

東北蚕糸・昆虫利用研究報告

第 44 号

令和元年 12 月

日本蚕糸学会東北支部

No.44 目 次

藤本 章晃 倉西 良一 安河内 祐二 佐原 健	ホタルトビケラおよびニンギョウトビケラの BAC ライブラリーの構築 1
高木 圭子 大森 裕介 富田 秀一郎 金児 雄	カイコ 5 齢幼虫のヒートショックの誘導方法の条件検討 5
関口 真理 佐藤 昌直 浅野 眞一郎 伴戸 久徳	カイコ核多角体病ウイルス H4 株の膜タンパク質 GP64 の膜融合活性 10
中西 登志紀 関口 真理 浅野 眞一郎 伴戸 久徳 佐藤 昌直	マイクロプレートウェル全体をカバーする ステッチング画像のバイアス補正技術の確立 15
伊藤 水音 佐藤 昌直 伴戸 久徳 浅野 眞一郎	INA288 株由来 Cry44Aa トキシンのイエカ殺虫活性機構の解明 19
亀田 侑希 高木 圭子 丸田 莉奈 小谷 英治	カイコゲノム編集のための簡易操作法 22

ホタルトビケラおよびニンギョウトビケラの BAC ライブラリー構築

藤本 章晃¹・倉西 良一²・安河内 祐二³・佐原 健^{1,*}

岩手大学農学部¹・千葉大学理学部²・農業・食品産業技術総合研究機構³

トビケラ目昆虫とチョウ目昆虫は約 2 億年前に共通祖先からそれぞれ分岐した昆虫群で、最も近縁な姉妹系統群の 1 つである (MISOFF *et al.* 2014)。染色体に関しても、昆虫綱においてマイナーな雌ヘテロ型の性決定システムと分散動原体型染色体構造を共有している (MAREC and NOVÁK, 1998)。トビケラ目昆虫の染色体研究は、染色体の観察実験によって、性染色体構成と染色体数の特定が複数種において報告されている (KIAUTA, 1971; LUKHTANOV, 2000)。性染色体構成は解析されたすべての種で雄が ZZ、雌が ZO である。トビケラ目昆虫 3 上科で初期に分岐したシマトビケラ上科の種では、染色体数が $n=13\sim 15$ と他の上科に比べ少ない。ナガレトビケラ上科では、ヒメトビケラ科は $n=14$ 、ナガレトビケラ科は $n=23$ の種が報告されている。エグリトビケラ上科では解析された種が最も多く、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ではそれぞれ、 $n=22$ 、 28 、 27 および 25 の種が報告されている。エグリトビケラ科では 17 種の解析が行われ、染色体数は $n=6\sim 30$ と多様性が認められるが、10 種が $n=30$ であったことから、基本数は $n=30$ と推測されている。一方、チョウ目昆虫はトビケラ目昆虫に比べ、大規模な種数の染色体数のカウントが行われた結果、チョウ目昆虫における染色体の基本数は $n=31$ と推測されている (ROBINSON, 1971)。この基本数は、次世代シーケンサー解析によるゲノム解読や fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

による遺伝子マッピング解析からも支持されている (AHOLA *et al.* 2014; YASUKOCHI *et al.* 2016)。チョウ目昆虫間の染色体対応関係は、基本的に 1 対 1 対応であることと、その染色体座上遺伝子の位置さえも高い保存性が確認されている (SAHARA *et al.* 2013; YASUKOCHI *et al.* 2016)。染色体数の増減があった場合も、単純な切断と接着の関係で説明ができる (YOSHIDO *et al.* 2011; HELICONIUS GENOME CONSORTIUM, 2012)。このような染色体の対応関係がトビケラ目昆虫に存在することが確認できれば、チョウ目昆虫において解析が困難とされている単門亜目の種の染色体構成を推測することができると考えられる。ゆえに筆者らは、シマトビケラ上科ヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) において、BAC ライブラリーを構築し (藤本ら, 2015; FUJIMOTO *et al.* 2018)、FISH マッピングによる染色体比較を行った。その結果、ヒゲナガカワトビケラとチョウ目昆虫との染色体対応関係は、性染色体 (Z) のみに認められ、常染色体間は大きなリアレンジメントが予測された (藤本ら, 未発表)。ヒゲナガカワトビケラは、最も祖先的と考えられるシマトビケラ上科に属する。進化的な分類群における染色体対応解析研究は存在しないので、チョウ目昆虫とのトビケラ目昆虫の一部のグループとの間に常染色体対応関係が存在する可能性はある。そこで、本研究では、エグリトビケラ上科のホタルトビケラ (*Nothopsyche ruficollis*) およびニンギョウトビケラ (*Goera japonica*) の BAC ライ

*責任著者

〒020-8550 盛岡市上田 3-18-8

e-mail: sahara@iwate-u.ac.jp

ブラリーを構築し、染色体比較研究のツールを得た。なお、一部の BAC を用いた FISH 実験によって、エグリトビケラ上科 2 種へ FISH 解析を適用することに成功し、研究基盤も形成できた。

材料と方法

1. 供試昆虫

ホタルトビケラは、2017 年 6 月に千葉県君津市豊英の小糸川にて幼虫を採集し、岩手大学内の研究室で、適切なステージまで飼育を行った。ニンギョウトビケラは、2016 年 8 月と 2017 年 5 月に岩手県盛岡市上米内の米内川にて幼虫と蛹を採集した。

2. BAC ライブラリー作製

BAC の作製は、FUJIMOTO *et al.* (2018) に準じて行った。つまり、ホタルトビケラおよびニンギョウトビケラの蛹約 600 mg からそれぞれ高分子 DNA を抽出し、アガロースゲルに内包した。アガロースゲル内の高分子 DNA を *HindIII* にて部分消化し、低融点アガロースゲルを用いて CHEF Mapper® XA システム (BioRad) によるパルスフィールド電気泳動で約 100~125 kb 程度のゲノム断片を分画し、ゲル抽出によって断片化した DNA を獲得した。さらに、*HindIII* で完全消化済みの pBeloBAC11 とのライゲーションを行った。ライゲーションミックスは、コンピテントセル HST08 Premium Electro-Cells (TaKaRa) にエレクトロポレーション (1.5 kV, 25 μ F, 100 Ω) で導入し、形質転換体を獲得した。形質転換体は X-gal と IPTG を塗布した 10 μ g/ml のクロラムフェニコール含有 LB 培地にて培養を行い、白コロニーのみを 8% グリセロール入りの LB 溶液 (20 μ g/ml クロラムフェニコール含有) に植菌し、16 時間以上 37°C で培養した後、-80°C にストックした。

3. BAC ライブラリーのインサートサイズ推定

ストックした白コロニーを無作為抽出し、BAC からプラスミッド DNA を QIAGEN Plasmid Midi Kit を用いて抽出した。約 400 ng のプラスミッド DNA を 5 時間以上、37°C で *NotI* 処理することで、プラスミッド DNA をベクター DNA とインサート DNA に切断した後、1% Pulse Field Certified Agarose (BioRad) ゲルを用いて CHEF Mapper® XA システムでパルスフィールド電気泳動を行った。泳動条件は、「5-400 kb」を分画する Auto algorithm モードを用いた。ベクターを除いたインサートサイズの合計を供試数で除して平均インサートサイズを推定した。

4. 染色体標本作製

TRAUT (1976) を一部改変して、ホタルトビケラおよびニンギョウトビケラの終齢幼虫から抽出した卵巣もしくは精巣を用いて、減数分裂パキテン期の染色体標本作製した。

5. FISH

BAC-FISH ならびに画像解析は、YOSHIDO *et al.* (2014) に従って行った。FISH には QIAGEN Plasmid Midi Kit で抽出したプラスミッド DNA を Nick translation Kit (Abbott) で蛍光ラベルしたものをプローブとして用いた。FISH された染色体標本は蛍光顕微鏡 DM6000B (Leica) を用いて観察し、FX 白黒 CCD カメラの DFC350 (Leica) にて画像をデジタルデータとして保存し、Adobe photoshop CS6 にて画像の解析を行った。

結果と考察

本研究で構築したホタルトビケラの BAC ライブラリーは、総クローン数 42,240、平均インサートサイズ 57.97 kb から推定される総インサートサイズは 2,449 Mb であった (表 1)。ニンギョウトビケラの BAC ライブラリーは、総クローン数 79,872、平均インサートサイズ 46.33 kb から推定される総

インサートサイズは、3,700 Mb となった。トビケラ目昆虫のゲノム情報は、現在 5 種が報告されており (i5K CONSORTIUM, 2013; FERGUSON *et al.* 2014; WEIGAND *et al.* 2017; 2018; LUO *et al.* 2018)、推定ゲノムサイズは、451~1,369 Mb である。最大のサイズを持つ種を基準とすると、我々の構築した BAC ライブラリーは、ホタルトビケラで約 1.78 ゲノム分、ニンギョウトビケラでは約 2.70 ゲノム分に相当する。ヒゲナガカワトビケラ BAC ライブラリー (FUJIMOTO *et al.* 2018) は、平均インサートサイズが 65.38 kb、総クローン数 32,256 であり、総インサート長は 2,108 Mb と推定される (表 1)。シマトビケラ上科の *Stenopsyche tienmushanensis* ゲノム解析 (LUO *et al.* 2018) から推定されたゲノムサイズは、451.5 Mb と他の上科の種よりも小さい。エグリトビケラ上科の *Limnephilus lunatus* および *Sericostoma* sp. は、推定されたゲノムサイズが共に 1,000 Mb を超える (i5K CONSORTIUM, 2013; WEIGAND *et al.* 2017)。こうした情報から、本研究では、ヒゲナガカワトビケラ BAC ライブラリーよりもストッククローン数を増加させた。しかしながら、ヒゲナガカワトビケラと比較して、ホタルトビケラでは 7.41 kb、ニンギョウトビケラでは 19.05 kb も平均インサートサイズが小さかった。高分子 DNA 抽出に使用した蛹個体数が、ヒゲナガカワトビケラでは蛹 3 個体だったのに対し、個体サイズの小さなホタルトビケラならびにニンギョウトビケラでは、それぞれは 20 個体程度ならびに 30 個体と多く、抽出過程で粗雑物が多くなった。そのため、十分な長さの高分子 DNA の抽出ができなかった可能性とライゲーション効率の低下が要因として

表 1. トビケラ 3 種の BAC ライブラリー比較

種名	総クローン数	平均インサートサイズ (kb)	総インサート長 (Mb)
ホタルトビケラ	42,240	57.97	2,449
ニンギョウトビケラ	79,872	46.33	3,700
ヒゲナガカワトビケラ	32,256	65.38	2,108

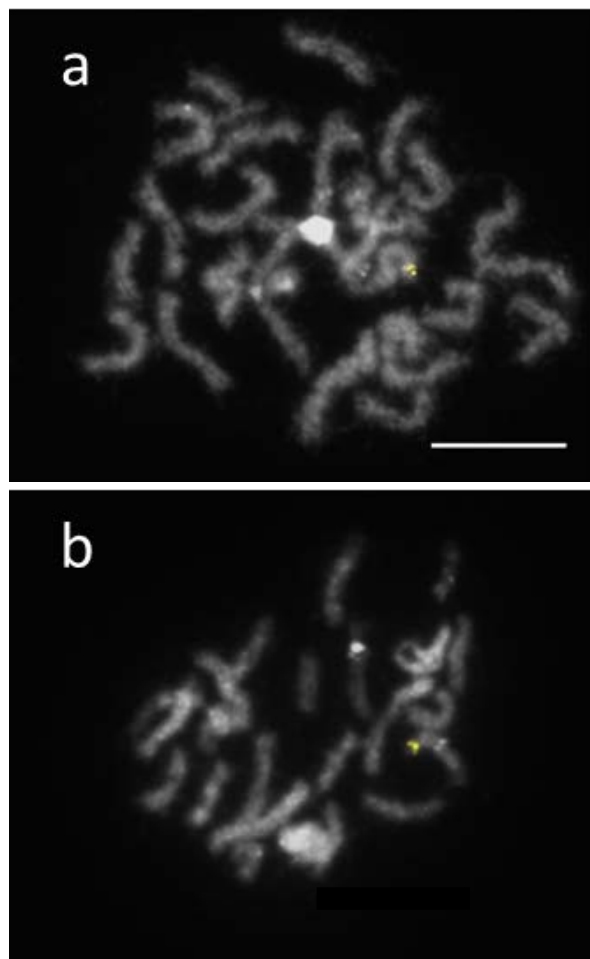


図 1. BAC-FISH による評価。a, :ホタルトビケラ; b, ニンギョウトビケラ; スケールバー, 10 μ m

考えられた。

研究では、構築した BAC クローンが FISH 実験に使用できるかを評価した。無作為抽出した BAC をプローブとしてホタルトビケラおよびニンギョウトビケラの染色体標本にハイブリダイズを行った。特定の染色体領域に特異的ダブルドットシグナルが確認できた (図 1a, b)。よって、本研究で構築した BAC ライブラリーは、今後 BAC-FISH 解析に使用できると考えられる。つまり、構築した BAC ライブラリーから、ヒゲナガカワトビケラおよびチョウ目昆虫との染色体比較が可能なオルソログを選抜し、各昆虫体の染色体標本に対して FISH マッピングすることで、トビケラ目昆虫間およびチョウ目昆虫との染色体比較解析から、姉妹系統間の染色体進化の解明につながることを期待される。

文 献

- AHOLA V. *et al.* (2014): Nature Comm, **5**: 4737
- FERGUSON *et al.* (2014): PLoS Genet, **10**: e1004698
- 藤本ら (2015): 東北蚕糸・昆虫利用研究報告, **40**: 15-18
- FUJIMOTO *et al.* (2018): J. Insect Biotech. Seric, **87**: 61-69
- HELICONIUS GENOME CONSORTIUM (2012): Nature, **487**: 94-98
- i5K CONSORTIUM (2013): J. Hered, **104**: 595-600
- KIAUTA B. (1971): Ergebn. Wiss. Unters. Schweiz. Natn. Parks, **9**: 174-185
- LUKHTANOV V.A. (2000): J. Zool. Sys. Evol. Res, **38**: 73-79
- LUO S. *et al.* (2018): GigaScience, **7**: giy143
- MAREC F. and NOVÁK K. (1998): Eur. J. Entomol, **95**: 197-209
- MISOF B. *et al.* (2014): Science, **346**: 763-767
- ROBINSON R. (1971): Pergamon Press, Oxford, pp. 557-598
- SAHARA K. *et al.* (2013): Insect Biochem. Mol. Biol, **43**: 644-653
- TRAUT W. (1976): Chromosoma, **58**: 275-284
- WEIGAND H *et al.* (2017): Mol. Ecol, **26**: 5705-5715
- WEIGAND H *et al.* (2018): Sci. Total Environ, **633**: 875-891
- YASUCKOCHI Y. *et al.* (2016): Heredity, **116**: 75-83.
- YOSHIDO A. *et al.* (2011): Insect Biochem. Mol. Biol, **41**: 370-377
- YOSHIDO *et al.* (2014): CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 219-256

カイコ 5 齢幼虫のヒートショックの誘導方法の条件検討

高木 圭子^{1,2,*}・大森 裕介^{1,*}・富田 秀一郎³・金児 雄^{1,**}

¹弘前大学農学生命科学部・²京都工芸繊維大学工芸科学部（現所属）・³農業・食品産業技術総合研究機構

遺伝子の過剰発現系は、特定の遺伝子の機能を調べるために広く利用されている。中でも、任意のタイミングでヒートショックによる発現誘導が可能な *hsp70* のプロモーターは広く利用されてきた。カイコ (*Bombyx mori*) においても、キイロシヨウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の *hsp70* プロモーターを利用した、個体での過剰発現系が 2002 年に開発された (UHLÍŘOVÁ *et al.* 2002)。その際、ヒートショックは、タバコスズメガ (*Manduca sexta*) の熱抵抗性の値を参考にして、42°C、60 分または 90 分で行われた。その後、カイコの *hsp70* プロモーターを使用した系も利用されている (YOKOYAMA *et al.* 2012)。カイコの熱応答性は、系統や発育段階によって異なることが知られており (MANJUNATHA *et al.* 2010)、用いる系統によっては、*hsp70* プロモーターに対するこれまでの誘導条件が適切とは限らない。しかしながら、現在でも多くのカイコの研究において、42°Cでのヒートショックが行われている。

通常、カイコの休眠卵は紫色に着色するため、マーカーとして使用される蛍光タンパク質の発現を、胚の時期で確認するのは困難である。*w-1* 系統では、キヌリン酸化酵素遺伝子が正常に機能しないため、卵が着色しない (QUAN *et al.* 2007) ので、蛍光タンパク質の発現を卵の外から観察できる。そのため遺伝子組換えカイコの前系統として使用されている。そこで本報告では、*w-1* 系統における *hsp70* プロモーターのヒートショックの条件を検

討した。さらに、組織間のヒートショックによる発現誘導率の違いについても述べる。本報告では、カイコのエクダイソン応答性転写因子のひとつである *BHR4* をカイコ *hsp70* プロモーターに繋いだ遺伝子組換えカイコを使用する。そこで *BHR4* の終齢期における機能を示唆する結果も併せて報告する。本報告は、カイコにおけるヒートショックによる遺伝子発現誘導の条件設定において、基礎的な知見として役に立つと考えている。

材料と方法

1. 供試カイコ系統

本研究では、YOKOYAMA *et al.* (2012) の報告にある *pnd; w-1* 系統に、*hsp70-BHR4* を *piggyBac* によって挿入された遺伝子組換えカイコから作出された系統を使用した。検証には、上記の遺伝子組換え系統に *w-1* 系統を交配した後代から、*hsp70-BHR4* をホモに持ち、*pnd* を持っていない個体を選抜して樹立された系統を利用した。25°C、12L:12D の明暗周期下で、人工飼料 (シルクメイト 2S、日本農産工業) を与えて飼育した。齢期は、脱皮した最初の日を 0 日として数えた。

2. ヒートショック

a) 処理時間 1 時間の場合 (図 1)

インキュベーター内で一定の温度に保ったアルミビーズ (アルミドロップビーズ小粒, SANSYO)

* Equal contribution

**責任著者

〒036-8561 弘前市文京町 3

e-mail: yukaneko@hirosaki-u.ac.jp

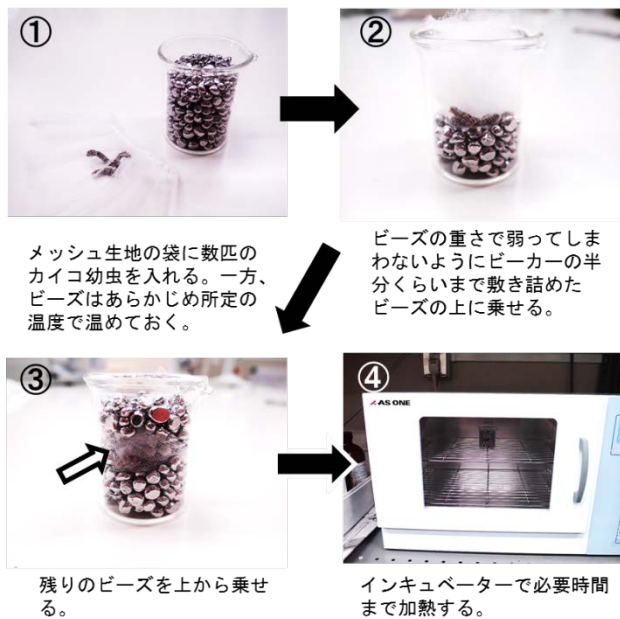


図 1. ビーズを使用したカイコ幼虫のヒートショック方法

でカイコを覆うことにより、任意の温度でヒートショックを与えた。カイコは脱走を防ぐために、袋状の網の中に入れた。アルミビーズはあらかじめビーカーに入れ設定温度に熱した後、カイコの全身を覆った。その後、ビーカーごとインキュベーター内に静置した。

b) 処理時間 24 時間以上の場合

所定温度のインキュベーター内で、飼育を行うことでヒートショックを与えた。ヒートショック後、25℃に戻して飼育した。

3. 遺伝子発現解析

カイコは水麻酔の後に解剖し、組織を摘出した。摘出した組織は抽出まで-80℃で凍結保存した。Total RNA をキット (Tissue Total RNA mini kit, チョダサイエンス) を用いて抽出後、DNase I (ThermoFisher) 処理によりゲノム DNA を除去した。その後、RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (ThermoFisher) と oligo (dT) primer (12 mer) を用いて cDNA を合成した。定量 PCR は、Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent)

を用いて、95 °C、10 秒を 1 cycle、続いて 95°C、5 秒、60°C、30 秒を 40 cycles の条件で行った。遺伝子発現量は、目的遺伝子をクローニングした pBluescript-SK(+) (Agilent) の希釈系列を用いた検量線を使用し、決定した。*BHR4* 遺伝子のコピー数は、*rp49* 遺伝子のコピー数で標準化した。各遺伝子の定量に用いたプライマーの配列は以下の配列である。

BHR4 forward primer;

5'- TCAAGCGATGCACGGAAA-3'

BHR4 reverse primer;

5'- GGTTATCTGCGTCATCTTTTCCAC-3'

rp49 forward primer;

5'- CAGGCGGTTCAAGGGTCAATAC-3'

rp49 reverse primer;

5'- TGCTGGGCTCTTTCCACGA-3'

4. 統計解析

ヒートショックの有無による発現量の比較を、Welch の 2 標本 *t* 検定により解析した。解析には、Instat 3 (GraphPad Prism) を使用した。

結果と考察

5 齢 0 日のカイコに 42°C で 60 分間のヒートショックを与えた (図 2)。ヒートショックの直後に解剖し、前胸腺、精巣および卵巣を取り出し、*BHR4* の発現量を測定した。その結果、ヒートショックを与えていない区と比較して、ヒートショックを与えた区では全ての組織において遺伝子発現が有意に上昇していた。*BHR4* の過剰発現がエクダイソン合成を促進することが報告されていることから (YOKOYAMA *et al.* 2012)、上記のヒートショックの条件により、早熟な脱皮や変態、または脱皮不全が予想されたが、そのような表現型は観察されなかった。誘導された遺伝子発現が、どのくらいの時間維持されるのかは不明であるが、発現量、発現期間のいずれか、またはその両方が、脱皮や変

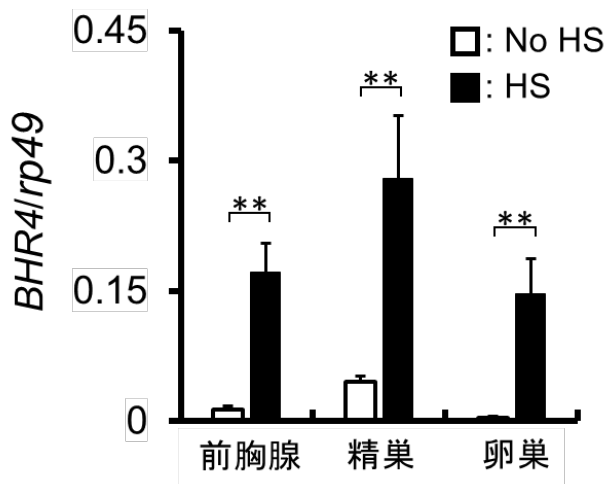


図 2. 42°Cのヒートショック後における組織ごとの BHR4 の発現量
5 齢 0 日のカイコに、42°C、60 分のヒートショックを与えた直後に、前胸腺、精巣、卵巣を取り出して遺伝子発現量を測定した。BHR4 の発現量は、rp49 で標準化した値で示した。N=3-6、エラーバーは SD を示す。HS: ヒートショック。 **P<0.01。

態に影響を及ぼすには不十分であった可能性が考えられる。そこで表現型を得るために、より長く発現誘導を維持できる条件の検討を行った。

これまで長時間に渡って発現状態を維持するために、短時間のヒートショックを繰り返し行う方法が報告されているが (YOKOYAMA *et al.* 2012)、本報告では作業効率の向上の為に、24 時間連続して高温下におくこととし、その温度条件を検討した。42°C (25 個体) 及び 39°C (26 個体) で 24 時間ヒートショックを与えたところ、ヒートショック後 2 日以内に全ての個体が死亡した。一方 38°C (24 個体) で 24 時間ヒートショックを与えたところ、死亡することなく全ての個体が蛹化した。そこで 38°C、24 時間のヒートショックによる BHR4 の発現誘導を、前胸腺、精巣および卵巣において確認した。5 齢 0 日から 1 日にかけてヒートショックを行なった場合と、5 齢 3 日から 4 日にかけてヒートショックを行なった場合の二つのタイミングでの実験をおこなった (図 3)。その結果、前胸腺、精巣および卵巣のいずれにおいても、遺伝子発現の有意な誘導がみられた。前胸腺での誘導は、ヒートショックを与えていないコントロールと比較して、およそ 1.8 倍の誘導にとどまっております、精巣と

卵巣ほど高くは誘導されなかった。その要因のひとつとして、組織によって熱応答性に違いがある可能性が考えられる。例えば、42°C、60 分のヒートショックによって、絹糸腺で誘導された内在性 hsp70 の発現は、脂肪体や中腸で誘導された発現量の 20%に留まるとの報告がある (CHANDRAKANTH *et al.* 2015)。一方、脂肪体では、38°C と 42°C でそれぞれ 60 分のヒートショックで誘導される内在性の hsp70 には差が無いことが報告されている (VELU *et al.* 2008)。前胸腺の場合は、42°C、60 分のヒートショックでは、ヒートショックを行っていない区と比較し

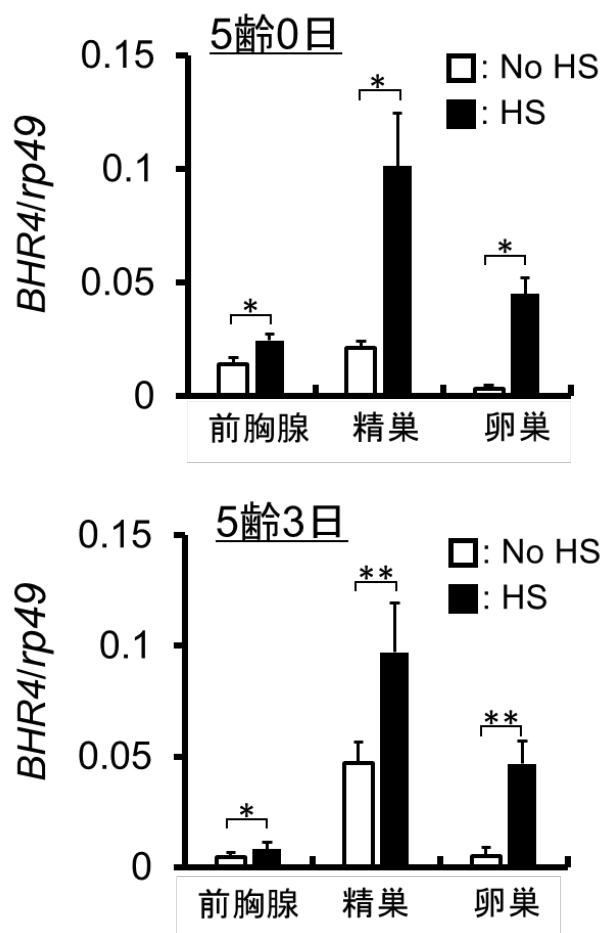


図 3. 38°Cのヒートショックを 24 時間与えた後の組織ごとの BHR4 の発現量
5 齢 0 日または 5 齢 3 日のカイコに、38°C、24 時間のヒートショックを与えた直後に、前胸腺、精巣および卵巣を取り出し、BHR4 の発現量を測定した。BHR4 の発現量は、rp49 のコピー数で標準化した値で示した。HS: ヒートショック。N=3-6、エラーバーは SD を示す。*P<0.05, **P<0.01。

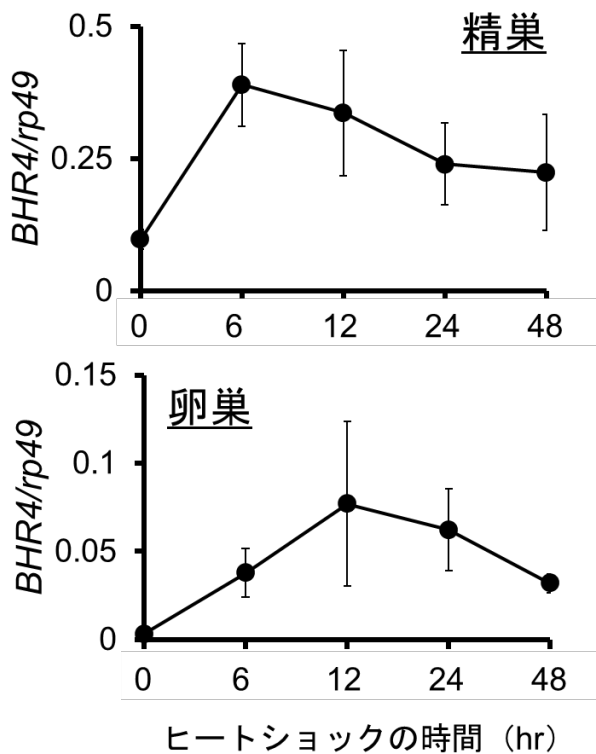


図4. 38°Cのヒートショックによる *BHR4* 発現量の継時変化
5 齢脱皮直後から 48 時間、38°Cでヒートショックを連続し
て行い、精巣及び卵巣における *BHR4* の発現量を時間を追っ
て計測した。*BHR4* の発現量は *tp49* のコピー数で標準化し
た値で示した。N=4-5, エラーバー: ±SD。

て 12.6 倍もの誘導が観察されたのに対し、38°C、24 時間では 1.8 倍程度の誘導であったことから (図 2, 3)、生殖巣や脂肪体などと比べて、熱に対する感受性は一過性であり、継続することで低下する可能性が考えられる。これらのことから、対象とする組織ごとにヒートショック条件の検討が必要であることが明らかになった。

38°Cで 24 時間のヒートショックを与えた場合、

特に生殖巣で強く発現が誘導されることが分かった。ヒートショックを与えている間の発現変動を測定したところ、精巣、卵巣、共にヒートショック開始後 6 時間で発現の上昇が確認された (図 4)。また、少なくとも 48 時間までは、ヒートショックを与えている間、高い発現が維持された。そこで、この条件でのヒートショックが幼虫の成長にどのように影響するかを観察した。38°Cのヒートショックを、5 齢 0 日から 24 時間与えた場合と、48 時間与えた場合の二つの条件で成長への影響を観察した (図 5)。蛹変態における最初の外部形態の変化である吐糸管の着色を蛹化の指標とした。ヒートショックを与えず 25°Cで飼育した場合、21 個体中 21 個体が 5 齢 5 日で吐糸管の着色を示し、吐糸管着色の 3 日後 (5 齢 8 日) に蛹化した。38°C、24 時間のヒートショックを与えた場合、20 個体中 20 個体が 5 齢 7 日に吐糸管着色し、3 日後 (5 齢 10 日) に蛹化した。48 時間のヒートショックを与えた場合、半数以上の個体がヒートショックの直後および翌日に死亡した。残りの個体の吐糸管着色は 5 齢 9、10、11 日まで遅れた。また、このとき、吐糸管着色から蛹化まで通常 3 日かかるところ、4 日間かかった。以上の結果から、5 齢初期における *BHR4* の過剰発現は、5 齢期間の延長をもたらす可能性が示唆された。幼虫期の延長の原因として最も高い可能性が考えられるのは、血中エクダイン濃度の上昇の遅延である。キイロショウジョウバエにおける報告から、*BHR4* ホモログである

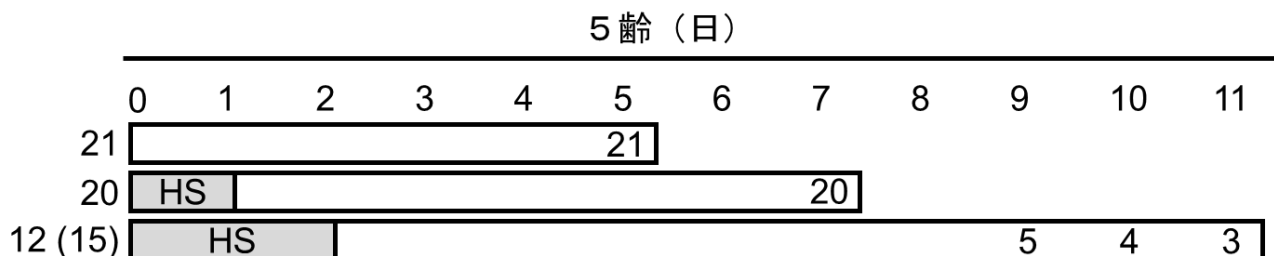


図5. ヒートショックを与えたカイコの蛹化への影響
ヒートショックを 38°Cで 0 (上段)、24 (中段)、48 時間 (下段) 与えたカイコを飼育し、蛹化の指標である吐糸管の着色を観察した。実験条件と結果を模式的に示す。図の上段の数字は、5 齢期での経過日数を示している。HS はヒートショックを与えていた期間を表わしている。バー中の数字は、上の 5 齢の日数において、吐糸管着色が見られた個体数を示す。バーの左側の数字は、吐糸管着色を示した全ての個体数、またカッコ内の数字は、吐糸管着色に至らず死亡した個体数を表している。

DHR4 の過剰発現は、前胸腺のエクダイソン合成活性を抑制することが明らかにされている (OU *et al.* 2011)。今回我々が得た結果と上記の報告は一致する。このことから、5 齢摂食期においては、*BHR4* もまた前胸腺のエクダイソン合成活性を抑制する可能性が高いと考えられる。一方で、蛹脱皮直前のカイコにおいては、*BHR4* の過剰発現によりエクダイソン合成が促進されることから (YOKOYAMA *et al.* 2012)、*BHR4* の発現に対する前胸腺の反応は発育時期によって異なる可能性が示唆される。しかしながら、前胸腺での 24 時間のヒートショックによる発現誘導率は低いことから (図 3)、*BHR4* の過剰発現よりも、むしろ長時間のヒートショックによって発育の遅延が生じた可能性もあり、今後の検証が必要である。

本報告によって、38°C という低温でも、*hsp70* プロモーターの活性化が起こることが明らかになったことから、長時間にわたる外来遺伝子発現誘導が可能であることがわかった。加えて、長時間のヒートショックの間も発現が維持されることから、必ずしもヒートショックを複数回に分けて断続的

に与える必要がないことも同時に判明し、*hsp70* プロモーターを利用した遺伝子発現誘導において、新たな方法を提示することができた。しかしながら、38°C によるヒートショックでは、組織によって誘導効率が異なっており、組織によっては表現型を得るのに十分な発現誘導が行われない可能性がある。そのため、今後、より詳細な組織毎の誘導効率の検証が必要である。

文 献

- CHANDRAKANTH N. *et al.* (2015): *Eur. J. Entomol*, **112**: 676-687
- MANJUNATHA H. B. (2010): *J. Insect Sci*, **10**: 204
- OU Q. *et al.* (2011): *PLoS Biol*, **9**: e1001160
- QUAN G.-X. *et al.* (2007): *Insect Sci*, **14**: 85-92
- UHLÍŘOVÁ M. *et al.* (2002): *Dev. Genes Evol*, **212**: 145-151
- VELU D. *et al.* (2008): *Int. J. Indust. Entomol*, **16**: 21-27
- YOKOYAMA T. *et al.* (2012): *J. Insect Biotech. Sericol*, **81**: 45-54

カイコ核多角体病ウイルス H4 株の膜タンパク質 GP64 の膜融合活性

関口 真理・佐藤 昌直・浅野 眞一郎・伴戸 久徳*

北海道大学大学院農学院

エンベロープと呼ばれる膜構造をもつ動物ウイルスにおいては、エンベロープと細胞膜、またはエンベロープとエンドソーム膜との膜融合はウイルス感染に必須のステップである。アルファバキキュロウイルスは膜融合タンパク質 GP64 をもち、GP64 の構造変化によりウイルスのエンベロープと宿主のエンドソーム膜が膜融合を起こすことでヌクレオカプシドが細胞質中に放出され、ウイルスが宿主細胞へ侵入する (BLISSARD and WENZ, 1992)。膜タンパク質の膜融合活性はウイルスの増殖に影響を及ぼすことが様々なウイルスで知られており (JEETENDRA *et al.* 2003; Ji *et al.* 2017; DREIER *et al.* 2019)、*Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) でも GP64 の膜融合活性が低下した変異体は培養細胞でのウイルスの増殖が低下した (LI and BLISSARD, 2011)。また、カイコ核多角体病ウイルス (*Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus: BmNPV) と AcMNPV の GP64 膜融合活性が Sf9 細胞で比較され (KATOU *et al.* 2010)、AcMNPV の GP64 が BmNPV ホモログより膜融合活性が高いこと、これらの膜融合活性の違いは 1 アミノ酸 (Ac-GP64 H155/Bm-GP64 Y153) によることが明らかにされた。

本研究室ではプラークサイズが小さい BmNPV H4 株 (H4) を分離し、BmNPV 標準株 T3 株 (T3) と異なる増殖特性をもつことを明らかにした (角谷, 2006)。BmN 細胞での H4 の増殖能は T3 のそれより低い、一方、カイコ個体では H4 は T3 よ

り増殖能が高い。感染後 120 時間での H4 感染カイコ体液 1 μ l 中あたりのウイルス DNA 量は T3 感染カイコのもの約 8 倍であった (図 1)。H4 と T3 の GP64 には 6 残基の違いがある (図 2, 酒井, 2012)。本研究では、これらのどのアミノ酸の違いと増殖特性差異の関係を明らかにする端緒として、この 6 つのアミノ酸をそれぞれ T3 型から H4 型に変化させた GP64 発現プラスミドを作製し、これら変異 GP64 の膜融合活性を観察した。

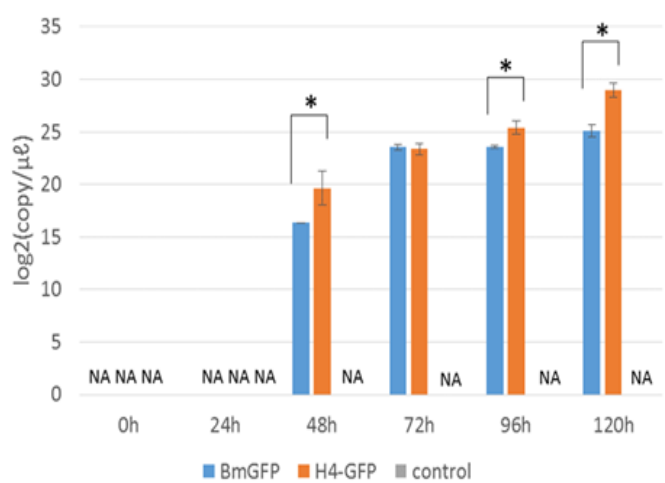


図 1. カイコ体液中の BmGFP と H4-eGFP のウイルス DNA 量 BmGFP (Ono *et al.* 2012) と eGFP を発現する H4 である H4-GFP を使い、5 齢起蚕の血体腔に 100 pfu 相当量注射した。カイコは各 5 頭ずつ用い、コントロールは TC100 培地を注射した。24 時間おきに体液を採取し、採取した体液は滅菌水で 50 倍希釈した後、等量の 0.1% SDS と混合し、95°C で 5 分処理した。その後、遠心 (15000 rpm, 5 分, 4°C) を行い、その上清を 4 分の 1 希釈したものをサンプルとし、qPCR を用いた絶対定量により体液中のウイルス DNA 量を定量した。qPCR の際に Cq 値が 35 以下だったサンプルは信頼性が低いため、NA と表示した。縦軸は体液 1 μ l 中のウイルス DNA のコピー数の log2 対数、横軸は時間 (h) を表しており、エラーバーは標準誤差である。各時間ごとに t 検定を行い、p 値が 0.05 以下の比較に*を表示した。

*責任著者

〒060-8589 札幌市北区北 9 西 9

e-mail: hban@abs.agr.hokudai.ac.jp

材料と方法

1. 供試細胞

当研究室で保存されているカイコ卵巣由来の BmN 細胞を用いた。細胞は、10% FBS (Biosera) を含む TC-100 培地 (Applichem) を用いて、26°C で培養した。

3. 膜融合活性試験

12-well-plate (Iwaki) に無血清 TC 100 培地で 2 度洗浄した BmN 細胞を各ウェルあたり 5.0×10^5 個になるように播種し、26°C で 2 時間静置した。X-tream GENE 9 DNA Transfection Reagent (Roche) 3 μ l、無血清培地 97 μ l を混合したものに、GP64 発現プラスミド (pSK-T3gp64、pSK-H4gp64、pSK-T3gp64_A30del、pSK-T3gp64_L99M、pSK-T3gp64_G158S、pSK-T3gp64_Y172H、pSK-T3gp64_V183I、pSK-T3gp64_R191K) 1 μ g を含む無血清培地 100 μ l を混合したものを加え、室温で 20 分間静置し、形質転換用培地とした。これを上記の 12-well-plate の培養細胞に添加し、26°C で 6 時間培養した。その後、形質転換用培地を除き、1 ml

の 10% 血清 TC 100 培地に交換して 48 時間培養した。その後、pH を 3.2 に調製した PBS 1 ml に交換後 5 分間静置し、低 pH 処理を行った後、無血清培地で 1 回洗浄し、1 ml の 10% 血清培地に交換して 26°C で培養し、1 時間後に顕微鏡で観察を行った。

結果と考察

まず初めに、T3GP64 と H4GP64 の膜融合活性を観察した。それぞれを発現するプラスミドを BmN 細胞にトランスフェクションし、培養上清の pH を 6.2 から 3.2 にしてシンシチウム形成を膜融合活性の指標にして比較した。pH3.2 において、H4 の GP64 が T3GP64 より膜融合活性が高かった (図 3)。

次に T3gp64、H4gp64、T3gp64 の 6 つのアミノ酸バリエーションをそれぞれ 1 つずつ H4 型に置換した GP64 (T3GP64-A30del、T3GP64-L99M、T3GP64-G158S、T3GP64-Y172H、T3GP64-V183I、T3GP64-R191K) の膜融合活性を T3gp64、H4gp64 と比較した (図 3)。T3GP64-Y172H の膜融合活性が H4 と比較して顕著に高く、次いで T3GP64-A30del が H4

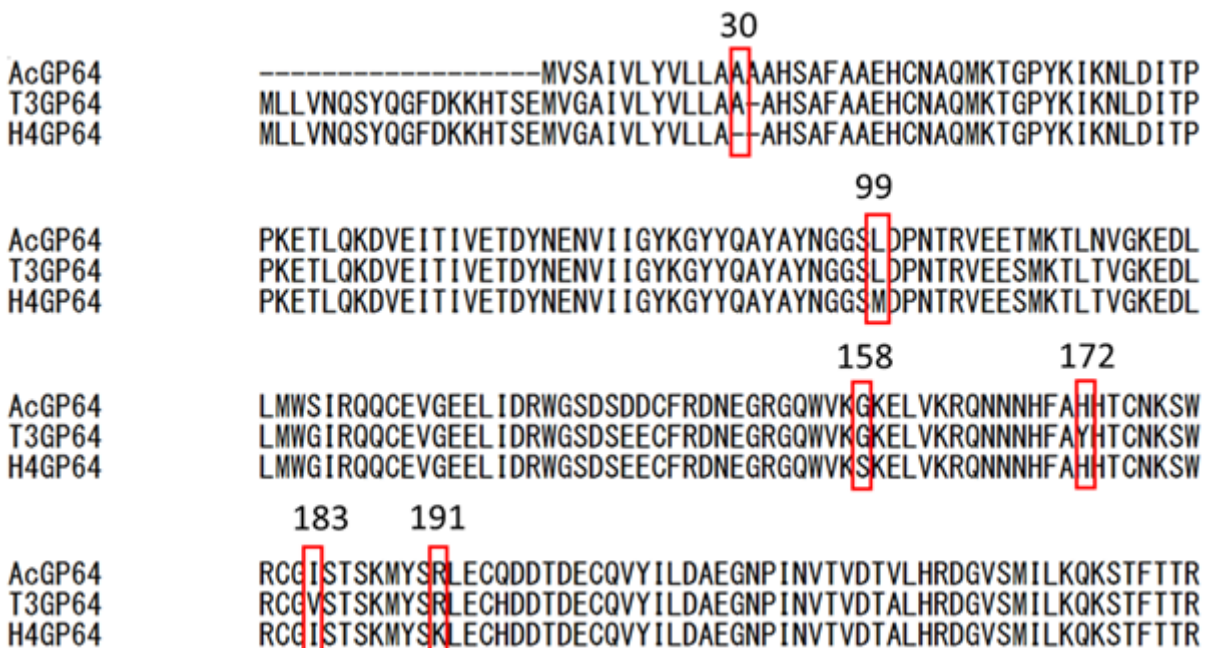


図 2. AcGP64、T3GP64、H4GP64 のアミノ酸配列アライメントの一部を表示している。T3GP64 と H4GP64 の 6 つのアミノ酸バリエーションを赤枠で囲み、上部にそれぞれのバリエーションの T3GP64 アミノ末端のメチオニンから数えたアミノ酸の番号を記載した。

と同等の膜融合能を示した。T3GP64-Y172 は KATOU *et al.* (2010) における Bm-GP64 Y153 に相当し、このアミノ酸を T3 型のチロシンからヒスチジン (=H4 型、Ac-GP64 H155 に相当) に変化させると、膜融合活性が高くなり、先行研究の結果と一致した。T3GP64-G158S、T3GP64-R191K は T3 と同等の膜融合活性を示し、T3GP64-L99M、

T3GP64-V183I は T3 より低い膜融合能を示した。Ac-GP64 で T3GP64-L99 に相当する L82 は、X 線構造解析の結果から、GP64 のフュージョンループに存在し、チロシン、スレオニンへの置換で膜融合活性が低下することが報告されている (KADLEC *et al.* 2008)。また、T3GP64-V183I については、T3 型のイソロイシンから Ac-GP64 型 (=H4 型) のバ

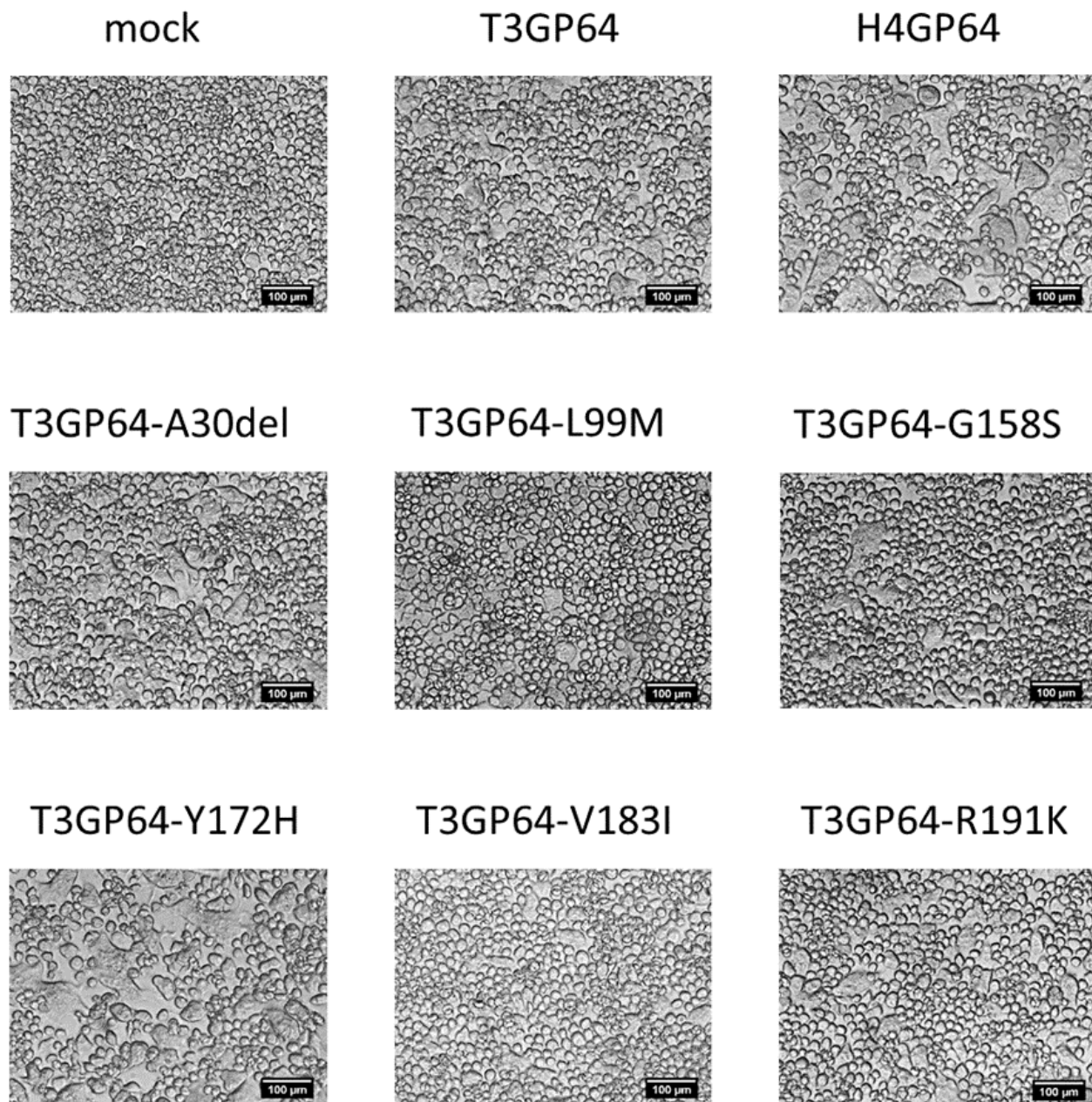


図 3. T3GP64、H4GP64 および 6 つのアミノ酸バリエントをそれぞれ 1 つずつ H4 型に置換した T3GP64 (T3GP64-A30del、T3GP64-L99M、T3GP64-G158S、T3GP64-Y172H、T3GP64-V183I、T3GP64-R191K) の膜融合試験の比較
各 GP64 を発現するプラスミドを 1.0 μg BmN 細胞にトランスフェクションし、48 時間後に pH3.2 で低 pH 処理を行った後、顕微鏡で観察した。Mock は未処理の BmN 細胞を pH3.2 で処理を行ったものである。スケールバーは 100 μm である。

リンへの置換で膜融合活性が低下すると報告されている (KATOU *et al.* 2010)。今回の結果はこれらの先行研究の結果と矛盾しないものであった。また、膜融合活性が低下した Ac-GP64 アミノ酸置換 AcMNPV は培養細胞でのウイルス増殖も低下したことが示されているが (LI and BLISSARD, 2011)、今回膜融合活性を観察した 6 つのアミノ酸 1 塩基置換をもつ BmNPV-GP64 アミノ酸置換ウイルスの増殖と膜融合活性の関係を今後、明らかにしていく。

他のウイルスで観察されている膜融合活性とウイルスの培養細胞、個体での増殖性の関係には以下の 4 例が知られている。(1) 膜融合活性亢進が個体での増殖に負に働いたケース：鳥インフルエンザウイルス Avian influenza A viruses (AIV) H7 subtype では膜タンパク質 HA の 1 アミノ酸置換で膜融合活性が変化し、膜融合活性亢進変異体はマウス個体での増殖能が低下した一方、膜融合活性が低下した変異体はマウスでの増殖が増加した (DREIER *et al.* 2019)。(2) 膜融合活性亢進が細胞、個体での増殖に負に働いたケース：パラミクソウイルス科に属するニューカッスルウイルスでは、膜タンパク質 F (F プロテイン) の HRB リンカードメインの 1 アミノ酸置換で膜融合活性が亢進する。その膜融合活性亢進変異体は、BHK-21F 細胞とニワトリ個体の両方でウイルス増殖や病原性が減少し、膜融合活性の強さが強いものほどウイルス力価や病原性が低くなった (Ji *et al.* 2017)。(3) 膜融合活性亢進が細胞での増殖に正に働いたケース：同ウイルスの F プロテインの CT ドメインのアミノ酸を欠失または置換した別の膜融合活性亢進変異体は、ニワトリ DF1 細胞でウイルス増殖が増加した (SAMAL *et al.* 2013)。(4) 膜融合活性低下が細胞での増殖に負に働いたケース：GP64 と同じ Class III の膜タンパク質 G をもつ水泡口炎ウイルス (VSV) では、フュージョンループおよびメンブレンプロキシマル領域の 1 アミノ酸置換により膜融合活性が低下した変異体は培養細胞での増殖

も低下した (FREDERICKSEN and WHITT, 1995; JEETENDRA *et al.* 2003)。これらを元に考えると、実験に用いた培養細胞では膜融合活性とウイルス増殖の相関は低いが、個体レベルでは膜融合活性が低くなれば、ウイルス増殖が高い観察が得られている。カイコ個体での感染では膜融合能が高い H4 が T3 より増殖能が高く、膜融合能とウイルス増殖能の関係性は既存の情報では説明しにくい。今後は BmN 細胞とカイコ個体において GP64 の 6 つのアミノ酸バリエーションをそれぞれ 1 つずつ T3 型から H4 型に置換した T3 の増殖能を測定し、T3 と H4 のウイルス増殖性の違いに寄与するアミノ酸バリエーションを特定し、ウイルス増殖と膜融合活性との相関を探りたい。さらに、GP64 のアミノ酸とウイルス増殖の関係を紐づけられる情報を収集することで、ウイルス増殖やトロピズムを人為的に設計できるツールの開発の可能性を探っていく。

文 献

- BLISSARD G.W. and WENZ J.R. (1992): *J. Virol*, **66**: 6829-6835
- DREIER C. *et al.* (2019): *EMI*, **8**: 1324-1336
- FREDERICKSEN B.L. and WHITT M.A. (1995): *J. Virol*, **69**: 1435-1443
- JEETENDRA E. *et al.* (2003): *J. Virol*, **77**: 12807-12818
- Ji Y. *et al.* (2017): *Virology*, **509**: 146-151
- KADLEC J. *et al.* (2008): *Nat. Struct. Mol. Biol*, **15**: 1024-1030
- 角谷 聡 (2006): 北海道大学農学部卒業論文
- KATOU Y *et al.* (2010): *Virology*, **404**: 204-214
- 小島 桂 (2002): 北海道大学大学院農学研究科博士論文
- LI Z. and BLISSARD G.W. (2011): *J. Virol*, **85**: 12492-12504
- MOTOHASHI K. (2015): *BMC Biotechnol*, **15**: 47
- ONO C. *et al.* (2012): *Virus Res*, **165**: 197-206
- 酒井 真美 (2012): 北海道大学大学院農学研究科

マイクロプレートウェル全体をカバーする スティッチング画像のバイアス補正技術の確立

中西 登志紀・関口 真理・浅野 眞一郎・伴戸 久徳・佐藤 昌直*
北海道大学大学院農学院

顕微鏡の自動制御は、1視野では観察しきれない広範囲の画像取得を可能にする。広範囲を撮影する際には、その範囲をカバーできるだけの複数画像を取得し、計算機でそれらを重ね合わせる。この技術をスティッチングと言い、顕微鏡メーカーが開発したプログラムやオープンライセンスのソフトウェアで実装されている。しかしながら、撮影装置や実験条件により、既製のプログラムではスティッチングできない状況の画像の場合は、その状況に応じた画像の前処理やスティッチング技術が必要となる。本研究ではカイコ卵巣由来細胞 (BmN 細胞) の観察を行う際に観察者の選択バイアス無しに情報を収集する目的で、ウェル全体を解析するための要素技術としてスティッチングプログラムを開発した。

材料と方法

1. 細胞およびウイルス

供試細胞は、当研究室で継代されているカイコ卵巣由来 BmN 細胞を用いた。BmN 細胞は、ウシ胎児血清 (Gibco) を 10% 添加した TC-100 培地 (PanReac AppliChem) を用い、26°C で培養した。供試ウイルスは、BmNPV バクミドにポリヘドリンプロモーター下流 GFP を導入した BmGFP (ONO *et al.* 2007) を使用した。

2. プラークアッセイ

12 ウェルプレート (Iwaki) に無血清 TC 100 培地で 2 度洗浄した BmN 細胞を各ウェル 5×10^5 個の密度で播種し、26°C で 2 時間培養した後、無血清 TC100 培地で段階希釈したウイルス液をウェルあたり 450 μ l 加え、26°C で 1 時間培養した。その後、ウイルス液を除き、1% SeaPlaque GTG Agarose (TaKaRa) を含む 10% 血清 TC100 培地をウェルあたり 1 ml 加え、26°C で培養した。

3. 共焦点蛍光顕微鏡を用いた観察

共焦点蛍光顕微鏡は、本学院共同利用機器の Leica TCS SP5 II を使用した。本研究では、プラークアッセイ用に準備したプレートのなかから、 10^4 倍希釈したウイルス液を添加したウェルを観察した。顕微鏡は Leica LAS AF Lite 4.0 によって制御し、ウェル全体を撮影するように領域を設定した後、ピクセルが画像間で 10% 重なるように撮影点を設定し、縦 10、横 11 枚の撮影で一つのウェルをカバーする領域の画像を取得した (以下、個々の画像をウェル分割画像とする)。ウェル分割画像は縦、横 1024 ピクセルである。また、ウェル分割画像ごとに 30 μ m 刻みで Z 座標をずらしたウェル分割画像を 10 枚撮影した (これら 10 枚を z スタックと呼ぶ)。

4. 画像解析

*責任著者

〒060-8589 札幌市北区北 9 西 9
e-mail: satox@abs.agr.hokudai.ac.jp

画像解析には以下の用途に応じて、Python もしくは Fiji (imagej) を使用した。

A) 各撮影点における最適 Z 座標の決定

Python の OpenCV2 モジュールの cvLaplacian 関数を用いたカスタムスクリプトを作成し、使用した。各 z スタックについてピクセル間の輝度値の変化がもっとも強い (輝度値のラプラシアンが大きい) 画像をベストフォーカスの画像と定義して各ステージでのベストフォーカス画像を得た。

B) 撮影装置特有のバックグラウンド輝度値の除去

Fiji のマクロを作成し、使用した。10×11 枚のベストフォーカス画像の各ピクセルでの平均値を計算し、それら平均値の画像を作成した後、さらに Fiji に内蔵されている平均値フィルターを 20 ピクセル単位でかけ、平滑化した背景画像を作成した。元画像の輝度値から背景画像の輝度値を引き算し、セル単位で平滑化した背景画像を作成した。この平均値を加えることで、撮影装置特有のバックグラウンド輝度値を除去した。これらの計算は全て 32 bit で行った。

C) スティッチング

撮影装置特有のバックグラウンド輝度値を除去した各画像を重ね合わせて、一枚の画像にするために Fiji のプラグインの一つである stitching を用いた。Plugins の中の stitching にある Grid/Collection stitching を選択した後、Grid 設定を row-by-row、Right&Up に設定、最後に Grid size x を 10、y を 11 に、Tile overlap を 10% に設定し、使用するディレクトリを指定することでスティッチング画像を得た。

結果と考察

1. Leica SP5 の Tiling 機能を用いた well 全体の撮影

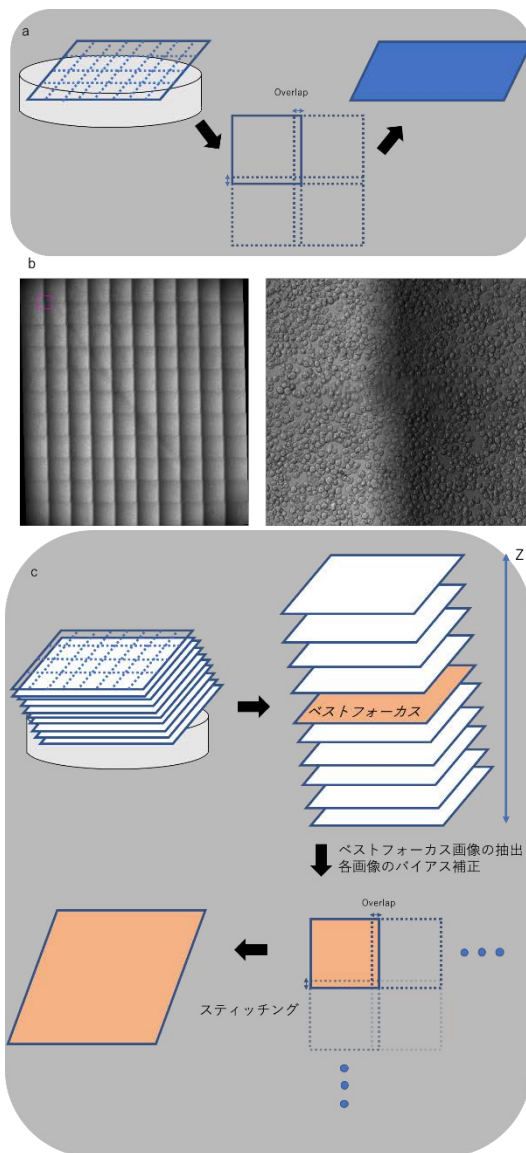


図1. 既製のソフトウェアによるスティッチング画像の問題点と本手法のフローチャート
a) スティッチングの概要。1 ウェル全体を分割して撮影し、これらの分割画像を再構成した 1 枚の画像を作成する。b) Leica SP5 既製のソフトウェア (Leica LAS AF Lite 4.0) を使用した際のスティッチング画像 (左) とマゼンタ領域を拡大した画像 (右)。c) 本手法のフローチャート。

12 ウェルプレートの 1 つのウェル全体を 110 点の XY 座標で撮影し、それら 110 枚の画像を (Leica LAS AF Lite 4.0) で再構成することで 1 ウェル全体の画像を得た (図 1b)。画像同士の重なるの領域に見られる細胞は正確に繋ぎ合わさっていることが分かるが (図 1b)、どの画像でも同様に輝度値の勾配が見られ、細胞には関係ないバックグラウンド輝度値がスティッチング画像へ縞を作った。また、同一 Z 座標の画像間でしか重ね合わせられな

いという機能上の制約からわずかに焦点がずれた画像がいくつか見られた。以降は、図 1c のフローチャートに沿ってこれらの問題解決に努めた。

2. 各ステージで最適な Z 座標の決定とその画像抽出

これらの問題のうち、Z 座標が異なっているベストフォーカス画像でスティッチングできるようにカスタムスクリプトを作成した。このスクリプトでは画像中のあるピクセルの輝度値とその周囲、縦横斜めに 1 ピクセルずれた位置のピクセルの輝度値の差（ラプラシアン）を求める計算を 1 枚の画像中の全ピクセルに対して行い、その合計値を算出する。細胞の輪郭が明確な画像、つまり、ラプラシアンが最も大きな画像が最も焦点の合った Z 座標で撮影された画像と定義し、本研究で撮影した z スタックからベストフォーカス画像を選んだ（図 2）。各観察点でベストフォーカス画像を 1 枚

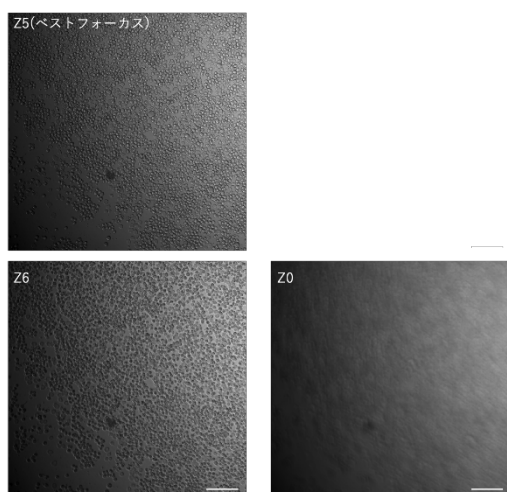
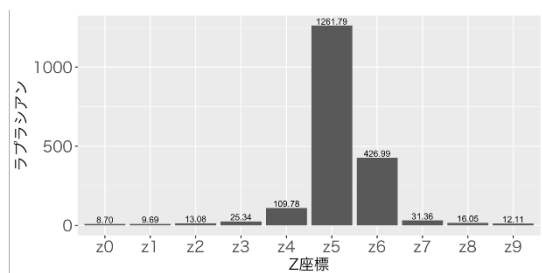


図 2. ステージ 0 での最適な Z 座標の決定とベストフォーカス画像の抽出

ステージ 0 の各 Z 座標での画像（10 枚）でラプラシアンの合計値を算出し、この値が最大である z5 での画像をステージ 0 のベストフォーカス画像と決定し、抽出した。スケールバーは 200 μm 。

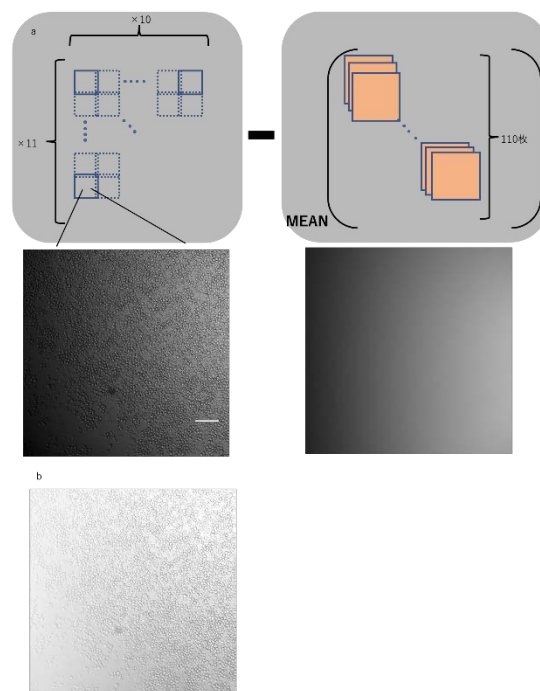


図 3. 各画像に共通して見られるバイアスの除去

a) 材料と方法に従って作成した背景画像を各画像の元画像から差し引いた。b) 背景画像全体の平均値を画像全体に足し合わせて、バイアスを補正した。スケールバーは、200 μm を示す。

抽出し、それらを用いて、この後の処理を行った。

3. 全画像に共通して見られるバイアスの補正

次に、全画像で共通して見られるバイアスを除去する作業を Fiji (imageJ) を用いて行った。材料と方法に記載した手法で全画像の平均値をプロットした画像を作製し、これを細胞の輪郭が認識できない程度に平滑化し（図 3a）、背景の画像を作製した。これを各画像から差し引いて、その後背景の画像全体の平均値の値を加え、各画像のバイアスを補正した（図 3b）。

4. Stitching Plugin を用いたタイル画像の作製

以上の作業により、Leica LAS AF Lite 4.0 でのスティッチングで見られた問題を解決できたため、これらの画像のスティッチング画像を作製した（図 4a）。図 1 よりもバックグラウンド輝度値のバイアスが小さい画像を得る事ができたが、スティッチング境界に発生するバイアスを除去できて

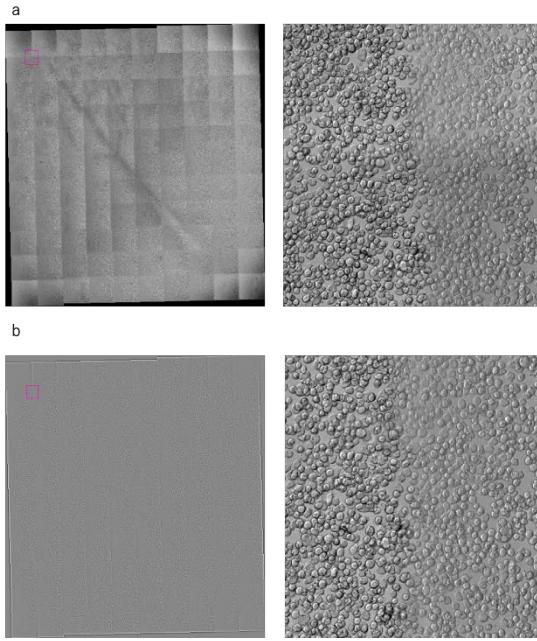


図4. 作成したタイル画像
 a) Plugin を用いて作成したスティッチング画像(左)とマゼンタ領域を拡大した画像(右)。b) バイアス除去後のスティッチング画像とマゼンタ領域を拡大した画像。

いなかった。このバイアスを除去するために、スティッチング画像を細胞の輪郭が認識できなくなる程度に平滑化した画像を作製し、スティッチング画像から引き算することで、このバイアスの除去を試みた。出来上がった画像を Enhanced contrast で

処理し、ヒストグラムを補正した(図4b)。図4の左側2枚の上下画像を比較すると下(図4b)の方が画像中のバイアスが少なくなっており、また細胞一つ一つ輪郭は保たれていた。拡大すると重ね合わせの部分にバイアスがまだ残っていることが分かる(図4b右)が、初めのタイル画像(図1b右)と比較すると顕著にバイアスは除かれていることが分かる。

本研究で開発したスクリプト、マクロはオープンソースのモジュールの関数等を組み合わせ、ブラックボックスを作らずに設計したため、今後も内部の改良が可能な自由度の高い手法である。この画像前処理を行なった画像をもとに、次は二値化する閾値の決定、細胞と背景の分離等の処理が続く。今後はそれらの要素プログラムを組み合わせ、ウェル全体の画像を処理する一連のプログラムとして完成させる。

文 献

ONO C. *et al.* (2007): *J. Insect Biotech. Sericol*, **76**: 161-167

INA288 株由来 Cry44Aa トキシンのイエカ殺虫活性機構の解明

伊藤 水音・佐藤 昌直・伴戸 久徳・浅野 眞一郎*

北海道大学大学院農学院応用分子昆虫学研究室

イエカは、ウエストナイル熱やフィラリアを媒介する都市衛生害虫であり、環境に優しい防除法として *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) による微生物防除法が広く用いられている。Bti は熱帯性感染症を媒介するカ類(イエカ・シマカ・ハマダラカ)に殺虫活性を持つ Cry4 や Cry11 等の Cry トキシンを産生するため、それらのカ類の防除資材として利用されている。本研究室では *B. t. entomocidas* INA288 株より Cry44Aa が分離され、Bti が産生する Cry トキシンとは異なる殺虫スペクトルを示すことが報告された (Iro *et al.* 2006)。特にイエカとシマカ類に対して、Bti 由来 Cry トキシンよりも強力な殺虫活性を有しており、Cry44Aa は新規防除資材としての利用が期待されているがその作用機構の詳細については未だ明らかでない部分が多い。

Cry トキシンの作用機構において重要な段階は、可溶化されプロセッシングを受けた後に、Cry トキシンが昆虫中腸内のレセプターと結合するステップである。Cry トキシンレセプターの同定は殺虫活性作用の理解において重要である。カ類の Cry トキシンレセプターとしては、アルカリホスファターゼ (ALP)、アミノペプチダーゼ N (APN)、カドヘリン様タンパク質が同定されている。ネッタイシマカにおいて Cry44Aa トキシンが ALP1 と結合し殺虫活性を示すことから (中神, 2017)、チカイエカ (*Culex pipiens*) における Cry44Aa トキシンレセプターとして CxALP1 に着目した。本研究では CxALP1 の Cry トキシン結合部位を発見させた

Sf9 細胞を Cry44Aa トキシンで処理、細胞形態の変化を観察することでトキシンレセプターとしての機能について調査した。

材料と方法

1. 供試昆虫

チカイエカは、九州大学農学部の藤田龍介博士より分与され、本研究室で継代飼育した。

2. Cry44Aa トキシンの発現および精製

cry44Aa 遺伝子を pGEX-4T-3 Plasmid (GE healthcare) に組み込み pGEX-Cry44Aa を作製した。pGEX-Cry44Aa を *E. coli* BL21 株に導入したコロニーを 1.5 ml の LB-amp に植菌し、37°C で 16 h 振盪培養した。これを 50 ml の LB-amp に植え継ぎ、OD₆₀₀ = 0.5 になるまで振盪培養した。IPTG を終濃度 0.2 mM となるように添加し 37°C で再び振盪培養した。5 h 後に培養液を回収したものを GST-Cry44Aa とした。回収した GST-Cry44Aa を P1 Buffer (Qiagen) で懸濁し、1.25 ml の P2 Buffer (Qiagen) を混合した後、4 °C で 16 h インキュベートした。その後、液体窒素を用いて冷凍し、氷冷しながら超音波破砕機 Sonifier II 450 (Branson) を用いて超音波破砕を行った。N3 Buffer (Qiagen) を 1.25 ml 加えた後、遠心分離し、上清を回収して得られた画分を Cry44Aa プロトキシンとした。これを AMicon Ultra-4 Centrifugal Filter, Ultracell-50K (Millipore) を用いた限外濾過によって濃縮した。濃縮 Cry44Aa

*責任著者

〒060-8589 札幌市北区北9西9

e-mail: sangaku@abs.agr.hokudai.ac.jp

プロトキシン中タンパク質の 10 分の 1 量のトリプシン (Sigma) を加え、37°C で 2 h インキュベートした。100 mM PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) を終濃度 0.1 mM になるように加えた後、透析膜 (Fisherbrand) により PBS にバッファー交換を行い、Cry44Aa トキシンを得た。作製した Cry44Aa トキシンを SDS-ポリアクリルアミドゲル (10%) 電気泳動 (SDS-PAGE) に供試し、サイズを確認した。

3. CxALP1 トランスファーベクターの構築

pFastbacDual (Invitrogen) にチカイエカ由来の *cxalp1* 遺伝子、*egfp* 遺伝子を組み込んだトランスファーベクターを構築した。P10 プロモーター下流に *aealp1* 遺伝子を、polyhedrin プロモーター下流に *egfp* 遺伝子をそれぞれ組み込んだ pFBD-AeALP1-EGFP (中神, 2017) をもとに、*cxalp1* 遺伝子の一部配列に置き換え、pFastbacDual-CxALP1-EGFP を作製した (FERNANDEZ *et al.* 2009)。Bac to Bac Baculovirus Expression System (Invitrogen) を用いて、pFBD-CxALP1-EGFP で DH10Bac を形質転換した。Plasmid Midi Kit (Qiagen) を用い、組換えバクミド CxALP1-Bacmid を得た。ツマジロクサヨトウ由来の Sf9 細胞に組換え Bacmid を加え 96 h 培養した。その後、培養液を回収し、遠心分離して得られた上清を CxALP1-AcMNPV とした。

4. Cry44Aa トキシンによる組換え AcMNPV 接種 Sf9 細胞の細胞損傷試験

Sf9 細胞を 8 well BD Falcon Slides (BD Bioscience) に 1.0×10^5 個 / well 播種し、作製した組換え AcMNPV を接種した。接種後 48 h 培養した Sf9 細胞を 20 μ g の Cry44Aa トキシンを含む培地に交換し 26 °C で静置した。コントロールとして、AcMNPV 非感染細胞をトキシン含有培地に交換したもの、AcMNPV 感染細胞を、トキシン非含有培地に交換したものを用意した。培地交換から 3 h 後と 15 h 後に倒立顕微鏡 (Nikon) を用いて、これら

の細胞における浮遊、膨張等の細胞形態の変化を観察した。

結果と考察

細胞損傷試験で使用するための Cry44Aa トキシンを図 1 のように調製した。つまり、限外濾過による濃縮前後の Cry44Aa プロトキシンと、トリプシン処理後の Cry44Aa トキシンを SDS-PAGE に供試した結果、Cry44Aa プロトキシンの予測サイズである 77 kDa のバンドと Cry44Aa トキシン予測サイズである 45 kDa、25 kDa のバンドが確認されたため、Cry44Aa トキシンが精製できたと考え、細胞損傷試験に用いた。

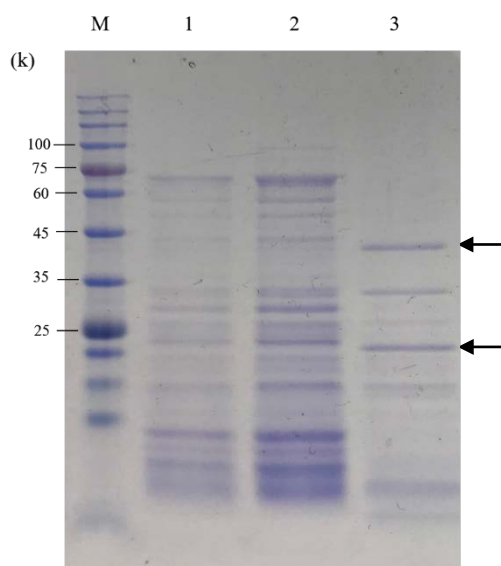


図 1. *E.coli* BL21 で発現させた Cry44Aa の SDS-PAGE 画像
Lane M: EzProtein Ladder, Lane 1: Cry44Aa プロトキシン(濃縮前), Lane 2: Cry44Aa プロトキシン(濃縮後), Lane 3: Cry44Aa トキシン。矢印: 25 および 45 kDa トキシン

昆虫個体を用いて行う殺虫活性調査とは異なり、細胞損傷試験では、Cry トキシンの純度が低いと不純物による影響が細胞の状態に現れ、トキシンによる影響を正確に評価することができない。本研究では pGEX Cry44Aa を用い *E.coli* BL21 株にて発現させることで純度の高い Cry44Aa トキシンが得られ、培養時間も IPTG 誘導前を含めて 6 時間と大幅に短縮された。また通常、pGEX を用いて

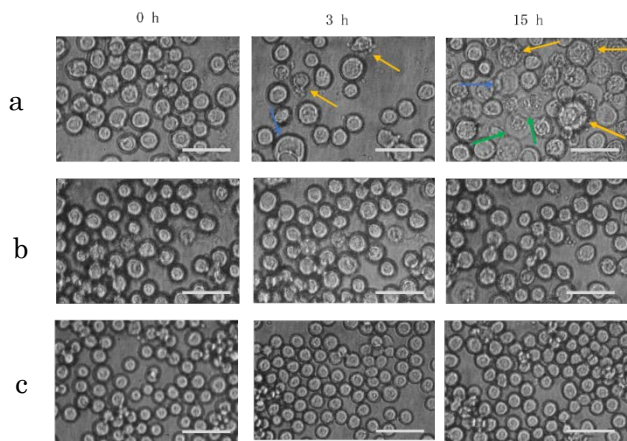


図 2. 組換え AcMNPV を感染させた Sf9 細胞の Cry44Aa トキシン添加による形態変化
(A) CxALP1 発現トキシン有, (B) CxALP1 発現トキシン無, (C) AcMNPV 感染無トキシン有。青色の矢印: 膨張, 緑色の矢印: 浮遊, 黄色の矢印: 破裂。(スケールバーはすべて 100 μ m)

GST-Cry 融合タンパク質を発現させる場合、不溶化を避けるために IPTG 誘導後は低温で培養を行わなくてはならず、大量の Cry トキシンを得るには非効率的であるという問題点があった。本研究では Cry タンパク質が昆虫中腸内のアルカリ条件下で可溶化する性質 (VACHON *et al.* 2012) を生かしアルカリ SDS 液で可溶化させるため、IPTG 誘導後も 37 $^{\circ}$ C での培養が可能となり、収量が大幅に増加した。これらのことから、今回の精製方法は Cry44Aa を大量かつ高純度で精製する効率的な方法であり、他の Cry トキシンの調整にも応用できると考えられる。

作製した組換え AcMNPV を Sf9 細胞に接種し、48 h 後に Cry44Aa トキシン含む培地に交換し、倒立顕微鏡で継時的に細胞形態を観察した。Cry44Aa トキシンを含む培地に交換後、CxALP1 発現 Sf9 細胞では 3 h で細胞の膨張や破裂が観察された。15 h

後には半数以上の細胞において膨張・破裂・浮遊等の細胞形態の変化が観察された。AcMNPV 非感染細胞では培地交換後 15 h 経過しても細胞形態の変化は観察されなかった。AcMNPV 感染細胞を、トキシン非含有培地に交換したコントロールにおいても、15 h 経過後も細胞形態の変化は観察されなかった。また、先行研究において EGFP のみを発現させた Sf9 細胞を Cry44Aa トキシン処理した際にも、細胞の形態に変化は見られなかったことが報告されている (中神, 2017)。

これらのことから、CxALP1 発現 Sf9 細胞を Cry44Aa トキシンによって処理した際に観察された細胞損傷は AcMNPV 感染による損傷ではなく、発現した CxALP1 が Cry トキシンレセプターとして機能し、Sf9 細胞に細孔が形成されたことによるものだと考えられた。

今後は、CxALP1 発現細胞において定点観察や細胞損傷率の測定、また RNAi により *cxalp1* 遺伝子をノックダウンしたイエカを用いての殺虫活性試験を行い、CxALP1 の Cry44Aa トキシンレセプターとしての機能を調査したいと考えている。

文 献

- ITO T. *et al.* (2006): *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**: 5673-5676
- FERNANDEZ L. *et al.* (2009): *Biochemistry*, **48**: 8899-8907
- 中神 あゆみ (2017): 北海道大学大学院農学研究科修士論文
- VACHON V. *et al.* (2012): *J. Invertebr. Pathol.*, **111**: 1-12

カイコゲノム編集のための簡易操作法

亀田 侑希・高木 圭子・丸田 莉奈・小谷 英治*

京都工芸繊維大学応用生物学系

カイコ (*Bombyx mori*) は、養蚕に用いられる有益昆虫であることに加え、遺伝子組換え研究のための実験動物としても優れている。このため、現在までに、糸の性質の改変 (OTSUKI *et al.* 2017)、薬剤の生体影響評価のためのモデル動物化 (SEKIMIZU, 2017)、有用物質の生産と利用 (KOTANI *et al.* 2017; SATO *et al.* 2017; TOMITA 2018)、さらに、ウイルス感受性の解明 (ITO *et al.* 2018) 等に関する多くの分子生物学的研究がなされてきた。

遺伝子組換えカイコの作出の方法として、マイクロインジェクションでプラスミド DNA をカイコ卵に取り込ませ、*piggyBac* 認識配列の間にコードされる目的配列をトランスポゼースによりカイコゲノムに移入する手法が開発されている (TAMURA *et al.* 2000)。この方法は、遺伝子組換えカイコを得る上で効果的であるが、目的遺伝子の挿入部位を人為的に選択できず、しばしば挿入位置の違いによる外来タンパク質の発現量の差異が生じることがある。稀なケースではあるが、転移遺伝子が重要な遺伝子の機能に影響する可能性もある。このような理由から、ゲノム内の特異的な標的遺伝子を操作する方法の汎用化が待たれる。

近年、トランスポゾンによる遺伝子組換え技術に加え、特定染色体配列を人為的に操作する方法として、transcription activator-like effector nuclease (TALEN 法; CHRISTIAN *et al.* 2010) や、clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR-associated protein 9 (CRISPR/Cas9) 法 (Hsu

et al. 2013; 石野, 2016) などを利用するゲノム編集技術が登場した。これらは特定遺伝子の切断と、修復過程で生じる変異導入および相同性テンプレート存在下の相同組換えによる目的遺伝子挿入に用いられる。それぞれに長所があるものの、特にカイコでは TALEN 法がよく利用される。しかし、その方法の簡便性から、CRISPR/Cas9 のカイコ遺伝子操作への適用も期待される (MA *et al.* 2019)。これまでに、試験管内転写系で作られた人工 mRNA から卵内での翻訳で作られた Cas9 によるゲノム配列改変に関して成功例がいくつかあるものの、カイコでは、試験管内で作製した sgRNA と Cas9 タンパク質との複合体を用いた事例は乏しい。

そこで本研究では、簡易な CRISPR/Cas9 操作によるカイコ遺伝子の人為改変の実効性を探るため、市販 Cas9 と試験管内で合成した sgRNA との混合物によるゲノム配列改変を検討した。標的には、哺乳類の *biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 subunit 2* のカイコホモログである *BmBLOS2* 遺伝子 (FUJII *et al.* 2010) と、カイコキチンシンターゼ B 遺伝子 (*BmChsB*; ZHUO *et al.* 2014) を選んだ。*BmBLOS2* は、すでにゲノム編集研究で実績のある標的遺伝子であり、その変異を油蚕形質として簡単に検出することができる (DAIMON *et al.* 2014)。このため、本研究における変異導入法の実現性を調べる目的で、*BmBLOS2* を用いた。*BmChsB* は中腸特異的に発現し、囲食膜形成に関与することが知られており、本研究では、同酵素遺伝

* 責任著者

〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎橋上町

e-mail: kotani@kit.ac.jp

子改変をもたらすカイコの未知の特徴の解明を視野に入れて研究を進めた。

材料と方法

ゲノムの改変には、非休眠性である *w1-pnd* 系統を用いた。全齢を人工飼料（無菌養蚕研究所製）により 25°C 条件で飼育した。

BmBLOS2 (accession no. AB539593) に対する変異導入のために、Cas9 mRNA の微量注入による CRISPR/Cas9 法の実績があり、イントロン 3 とエキソン 4 の境界にあたる 5'-AGTAGGGGTTGGATCTGCT-3' を標的とした (DAIMON *et al.* 2014)。

BmChsB (accession no. JQ074175) 配列の第 7 エキソン内の配列のうち、オフターゲット効果が少ないものと予想される配列を CRISPRdirect ソフトウェア (<http://crispr.dbcis.jp>) を用いて選抜し、標的配列とした (5'-TTGTTCTACGAAATTCCTCC-3')。

さらに、これら標的配列の 5' 上流に T7 RNA ポリメラーゼプロモーター配列 (5'-TTCTAATACGACTCACTATAG-3') と、3' 下流側に Cas9 結合領域を連結させるためのオーバーラップ配列 (5'-GTTTTAGAGCTAGA-3') を持つオリゴヌクレオチドを合成した。これらのオリゴヌクレオチドを用いて、EnGen sgRNA synthesis kit (NEB 社製) の反応により *BmBLOS2* および *BmChsB* を標的とする sgRNA を試験管内で合成した。マイクロインジェクション用緩衝液 (2 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄, 5 mM KCl) 中で 8 ng/μL の sgRNA と、0.2 μg/μL の市販 Cas9 endonuclease (EnGen Cas9 NLS, *S. pyogenes*, NEB 社製) を混合し、37°C で 30 分間インキュベートした。この混合液を、産卵後約 3-8 時間のカイコ発生卵にマイクロインジェクション法で取り込ませた (TAMURA *et al.* 2007)。これを G0 世代とし、G0 世代を *w1-pnd* 系統と交配させ、得られる次世代を G1 世代とした。

G1 の 1 齢幼虫から抽出したゲノム DNA を鋳型

に、改変を受けた *BmBLOS2* の遺伝子配列を調査用プライマー (5'-CGGTCCGCAATTTATTAGCAC-3' と 5'-GAGAAGTAAGGCGGTACCCG-3') による PCR で標的付近の 336 bp 配列を増幅させた。この断片の配列は、同プライマーを用いたサンガーシーケンスにより決定した。塩基配列結果は、改変を受けていないゲノムと変異を導入したゲノムの配列が標的部周から混在することになるが、正常ゲノム配列をもとに変異部位下流の配列を web ツールの Poly Peak Parser (HILL *et al.* 2016) を利用して解析した。さらに、この PCR 増幅断片を、pCR[®]4Blunt-TOPO (Thermo Fisher Scientific 社製) に連結させ、これを標的付近の塩基配列の決定に用いた。

配列改変を受けた *BmChsB* 遺伝子の検出のために、以下に示す T7E1 アッセイを行った (MA *et al.* 2014)。各 G1 世代集団の 1 齢幼虫 30 頭から抽出した DNA を鋳型に用いて、*BmChsB* の第 7 エキシソンの標的配列の両側に位置するプライマー (5'-CCTTGACCGCAAGACGTTAGAG-3' および 5'-TCGGTAGCAGCGACACGCTCAC-3') により約 940 bp の DNA 断片を PCR 増幅させ、これを熱変性により一本鎖に解離させた後に、さらに再アニーリングさせた。変異導入ゲノムをヘテロの状態を持つ個体の DNA を試料とした場合、再アニーリング後に変異部位が水素結合できないミスマッチを含む DNA が生じる。次に、この PCR 反応液 15 μL 中の DNA を、10 unit の T7 endonuclease I (NEB 社製) により 37°C で 30 分間処理することで、ミスマッチ部分を特異的に切断した。DNA の切断の有無は、アガロースゲル電気泳動で検出した。ミスマッチ部分の配列は、同様に、ネステドプライマー (5'-TCTACATCTCTCTGGGTGGCCGC-3') を用いたサンガーシーケンスにより調べた。

結果と考察

1. *BmBLOS2* を標的とするゲノム編集

カイコでは、脂肪体で合成された尿酸は真皮に取り込まれて尿酸顆粒となるが、この尿酸顆粒形成が *BmBLOS2* 変異個体では阻害され、油蚕の皮膚形質を示すようになる (Fuji *et al.* 2010)。体表に現れる変化を簡便に検出できることから、ゲノム編集の効果を検証する上で *BmBLOS2* を標的特定することは有効である。本研究では、市販 Cas9 と試験管内合成 sgRNA による簡便な CRISPR/ Cas9 操作法の有効性を明らかにするため、まず *BmBLOS2* を標的とした場合の変異導入の実現性を調べた。その結果、胚発生中の G0 世代卵に sgRNA と Cas9 混合液を処理した場合に、得られる全ての G0 世代幼虫において、図 1 に示されるような斑状の透明皮膚形質が見られた。



図 1. *BmBLOS2* を標的とする簡易ゲノム編集操作法により生じた G0 個体の体表

次に、G1 幼虫の個体ごとのゲノム DNA の標的付近の塩基配列を解析した。変異導入部分は、Poly Peak Parser による推測とともに、クローニングベクターに連結させた個別の断片の塩基配列を決定したところ、図 2 に示された二種類の変異導入配列を持つ個体が見つかった。一方、*w1-pnd* 系統カイコの 50 個体分のゲノムを個別に調べたところ、

このような変異導入配列を持つ個体は見つからなかった。ともに、6 および 9 塩基の欠失でアミノ酸配列のフレームシフトは起こさない変異であるが、個体の皮膚における斑状の油蚕形質が現れたため、これらのわずかなアミノ酸の欠失によって、*BmBLOS2* タンパク質の活性に大きな影響が出るものと考えられる。このような結果から、試験管内合成した sgRNA と市販 Cas9 の混合物のカイコ発生卵へのマイクロインジェクションにより、確かにカイコゲノムの特定部分への変異導入が可能であることがわかった。

2. *BmChsB* を標的とするゲノム編集

BmChsB は中腸で発現し、囲食膜形成に関わると考えられているが (ZHUO *et al.* 2014)、その詳細な機構は調べられていない。特に、*BmChsB* 遺伝子の働きを人為的に阻害する研究による生物学的重要性の検討は行われていない。本研究では、同様の CRISPR/Cas9 操作による *BmChsB* 遺伝子の改変を試みた。カイコ発生卵に、人工合成した sgRNA と市販 Cas9 との混合液を微量注入後、孵化した個体を成虫まで飼育し、無処理個体と交配させた。それぞれのメス成虫の産卵区から 30 個体ずつの 1 齢幼虫の DNA を抽出し、標的部位における遺伝子変異の導入を調べるための T7E1 アッセイを行った。未処理区の G1 個体では、PCR 法で増幅される約 920 bp の DNA 断片が検出され、T7 endonuclease 1 による切断は見られなかった (図 3, lane 1)。一方、この未処理区と比較して、一つの実験区の G1 個体では約 920 bp DNA バンドの他に、約 670 bp および約 250 bp の DNA バンドが検出された (図 3,

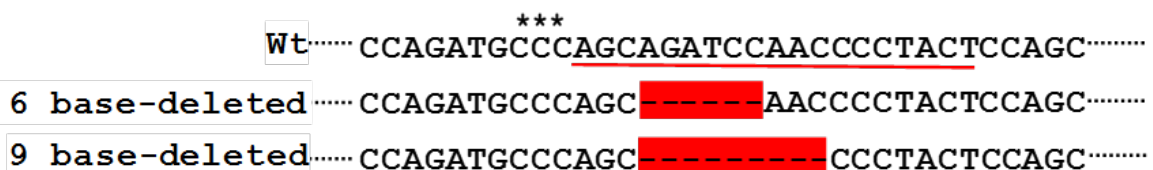


図 2. *BmBLOS2* に見られる塩基の欠損

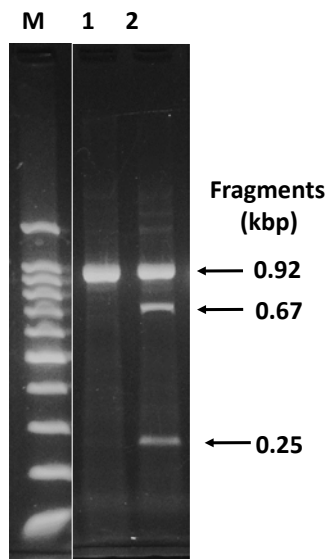


図 3. *BmChsB* に導入された変異の検出

標的配列周辺の配列を PCR 増幅し、熱変性と再アニーリング処理した。この断片を T7 endonuclease I で処理し、アガロースゲル電気泳動で分析した。M: 100bp DNA ladder (下から 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000, 1,500 bp); lane 1: wild-type *w1-pnd*; lane 2: 実験区 1 個体からの DNA 増幅産物。

lane 2)。本研究で用いた標的配列のすぐ下流に PAM 配列があり、この部分付近の DNA が Cas9 により二本鎖切断を受けると仮定すると、T7 E1 アッセイで PCR 断片から二本のバンドが生じ、その塩基数の合計がおおよそ 920 bp 程度になると想定される。本結果から、想定した通りに Cas9 が標的付近の DNA を切断したと考えられる。

T7 endonuclease I による切断を生じた DNA 断片の標的部付近の塩基配列を調べたところ、図 4 に示される PAM 配列 (AGG) 付近の三つの塩基である TCC の欠失が認められる個体が生じていることが明らかとなった。これまでに、正常型である *w1-pnd* 系統 50 個体の DNA の同じ部位を調べた結果、その全てが図 4 の上段の配列をもっており、

Wt (50) **TTATTTGTTCTACGAAATTCCTCC** **AGGTGAGATAAAA**

RNP (3) **TTATTTGTTCTACGAAATTC** --- **AGGTGAGATAAAA**

図 4. *BmChsB* 遺伝子に見られる塩基の欠損

無処理区 (Wt; 50 個体) と G1 の 3 個体の DNA 増幅産物の塩基配列を調べ、欠損 (red box) を検出した。*: PAM sequence; red underline: target sequence in sgRNA

TCC の欠損は生じていなかった (data not shown)。一方、T7E1 アッセイでゲノムの変化を認めた 3 個体の DNA 配列を調べたところ、全て図 4 に示された同じ変異を持つことが明らかとなった。この変異は、Cas9 が切断したゲノムに対するカイク個体の非相同末端結合で修復される過程に生じたと考えられる。さらにこの変異は、1089 アミノ酸残基からなる *BmChsB* タンパク質のうちわずかに 395 番目のプロリンを欠失させるものであり、アミノ酸フレームシフトは生じさせない。二箇所以上の標的部切断と修復により、さらに大きな割合のアミノ酸配列欠失により生じる顕著な遺伝的影響を調べることにより、*BmChsB* タンパク質の個体における役割が明確化されると考えられる。

3. 本法によるゲノム編集の有効性評価

本研究では、150 個体の *BmChsB* を標的とする RNP の微量注入を行った卵から交配可能な 14 の G0 成虫を得た後、*w1-pnd* 系統との交配で得られる各 G1 集団のうち、3 集団の中にそれぞれ 1 個体ずつの *BmChsB* 遺伝子変異導入個体を認め、全体の処理数が少ないながらも約 20% の変異導入効率が認められた。すでに Cas9 mRNA と、*BmBLOS2* 遺伝子を標的とする sgRNA によるゲノム編集操作の効率が報告されているが、G1 に現れる全身体表の油蚕形質を示す個体はおおよそ 35% 程度にまで達するとされている (WANG *et al.* 2013)。本研究における *BmChsB* 遺伝子のゲノム編集では、この WANG *et al.* (2013) による *BmBLOS2* 遺伝子のケースに比べると変異導入効率は劣る。*BmChsB* 遺伝子変異の致死性は明らかではないが、さらなる研究で致死率を明らかにした上で、本法による変異導

文 献

入効率の適正評価が必要となる。また、本研究の方法により、100%の G0 個体において *BmBLOS2* 遺伝子への変異導入の証拠である油蚕斑含有個体を検出した (図 1)。これらの証拠から、市販 Cas9 と合成 sgRNA による簡易な方法で効率的なゲノム編集が実現可能であることが明らかとなった。しかし、様々な遺伝子への変異導入効率の上昇に向けて、用いる RNP の量や RNP 作製に用いる Cas9 と RNA との量比の検討が残されている。さらに、複数標的個所への同法による変異導入効率も明らかにされるべきである。

現在までに 1 アミノ酸欠損を持つ変異 *BmChsB* 遺伝子のホモ個体が得られた。囲食膜の形態の違いや、個体中腸からの病原への感染性も明らかでないものの、その生育に問題は認められていない。本研究を足掛かりとして、*BmChsB* 遺伝子機能の完全な欠失を伴うカイコ個体を用いて同酵素遺伝子の生理学的意義が解明されるものと考えられる。本研究の結果、市販の Cas9 を用いた CRSPR/CAS9 ゲノム編集技術を用い、有益な性質を持つカイコがより簡便かつ迅速に作出されるようになると期待される。

- 石野 良純 (2016) : 生物工学会誌 **94**: 336-342.
ITO K. *et al.* (2018): *Sci. Rep.*, **8**: 7430
CHRISTIAN M. *et al.* (2010): *Genetics*, **186**: 757-761
DAIMON *et al.* (2014): *Dev. Growth Differ.*, **56**: 14-25
FUJII T. *et al.* (2010): *Insect Mol. Biol.*, **19**: 659-667
KOTANI E. *et al.* (2015): *Sci. Rep.*, **5**: 11051
HILL J.T. *et al.* (2016): *Dev. Dyn.*, **243**: 1632-1636
HSU P.D. *et al.* (2014) *Cell*, **157**: 1262-1278
MA S. *et al.* (2014): *Sci. Rep.*, **4**: 4489
MA S.Y. *et al.* (2019): *Insect Sci.*, **26**: 964-972
OTSUKI R. *et al.* (2017): *PNAS*, **114**: 6740-6745
SATO M. *et al.* (2017): *Sci. Rep.* **7**: 16077
SEKIMIZU K. (2017): *Yakugaku Zasshi*, **137**: 551-562
TAMURA T. *et al.* (2000): *Nature Biotech.*, **18**: 81-84
TAMURA T. *et al.* (2007): *J. Insect Biotech. Sericol.*, **76**: 155-159
TOMITA M. (2018): *Yakugaku Zasshi*, **138**: 875-884
WANG Y. *et al.* (2013): *Cell Res.*, **23**: 1414-1416
ZHUO W. *et al.* (2014): *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **85**: 36-47

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、 μ m、nm、ha、a、(アール)、 m^2 、ml、 μ l、kg、g、mg、 μ g、sec、min、hr、rpm、%、ppm、M(モル濃度)、N(規定度)、 $^{\circ}$ C、kcal、pH、RH(相対湿度)、 32 P(放射性リン 32 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) (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 役員

(任期 2019 年 1 月 1 日～2020 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)

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

印 刷	令和元年 12 月 25 日
発 行	令和元年 12 月 25 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

