtatttaa attactttac ttcacgtaac ctctgacag cagatctgca tgatgaggca 60
 gcagtagtgg agaataccca agctcctcct gctacagtcc tcttgcatcg cttacaagac 120
 cagatgccga cacaagaacg ttt 143

<210> 28
 <211> 140
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> probe Ep40
 <400> 28

caaaaaagta ttttatttaa tcaaaccagc atataaacia ttcaagactt ttttaataag 60
 cagtcctatt ccaaagtat tctgctcttt ttacattac aattaagaac aaacaattac 120
 tgtccgaaa agaaaaaaaa 140

<210> 29
 <211> 141
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> probe M017
 <400> 29

gctgttctta acatttttac aaacatcatt tcattatcac agatgtaat atttaatatg 60
 ctatttaaatt attaaatgaa ttcatatttg aaattaatta ttgcataaaa caataatgaa 120
 ttggttcatg ctgctgcatt g 141

<210> 30
 <211> 142
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> probe M291
 <400> 30

aaatittgaa aacaatatca aatttaatac ataaataata tttatgtatt tctacataca 60
 tgttttcgtc tatatatatt tacattgaaa cacataatct tcctaattaa aattatctaa 120
 aatttcacgt tttctttttc gt 142

<210> 31
 <211> 144
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> probe M275
 <400> 31

```

atTTTTgtga ttttgataat tatttttact gttagattta gtgatatttg atttcagtaa 60
gctgacaaaa ttattctttt tatttgattt tccatcttca ttactattt tgttactatt 120
ctcattcttg tttttatttt tctg 144

```

【図面の簡単な説明】

【図 1】大造及び日02号のRFLPを示す図である。

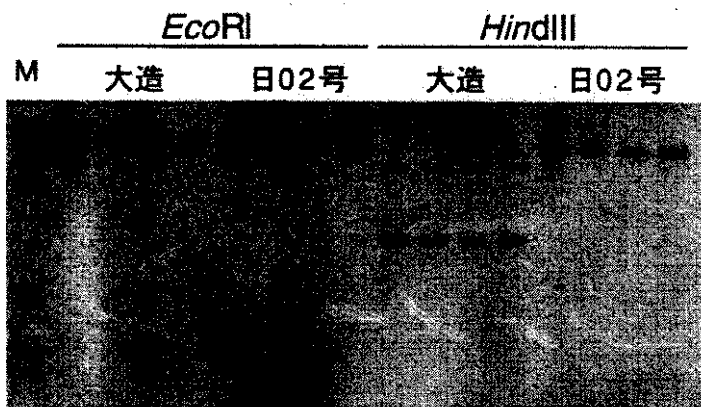
【図 2】大造及び日02号並びにそれらの雑種第一代 (F₁) のRFLPを示す図である。

【要約】

【解決手段】 カイコ染色体DNAの制限酵素断片長多型を、カイコcDNAをプローブとして用いて検出することを特徴とする、カイコの遺伝子型同定法である。

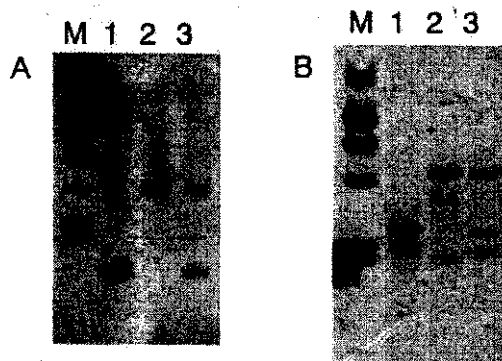
【効果】 客観的な指標に基づいて、カイコの品種、系統、個体等を再現性及び精度よく識別できる。

【図 1】



異なる制限酵素処理によって得られるRFLPの品種間差
Mは分子量マーカー

【図 2】



RFLPパターンによる異なる遺伝子型
Aのクローンでは大造および日02号共にホモ型であるが、Bのクローンでは日02号がヘテロ型である。M：分子量マーカー
1：大造、2：日02号、3：F₁

フロントページの続き

(72)発明者 山本 俊雄

長野県松本市中山字二山1147 - 25

(56)参考文献 特開 平11 - 116599 (J P , A)

特開 平11 - 337183 (J P , A)

Chromosoma , 103 (1994) ,
(7) , p . 468 - 474

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷ , DB名)

C12N 15/00

C12Q 1/68

A01K 67/033

B I O S I S (D I A L O G)

G e n B a n k / E M B L / D D B J

W P I (D I A L O G)