

# 東北蚕糸・昆虫利用研究報告

## 第 40 号

平成 27 年 12 月

日本蚕糸学会東北支部

# No.40 目 次

比留間 潔	昆虫の発育とホルモン：40年の研究生活で得たこと考えたこと . . . . . 1
中神 あゆみ 伴戸 久徳 浅野 眞一郎	Cry44Aa トキシンの殺虫活性作用機構について . . . . . 8
中石 有実 伴戸 久徳 浅野 眞一郎	Cry1A.106 の殺虫活性について . . . . . 10
宇多 桃香 佐藤昌直 浅野 眞一郎 伴戸 久徳	<i>BmSyndecan</i> ノックダウン BmN 細胞における BmNPV の増殖 . . . . . 12
藤本 章晃 鈴木 剛 奥村 梓 安河内 祐二 吉戸 敦生 佐原 健	毛翅目昆虫における染色体同定 . . . . . 15

## 昆虫の発育とホルモン：40年の研究生活で得たこと考えたこと

比留間 潔

弘前大学農学生命科学部・岩手大学大学院連合農学研究科

私は2016年3月で定年退職し、研究生活にピリオドを打つ。長かったようで短くもあった40数年であり、紆余曲折を経ながらも最終的には学生時代から自身が考え続けてきた目標の多くを、小さいながらも全うしたと自負している。私は他の多くの日本人研究者とは少し異なる経歴を持っているし、他の研究者とは少し考え方が異なるかもしれない。しかし、ここに書き残した「一研究者としての軌跡と研究についての考え方」を読んだ若手研究者が、何か感じ得ることがあればこの上ない喜びである。ここに書いたことはもちろん皆に強制するものではない。私の私見であり、賛否両論あるであろうことは諒とされたい。

### 私の研究の概要

私は一貫して昆虫の発育をホルモンとの関係で研究してきたが、研究活動は大きく分けて3つのステージに分けられる。①1982年までの大学院・日本学術振興会奨励研究員の時代（東京教育大学・筑波大学・国立予防衛生研究所/東京大学）、②1982-2004年のアメリカ時代(SeattleにあるUniversity of Washington)、③2004年5月以降の弘前大学時代に分けられる。この経歴を見ればわかるように、アメリカ時代が22年と突出して長い。研究者として最も油の乗っていた時期を、雑用にあまり振り回されることもなく、自由気ままにアメリカで研究生活を過ごしたわけである。この時代に、私の研究者としての考え方がほぼ固定されたと言っても過言ではない。多くの日本人研究者

は数年の海外留学の経験はあると思うが、20年以上の海外研究生活を送った人はあまりないに違いない。

弁護士であり「サハリンの蝶（北海道新聞社）」の著者の一人である朝日純一さんは、「職業年齢」を40年として、それを起承転結で「雌伏期」「両立期」「居直り期」「悠々期」の4つに分けたという（川村, 2009）。両立期というのは、本職と趣味が両立できる時期という意味である。私の場合顕著な雌伏期がなかったのみで他は当てはまるようである。

後述するように、私の学生時代に昆虫生理学の大御所であられた深谷昌次先生から、研究に対する考え方に多大なる影響を受けた。ところが残念なことに私が実際の研究を始める少し前、それも定年前に他界されてしまった。このようなことから、私は研究テーマを自分で見つけた結果、苦勞もしたが、誰にも「雌伏」する必要がなく、明瞭な雌伏期はなかった。しかしいろいろな大学や研究機関を訪問して援助を得たり、叱咤激励されたりしたことはもちろんである。渡米後4、5年は、がむしゃらに研究に没頭したが、その後は趣味との両立期に入り、米国生活の後半10年は居直り期であった。弘前大学時代は、まさに悠々期であり今それが終わろうとしている。

### ①大学院・日本学術振興会奨励研究員時代

私が昆虫ホルモンの研究を始めた1970年代半ばは、昆虫の発育に關与するエクダイソンと幼若ホルモン(JH)の化学構造も決まり、それらの基本

的な作用が明らかになり始め、また、ホルモン作用の生化学研究が盛んになり始めた頃である。JHの存在下でエクダイソンが作用すると幼虫脱皮が引き起こされ、JHの血中濃度が減少して少量のJHの存在下でエクダイソンが分泌されると、蛹化が引き起こされると考えられていた。しかし、後者は明らかに誤りである。

蛹変態のメカニズム解明の breakthrough は 1976 年に RIDDIFORD によってなされた。タバコスズメガ (*Manduca sexta*) の終齢幼虫を使用した実験で、血中の JH が一度完全に消失した時に、少量のエクダイソンが分泌されると蛹に変態するようにプログラムされ、実際の蛹への発育は前蛹期に現れる大量のエクダイソンにより誘導されるという今まで考えても見なかったことを明らかにした (RIDDIFORD, 1976)。このプログラムは蛹コミットメントといわれ、コミットメントが完了すると、たとえ JH が存在していても幼虫へとは逆戻りできない。この機構を彼女が *in vitro* の実験で解明したのに触発されて、私は昆虫の発育をホルモンとの関係で研究しようと決心した。当時盛んに行われていた生化学実験をしり目に、実験形態学手法や組織培養を中心として発育時期特異的に変動するエクダイソンと JH の作用や役割を調べる研究を行なった。実験材料としては、人工飼料がすでに開発され、飼育も簡単で容易に大量の無菌幼虫が得られるヨトウガ (*Mamestra brassicae*) 幼虫を使用した。その結果 JH は、変態の阻害ばかりでなく、前胸腺からのエクダイソン分泌や、脳からの前胸腺刺戟ホルモン (PTTH) 分泌の抑制あるいは活性化など、発育時期の違いにより様々な作用があることを見出した。それに加えて、JH は PTTH の分泌タイミングを調節していることを明らかにした。また JH とエクダイソンの相互作用やフィードバック作用についても明らかにした。すなわち、昆虫の脱皮・変態の現象についての発育時期特異的なホルモン作用の全貌を明らかにした (以下の総説参照：比留間, 1983; HIRUMA, 2003)。

私の学生時代は各大学間のつながりが強く、同年代の、例えば A 大学の B 君や C さん、D 大学の E 君や F さんがどのような研究をしていたかよく知っていた。合同で「昆虫若手の会」や「昆虫生理談話会」などの研究会も開かれた。そのような会で先輩研究者である柳沼利信さん (現在名古屋大学名誉教授) から「比留間君の研究は高く評価するが、現象ばかりで物体がない。これからの研究は物質のレベルで行うことが重要である」と評された。もちろん反論もしたが、頭の隅にこのことが常にあった。

## ②アメリカ時代

上記のような経緯もあり、1982 年に渡米後は、タバコスズメガを使用し、脱皮時に起こる皮膚のメラニン生成と関係づけて、幼虫脱皮のメカニズムの解明を生化学、分子生物学的手法を用いて研究した。なぜなら、メラニン生成過程では多くの酵素が必要で、それらをターゲットにして幼虫脱皮のホルモン支配の研究ができると考えたからである。

昆虫の脱皮は、エクダイソン血中濃度が上昇し、その後濃度が下降しなければ脱皮が行われずに死に至る (SLAMA, 1980)。そのメカニズムをメラニン化機構、特にそれに関与するドーパデカルボキシラーゼ (DDC) とフェノールオキシダーゼ (PO) の合成調節と関連付けて解明した (総説参照：比留間, 2008; HIRUMA and RIDDIFORD, 2009; 2010)。初めに *in vitro* でクチクラのメラニン化の誘導に成功し、その実験系を使用して、1985 年に昆虫のメラニンはドーパミンメラニンであることを同定した。現在、昆虫を含む節足動物のメラニンは、哺乳類のドーパメラニンとは異なり、ドーパミンメラニンであることは定説となっている。

DDC はドーパをドーパミンに変換する重要な酵素である。DDC の発現は、エクダイソンの血中濃度が上昇することにより発現がプログラムされるが、その後濃度が下降することにより実際の発

現が誘導されることを見出した。つまりエクダイソンが上昇して下降しなければ DDC の発現が起こらず、メラニン化や皮膚の硬化が起こらず、昆虫は正常に脱皮できないことを明らかにした。この過程で、ドーパミンの酸化に重要な PO は糖鎖を持っていることを見出し、昆虫の PO にも哺乳類の PO と同じように糖タンパクであるものが存在することを見出した (HIRUMA and RIDDIFORD, 1988)。その上、その糖鎖にシアル酸が含まれることを見出した。この発見は、昆虫にシアル酸が存在することを証明した最初の研究である。

その後、メラニン生成や皮膚の硬化に重要な DDC の発現に関与する様々なエクダイソン応答性転写因子のエクダイソンカスケードもほぼ明らかにした。これはターゲットが明らかとなっているエクダイソンカスケードを解明した最初の研究の一つである。

エクダイソンが上昇し、その後下降することによる DDC 発現のメカニズムの研究は、bisacylhydrazine ecdysone agonists を使用してのカナダのタイガ地帯の森林害虫である spruce bud worm の防除研究まで発展させ (RETNAKARAN *et al.* 1995)、現在実用化されている (CADOGAN *et al.* 1998)。

### ③弘前大学時代

幼虫脱皮の分子メカニズムは、ある程度解明することができたので、帰国後 (2004 年) は蛹変態の解明を目指した。当時、ゲノムプロジェクトが終了しつつあったカイコを使用して、蛹変態の分子機構の解明と、JH 生合成の調節機構の解明を試みた。後者は主として蛹変態誘導の鍵となる、終齢幼虫での JH 合成の停止機構に焦点を当てた。渡米前に、JH 合成はメバロン酸経路を経由していることを *in vivo* で示していた (HIRUMA *et al.* 1983)。この論文では 2008 年にノーベル賞の登竜門と言われているラスカー賞を受賞した、当時東京農工大学助教授の遠藤章先生からいただいた HMG

Co-A レダクターゼの阻害剤である compactin (この物質からスタチンが誕生した) の処理により、JH 合成が停止することを示した。こうした経緯から、22 年のブランクをおいて、このプロジェクトを再開することとした。驚くことにこの分野はその後、私が帰国するまでほとんど進展がなかった。

JH 生合成調節の研究では、初めにメバロン酸経路に関与するすべての酵素 (JH 合成酵素) をクローニングして、それらのアラタ体での発現変動を詳細に調べた。これにより JH 合成調節機構の準備が出来たわけである (KINJOH *et al.* 2007; UEDA *et al.* 2009)。これらの結果を利用して、発育時期で変動する JH の合成能は、エクダイソン、ドーパミン及び種々のペプチドホルモンにより、発育時期で異なる作用および作用機構で時期特異的に複雑に組み合せて調節されていることを明らかにした (KANEKO *et al.* 2011; KANEKO and HIRUMA, 2014; 2015; 特に以下の総説参照: 金児・比留間, 2011 および HIRUMA and KANEKO, 2013)。蛹変態の引き金となる終齢期での JH 合成の停止については、エクダイソンの血中濃度の低下とドーパミンやアラトスタチン、short Neuropeptide F などペプチドホルモンによる JH 合成の抑制作用が同時に作用し、かつこれらが異なる作用機構で幾重にも保険が掛けられ、完全な停止を保証するシステムであることを明らかにした。

一方、蛹変態のセントラルドグマである蛹コミットメントの分子機構は RIDDIFORD が示したように単純ではなく、カイコの皮膚を使用した実験から、実際のコミットメント開始の前に、エクダイソンと JH に対する細胞の感受性の変化が行くコミットメントの準備段階がある事を示した (MURAMATSU *et al.* 2008)。この現象は終齢 (5 齢) 幼虫の皮膚にだけ見られ、4 齢幼虫のそれでは見られない。終齢期特異的な要因のあることが推定されるが、この研究を突き進めてもカイコの研究にしかならない。一般生物学に貢献するには細胞のレベルでの研究が必要である。ところが皮膚の

細胞は小さすぎて細胞レベルでのコミットメントの研究には不向きである。そこで細胞レベルで解明するために、巨大単一細胞であり、発育するとショウジョウバエの成虫よりも大きくなる Verson's gland を使用して現在研究を行っている。この単一細胞を使用して、細胞レベルでのコミットメントは発生生物学上の定説である all-or-none ではなく、幼虫から蛹へと徐々に起こることをすで見出した。また皮膚とは異なり Verson's gland の蛹コミットメントにエクダイソンは関与せず、JH 不在下でインスリンシグナル経路と TOR シグナル経路が関与する 2つのステップで誘導されることも明らかにした(金児・比留間, 論文執筆中)。これら 2つの研究課題により蛹変態の分子機構の概略を明らかにすることができたと考えている。以上の成果は、私のポスドクであった金児雄君(現在弘前大学助教)の貢献が大きいことを付け加えておく。

これらの研究の最中に偶然にも JH が昆虫の発育に及ぼす新規な作用を見出した。それまで JH 自身は、昆虫の発育に対してはホルモンとしての活性はなく、エクダイソンが存在する時のみ、エクダイソンの作用を修飾する活性を示すと考えられていた。ところが、終齢幼虫になると成虫原基の発育を積極的に抑制するという新規な作用が JH にあることを発見した (TRUMAN *et al.* 2006)。さらに、正常に発育している昆虫では、JH の抑制作用に打ち勝つ物質が分泌されるために、JH の存在する終齢の摂食期の成虫原基は発育することも明らかにした。後に、この物質はインスリンと同定された (KOYAMA *et al.* 2008)。また、正常に発育している終齢幼虫は体重が臨界値を超えないと蛹へと変態できないが、それは JH の制御下にある。我々は、JH 分泌器官のアラタ体を除去して、上記の JH 制御作用をなくした幼虫を使用した実験から、体重に関係なく摂食によりスイッチが入る、「蛹化を導く内在のタイマー」が存在(脳以外に存在)していることを証明した(SUZUKI *et al.* 2013)。

これらは、ほとんどすべて実験形態学的手法により明らかにしたもので、私の研究は実験形態学に始まり、実験形態学で終わったと言っても過言ではない。

### 3人の mentors

研究を始めるには良き指導者が必要であり、たとえ全て自分で考えて行ったとしても、独りで研究を完遂することは自然科学の分野では不可能である。必ず、お世話になった人や影響を受けた人がいるはずである。私には 3人の偉大な mentor がいる。深谷昌次先生(元東京教育大学農学部教授・故人)、LYNN M. RIDDIFORD 先生(Howard Hughes Medical Institute)、JAMES W. TRUMAN 先生(Howard Hughes Medical Institute)である(図1)。RIDDIFORD 先生は米国 National Academy of Sciences の会員である。

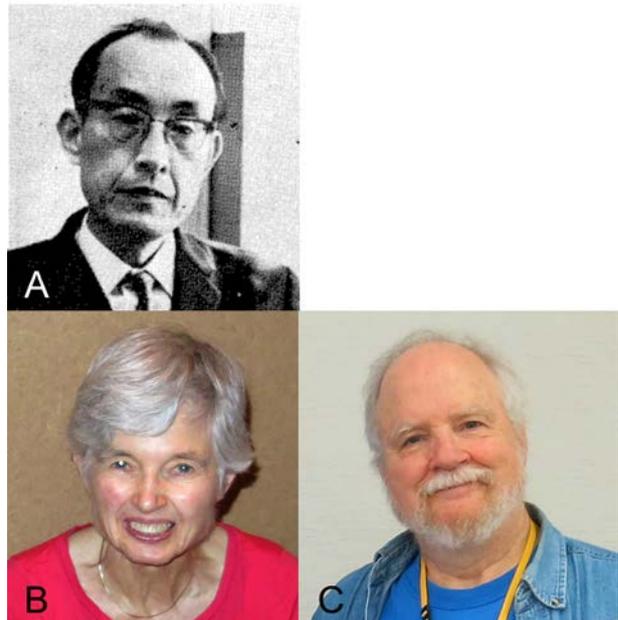


図1. 3人の mentors。A, 深谷昌次先生; B, Lynn M. Riddiford 先生; C, James W. Truman 先生

彼ら彼女に出会うことがなかったら、私は定年まで研究者として過ごすことは出来なかったといっても過言ではない。彼らからは常々、たとえ小

小さな課題でも良いから、人まねをせずにオリジナルな研究をなささい。また、あちこちいろいろな研究テーマに手を出さずに、一つのテーマをとことん突き止めなささいと言われ続けてきた。研究生生活を終えた時に「比留間は何の研究をしたの？」と問われたならば、「比留間の研究は何々だ」と皆に即座に答えられるような研究者になりなささいということだと思う。期せずして前者は、本田宗一郎の名言「まねをして楽をしたら、その後苦しみ、転落と崩壊しかない。苦しくとも、独自の製品を創り出せば、最終競争に勝つ王道に至る」の意味することと共通していると思う。あれもこれもと手を出しては、私のような普通の研究者は一つとして何も物にできないだろうことを、見ぬかれていたのだと思う。私自身は、彼らの考えに従って努力してきたつもりであるが、実際に実行できたかどうかは他の研究者が判断すべきであろう。

### 私の研究手法

どんなに小さな、些細な現象でも良いから、私は常に現象をターゲットにして研究をすすめるように心がけてきた(図2)。すなわちメカニズムを明らかにしたい現象を見出し、それらに影響を与える要因を、実験形態学的手法を含めて解析してきた。もちろん、研究が進むにつれて生化学や分子生物学的手法など、最新の現代生物学的手法を取り入れて、現象を説明するというスタンスを取ってきた。私の採った戦略は、少しずるい考えかも知れないが、たとえばショウジョウバエなど他種でメカニズム解明が先行され、メカニズムの解明自身は一部遅れをとったとしても、「自分だけの」現象の説明につながれば、新しい局面が開かれるというものである。タバコスズメガで明らかにした DDC 発現のエクダイソンカスケードそのものは、ショウジョウバエの研究に先行され興味であったが、幸運なことに研究手法および結果共にハエのそれとはかなり異なっており、何より

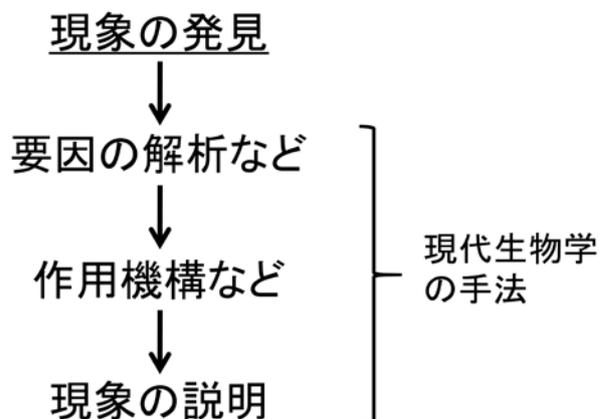


図2. 私の研究手法

も DDC 発現の分子機構解明の一部に繋がった。その上、DDC の発現調節という、ターゲットの明らかなエクダイソンカスケードを解明した最初の一つとなった。このカスケードは、長年研究を続けてきたメラニン化および皮膚の硬化の誘導機構の分子メカニズム解明の一端となり、全く異なった意味合いを持つこととなった。

私自身が現象を中心として研究を進めてきた理由は、他にもある。たとえ小さくても良いから、自分にとって興味ある、新しい、目に見える現象を発見し、その解明を行うことほど興味を惹かれることはなかったからである。また現象のない研究はすぐに色あせ、研究が進んでも、基本的なことが変わらない現象の研究は、比較的残りやすい気がしてならない。このことは解説書などでも同様なことが言える。例えば、Fred Nijhout が 1994 年に出版した "Insect Hormones" (Princeton University Press) は、昆虫の発育とホルモンとの関係を、現象を中心として解説した昆虫内分泌学の教科書である。この本の出版前や後にも、この分野では多くの教科書的な解説書が書かれた。これらの多くは生化学、分子生物学の知見を取り入れ、その時代の最新の情報を提供してくれたものであり、その時々には私も含めた多くの研究者にとって貴重なものであった。名著も多くあったが、本あるいは解説としての賞味期限が短いという性質

上、すぐに時代遅れとなり、数年で忘れ去られてしまっている。しかし Nijhout のこの本は、出版から 20 年経過した今でも、いまだに現役として読み続けられており、昆虫ホルモンを学生たちに教える時、世界中の多くの教育者達が参考になっている。このような「現象」は今後も続くと思う。

### 基礎研究に対する考え方

主として基礎研究を行ってきた者として、最後に基礎研究に対する私の考え方を述べたいと思う。

1) 自分が行わなくても誰かが行う研究課題は避けたほうが良い：特に他人の研究の穴埋め的な研究に相乗りするのは比較的楽であり、成果も出しやすいが、短期的にはともかく、長い目で見ると評価されない場合が多いような気がする。悪いことに、それがその分野のトピックス的な研究であった場合、オリジナルの研究の不明なことを解明した研究（穴を埋めた研究！）として高く評価され、多くの場合良い雑誌に掲載されやすい。ただし、結果的にはオリジナルの研究者の手助けをしているにすぎず、将来的には初めに見出した研究者の仕事として記憶されてしまうことが多い。

また、他の研究者が見出したことや、あるいは自身で見出したことを「目的もなく」種を変えてだけ行う安易な研究は避けるべきである。つまり、進化の研究や目的を持った研究である場合を除いて、種を変えて同じ研究をすることは基礎研究においては避けるべきと考える。ある現象や事象解明のために、同一種を使用しての研究を基本とすべきと思う。しかし、ある特定の事象解明において、現在使用している生物種では解明が困難あるいは不可能な場合や、有利となる種がある場合に実験材料を変えるのは賢明な選択であると思う。例えば、遺伝学的手法が使えるショウジョウバエやカイコ、あるいは dsRNA 作用が効果的な *Tribolium* などの使用は、目的とすることを解明す

る有用な実験材料となりうるかも知れない。

2) 自分が行わなければ、誰も行わない研究を行うべきである：私自身は「現象」の解明に興味を持ちそれに重点を置いてきたが、そうでない研究者も多くおり、それを否定するわけでは全く無い。むしろ現象解明以外にも非常に多くの生物学上の重要な発見がなされているが、考え方は同じで、どのような研究でも「自分が行わなければ誰も行わず、かつ意味のある研究を行う」べきである。

3) 「あれこれ目移りせずに、一つの目的に向かい、徹底的に解明する」という態度：これが研究を行うに際して一番重要なことだと思う。上述の 3 人の mentor には口を酸っぱくして自分自身の研究を持ってと言われ、私も重要だと感じて実践してきたつもりである。多くの分野に興味を持つことは重要であるが、あれもやり、これもやりと何もかも行くと、それぞれの研究全てが中途半端になり、一つとして自分のものとして確立出来ない可能性が高い。深谷昌次先生は「幼虫休眠のホルモン支配」を解明した業績以外に、「害虫の総合防除の概念」を確立した一人として知られており、2 つの大きな業績に輝いている。しかし、私のような凡人には一つが精一杯であり、多くのことを行うにも才能がなかったのが幸いした。

弘前大学の私の研究室と岩手大学の佐原健教授の研究室では、年に 1 度、外部の研究者も招待して、夏に合同セミナーを行っている。今夏 (2015 年) のセミナーで「研究生活 40 年」と題して研究に対する私の考え方を両大学の学生達に話したところ、佐原さん（先生と呼び合うことはお互いに禁止している）から「これ書いて残してよ」と言われてしまった。私の研究に対する考えを書き残しても批判こそ受け、何の役にも立たないと思ったが、今後の研究を担っていく若い研究者に些細な事でも何かのヒントになることがあるかもしれ

ないと思い直し、勇を鼓して筆を執った。この拙文の執筆中に、実際に実験を行っている自分自身の過去や、取り巻く多くの人達のことが走馬灯のように年代順に駆け巡り、楽しい思いに浸ることが出来た。この私の経験や考えを書くことを勧めてくださった佐原さんに感謝したい。初めに述べたように、ここに書いた考えはあくまでも私個人の意見であり、他の研究者の考え方と相容れない部分があるかもしれないことを強調しておく。

## 文 献

- CADOGAN B.L. *et al.* (1998): *Pest. Sci.* **53**, 80-90.
- 比留間潔 (1983): *化学と生物* **21**, 84-91.
- HIRUMA K. (2003): *In "Encyclopedia of Hormones"* (Henry H.L. and Norman A.W. ed), Vol. 2, pp. 528-535. Academic Press, San Diego.
- 比留間潔 (2008): *化学と生物* **46**, 571-578.
- HIRUMA K. and KANEKO Y. (2013): *Curr. Tops. Dev. Biol.* **103**, 73-100.
- HIRUMA K. and RIDDIFORD L.M. (1988): *Dev. Biol.* **130**, 87-97.
- HIRUMA K. and RIDDIFORD L.M. (2009): *Insect Biochem. Mol. Biol.* **39**, 245-253.
- HIRUMA K. and RIDDIFORD L.M. (2010): *J. Insect Physiol.* **55**, 798-804.
- HIRUMA K. *et al.* (1983): *Appl. Entomol. Zool.* **18**, 111-115.
- 金児雄・比留間潔 (2011): *比較内分泌学* **37**, 204-211.
- KANEKO Y. and HIRUMA K. (2014): *Dev. Biol.* **393**, 312-319.
- KANEKO Y. and HIRUMA K. (2015): *J. Insect Physiol.* **80**, 15-21.
- KANEKO Y. *et al.* (2011): *Mol. Cell. Endocrinol.* **335**, 204-210.
- 川村俊一 (2009): *虫に追われて: 昆虫標本商の打ち明け話*. 河出書房新社, pp. 239.
- KINJOH T. *et al.* (2007): *Insect Biochem. Mol. Biol.* **37**, 808-818.
- KOYAMA T. *et al.* (2008): *Dev. Biol.* **324**, 258-265.
- MURAMATSU D. *et al.* (2008): *Mech. Dev.* **125**, 411-420.
- RETNAKARAN A. *et al.* (1995): *Insect Biochem. Mol. Biol.* **25**, 109-117.
- RIDDIFORD L.M. (1976): *Nature* **259**, 115-117.
- SLAMA K. (1980): *Acta Entomol. Bohem.* **77**, 145-168.
- SUZUKI Y. *et al.* (2013): *PNAS* **110**, 12518-12525.
- TRUMAN J.W. *et al.* (2006): *Science* **312**, 1385-1388.
- UEDA H. *et al.* (2009): *J. Insect Physiol.* **55**, 798-804.

## Cry44Aa トキシンの殺虫活性作用機構について

中神あゆみ・伴戸久徳・浅野眞一郎  
北海道大学大学院農学院

本研究室で分離された *Bacillus thuringiensis entomocidus* INA288 株 (LAY *et al.* 1994) が産生する Cry44Aa は、ネッタイシマカに対して Bti 由来の Cry4Aa や Cry11Aa よりも強い殺虫活性を持ち、Bti に代わる、もしくは併用可能な Bt 剤として期待されているが、その詳細な作用機構については未だ解明されていない。Cry タンパク質の作用機構としては、現在以下のようなモデルが提唱されている。感受性昆虫に摂食された Cry タンパク質は昆虫体内のアルカリ条件下で可溶化しプロトキシンとなる。続いて消化液中のプロテアーゼにより分解され、活性化した Cry トキシンとなり、中腸上皮細胞膜上のレセプターと結合してオリゴマー化が起き、細胞膜に細孔を形成することで、細胞死が引き起こされ、昆虫を死に至らしめる (ARONSON *et al.* 1999; BRAVO *et al.* 2004)。Cry タンパク質の作用機構において重要なのが Cry トキシンと感受性昆虫レセプターの結合であり、レセプターの同定によりさらに効果的な Cry トキシンの利用が可能となる。ネッタイシマカの Cry トキシンレセプターとしてはアルカリフォスファターゼ (ALP) などが報告されているが、Cry44Aa については未だ明らかになっていない。

本研究ではネッタイシマカ ALP (以下 AeALP) に着目し、Cry4Ba と Cry11Aa の受容体として報告されている AeALP1 と中腸において最も転写量が多い AeALP3 をレセプター候補とし、GST 融合タンパク質として大腸菌で発現させ、プルダウンアッセイ、トキシンオーバーレイアッセイによる結合試験、殺虫活性阻害試

験、BBMV 結合競合試験を行った。

### 材料と方法

本研究室保存のプラスミド DNA、pHY44A-44Aorf2 (ITO *et al.* 2002) を、結晶非産生 *Bacillus thuringiensis* BT51 (YAMAMOTO *et al.* 1988) に形質転換して *cry* 遺伝子の発現に用いた。また、GST-AeALP1、GST-AeALP3 の発現は、本研究室保存の pGEX-AeALP1、pGEX-AeALP3 でそれぞれ形質転換した大腸菌 BL21 株を使用して行った。

プルダウンアッセイは以下のようにして行った。50  $\mu$ l の Glutathion Sephalose 4B を加えた Micro Bio-Spin Columns に GST-AeALP1 の終濃度が 0.5  $\mu$ M、ビオチン標識した Cry44Aa トキシン (以下 bio-Cry44Aa トキシン) の終濃度が 1  $\mu$ M になるように加え、還元型グルタチオンで溶出された画分を吸着画分とした。GST-AeALP3 についても同様に実験を行い、回収したものをそれぞれ Streptavidin horseradish peroxidase conjugate を用いたウエスタンブロット解析に供試した。

GST-AeALP1、GST-AeALP3 を用い、トキシンオーバーレイアッセイを行った。それぞれを 5  $\mu$ mol 含むようサンプルを調整し、SDS-PAGE 後、PVDF 膜に転写した。TBST 1 ml あたり Cry44Aa トキシンが 1  $\mu$ g 含まれるように調整した溶液に PVDF 膜を浸した後、INA288 抗血清を用いて Cry44Aa トキシンを検出した。

殺虫活性試験は、300  $\mu$ l の滅菌水を分注した

24 ウェルタイタープレートの各ウェルに 24 時間絶食させたネッタイシマカの 2 齢幼虫を 5 匹ずつ入れた。0.5 µg の Cry44Aa トキシンのみ、あるいは 0.5 µg の Cry44Aa トキシンのみと 25 µg の GST-AeALP1、0.5 µg の Cry44Aa トキシンのみと 25 µg の GST-AeALP3 を含む 200 µl の溶液を調整し、この溶液をそれぞれウェルに加え、室温で緩やかに震盪し、24 時間後に死亡数をカウントした。

ネッタイシマカ BBMV と GST-AeALP1 を用いて結合競合試験を行った。30 ng の bio-Cry44Aa トキシンのみを 300 ng または 3000 ng の GST-AeALP1 と 4 °C で 1 時間インキュベートした後、遠心分離し、上清をそれぞれネッタイシマカ BBMV (10 µg タンパク質) に加え、さらに 4 °C で 1 時間インキュベートした後、遠心分離により、BBMV に結合しなかった Cry トキシンを除いた。ペレットは Streptavidin horseradish peroxidase conjugate を用いたウエスタンブロット解析に供試した。

### 結果と考察

プルダウンアッセイによる結合調査を行った結果、GST-AeALP1 と bio-Cry44Aa トキシンの結合を示すシグナルが検出された。GST-AeALP3 ではシグナルは検出されず、結合は確認できなかった。

トキシンオーバーレイアッセイによる結合調査を行ったところ、GST-AeALP1 に対してシグナルが確認できた。シグナルはサイズから GST-AeALP1 に結合した Cry44Aa トキシンによるものであると推測できた。GST-AeALP3 では目的の位置にシグナルは検出されず、結合は確認できなかった。

GST-AeALP1、GST-AeALP3 を Cry44Aa トキシンと混合したものをそれぞれネッタイシマカ幼虫に与え、GST-AeALP1、GST-AeALP3 が殺虫活性に与える影響を調査した。GST-AeALP1

と Cry44Aa トキシンを混合したものを与えた結果、Cry44Aa トキシンのみを投与した場合と比較して死虫率が 23.1 % まで低下しており、強く殺虫活性を阻害することが確認された。これは GST-AeALP1 が Cry44Aa トキシンと結合することで、レセプターに結合する Cry44Aa トキシン量が低下したことによると考えられた。GST-AeALP3 においては、死虫率に大幅な低下は見られなかった。

Cry44Aa トキシンのレセプター分子として AeALP1 に着目し、ネッタイシマカ BBMV を用いた結合競合試験を行った。bio-Cry44Aa トキシンのみを BBMV と結合させたものより、GST-AeALP1 を bio-Cry44Aa トキシンとインキュベートさせてから BBMV と結合させたものの方が BBMV へのトキシンの結合量が大幅に低下しており、これは GST-AeALP1 と Cry44Aa が結合することにより、BBMV への結合阻害が生じているためだと考えられた。

これらの結果から、AeALP1 は Cry44Aa トキシンと結合しており、レセプターである可能性が高いと考えた。今後は、AeALP1 がレセプターとして機能していることをより明確なものとするため、RNAi により、AeALP1 遺伝子をノックダウンしたネッタイシマカに対する殺虫活性試験を行いたいと考えている。

### 文 献

- ARONSON A. *et al.* (1999): *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2503-7.
- BRAVO A *et al.* (2004): *Biochem Biophys Acta.* **1667**, 38-46.
- ITO T *et al.* (2002): *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 5673-5676.
- LAY B *et al.* (1994): *Abstract of the Pacific Rim BT Conference*, **30**.
- YAMAMOTO T *et al.* (1988): *Curr. Microbiol.* **17**, 5-12.

## Cry1A.106 の殺虫活性について

中石 有美・伴戸 久徳・浅野 眞一郎  
北海道大学大学院農学院

コナガはアブラナ科作物を食害する重要農業害虫である。コナガによる被害は全世界で年間40～50億USドルにもなる(FURLONG *et al.* 2013)。コナガの防除法の一つとして、*Bacillus thuringiensis* を製剤化した Bt 剤が用いられている。*B. thuringiensis* が孢子形成時に産生する結晶タンパク質 (Cry タンパク質) のうち、Cry1A は鱗翅目昆虫に対し強い殺虫活性を示すため防除資材として広く使用されている。しかしながら、Bt 剤の継続的利用により、抵抗性をコナガの出現が北米を初めとして世界中で報告されている(FURLONG *et al.* 2013)。このように抵抗性を獲得する標的害虫の出現は Bt 剤を使用する上で大きな問題となっている。

Cry1A.105 は Cry1Ac 抵抗性害虫にも殺虫活性を示すトキシシンとして期待され、ドメイン1、2がCry1Acで、ドメイン3はCry1Faからなるドメインスワップにより構築された。他のCryタンパク質と比べて鱗翅目昆虫に対し強い殺虫活性を示すことはわかっているが、その詳細な殺虫活性機構については明らかになっていない。

Cry タンパク質が殺虫活性を示すには、昆虫中腸消化液中のプロテアーゼにより活性化されること、中腸上皮細胞膜上のレセプターと結合し膜上に細孔を形成することが重要であると提唱されている。一方、抵抗性を獲得した昆虫では、昆虫中腸消化液中のプロテアーゼまたは中腸上皮細胞膜上のレセプターが欠失していた、または変異が生じていたという報告がある(HECKEL *et al.* 2004)。これにより、Cry タンパク質のプロテアーゼによる活性化及びレセプターとの結合が阻害されることで、抵抗性を獲得す

ると考えられている。そのためCry1A.105は、抵抗性昆虫中腸内におけるこうした阻害を克服できると推測される。

本研究では、Cry1A.105 の殺虫活性について検証するため、Cry1Ac ならびに Cry1Fa と相同性の高い Cry1Fb を用いて Cry1A.106 を構築した。Cry1A.106 の殺虫活性機構への影響を検証するため、Cry1Ac 感受性コナガに対する殺虫活性試験、消化酵素によるプロセッシング様式、中腸上皮細胞刷子縁膜小胞(BBMV)結合試験を行い、Cry1Ac と Cry1Fb と比較した。

### 材料と方法

本研究室で保存されていたCry1Ac発現プラスミドをテンプレートにドメイン1、2を、Cry1Fb発現プラスミドをテンプレートにドメイン3をクローニングし、オーバーラップ伸張PCR法によりCry1A.106を構築した。Cry1A.106をBT発現プラスミドであるpH2A(SASAKI *et al.*, 1996)にクローニングし、Cry1A.106発現プラスミドを作製し、非結晶産生株BT51株(YAMAMOTO *et al.* 1998)にトランスフェクションして、Cry1A.106を発現させた。Cry1A.106の発現はSDS-PAGE、抗Cry1Ac抗体、抗Cry1Fb抗体を用いたウェスタンブロットに供試し確認した。

北海道大学農学部付属農場で採取したコナガを継代飼育し、終齢幼虫を用いて殺虫活性試験を行った。段階希釈したCry1A.106、Cry1Fb、Cry1Ac懸濁液を40μlずつ2cm四方のキャベツに塗り供与した。室温で48時間後の死虫数を計

測した。プロビット法により、半数致死濃度 (LC<sub>50</sub>)を求めた。

Cry タンパク質懸濁液を可溶化し、トリプシンを加え 37 °C で 2 時間静置することで、プロセッシング様式を SDS-PAGE で検証した。

コナガの刷子縁膜小胞(BBMV)と ECL Protien Biotinylation Module を用いてビオチン化した Cry トキシン(200 ng)を結合 buffer に加え 200 µl に調整し、室温で一時間静置した。遠心分離 (15,000 rpm, 4 °C, 15 min)後、ペレットを wash し、BBMV に結合しなかったトキシンを除去した。ペレットはウェスタンブロットに供試し、ビオチン化トキシンのシグナルを検出した。

### 結果と考察

作出した Cry1A.106BT 発現プラスミドは BT51 において、76kDa のタンパク質として発現されており、目的のサイズであることが確認された。また、ウェスタンブロットに供試した際、抗 Cry1Ac 抗体、抗 Cry1Fb 抗体の両方で 76kDa の大きさのシグナルが検出されたことより、両方のアミノ酸配列を持つキメラトキシンの発現が確認された。殺虫活性試験の結果、コナガに対する Cry1A.106、Cry1Ac、Cry1Fb の LC<sub>50</sub> の値はそれぞれ 23.06 ng/cm<sup>2</sup>、10.47 ng/cm<sup>2</sup>、34.93 ng/cm<sup>2</sup> であった。Cry1A.106 の感受性のコナガに対する殺虫活性は他のトキシンと比べて大差がないと考えられた。

コナガ幼虫の消化液のメインプロテアーゼであるトリプシンで Cry1A.106、Cry1Ac、Cry1Fb

を処理したところ、どのトキシンも 60kDa サイズのバンドが確認された。Cry1Ac においてトリプシンにより切断される部位が明らかにされており、Cry1A.106 及び Cry1Fb で切断部位付近のアミノ酸配列は保存されているため、Cry1A.106 のプロセッシング様式は Cry1Ac、Cry1Fb と同じであると考えられる。プロセッシングにより生じる 60kDa のトキシンをビオチン化し、コナガ BBMV との結合試験を行った結果、全てのトキシンで結合のシグナルが認められた。

以上のことから、感受性のコナガにおいて、キメラトキシン Cry1A.106 は元となった Cry1Ac と Cry1Fb と同じようにトリプシンによるプロセッシングを受け BBMV に結合する。そのため殺虫活性には著しい差がなく、Cry1A.106 が感受性のコナガの殺虫活性には大きな影響を与えないことが示唆された。このことは、今後抵抗性のコナガにおける Cry1A.106 の殺虫活性機構を検証する上で参考となる有用なデータであると考えられる。

### 文 献

- HECKEL D. *et al.* (2004): The Management of Diamondback Moth and Other Crucifer Pests. Ridland P.M. and Endersby N.M. eds. pp27-36.
- FURLONG M. *et al.* (2013): Annu. Rev. Entomol. **58**, 517-541.
- SASAKI J. *et al.* (1996): Curr. Microbiol. **35**, 1-8.
- YAMAMOTO T. *et al.* (1988): Curr. Microbiol. **17**, 5-12.

## *BmSyndecan* ノックダウン BmN 細胞における BmNPV の増殖

宇多桃香<sup>1</sup>・佐藤昌直<sup>2</sup>・浅野眞一郎<sup>1</sup>・伴戸久徳<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>北海道大学大学院農学院・<sup>2</sup>慶應義塾大学先端生命研究所

カイコガを宿主とするカイコ核多角体病ウイルス (*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus: BmNPV) はバキュロウイルス科に属する核多角体病ウイルスの一種である。NPV は一次感染に関与する包埋体由来ウイルス (occlusion derived virus: ODV) と二次感染に関与する出芽ウイルス (budded virus: BV) でそれぞれ異なるウイルス形態を有する。感染後期ではポリヘドリンを主成分とする包埋体が細胞核内に確認できるようになり、この強力なポリヘドリンプロモーターの制御下に外来遺伝子を発現させる外来遺伝子発現ベクターとして利用されている。より多くのタンパク質を回収するためには BV による二次感染を拡大させることが重要であるが、二次感染には不明な点が多い。

二次感染にはウイルスの膜タンパク質である GP64 が必須であり、ウイルスが細胞へ侵入する際の細胞への結合や膜融合に関与する (ROHMANN 2013)。一方、二次感染に関与する細胞因子には様々なものが挙げられている。例えば、細胞表面上に存在するリン脂質やコレステロール、リピッドラフト領域やプロテオグリカンなどの関与が示唆されてきた (TANI *et al.* 2001; HUANG *et al.* 2014)。しかし、特定のレセプタータンパク質の有無については議論が分かっている。特定のレセプタータンパク質があるとする説一方で、非特異的な静電気力で細胞膜上に存在する何らかの分子と結合し侵入する、またこれらの両者の場合によって使い分けてい

るといった説があるが、少なくとも特定のレセプタータンパク質の報告はこれまでにない。

近年、BmNPV の近縁種であり、最も研究が盛んに行われている核多角体病ウイルスの AcMNPV が哺乳細胞に侵入する際、ヘパラン硫酸プロテオグリカンの一種である Syndecan-1 をレセプターとして利用することが報告された (MAKKONEN *et al.* 2013)。AcMNPV は哺乳細胞を自然宿主とはせず、細胞内に侵入するのみで複製はしないため、哺乳動物細胞への安全なウイルスベクターとして注目されており、近年、細胞への侵入機構について研究が精力的になされてきた。バキュロウイルスにおいて特定のタンパク質がレセプターとして同定されたのはこれが初めてであり、今後バキュロウイルスのレセプター研究とその応用において重要な足がかりになると考えられる。本研究では、BmNPV が宿主細胞 (BmN) に感染する際にも Syndecan 様タンパク質が重要な役割を果たしているかどうかを RNA 干渉 (RNA interference: RNAi) 法を用いて調査した。

### 材料と方法

#### 1) 供試細胞、供試ウイルス

供試細胞は当研究室で継代培養されているカイコ卵巣由来 BmN 細胞を用いた。BmN 細胞は TC-100 培地 (PanReac AppliChem) にウシ胎児血清 (BIOSERA) を 10% になるように加えた血

清培地を利用して、26°C でインキュベートし培養した。

供試ウイルスは当研究室で継代保存されている BmNPV T3 株を用いた。

## 2) ds-RNA の作製

BmN 細胞より total RNA を抽出し、cDNA を合成した。この cDNA をテンプレートにして、カイコの *Syndecan* 遺伝子ホモログ (*BmSyndecan*) の配列 (GENBANK, accession number XM004932339; GENBANK, accession number XM004935340) の一部を PCR によって増幅し、これを pGEM T-easy vector (Promega) にクローニングした。さらにこれを SP6 RNA Polymerase promoter と T7 RNA Polymerase promoter 領域にあたるプライマーを用いて PCR を行い、増幅された DNA 断片をアガロースゲル電気泳動により精製した。これをテンプレートとして、SP6 RNA Polymerase と T7 RNA Polymerase を用いて相補的な ss-RNA をそれぞれ合成し、これらをアニーリングさせることで ds-RNA を作製した。

## 3) *BmSyndecan* ノックダウン実験

X-treamGENE 9 DNA Transfection Reagent (Roche Life Science) を用いて BmN 細胞に ds-RNA を導入し、48 時間培養した。この ds-RNA を導入して 48 時間培養を続ける操作をさらに 2 回繰り返した。3 回目の ds-RNA トランスフェクションの 10 時間後、細胞に感染多重度 0.1 に希釈したウイルス液を接種し、その後 0 時間から 48 時間まで経時的に培養上清中の DNA と細胞 RNA の抽出を行った。これらのサンプルを用いて、培養上清中のウイルス DNA 量 (コピー数) と細胞における *BmSyndecan* 転写量を定量 PCR により測定した。

## 結果と考察

AcMNPV 感染哺乳細胞 (HepG2 細胞、EA.hy926 細胞) においては、ウイルスと

*Syndecan-1* の局在が一致すること、また *Syndecan-1* を抗体でマスクすることによってウイルスの感染拡大が抑制されることが免疫学的手法を用いて示された (MAKKONEN *et al.* 2013)。しかし現在、抗 *BmSyndecan* 抗体は入手できないことから、本研究では *BmSyndecan* ノックダウン BmN 細胞において、ウイルス感染が抑制されるかどうかを定量 PCR 法により解析した。

まず、BmN 細胞に ds-RNA を導入することで *BmSyndecan* の発現が阻害されるかどうかを調査したところ、ds-RNA を 1 回トランスフェクションすることで *BmSyndecan* の転写量はトランスフェクション後 48 時間でコントロール細胞の 1 割以下まで抑制された。一般にヘパラン硫酸プロテオグリカンのターンオーバーは 1~6 時間程度と言われており (IOZZO, 1987; BRANDON *et al.*, 2003)、*Syndecan* は細胞表層ヘパラン硫酸プロテオグリカンの代表的ファミリーであることから、ds-RNA のトランスフェクション後 6 時間以降では、細胞表面上に存在する *BmSyndecan* を効果的に除去できると考えられた。そこで、ds-RNA 導入 10 時間後 (材料と当方参照) の BmN 細胞に BmNPV を感染させ、経時的に *BmSyndecan* の発現とウイルスの増殖を定量 PCR 法で解析した。その結果、*BmSyndecan* の発現 (転写) は、ウイルス感染後 48 時間まで効果的にノックダウンされた。一方、BmNPV の増殖に関しては、コントロールと比べて明確な差は認められなかった。これらの結果から、*BmSyndecan* は BmN 細胞における BmNPV の感染・増殖に顕著な影響を与えるほど重要な役割は担っていないことが強く示唆された。

## 文 献

- BRANDON J.B. (2003): *Matrix Biology*, **22**, 163-177  
HUANG J. *et al.* (2014): *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **453**, 166-171.  
IOZZO R.V. (1987): *J. Biol. Chem.* **262**, 1888-1900.  
MAKKONEN K.E. *et al.* (2013): *J. Virol.* **87**,

11148-11159.  
ROHMANN G.F. (2013): *National Center for  
Biotechnology*

*Information*[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/  
NBK49](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK49)  
TANI H. *et al.* (2001): *Virology* **279**, 343-353.

## 毛翅目昆虫における染色体同定

藤本 章晃<sup>1</sup>・鈴木 剛<sup>2</sup>・奥村 梓<sup>2</sup>・安河内 祐二<sup>3</sup>・吉戸 敦生<sup>4</sup>・佐原 健<sup>1</sup>  
岩手大学農学部<sup>1</sup>・大阪教育大学自然研究専攻<sup>2</sup>・農業生物資源研究所<sup>3</sup>・  
チェコ科学アカデミー生物学研究センター<sup>4</sup>

昆虫綱の性決定システムは、大部分の目においてXY/XXと表記される雄ヘテロ型である。しかし、毛翅目と鱗翅目昆虫のみが雌ヘテロ型の性決定システムを採用し、分散動原体型と呼ばれるマイナーな染色体構造を共有している(MAREC and NOVÁK, 1998)。毛翅目昆虫は約2億年前に鱗翅目昆虫と分岐した昆虫グループである(MISOF *et al.* 2014)。この目は49科14,300種同定されており(ZHANG 2011)、シマトビケラ上科、ナガレトビケラ上科、エグリトビケラ上科に3上科に分類される。一部の例外を除き幼虫期から蛹期まで水中生活を行う水生昆虫で、可携性もしくは固着性の巣を形成する。終齢幼虫から蛹に変態する時期には外敵から身を守りつつ脱皮するために巣を固定し、入り口を封鎖するが、羽化の際には巣を切り開き、陸上に上がって脱皮を行う。成虫期は陸上で生活し、産卵時に雌が水中に潜り、固形物に卵塊を産み付ける種がほとんどである(津田・赤木 1962)。

染色体研究に関しては、エグリトビケラ科の一種において、染色体数が雄  $2n=40$ 、雌  $2n=39$  であることが最初に報告され(KLINGSTEDT, 1931)、その後の染色体研究により各科における代表的な染色体数が推測された(MAKINO and KICHIO, 1935; KIAUTA, 1971)。シマトビケラ上科は最も祖先的であると推測され、染色体数は比較的少ない。シマトビケラ科が  $n=15$ 、イワトビケラ科とヒゲナガカワトビケラ科が共に  $n=13$  であり、それぞれのグル

ープの基本数とされている。ナガレトビケラ上科のナガレトビケラ科は  $n=23$  が基本数とされている。最も進化的な上科とされているエグリトビケラ上科のナガレトビケラ科においては、31種の染色体数がカウントされており、最も多かった  $n=30$  が基本数とされている。この数は鱗翅目昆虫の染色体基本数(AHOLA *et al.* 2014; YASUKOCHI *et al.* 2015)とされている  $n=31$  に近い。また、この科以外においてはニンギョウトビケラ科、トビケラ科、キソトビケラ科、ヒゲナガトビケラ科においてそれぞれ、 $n=22$ 、 $28$ 、 $27$  および  $25$  が基本数と推測されている。

BAC-FISH法によりモデル鱗翅目昆虫のカイコで染色体同定とカリオタイプ法が達成(YOSHIDO *et al.* 2005)されて以降、いくつかの鱗翅目昆虫種において染色体同定研究が進んだ(YASUKOCHI *et al.* 2009; YOSHIDO *et al.* 2011; SAHARA *et al.* 2013)。これらの研究と分子連関地図やゲノム解析による染色体進化に関する知見も同様に深まっている(HELICONIUS GENOME CONSORTIUM, 2012; VAN'T HOF *et al.* 2013; YOU *et al.* 2013; AHOLA *et al.* 2014)。これらの結果から、鱗翅目昆虫では、染色体の対応関係が融合や切断によって説明でき、染色体進化においてマクロなシンテニーが認められるとともにオルソログの配置が高度に保存されているとのコンセンサスが形成されつつある(YASUKOCHI *et al.* 2015)。

一方、姉妹系統関係にある毛翅目昆虫における染色体研究に大きな進展はこれまでなかった。そこで本研究では、日本において広く分布し、水質調査や地理的分布の研究に用いられているヒゲナガカワトビケラ科のヒゲナガカワトビケラ(林・谷田 2008)に対して、鱗翅目昆虫と同様に BAC-FISH 法を用いた染色体の同定を試みた。

## 材料と方法

### 1) 供試昆虫

本研究には、2007 年 7 月 25 日に札幌市南区豊滝の盤溪川、2012 年 6 月 11 日に盛岡市玉山区栗木田官代沢ならびに 2013 年 5~6 月に盛岡市上ノ橋付近の中津川にて採集したヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata* Navas)の幼虫と蛹を使用した。

札幌を除く上記の採集地においてヒゲナガカワトビケラとチャバネヒゲナガカワトビケラが混在しているため、幼虫は頭部の斑紋と前肢基節にある突起を確認し、基部側が長く、額頭楕正中線に沿った細長い斑紋がある個体をヒゲナガカワトビケラとした(津田・赤木 1962)。蛹と成虫は前肢の距式を確認し、3-4-4 のものをヒゲナガカワトビケラとし 0-4-4 または 2-4-4 のチャバネヒゲナガカワトビケラと区別した。

### 2) BAC ライブラリー作製

盛岡市玉山区栗木田官代沢で採集したヒゲナガカワトビケラの蛹を用いて作製を行った。pBeloBAC11 の *HindIII* サイトへ部分消化したヒゲナガカワトビケラ HMW ゲノム断片を挿入した。大腸菌 DH10b へのエレクトロポレーションにより形質転換体を得て、挿入のあるシングルコロニーをストックすることでライブラリーを作製した。BAC ライブラリー作製の詳細については藤本 (2014)に記述した。

### 3) BAC ライブラリーの平均インサート長調査

ランダム抽出した BAC から DNA を単離し、インサート長を確認するために CHEF Mapper® XA システム(BioRad)を用いてパルスフィールド電気泳動を行った。BAC-DNA を *NotI* 処理によりベクターDNA を切断し、1% Pulse Field Certified Agarose (BioRad)ゲルにて泳動することでインサートサイズの合計長を求めた。泳動条件は「5-400kb」を分画する Autoalgorithm モードを用いた。

### 4) 染色体標本作製

盛岡市上ノ橋付近の中津川にて採集した終齢幼虫と蛹の体腔内から抽出した生殖巣より、TRAUT (1976)の方法を一部改変して染色体標本作製した。

### 5) オルソログ特定とクローン選抜

札幌市採集のヒゲナガカワトビケラ個体から全 RNA 抽出を行った後、mRNA を精製した。この mRNA をテンプレートとして SuperScript® Choice System for cDNA Synthesis (Invitrogen)を用いて cDNA ライブラリーを作製した。

任意のクローンについてシーケンスを行い、EST シーケンスデータをクエリーとして Kaikobase (<http://sgp.dna.affrc.go.jp/KAIKObase>) に対して、tBlastX サーチを行い、206 個のカイコ単一遺伝子オルソログ候補を得た。この情報に基づきカイコ単一遺伝子オルソログと考えられる配列について STS プレイマーをデザインした。それらを用いて、ヒゲナガカワトビケラ BAC ライブラリーから、カイコの単一遺伝子オルソログと推測された BAC を 3 ステップ選抜法 (YASUKOCHI, 2002) で選抜した。

### 6) BAC-FISH

それぞれのクローンより QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen)を用いて、BAC-DNA を抽出した。Nicktranslation Kit (Abbott)により、蛍光色素をラベ

ルした BAC-DNA をプローブとして FISH を行った。FISH した染色体標本は蛍光顕微鏡 DM6000B (Leica)を用いて観察し、B&W CCD カメラ(DFC350 FX, Leica)と RS Image (LAS AF ver: 1.8.0)により、DAPI 蛍光、Cy5 蛍光、Orange 蛍光、Green 蛍光、Red 蛍光をそれぞれデジタル化して保存した。デジタル画像は Adobe Photoshop CS6 を用いてプロセした。

## 結果と考察

染色体標本の観察から、ヒゲナガカワトビケラの染色体数は雄が  $2n=26$ 、雌が  $2n=25$  と先行研究 (MAKINO and KICHUO, 1935)で示されていた結果が確認された。

今回作成した BAC ライブラリーは 384 ウェルプレート 84 枚に相当し、92 クローンの平均インサート長は 65.3kb であった。ヒゲナガカワトビケラのゲノムサイズが鱗翅目昆虫と同様に約 400Mb であると想定すると、本ライブラリーは約 5 ゲノム分に相当する。このライブラリーを用いて、前述した STS プライマーにより 77 クローンのカイコ単一遺伝子オルソログを含む BAC クローンを選抜した。

これまでに公表されている鱗翅目昆虫の物理マッピングでは、カイコとの対応関係を想定し、対処種の各染色体をマッピング同定することが可能であった。そこで、選抜された 77 クローンから、カイコ同一染色体上に座している遺伝子のオルソログを含むクローンを複数選択し、それぞれからプラスミドを抽出、異なる蛍光ラベルを施しヒゲナガカワトビケラの染色体標本を用いて BAC-FISH を行うことで二種間の染色体対応関係を調査した。その結果、一部の限られた領域のみ対応関係が確認されたものの、鱗翅目昆虫でコンセンサスが得られつつある各染色体の対応関係は、明確ではなかった。

この結果をうけて、ヒゲナガカワトビケラでは、

鱗翅目昆虫で通常行われている方法とは別の方法により各染色体を特定する必要があることが明らかとなった。よって、一度 BAC-FISH に使用した染色体標本に対して、再度 FISH を行う、鱗翅目昆虫のリプローブ法 (SHIBATA *et al.* 2009)を適応することで、染色体同定を行うこととした。雌の減数分裂前期の核に対して BAC-FISH ならびにリプローブを試みた。1 回の FISH に 4 色の異なる dye ラベルのプローブを用いて、同一標本に 5 回の BAC-FISH を行う事で、11 の常染色体を FISH シグナルによって識別、1 つの常染色体 (第 12 染色体) はシグナルが無いことで識別し、さらに雌の性染色体がユニバレントであるため、丸くなる形態的特徴で区別して全染色体の識別に成功した。

この成功に基づき、シグナルが認められなかった第 12 染色体と Z 染色体に座乗する BAC を特定し、雄の減数分裂前期核において、すべての染色体を同定する事も可能となった。つまり、13 染色体対についてのカリオタイプに成功した。また、2 回の FISH により、カリオタイプする事にも成功しており、さらに未同定 BAC をリプローブすることで、その染色体標本に対して、カイコ単一遺伝子オルソログマッピングを行えるシステムが開発できた。

鱗翅目昆虫においては、これまでに FISH マッピングによりカイコオルソログの染色体の座乗位置の保存性や染色体対応関係を解明する研究が進められてきた。本研究では、対応関係の無いもしくは、小さい種に対してヒゲナガカワトビケラにおける FISH マッピングを進捗させる細胞遺伝学的な研究方法が提案できた。現在、この方法を用いて、マッピングを行っている。

## 文 献

- AHOLA V. *et al.* (2014): Nature Commun. **5**, 4737.  
林義雄・谷田一三 (2008) 応用生態工学 **11(2)**, 153-159.

- HELICONIUS GENOME CONSORTIUM (2012): *Nature*, **487**, 94-98.
- KIAUTA B. (1971): *Ergebn. Wiss. Unters. Schweiz. Natn. Parks*, **9 (64)**, 174-185.
- KLINGSTEDT H. (1931): *Kol. Acta Zool. Fennica*, **10**, 1-69.
- MAKINO S. and KICHIO H. (1935): *J. Fac. Sci. Hokkaido Imp. Univ. VI (Zoology)*, **3**, 9-16.
- MAREC F. and NOVÁK K. (1998): *Eur. J. Entomol.* **95**, 197-209.
- MISOF B. *et al.* (2014): *Science*, **346**, 763-767.
- 藤本章晃 (2014): 岩手大学農学部卒業論文. 73pp.
- SAHARA K. *et al.* (2013): *Insect Biochem. Mol. Biol.* **43**, 644-653.
- SHIBATA F. *et al.* (2009): *Zoological Sci.* **26**, 187-190.
- TRAUT W. (1976): *Chromosoma*, **58**, 275-284.
- 津田松苗・赤木郁恵 (1962) 毛翅目. In 水生昆虫学. 津田松苗編, pp112-148.
- YOU M. *et al.* (2013): *Nature Genetics*, **45(2)**, 220-225.
- YASUKOCHI Y. (2002): *Methods in Mol. Biol.* **192**, 401-410.
- YASUKOCHI Y. *et al.* (2009): *PLoS ONE*, **4(10)**, e7465.
- YASUKOCHI Y. *et al.* (2015): *Heredity*, in press.
- YOSHIDO A. *et al.* (2005): *Genetics*, **170**, 675-676.
- YOSHIDO A. *et al.* (2011): *Insect Biochem. Mol. Biol.* **41**, 370-377.
- VAN'T HOF A.E. *et al.* (2013): *Heredity*, **110**, 283-295.
- ZHANG Z.Q. (2011): *Zootaxa*, **3148**, 1-237.

## 東北蚕糸・昆虫利用研究報告投稿要領

1. 東北蚕糸・昆虫利用研究報告(以下本報告)への投稿者は日本蚕糸学会員にかぎる。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、学術用語は日本蚕糸学会編「蚕糸学用語辞典」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、 $\mu$ m、nm、ha、a、(アール)、m<sup>2</sup>、ml、 $\mu$ l、kg、g、mg、 $\mu$ g、sec、min、hr、rpm、%、ppm、M(モル濃度)、N(規定度)、 $^{\circ}$ C、kcal、pH、RH(相対湿度)、<sup>32</sup>P(放射性リン <sup>32</sup>P)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(田中義麿編), 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、蚕糸学文献目録、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](mailto: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る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 27 年 1 月 1 日～平成 28 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)

### 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)

### 委員 (庶務担当)

比留間 潔 (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 27 年 12 月 20 日

発 行 平成 27 年 12 月 20 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

