

東北蚕糸・昆虫利用研究報告

第 38 号

平成 25 年 12 月

日本蚕糸学会東北支部

No.38 目 次

高 ひとみ

小野 慎子

佐藤 昌直

浅野 眞一郎

伴戸 久徳

BmNPV の非必須遺伝子 (Bm32~Bm36) 間相互作用解析 1

鈴木 一生

安河内 祐二

伴野 豊

佐原 健

BAC-FISH を用いたカイコ染色体突然変異系統の解析 4

半谷 大輝

浅野 眞一郎

伴戸 久徳

Cry8Da トキシンのオリゴマー化に関わる ADAM の機能解析 8

小林 洋平

浅野 眞一郎

伴戸 久徳

ネッタイシマカ ALP の Cry11Aa トキシンレセプターとしての機能調査 10

BmNPV の非必須遺伝子 (Bm32~Bm36) 間相互作用解析

高 ひとみ¹・小野 慎子²・佐藤 昌直³・浅野 眞一郎¹・伴戸 久徳¹
北海道大学大学院農学院¹・大阪大学微生物病研究所²・基礎生物学研究所³

バキュロウイルス科に属する核多角体病ウイルス (*Nucleopolyhedrovirus* ; NPV) は、感染後期における多角体タンパク質 (Polh) の高発現能を利用した効率の良い遺伝子発現ベクター (BEV) として広く利用されている。特にカイコを宿主とする *Bombyx mori* NPV とカイコ個体を用いる発現系は真核生物における最も効率の良い系の一つとして知られている。BEV の有用特性を人為的に操作することが出来れば、更なる高次利用が期待できる。そのためにはウイルス増殖と Polh の大量発現に関わる遺伝子群の特定とそれらの制御に関わる遺伝子間相互作用に関する知見の蓄積が不可欠である。

130 個以上存在する BmNPV 遺伝子の機能と相互作用について体系的な解析を進めるためには、効率的なウイルスゲノムの改変システムが必要である。我々はこれまでに、大腸菌内で組換えウイルスゲノムを複製可能な BmNPV バクミドシステムを確立し (ONO *et al.*, 2007)、さらに λ red recombination システム (DATSENKO and WANNER, 2000) を導入することで効率の良いゲノム改変システムを構築した (ONO *et al.*, 2012)。また、本システムを用いて作製した単一遺伝子ノックアウト BmNPV の解析から、約 2/3 のウイルス遺伝子はカイコ卵巣由来 BmN 細胞におけるウイルス増殖に甚大な影響を与えない非必須 (アクセサリー) 遺伝子であることを報告した (ONO *et al.*, 2012)。現在、複数の遺伝子を同時に欠失させた多様なノックアウト BmNPV を作製し、ウイルス増殖と Polh 大量発現の制御に関わる遺伝

子の遺伝学的相互作用について解析を進めている。

最近、非必須遺伝子クラスターの一部である *Bm11~Bm14* のノックアウトがウイルス増殖に与える影響について Polh 遺伝子 (*polh*) プロモーター下流に組み込んだ EGFP 遺伝子 (*egfp*) の発現を指標に解析した。*Bm11* は近縁種の *Autographa californica* multiple NPV の *Ac19* のホモログであり、機能は不明である。*Bm12* は *arif-1* (*actin rearrangement inducing factor*) のホモログであり、*arif-1* は感染細胞におけるアクチンの再編成を引き起こす (RONCARATI and KNEBEL-MORSOLF, 1997) と報告されている。*Bm13* は *pif-2* (*per os infectivity factor*) のホモログであり、経口感染に必須 (OHKAWA *et al.*, 2002) とされているが、培養細胞感染に機能は報告されていない。*Bm14* は Group II バキュロウイルスの膜融合タンパク質である F protein のホモログ遺伝子であると報告があるが、BmNPV や AcMNPV が属する Group I バキュロウイルスでは GP64 がその役割を果たすため、Group I NPV における機能は明らかになっていない。我々の解析結果から、これらの遺伝子の複数ノックアウトの影響は必ずしも単一遺伝子ノックアウトの影響の単純な総和ではないことが判明した。即ち、*Bm11* と *Bm12*, *Bm12* と *Bm13*, *Bm13* と *Bm14* の間には、相乗的、相加的、補償的な相互作用が見られた。 (TAKA *et al.*, 2013)。また、*Bm11~Bm14* の 4 個の遺伝子全てをノックアウトさせた場合にもウイルスは増殖可能であった。今回は、ゲノム領域において隣接して存在する他の非必須遺伝子群 *Bm32~Bm36*

について同様の解析を行った結果を報告する。

材 料 と 方 法

BmNPV のバクミドシステムと λ red recombination システムを利用して、*Bm32*~*Bm35* の 4 個のウイルス遺伝子について、複数個をクロラムフェニコール耐性遺伝子に置換したノックアウトウイルスを作製した。作製した各ノックアウトウイルスを BmN 細胞にトランスフェクションし、0 時間、24 時間、48 時間、72 時間、96 時間、120 時間において蛍光顕微鏡による観察と infinite M200PRO (Tecan) で蛍光強度の測定を行うことで、*polh* プロモーター制御下に組み込んだ EGFP の発現を指標に、遺伝子ノックアウトがウイルス増殖に与える影響を解析した。

結 果 と 考 察

Bm32~*Bm35* の 4 個遺伝子に関する単一遺伝子ノックアウトウイルスを BmN 細胞にトランスフェクションし、EGFP 蛍光を指標に感染の広がりを経時的に観察した。その結果、蛍光の強度にはばらつきが認められたが、いずれもコントロールウイルス(バクミドの *polh* を *egfp* に組み換えたもの)と同様に経時的に蛍光を発する細胞が増加し、120 時間後には培養細胞シートのほぼ全域に蛍光が拡大した。これらの結果は、既に報告した観察結果と一致していた (ONO et al., 2012)。今回、さらにこれらの蛍光強度を定量測定し、相互に比較した。トランスフェクション後 120 時間目の蛍光強度を比較すると、*Bm32* をノックアウトした場合にはコントロールウイルスの約 1/3 に蛍光強度が減少したが、*Bm33* あるいは *Bm34* をノックアウトした場合にはコントロールウイルスとほぼ同等の蛍光強度が観察された。また、*Bm35* をノックアウトすると蛍光強度はコントロールウイルスの 1/10 以下であった。次に、複数遺伝子のノックアウトウイルスで同様の解析を行った。

Bm32 と *Bm33* を同時にノックアウトした場合の蛍光強度は *Bm32* 単独ノックアウト、即ち蛍光強度の低い方と同様の値となった。また、コントロールウイルスと同等の蛍光強度が認められた *Bm33* と *Bm34* の両方をノックアウトした場合、蛍光強度に変化は認められず、コントロールウイルスと同等であった。一方、*Bm34* と *Bm35* を同時にノックアウトした場合の蛍光強度は、逆に蛍光強度の強い *Bm34* と同等であった。

以上の結果から、*Bm32* と *Bm33*、*Bm34* と *Bm35* の間には、それぞれ相加的あるいは補償的な相互作用が存在することが推定される。また、これら 4 個の遺伝子全てをノックアウトした場合にも増殖能は保持された。この結果は、既に報告した結果 (TAKA et al., 2013) と同様、非必須遺伝子間の多様な相互作用の上に、ウイルスの効率の良い増殖が達成されることを示唆している。BEV の機能操作技術の確立には非必須遺伝子間の相互作用について一層理解を深める必要がある。

これらの観察は、ウイルスゲノムは大別すると「増殖を可能にする基本機能のための最低限のウイルス遺伝子セット」と「宿主適応度、即ち、その宿主での増殖効率を高めるためのウイルス遺伝子セット」の 2 種類の遺伝子群により構成されているという考えを支持するものと言える。しかし、ここで観察された非必須遺伝子間の補償的な相互作用の存在は、ウイルスの増殖に必須な機能を複数の非必須遺伝子が担い、感染・増殖のロバストネスを向上させている可能性を示唆している。非必須遺伝子の重要性はこれまであまり議論されてこなかったが、我々の一連の解析結果は非必須遺伝子群の果たす役割の生物学的意義の高さを示唆している。この解析を更に発展させて、ウイルスの増殖を可能にする最小限の遺伝子セットを特定することは「ウイルス増殖機構の基礎・本質的理解」と「ロバストネス獲得・宿主適応の進化過程の理解」の両方の基盤であり、極めて重要な作業と言える。

文 献

- DATSENKO KA. and WANNER BL. (2000): *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **97**, 6640-6645.
- ONO C. et al. (2007): *J. Insect Biotech. Sericol.* **76**, 161-167.
- ONO C. et al. (2012) : *Virus Res.*, **165**, 197-206.
- OHKAWA T. et al. (2002) : *J. Virol.*, **76**, 12281-12289.
- RONCARATI R. and KNEBEL-MÖRSDOLF D. (1997): *J. Virol.*, **71**, 7933-7941.
- TAKA H et al. (2013): *J. Insect Biotech. Sericol.*, **82**, 25-32.

BAC-FISH を用いたカイコ染色体突然変異系統の解析

鈴木 一生¹・安河内 祐二²・伴野 豊²・佐原 健⁴

¹岩手大学大学院農学研究科・²農業生物資源研究所・

³九州大学大学院農学研究院・⁴岩手大学農学部

カイコは絹を効率よく生産するために馴化されてきた家畜昆虫である。我が国においては、古くより遺伝学の研究対象とされ、人為ならびに自然突然変異系統が多数維持されている。カイコは鱗翅目昆虫の中で最初にドラフトゲノムが公表され(MITA *et al.*, 2004, XIA *et al.*, 2004)。さらに BAC や fosmid そして cDNA 配列が加わることで非常に充実したゲノム解読情報としてアップデートされてきている(International Silkworm Genome Consortium 2008, <http://sgp.dna.affrc.go.jp/KAIKObase/>)。トランスジェネシス技術の開発(TAMURA *et al.*, 2000)と相俟って、カイコゲノム情報を利用したポジショナルクローニングによる突然変異原因遺伝子の同定は急速に拡大した(XIA *et al.*, 2014)。TALEN によるカイコでの非常に効率よいジーンターゲットングの成功(DAIMON *et al.*, 2014)は、突然変異同定研究を一層加速化するのであろう。よって世界中に保存される点突然変異や部分欠失などを原因とする突然変異原因遺伝子の配列特定も時間の問題であらう。一方、染色体の付着や転座による染色体レベルでの配列変異の特定は、こうした方法では困難である。

カイコの属する鱗翅目昆虫の染色体は、半翅目昆虫や毛翅目昆虫と同様に分散動原体型であり、多くの昆虫に認められる単動原体型染色体とは異なる。それ故、断片染色体でも分裂サイクルによる脱落が必ずしも起こらず(FUJIWARA *et al.*, 2000)潜在的には多くの未同定染色体変異が存在する可能性がある。他方、分散動原体型染色体は分裂時に特徴が乏しいことから長年、染色体同定ができないまま取り残されていた。こうした状況を一変させたのが、BAC を

プローブとして FISH を行う方法(BAC-FISH 法)のカイコへの適応(SAHARA *et al.*, 2003)である。この手法とゲノム情報ならびにゲノムツールの充実により、分散動原体型のカイコ染色体同定が可能となった(YOSHIDO *et al.*, 2005)。

現在維持されるカイコ染色体変異系統としては、表現形質にも変異を伴っている 3 系統(r501、r52 および r53)が最もよく解析され、r501 と r52 系統では染色体構成が予測されている(BANNO *et al.*, 1993, SAKAIDA *et al.*, 1996)。しかしながら、染色体変異が起こった領域の配列特定は前述したとおり、研究手法が確立していないため未解明のままである。我々は、これら 3 系統を用いて、染色体転座部位特定を目指している。本研究では、BAC-FISH によるカイコ染色体同定技術と染色体マッピング技術を駆使することで、染色体変異部分の責任領域絞り込みを行った結果について報告する。

材料と方法

本研究には、文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトの支援を受け九州大学大学院農学研究院遺伝子資源開発研究センターで系統維持されている r501、r52 および r53 を用いた。カイコにおいては雌で染色体乗り換えが起こらないので、これらの染色体変異系統では異常染色体をヘテロに有す雌個体に正常な染色体構成を有す雄個体を戻し交配する形式で染色体異常が安定的に維持されている(藤井ら, 1998)。

r501 系統の染色体異常は第 23 染色体と第 25 染色

体の相互転座が原因であるので (BANNO *et al.*, 1993)、第 23 と第 25 染色体の構成を表現形質から識別するため樽蚕 (*tub*) 形質と豊油 (*oy*) を用いた交配様式となっている。すなわち、 $T(23;25) Nd/tub; oy_{\text{♀}} \times ++/tub; oy_{\text{♂}}$ であり、この交配からは樽蚕 (*tub*) 形質と豊油 (*oy*) 形質の二重劣性を併せ持つ個体 (図 1a) と非樽蚕、非豊油個体である正常形質個体 (図 1b) の 2 種類の幼虫が 1:1 の比率で分離する。樽蚕 (*tub*) 形質と豊油 (*oy*) 形質を併せ持つ個体は (図 1a) 染色体構成に関しては正常であり、非樽蚕/非豊油個体、すなわち正常な表現形質を持つ個体が付着染色体を保有する染色体変異個体となる。

r52 系統の保有する異常染色体は、第 6 染色体と第 7 染色体の相互転座が原因であるので (SAKAIDA *et al.*, 1996)、2 つの染色体を表現形質から識別するためにそれぞれの染色体に座乗する遺伝子によって発現する二星紋 (E^{DS}) とかすり (*q*) 形質を用いた交配様式 $T(6;7)E^{DS}/+; q_{\text{♀}} \times ++; q/q_{\text{♂}}$ となっている。分離するかすり (*q*) 形質 (図 2a) は染色体構成に関して正常、第 7 体節に過剰な星状紋を認める二星紋 (E^{DS}) 形質を持つ個体 (図 2b 矢印) が染色体変異個体となる。この系統についても 2 種類の幼虫 (図 2) が 1:1 の比率で分離する。

r53 系統の保有する異常染色体は、第 6 染色体と第 20 染色体の相互転座が原因であるので (中村ら, 1994)、2 つの染色体を表現形質から識別するために Np 重い形 (E^{Np}) と霜降油 (*oh*) 形質を用いた交配様式 $T(6;20)E^{Np}/+; oh_{\text{♀}} \times ++; oh/oh_{\text{♂}}$ となっている。分離する霜降油 (*oh*) 個体 (図 3a) は染色体構成に関して正常、半月紋 (図 3b 矢じり)、星状紋 (図 3b 矢印) が各 2 体節に現れる形質を持つ個体が染色体変異個体となる。これらの分離比は前 2 系統と同じく 1:1 である。

各系統 5 齢幼虫の体腔内から摘出した生殖巣より TRAUT (1976) の方法で減数分裂染色体を、YOSHIDO *et al.* (2014) の方法で翅原基より体細胞分裂染色体をスライドガラス上に作製した。BAC-FISH のプローブとして、変異染色体上の BAC クローン (YASUKOCHI *et al.*, 2004; 2006) を選抜し蛍光色素

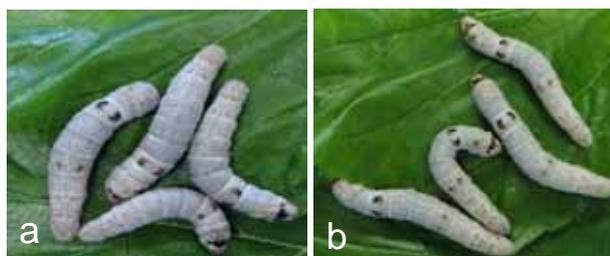


図 1. r501 系統幼虫表現形質. a: 樽蚕/豊油(染色体正常個体), b: 非樽蚕/非豊油(染色体変異個体)

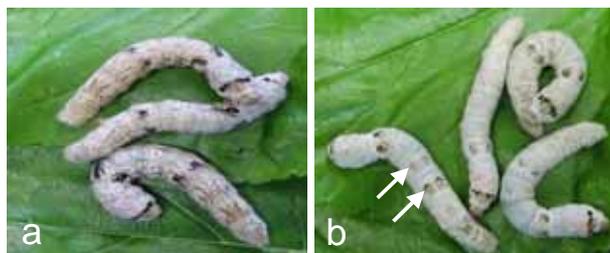


図 2. r52 系統幼虫表現形質. a: かすり(染色体正常個体), b: 二星紋(染色体変異個体). 矢印: 星状紋

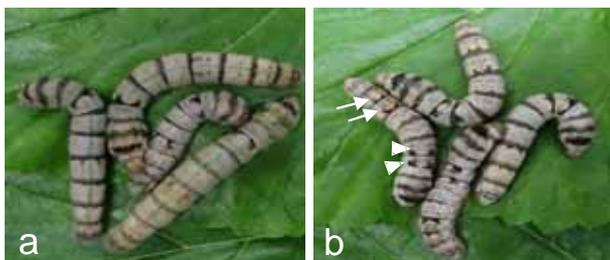


図 3. r53 系統幼虫表現形質. a: 霜降油(染色体正常個体), b: Np 重い形(染色体変異個体). 矢印: 星状紋; 矢じり: 半月紋

でラベルしたものをを用いた。BAC プローブを FISH した染色体標本は蛍光顕微鏡 DM6000B (Leica) を用いて、特異蛍光を検出し、画像解析を行った。BAC-FISH ならびに解析は YOSHIDO *et al.* (2005) に従った。

結果と考察

r501 系統は幼虫形質から第 23 染色体上に豊油 (*oy*)、第 25 染色体上に樽蚕 (*tub*) 形質を持つ個体が正常個体であり、非豊油/非樽蚕である個体において付着染色体が存在することが知られている (BANNO *et al.*, 1993)。染色体数は前者では $2n=56$ 、後者の個体で $2n=55$ であり (BANNO *et al.*, 1995)、減数分裂前期には 3 価染色体対が後者の卵母細胞 (栄

養細胞)で観察されている(BANNO *et al.*, 1993)。本研究において、r501 系統減数分裂パキテン期における BAC-FISH を行った結果、染色体正常個体(樽蚕)では、28 染色体対が観察され第 23 と第 25 染色体はそれぞれ 2 価染色体対として存在した。非豊油個体では、26 対の 2 価染色体に加えて、第 23 と 25 染色体が付着することによって形成されたと考えられる非常に長い付着染色体を 1 本確認することができた。また、FISH をする際に選抜した BAC の部分配列情報を KAIKObase に照らし合わせることで、非豊油/非樽蚕における第 23 と 25 染色体それぞれの付着方向が、第 23 染色体は distal end (23Mb 側)で第 25 染色体は proximal end (0Mb 側)で付着していることが判明した。

r52 系統に関しては、幼虫形質のかすり (q) 形質を持つ個体が正常で、二星紋 (E^{DS}) 形質を持つ個体が染色体突然変異個体である(SAKAIDA *et al.*, 1996)。二星紋個体はホモ致死かつこの形質が第 6 と第 7 染色体に連関し、二星紋個体雄の減数第一と第二分裂にはそれぞれ、 $n=27$ や $n=26, 27, 29, 30$ など通常 ($n=28$)とは異なる染色体数が観察される(SAKAIDA *et al.*, 1996)ことから、原因染色体の断片化や相互転座が考えられていた。しかしながら、非かすり ($+^q$) が座位する第 7 染色体と二星紋 (E^{DS}) が座位する第 6 染色体がどのような転座染色体を形成しているのか、また、それぞれの座の遠位の染色体部位の染色体構成は明らかとなっていなかった。そこで、これら転座/断片染色体の視覚化を目的として BAC-FISH を行った結果、染色体正常(かすり)個体の体細胞分裂において第 6 ならびに第 7 染色体は 2 本ずつ観察されるのに対し、二星紋個体では正常第 6 と第 7 染色体に加えて、非かすり座を含むと考えられる第 7 染色体の一部と二星紋座を含む第 6 染色体の一部が 1 染色体として、また非かすり座を含まないと考えられる第 7 染色体の一部と第 6 染色体の一部も 1 染色体として観察された。減数分裂前期パキテン期においては、これら相互転座染色体と正常第 6 ならびに第 7 染色体は 4 価染色体対を形成した。

r53 系統においては霜降油 (oh) 形質を持つ個体が正常で、 Np 重い形 (E^{Np}) 形質を持つ個体が染色体突然変異個体である(中村ら, 1994)が、非霜降油 ($+^{oh}$) が座位する第 20 染色体部位と Np 重い形 (E^{Np}) が座位する第 6 染色体部位の染色体異常の詳細については全く明らかとなっていなかった。本研究における BAC-FISH の結果、染色体が正常の霜降油個体では第 6 染色体と第 20 染色体とを含む 2 価染色体が 28 対観察できるのに対し、 Np 重い形 (E^{Np}) 形質を持つ突然変異個体では 26 対の 2 価染色体と、正常な第 6 と第 20 染色体ならびに第 6 と第 20 染色体間で相互転座した染色体が 4 価染色体対を形成していた。体細胞分裂における同様の FISH 解析からも、 Np 重い形個体では第 6 と第 20 染色体の相互転座が明らかとなった。

染色体の異常が相互転座であると確定した r52 ならびに r53 系統における転座領域の絞り込みを BAC-FISH により行っている。現段階では r52 の第 6 染色体上で約 0.4Mbp、第 7 染色体上で約 0.8Mbp の範囲、r53 では第 6 染色体上で約 0.2Mbp、第 20 染色体上で約 1.4Mbp の範囲に相互転座領域を絞り込んだ。

本研究によって、BAC-FISH はカイコ染色体突然変異系統の転座部位の絞り込みに利用できることが明らかとなった。今後は目的領域を詳細にするための BAC-FISH による絞り込みの継続と、転座領域を含む BAC クローンの配列から設計した STS プライマーによる PCR によって相互転座領域の配列特定ならびに変異部位に生じた *HOX* 突然変異の原因特定について研究を進めていきたい。

文 献

- BANNO Y. *et al.* (1993): *Hereditas*, **118**, 259-263
BANNO Y. *et al.* (1995): *J. Seric. Sci. Jpn*, **64**, 410-414
DAIMON T. *et al.* (2013): *Dev. Growth Differ.*, in press
藤井ら (1988): 家蚕遺伝子資源系統の特製情報
FUJIWARA H. *et al.* (2000): *Zool. Sci.*, **17**, 743-750
INTERNATIONAL Bombyx GENOME CONSORTIUM (2008):

- Insect Biochem. Mol. Biol.*, **38**, 1036-1045
- MITA K. *et al.* (2004): *Genetics*, **173**, 1319-1328
- 中村ら (1994): *九州蚕糸*, **25**, 50
- SAHARA K. *et al.* (2003): *Chromosoma*, **112**, 48-55
- SAKAIDA K. *et al.* (1996): *Hereditas*, **125**, 25-29
- TRAUT W. (1976): *Chromosoma*, **58**, 275-284
- XIA Q. *et al.* (2004): *Science*, **306**, 1937-1940
- XIA Q. *et al.* (2014): *Ann. Rev. Entomol.*, **59**, in press
- YASUKOCHI Y. *et al.* (2004): *Dev. Genes Evol.*, **214**, 606-614
- YOSHIDO A. *et al.* (2005): *Genetics*, **170**, 675-685
- YOSHIDO A. *et al.* (2014): In *Protocols for Cytogenic Mapping of Arthropod Genomes*, Sharakhov IV ed. in press

Cry8Da トキシンのオリゴマー化に関わる ADAM の機能解析

半谷 大輝・浅野 眞一郎・伴戸 久徳
北海道大学農学院応用分子昆虫学研究室

Bacillus thuringiensis はグラム陽性の芽胞形成細菌であり、芽胞形成時に産生する結晶性タンパク質（Cry タンパク質）は、鱗翅目・双翅目・鞘翅目昆虫などに対して特異的殺虫活性を示すものが存在する。Cry タンパク質の殺虫活性機構は鱗翅目昆虫についてはよく研究されている一方で、鞘翅目昆虫については明らかにされていない部分が多い。Cry タンパク質は一次構造の相同性が低いにもかかわらず、一様にドメイン I・II・III からなる三次構造をしていることから、鞘翅目昆虫においても鱗翅目昆虫で研究されている殺虫活性機構が概ね当てはまると予測される。Cry タンパク質の殺虫活性機構を解明する事は Cry タンパク質を害虫防除資材として利用する上で重要であると考えられる。そこで我々はコロラドポテトビートル (*Leptinotarsa decemlineata*) において Cry3Aa トキシン受容体のひとつとして報告されている A Disintegrin And Metalloprotease (ADAM) (OHCOA *et al.*, 2007) に注目した。

ADAM はメタロプロテアーゼドメイン及びディスインテグリンドメイン等の特徴的なドメインを有する膜貫通型タンパク質であり、原生動物から哺乳動物に至るまで広く認められ、現在までに 40 のオルソログが同定されている (JONES *et al.*, 2007)。哺乳動物において ADAM は細胞膜上の増殖因子、受容体、接着分子等の細胞外基質の分解活性(シェディング)をもち、インテグリン等への結合により細胞の接着、運動、増殖に関与する多機能分子である。鱗翅目、双翅目ならびに鞘翅目昆虫において Cry タンパク質の受容体として数多く報告があるカドヘリンは、哺乳動物においては ADAM に分解制御され

る。先行研究において、Cry タンパク質の殺虫作用機構における ADAM の機能は Cry3Aa トキシン受容体の他に、Cry3Aa トキシン分解プロテアーゼとしての機能し *in vitro* で Cry3Aa トキシンの細孔形成能を低下させるという報告がある (RAUSELL *et al.*, 2007)。

以上のことから、鞘翅目昆虫における Cry タンパク質の殺虫作用機構では ADAM が重要な役割を担っている可能性が考えられる。我々は Cry トキシンがオリゴマー化するステップで、ADAM はカドヘリン様タンパク質をシェディングすることで Cry トキシンの殺虫作用機構に影響を与えているのではないかと予測している。

本研究では、鞘翅目昆虫に殺虫活性を示す Cry8Da トキシン受容体として同定されたコクヌストモドキカドヘリン様タンパク質 (TcCAD) に注目し、Cry トキシンの殺虫作用機構における ADAM のプロテアーゼ活性と Cry トキシンのオリゴマー化の関係について解析した。

材料と方法

コクヌストモドキ幼虫より中腸上皮細胞刷子縁膜小胞 (TcBBMV) を分離精製した。コクヌストモドキに対して殺虫活性を示す Cry8Da トキシンを発現させ、Cry8Da トキシンとコクヌストモドキ消化液の主成分であるトリプシン、キモトリプシンと TcBBMV をインキュベートし、抗 Cry8Da 抗体を用いてウェスタンブロットによって Cry8Da トキシンのオリゴマー化を確認した。その後 ADAM 活性阻

害剤であるアセトヒドロキサム酸による Cry8Da トキシンのオリゴマー化の抑制を試みた。さらに抗 TcCAD 抗体を用いて、ADAM 活性の阻害によるカドヘリン様タンパク質の分子量とその構成部位を推定した。

また ADAM 活性特異的な蛍光基質を用いて、TcBBMV の ADAM 活性を蛍光プレートリーダーによって測定し、アセトヒドロキサム酸による濃度依存的な ADAM 活性の阻害を定量分析した。

結果と考察

TcBBMV と Cry8Da トキシンのトリプシン、キモトリプシンを 37、16 時間インキュベートし、抗 Cry8Da 抗体を用いてウェスタンブロットを行ったところ、約 220 kDa のタンパク質が確認された。Cry8Da トキシンのトリプシン、キモトリプシンによって活性化させた場合約 54 kDa のタンパク質となるため、約 220 kDa のタンパク質は活性化された Cry8Da トキシンのテトラマーであると考えられた。上記の実験系に、アセトヒドロキサム酸 5 mM、10 mM をそれぞれ加えたところ、アセトヒドロキサム酸の濃度に依存してオリゴマー化したトキシン由来のバンドが薄くなることが確認された。同実験で抗 TcCAD 抗体を用いてウェスタンブロットを行ったところ、アセトヒドロキサム酸による ADAM 活性の阻害でカドヘリン用タンパク質の分解が抑制され

ることが確認された。

蛍光基質を用いた TcBBMV の ADAM 活性の測定では、アセトヒドロキサム酸 1 mM、10 mM をそれぞれ TcBBMV に添加することで蛍光色素の発光量はアセトヒドロキサム酸の濃度に依存して抑えられることが考えられた。

以上のことから Cry8Da トキシンのオリゴマー化には ADAM 活性が必要であり、カドヘリン様タンパク質の分解によって制御されることが考えられた。

カドヘリン様タンパク質の Cry トキシン結合部位は膜近接細胞外ドメインに近いカドヘリンリピートに存在するという報告がある。我々は ADAM によるカドヘリン様タンパク質の分解によって、カドヘリン様タンパク質の構造が変化し Cry タンパク質の結合に影響するのではないかという仮説を立てた。今後、カドヘリン様タンパク質の構造変化と Cry8Da トキシンの結合について解析を進めることで、ADAM とカドヘリン様タンパク質の相互作用を明らかにし、Cry8Da トキシンの殺虫作用機構における ADAM の詳細な機能を明らかにしたいと考えている。

文 献

- JONES J. *et al.* (2007): *BMC Evol. Biol.*, 63
OCHOA C. *et al.* (2007): *BBRC*, 362, 437-442
RAUSELL C. *et al.* (2007): *BBA*, 1768, 2293-2299

ネッタイシマカ ALP の Cry11Aa トキシンレセプターとしての機能調査

小林 洋平・浅野 眞一郎・伴戸 久徳

北海道大学大学院農学院応用分子昆虫学研究室

デングウイルス等の熱帯感染症を媒介する *Aedes aegypti* (ネッタイシマカ) に対する有効な防除手段として *Bacillus thuringiensis subsp. israeliensis* (*Bti*) を用いた微生物防除がある。*Bti* が産生する Cry11Aa はネッタイシマカ幼虫に対して高い殺虫活性を示す (CHANG *et al.*, 1992) ことが明らかになっているが、殺虫作用機構は不明な点が多い。このような状況の中で、ネッタイエカ (*Culex quinquefasciatus*) 個体群が *Bti* 由来 Cry トキシンに対して抵抗性を獲得したことが報告されている (GEORGHIOU and WIRTH, 1997)。抵抗性獲得の要因の一つには Cry トキシンが結合するレセプター分子の変異があり、*Bti* 製剤の長期利用による抵抗性獲得蚊類の出現が懸念されている。このため、今後 *Bti* 製剤を安定して使用していくためにも双翅目昆虫における Cry トキシンの作用機構の解明が重要である。現在提唱されている Cry トキシンの殺虫作用機構において、Cry トキシンとレセプター分子の結合が特異的殺虫活性を示す重要なステップであると考えられており、ネッタイシマカにおいては Cry11Aa のレセプター分子としてアルカリフォスファターゼ (AeALP) などが報告されている (FERNANDEZ *et al.*, 2006)。

本研究では、AeALP の Cry11Aa に対するレセプター分子としての機能を解明することを目的とし、中腸細胞膜上で発現している複数の AeALP と Cry11Aa との結合飽和実験および殺虫活性阻害実験を行った。

材料と方法

本研究室で継代飼育しているネッタイシマカ 4 齢幼虫から total RNA の抽出および逆転写反応を行い、ネッタイシマカ中腸 cDNA ライブラリーを得た。AeALP の塩基配列を基に SOSUI Signal および Big PI predictor を用いてトランスメンブレン部位、GPI アンカリングサイトの予測を行い、細胞膜上で発現していると考えられる 5 つの AeALP を同定した。これらの AeALP の塩基配列を基に各 *Aealp* 遺伝子の一部を増幅するプライマーを設計し、ネッタイシマカ中腸 cDNA をテンプレートにして、各遺伝子のクローニングを行った。各 *alp* 遺伝子断片を発現ベクター pGEX4T-3 に組み込み、それぞれ GST 融合タンパク質として大腸菌で発現させた。発現させたタンパク質は GSTrapTMHP により精製を行い、PBS によって 24 時間透析したものを実験に使用した。また、Cry11Aa の発現は本研究室に保存されている結晶非産生株 *israelensis* mutant に pSB-11Aa を導入した形質転換体を 96 時間培養することによって行った。発現させた Cry11Aa は可溶化させた後、トリプシンで処理したものを活性型の Cry11Aa トキシンとして用いた。結合実験は Glutathion Sephalose を用いたブルダウアッセイ法により行い、回収したサンプルを *israelensis* Cry 抗体を用いたウエスタンブロットおよびエンザイムイムノアッセイ法に供試することにより調査した。一定量の AeALP に対して最大 5 倍量の Cry11Aa トキシンを使用し、濃度毎にシグナルの強度をプロットして結合飽和曲線を得た。

殺虫活性阻害実験は Cry11Aa および Cry11Aa と 50 倍量の AeALP1 混合液中における 24 時間後のネッ

タイシマカ二齡幼虫の死虫数を計測した。試験用いた幼虫数は20匹ずつとし、試験は3回繰り返し行った。

結果と考察

AeALPは蚊類ゲノムデータベースにより複数アイソフォームが存在することが知られており、そのアミノ酸配列の違いから AeALP1~7まで分類され、それぞれが異なる Cry トキシンと結合することが報告されている (LIKITVIVATANAVONG *et al.*, 2011)。ALPには分泌可溶性のものと GPI-anchor を介して細胞膜上で発現しているものが存在し、これらは発現している組織や酵素活性、糖鎖修飾の構造が異なっていることが報告されている (EGUCHI *et al.*, 1995)。また、現在提唱されている Cry トキシンの殺虫作用機構において、細胞膜上で発現しているレセプター分子と結合することが重要だと考えられているため、AeALPの塩基配列からトランスメンブレンおよび、GPI アンカリングサイトの予測を行った。その結果 AeALP1,2,3,4,7 が中腸上皮細胞膜上で発現していることが示唆された。ネッタイシマカにおいては Cry4Ba トキシンに対して AeALP1、7 との結合が確認されているなど、単一の Cry トキシンに対し複数のアイソフォームの ALP が結合タンパク質として報告されている (THAMMASITTIRONG *et al.*, 2011; JIMENEZ *et al.*, 2012)。単一の Cry トキシンに対し複数のレセプター分子が作用する可能性と単一のレセプター分子が単一の Cry トキシンを認識する場合との両方が考えられる。そこで AeALP において網羅的な解析を行い、AeALP の Cry11Aa トキシンレセプターとしての機能を調査した。

各 AeALP を GST 融合タンパク質として発現させ、精製した後、結合飽和実験においては、プルダウンアッセイによって回収したサンプルをウエスタンブロットおよびエンザイムイムノアッセイに供試した。検出できたシグナルの強度により各 AeALP における Cry11Aa の結合能を調査し、その結果 AeALP1 が最も結合能が高いことが確認された。また、AeALP1 を用いた殺虫活性阻害実験においてはネッタイシマカ二齡幼虫に対して Cry11Aa 単体で与えた試験区に比べて、Cry11Aa と 50 倍量の AeALP1 を加えた試験区では 40% 以上の殺虫活性を阻害されていることが確認された。

以上の結果から、ネッタイシマカにおいては AeALP1 が Cry11Aa トキシンのレセプター分子として機能していることが示唆された。

文 献

- CHANG, S *et al.* (1992): *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 507-512.
- GEORGHIOU, G.P. and WIRTH, M.C. (1997): *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 1095-1101
- FERNANDEZ, L.E. *et al.* (2006): *Biochemistry.*, **48**, 8899-8907.
- LIKITVIVATANAVONG, S. *et al.* (2011): *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 2829-2838
- EGUCHI, M. (1995): *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.*, **111**, 151-162
- THAMMASITTIRONG, A. *et al.* (2011): *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 6836-6840.
- JIMENEZ, A.I. *et al.* (2012): *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **42**, 683-689.

東北蚕系・昆虫利用研究報告投稿要領

1. 東北蚕系・昆虫利用研究報告(以下本報告)への投稿者は日本蚕系学会員にかぎる。共著のときは非会員を含むことができる。会員の推薦のもと支部長が許可した場合にも投稿可能とする。
2. 本報告への投稿原稿はデジタルデータとし、A4版サイズに、次の順序で記述する。1)表題 2)著者名 3)所属機関の名称 4)本文(目的、材料と方法、結果と考察、要約など) 5)文献
なお、1行21文字、1ページ40行とする。刷上がり1ページ分は1,600字を目安とする。
以下、URL参照
<http://hashi.agr.hokudai.ac.jp/temp.doc>
3. 本報告への投稿原稿は横書きとし、当用漢字および現代かなづかいを用いる。動植物および外来語はカタカナとするが、蚕や桑などは漢字を用いてもよい。薬品名、化学物質名等は和名を用い、学術用語は日本蚕系学会編「蚕系学用語辞典」による。また、学名(イタリック)および外国人の名、地名は原語とする。
4. 数字はアラビア数字とし、また単位および略記号の表し方は km, m, cm, mm, μm, nm, ha, a, (アール), m², ml, μl, kg, g, mg, μg, sec, min, hr, rpm, %, ppm, M(モル濃度), N(規定度), kcal, pH, RH(相対湿度), ³²P(放射性リン ³²P)などとし、単位は原則として c.g.s 単位系を用いる。
5. 図・表中の文字、記号とともにそのまま印刷となるよう明確に描く。刷り上がりサイズは横 8cm 以内もしくは 17.5 以内 cm、縦 24cm 以内となることを考慮して図中の文字、数字、記号などの大きさに注意する。
10. 図や表の挿入箇所を指定する場合は原稿の本文の右横などに朱書きする。
11. 文献の引用は本文中では著者名(年号)あるいは(著者名、年号)とする。共著者については2人まで両名を並記し、3人以上のときは最初の著者に「ら」を付記してほかを省略する。文献は次のようにまとめて論文の末尾に著者名のアルファベット順に配列する。

[学術雑誌より引用する場合]

著者名、発行年、雑誌名略記、巻数(ない場合は号数をカッコ内に記す)、始めと終わりのページ。

例: 四方正義・村田武(1969): 日蚕雑, 38, 1-10.

ASHHURST DE, RICHARDS AG (1964): J Morphol, 114, 247-254.

[単行本を引用する場合]

著者名、発行年、本の名前(初版以外の場合は版数)、総ページ数、発行所、同所在地。

例: 田中克己(1955): 顕微鏡標本の作り方(第2版), 278pp, 裳華房, 東京.

DOE JQ (1968): "The Disease of Animals without Backbones", (2nd ed.), 678pp, Academic Press, New York.

[共著の単行本の一部を引用する場合]

著者名、発行年、本の名前、編者名、引用ページ、発行所、同所在地。

例: 上田光雄(1952): 家蚕遺伝学(田中義磨編), pp 373-417, 裳華房, 東京.

BENZ G (1963): *In* "Insect Pathology, An Adv. Treat" (Steinhaus EA ed), vol 1, pp 229-338, Academic Press, New York.

なお、学術雑誌の略名は、最近の本誌、蚕系学文献目録、Biological Abstracts および Chemical Abstracts による。

12. 編集様式を整えるため、編集幹事は著者に原稿中の内容、字句等について訂正を求めることがある。

13. 校正は原則として初校のみ著者校正とし、誤植の訂正にとどめ変更は認めない。

14. 本報告への投稿原稿は付記の送状を添付し、編集担当宛(sangaku@abs.agr.hokudai.ac.jp) (浅野眞一郎)に送信する。紛失等の事故を考慮してデータの控えをとっておく。掲載した原稿データは返却しない。

付 記

送付の様式

発送年月日	平成	年	月	日
表 題				
著 者 名 (所属機関)	()			
連絡先 (電話番号)	(- -)			
送付枚数	原稿	枚、表	枚	
	図	枚、写真	葉	
備 考				

日本蚕糸学会東北支部規約

(総則)

- 第1条 この支部は日本蚕糸学会東北支部と呼び、事務局を岩手大学農学部におく
- 第2条 この支部は一般社団法人日本蚕糸学会支部設置規程のとおり北海道および東北六県に在住する日本蚕糸学会会員をもって組織され、この地方における蚕糸及び昆虫利用に関する学術の振興と普及をはかり、あわせて会員相互の研究上の連絡を緊密にすることを目的とする
- 第3条 前条の目的を達成するため次の事業をおこなう
- (1) 研究発表会、討論会、学術講演会等の開催
 - (2) そのほか支部の目的達成に必要な事業

(機関)

- 第4条 総会は最高の決定機関とし、支部会員の過半数（委任状も含む）の出席により成立する
- 2 総会は、委員会が必要と認めたととき支部長が召集する。総会の議長は支部長がこれにあたる
 - 3 総会は規約の改廃、その他重要な事項について審議決定する
- 第5条 この支部に委員を設ける
- 2 委員会は支部長が召集し、議長は支部長がこれにあたる
 - 3 委員会は支部の事業並びにこの規約に規定しない事項や細則などを審議決定するとともに支部運営の円滑な推進をはかる

(役員)

- 第6条 この支部に次の役員をおく
- (1) 支部長 1 名、副支部長 1 名、委員若干名
 - (2) 支部長及び副支部長は委員とする
 - (3) 支部長は一般社団法人日本蚕糸学会選挙規程にもとづき選出された東北選挙区選出理事、副支部長は第一位にて選出された東北選挙区選出代議員がこれにあたる。そのほかの東北選挙区選出の一般社団法人日本蚕糸学会理事、代議員

を委員とする

- 第7条 支部長は支部を代表し事務を総括する
- 2 副支部長は支部長を補佐し、支部長事故のあるときはこれを代理する
 - 3 委員は委員会を構成し合議により支部の運営にあたる
- 第8条 任期は一般社団法人日本蚕糸学会の任期規定に準ずる。ただし、再選を妨げない

(会計)

- 第9条 支部の会計は、一般社団法人日本蚕糸学会の会計に連結され、会計年度は毎年1月1日に始まり12月31日に終わる

(名誉会員及び賛助会員)

- 第10条 支部に対して特に功績のあった会員を総会の承認を経て名誉会員に推すことができる
- 2 支部の主旨に賛同し援助を与えられた個人・会社または団体を支部賛助会員に推すことができる

(規約の改廃等)

- 第11条 この規約の改廃は総会出席会員の過半数の賛同を必要とする

付則 この規定は平成4年10月31日より実施する
この規定は平成17年10月1日に改正した
この規定は平成25年1月1日に改正した

日本蚕糸学会東北支部 役員

(任期平成 25 年 1 月 1 日 ~ 平成 26 年 12 月 31 日)

支部長

伴戸久徳 (一般社団法人日本蚕糸学会東北選挙区選出理事、学会長)

副支部長 (会計担当)

佐原 健 (一般社団法人日本蚕糸学会東北選挙区選出代議員)

委員 (編集担当)

浅野眞一郎 (一般社団法人日本蚕糸学会東北選挙区選出代議員)

印 刷 平成 25 年 12 月 30 日

発 行 平成 25 年 12 月 30 日

編集者 伴戸 久徳

発行者 日本蚕糸学会東北支部

〒020-8550

盛岡市上田 3-18-8

岩手大学農学部応用昆虫学研究室

Tel 019-621-6147

