

東北蚕糸・昆虫利用研究報告

第45号

令和2年12月

日本蚕糸学会東北支部

No.45 目 次

橋本 健太 佐藤 昌直 伴戸 久徳 浅野 眞一郎	グアム産タイワンカブトにおける OrNV 配列の調査 1
長内 みのり 高木 圭子 金児 雄	20-Hydroxyecdysone 摂食による簡易コミットメント検定法とその評価 5
藤本 章晃 大野 瑞紀 佐原 健	BAC-FISH を用いたトビケラ類ゲノムアセンブルの試行 10
小島 桂 伴戸 久徳	改変 BmNPV ie1 プロモーター (SK16p) を用いたカイコ培養細胞 BmN におけるタンパク質高発現プラスミドベクターの構築 14

グアム産タイワンカブトにおける OrNV 配列の調査

橋本 健太郎・佐藤 昌直・伴戸 久徳・浅野 眞一郎*
北海道大学大学院農学院

(2020 年 11 月 26 日受理)

タイワンカブト(*Oryctes rhinoceros*)は農業および森林害虫として知られており、主に東南アジアでの被害が甚大である(BEDFORD, 2013a; b)。日本においても沖縄県と鹿児島県に侵入、増殖しており、ヤシ類やサトウキビでの食害が報告されている。

タイワンカブトの生物防除剤として、環状 2 本鎖 DNA をゲノムに持つ *Oryctes rhinoceros nudivirus* (OrNV)を用いたウイルス製剤が存在する。OrNV はタイワンカブトの幼虫と成虫の両方に感染性と毒性を持つ(HUGER, 2005)。20 世紀中頃に OrNV が発見されて以降、これを用いた生物的防除が東南アジアや太平洋諸島で実施されてきた。OrNV 製剤が導入された地域ではタイワンカブトによる被害が減少しただけでなく、新たな地域へのタイワンカブト拡散が未然に防がれていた(HUGER, 2005)。しかしながら、2007 年にグアムでタイワンカブトの新たな侵入が見られ、このタイワンカブト集団は、使用されてきた OrNV 製剤に抵抗性を示した(MARSHALL *et al.* 2017)。OrNV 感受性型か抵抗性型かは、ミトコンドリアゲノム内 *cytochrome C oxidase I (COI)*配列の SNP によって区別ができた(MARSHALL *et al.* 2017)。具体的な SNP の位置は、universal プライマー(FOLMER *et al.* 1994; SIMON *et al.* 2006)で増幅できる COI配列 676 bp 内 288 番目の

塩基で、OrNV 感受性型では A の部分が、抵抗性型では G に置換される(MARSHALL *et al.* 2017)。

タイワンカブトには OrNV 感受性型や抵抗性型が存在するが、OrNV もゲノム配列が一様でない。例えば、ソロモン諸島の OrNV 抵抗性型タイワンカブトから OrNV の全長配列が同定されたが、配列はウイルス製剤に利用される OrNV と一部異なっており、コア遺伝子 (*vlf-1*) を含むいくつかの遺伝子には、複数のアミノ酸の挿入や欠失が起こっていた(ETEBARI *et al.* 2020)。このことから、OrNV 抵抗性型と呼ばれてきたタイワンカブトからも OrNV が検出される可能性がある。また近年では、OrNV がタイワンカブトゲノムにインテグレーションされている可能性も指摘されている。そこで本研究では、グアム産タイワンカブトのゲノムを解析することでこれらの可能性について検証を行った。

材料と方法

1. 供試昆虫

タイワンカブトは、2018 年 11 月にグアムの数地点で採取された。本実験には、そのうちの成虫 1 個体の脂肪体と、幼虫 1 個体の腸管組織をそれぞれ

*責任著者

〒060-8589 札幌市北区北 9 西 9

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

れ 100 mg 使用した。

2. タイワンカブトのゲノム DNA 抽出

サンプルを液体窒素で冷却し、乳鉢・乳棒で破砕した。破砕したサンプルに 1 ml の Lysis buffer (4 ml 1 M Tris (pH8.0), 8 ml 0.5 M EDTA, 20 ml 10% SDS, 168 ml dH₂O)を加えてよく混合し、混合液に 20 mg/ml に調製した Proteinase K (Wako/富士フィルム和光純薬)を 10 µl 加えて 50°C で 4 h 静置した。その後、1 ml の Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) (Wako/富士フィルム和光純薬)を加え、室温で 10 min 転倒混和し、室温の下 2400 g で 10 min 遠心した。遠心後、上清を回収し 1 ml の Chloroform (Wako/富士フィルム和光純薬)を加えて室温で 10 min 転倒混和し、室温の下 2400 g で 10 min 遠心した。遠心後上清を回収し、100 µl の 3 M NaOAc と 700 µl の Isopropanol (Wako/富士フィルム和光純薬)を加えて数回転倒混和し、-20°C、オーバーナイトで静置した。その後、4°C、3500 g で 10 min 遠心し、上清を捨てて 500 µl の 70% ethanol (-20°C)で洗浄した。洗浄後、風乾により DNA ペレットを乾燥させ、ペレットを 500 µl の TE Buffer に溶解した。その後、100 mg/ml に調製した RNase (Sigma-Aldrich)を 5 µl 加えて 37°C で 2 h 静置した後、5 µl の Proteinase K を加えて 50°C で 2 h 静置した。その後、Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) と Chloroform で再び精製を行い、得られた上清に 50 µl の 3 M NaOAc と 1250 µl の 100% ethanol を加えて数回転倒混和させ、-20°C、オーバーナイトで静置した。その後、4°C、3500 g で 10 min 遠心し、上清を捨て、500 µl の 70% ethanol (-20°C)でペレットを洗浄した。洗浄後、風乾により DNA ペレットを乾燥させ、ペレットを 200 µl の 10 mM Tris-HCl (pH7.5)に溶解し、4°Cで保存した。

3. cytochrome C oxidase I (COI) の SNP 診断

本研究で供試したグアム産タイワンカブトのバリオタイプを決定するため、サンガーシーケンスにより SNP 診断を行った。

抽出したゲノム DNA をテンプレートとし、COI の 523 bp を増幅させるプライマー (5'-GGAGGTTTCGAAATTGACTTGTTCC-3' と 5'-CCAGGTAGAATTAATAAATRTATACCTC-3')を用いて PCR を行った(MARSHALL *et al.* 2017)。反応条件は 94°C, 3 min; 35 cycles [94°C, 30 sec; 50°C, 1 min; 72°C, 1 min]; 72°C, 5 min とした。得られた増幅産物を pGEM-T Easy Vector Systems (Promega)にインサートし、ABI3130 sequence analyzer (Applied Biosystems)で解析した。

4. MiSeq シーケンスライブラリーの作成

シーケンスライブラリーの作成には KAPA HyperPlus Kit (KAPABIOSYSTEMS)を用い、製品プロトコールに従い作成した。例外として、ポストライゲーションクリーンアップに Agencourt AMPure XP (BECKMAN COULTER Life Sciences)を用い、0.6×でクリーンアップを行った。なお、input DNA 量は 1 µg で、断片化反応は 37°C で 17 min 行った。

5. シーケンスデータの解析

MiSeq (illumina)のシーケンシングにより得られたデータは、fastp によってアダプター配列の除去および低クオリティのリードの除去を行った。

リード配列からの OrNV 配列の探索は blast-2.10.0+を用いて行った。まず、OrNV の配列(アクセッション番号: MN623374.1, NC_011588.1)を NCBI から取得し、データベースの作成を行った。

次に、リード配列をクエリとして、**blastn** によってデータベースとのアライメント処理を行った。

結果と考察

1. COIの SNP 診断

グアム産タイワンカブトの *COI*部分配列を図 1 に示す。本研究の増幅配列では、**universal** プライマーで増幅される 676 bp 配列(FOLMER *et al.* 1994) の 288 番目の塩基は、102 番目に対応する(MARSHALL *et al.* 2017)。OrNV 感受性型では A であるこの塩基が、グアム産タイワンカブトでは G に置換されていた。この置換は OrNV 抵抗性型と一致するため、本研究のグアム産タイワンカブトは、OrNV 抵抗性型であることが明らかとなった。

```
1 GGAGGTTTCGGAAATTGACTTGTTCATTAATACTTGGAGCCCCAGATATAGCATTTCCACGAATAAATAACATAAGATTTTGACTTCTTCTCCCTCTCT
101 TACTCTACTTCTAGCAAGAAGACTAGTAGAAAAACGGTGCAGGAACTGGTTGAACAGTATATCTCCCTCTCTGCAAATATTGCCATAGAGGAGCATC
201 AGTAGACTTAGCAATTTTTAGACTTCATCTTGCCGGAATTTTCATCAATTCTAGGGGCTGTAAACTTCATTACTACTGTAATTAATATACGATCAACCGGA
301 ATAACATTTGATCGTACTCCCTATTGTCTGATCTGTACATAACCGCTATCCTTCTTCTACTGTCTTACCTGTTCTAGCCGGTGCAATTACCATAAC
401 TTCTAACAGACCGAAATATTAATACATCATTTTTTTGATCCAGCAGGAGGAGATCCAATTTTATATCAACACCTATTCTGATTTTTTTGGACACCCAGA
501 GGTATACATTTTAATTCTACCTGG
```

図 1. グアム産タイワンカブトの *COI*部分配列

*COI*遺伝子の一部配列を PCR で増幅し、ABI3130 sequence analyzer (Applied Biosystems)により配列を決定した。プライマー配列(MARSHALL *et al.* 2017)を水色でマークし、SNP(102 番目の塩基)を黄色でマークしている。

2. MiSeq を用いたゲノムシーケンス解析

MiSeq のシーケンシングで得られたデータの概略を表 1 に示す。データ解析により、幼虫 1 と成虫 2 の両方で OrNV 配列の一部が検出され、

それらは *pif-2*、*vp91*、*dna hericase*、*hypothetical protein*、非翻訳領域であった。OrNV 抵抗性型のグアム産タイワンカブト 2 個体両方から OrNV 配列が得られたことの解釈について、潜在感染が否定されるのであれば 2 つの可能性が考えられる:

1) インテグレーションにより、OrNV のゲノムが

タイワンカブトゲノムに取り込まれている。

2) グアム産のタイワンカブトが OrNV 全長配列をプラスミドとして保有する。

しかし、これらの可能性について、本研究ではどちらかに結論づけることが出来なかった。この理由として 2 点あげられる。1 点目は、MiSeq によるシーケンス解析がタイワンカブトゲノムや OrNV ゲノムをフルカバーできていないことである。タイワンカブトのゲノムサイズは現在明らかにされていないが、近縁種の *Oryctes borbonicus* はゲノムサイズが 518 Mb であることが分かっており(JAN *et al.* 2016)、タイワンカブトも同じ程度のゲノムサイズだと仮定出来る。これに対して MiSeq のデータは、幼虫 1 と成虫 2 の両方で、最小インサートサイズが 31 bp、最大インサートサイズが

301 bp、平均インサートサイズが約 200 bp であり、これとリード数から計算される総インサート長は約 350 Mb ほどである(表 1)。リードの配列を確認したところ、forward 側と reverse 側で同じ配列を読んでいるペアがほとんどであった。そのため、実際に得られた配列は総インサート長の半分ほど(=約 175 Mb)であると推定できる。よって、タイワンカブトゲノムと OrNV ゲノムをフルカバーしていることは考え難い。2 点目は、インテグレーションの確認が出来なかった点である。MiSeq のシー

表 1. MiSeq で得られたデータの概略

個体	総リード数	最小インサートサイズ (bp)	平均インサートサイズ (bp)	最大インサートサイズ (bp)	総インサート長 (Mb)
グアム幼虫 1	1785132	31	199.6	301	356
グアム成虫 2	1622318	31	212	301	344

ケンスがタイワンカブトゲノムや OrNV ゲノムをフルカバーできていないとしても、OrNV 配列とタイワンカブト配列とのジャンクションを持つリードを確認することでインテグレーションの検証ができる。しかし、本研究ではジャンクションを見つけることができなかった。OrNV 配列と連結した非 OrNV 配列を含むリードを確認したが、非 OrNV 配列は、ライブラリーのアダプター配列と一致したことから、これらはアダプター配列を除ききれなかったものだと結論付けた。

仮説を検証するためには、リード数を増やした更なるゲノムシーケンスを行う必要がある。OrNV の全長配列が得られず、リード中に OrNV 配列とタイワンカブトのゲノム配列とのジャンクションが見つかった場合、1)の仮説を支持できる。一方、OrNV の全長配列が得られた場合、2)の仮説が支持できる。OrNV がタイワンカブトのゲノム配列内にインテグレーションされている場合、全長配列を持ちウイルス製剤として使われる OrNV と、断片化されタイワンカブト宿主にインテグレーションされた OrNV の比較を行うことで、OrNV 抵抗性のメカニズム解明につながると考えられる。今

後は、OrNV 抵抗性型のグアム産タイワンカブト内で、OrNV 由来の配列がどの様に存在しているか等、さらなる解析を続けていきたいと考えている。

文 献

- BEDFORD G.O. (2013a): *Annu. Rev. Entomol*, **58**: 353-372
- BEDFORD G.O. (2013b): *Afr. J. Agricult. Res*, **8**: 6422-6425
- ETEBARI K. *et al.* (2020): *Virus Research*, **278**: 197864
- FOLMER O. *et al.* (1994): *Mol. Mar. Biol. Biotech*, **3**: 294-299
- HUGER A.M. (2005): *J. Invertebr. Pathol*, **89**: 78-84
- JAN M.M. *et al.* (2016): *Genome Biol. Evol*, **8**: 2093-2105
- MARSHALL S.D.G. *et al.* (2017): *J. Invertebr. Pathol*, **149**: 123-134
- SIMON C. (2006): *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst*, **37**: 545-579

20-Hydroxyecdysone 摂食による簡易コミットメント検定法とその評価

長内 みのり¹・高木 圭子^{1,2}・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）

(2020年12月14日受理)

完全変態昆虫は複数の幼虫脱皮の後、蛹へと変態する。蛹変態の際に細胞や組織は劇的な変化を起こす。成虫特異的な組織は成虫原基などから分化し、幼虫特異的な組織は細胞死によって除去されるほか、皮膚のような幼虫期と蛹期を通して存在する組織は、幼虫型から蛹型へと再構成される。このような細胞の変化が実際に進行するよりも前に、将来変化する運命へと決定された状態に細胞は移行する。これをコミットメントという (HIRUMA, 2003)。コミットメントを受けた細胞は、外見上の変化はないものの、分化のシグナルを受け取ると予定された運命へと変化する。

コミットメントなどの脱皮と変態に伴う細胞の変化は、主に2つのホルモンの血中濃度のバランスによって制御されている。ひとつは脱皮を促すエクダイソンで、もうひとつは現状維持作用を示す幼若ホルモン (JH) である。JH 存在下で、エクダイソンが分泌されると、幼虫から幼虫への脱皮が引き起こされる。終齢幼虫へと脱皮すると、血中 JH 濃度が急激に低下する。この JH 濃度低下により、蛹コミットメントが誘導され、続いて起こる終齢後期のエクダイソンのピークにより、分化が誘導される (HIRUMA, 2003)。

蛹コミットメントの研究は、これまで成虫原基

や皮膚を中心に行われてきた。蛹コミットメントは、コミットメントの前後で細胞の形態が変化しないため、容易にその現象を捉えることができない。そこで、JH への応答性を指標とし、蛹コミットメントが完了したかどうか検証する方法が開発された (RIDDIFORD, 1976)。蛹コミットメントの完了前では、細胞は、JH の現状維持作用に応答し、幼虫形質を維持する。一方、蛹コミットメントが完了すると、JH への応答性が消失する。このことを利用して、調べたい組織を、JH 濃度の高い終齢の幼虫体内へ移植し、ホストの幼虫が幼虫脱皮を起こした後、移植片が幼虫形質か、蛹形質かを判断する。移植片が幼虫形質を維持していれば、JH への応答性を維持している、すなわち蛹コミットメントを受ける前であったことがわかる。蛹形質を発現していれば、JH への応答性を消失していた、すなわちコミットメントを受けた後であるといえる。このコミットメント検定法により、タバコスズメガ *Manduca sexta* の表皮の蛹コミットメントが、JH 不在下で少量のエクダイソンに曝されることにより誘導されることが明らかになった (RIDDIFORD, 1976; 1978)。

JH 産生組織であるアラタ体除去による早熟変態を利用したコミットメント時期の解析も行われ

*責任著者

〒036-8561 弘前市文京町3

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

ている (FUKUDA, 1952; OHTAKI *et al.* 1986)。カイコにおいて、終齢前期である 4 齢初期にアラタ体を除去すると、完全な早熟蛹へと変態する (FUKUDA, 1944)。またアラタ体除去直後に JH を投与すると、完全な幼虫脱皮が引き起こされる (OHTAKI *et al.* 1971)。このことから、アラタ体除去幼虫に JH を差時的に投与することで、様々な組織における蛹コミットメントの時期が推定された。その結果、触角、胸脚、翅原基のコミットメントが最も早く、遅れて皮膚のコミットメントが起こることが明らかにされた (OHTAKI *et al.* 1986)。

より簡便なコミットメントの検証方法として、終齢個体への JH 投与が試みられた (TRUMAN *et al.* 1974)。しかし、一般的にチョウ目昆虫の終齢初期幼虫に JH を投与した場合、JH が PTH の分泌を抑制するため、エクダイソンが分泌されない (NIJHOUT, 1994)。コミットメントの検証は、JH 濃度が高い状態でエクダイソン濃度が上昇するという条件で、調べたい組織が蛹形質を発現するか否かでしか判断できないことから、終齢初期個体への JH 投与によるコミットメントの検証は難しい。現在のところ、終齢初期におけるコミットメントの検証は、先述の移植によるコミットメント検定法とアラタ体除去によるしかない。これらの検定法は、組織の移植またはアラタ体除去と、実験手技に習熟してないで行うことができない。そこで本稿では、より簡便なコミットメントの検証法を検討した。

カイコ終齢脱皮直後の幼虫に活性型エクダイソンである 20-Hydroxyecdysone (20E) を含む餌を与えると、過剰な幼虫脱皮が引き起こされる (KAMIMURA *et al.* 2003)。これは 20E がアラタ体の JH 合成活性を促進し (KANeko *et al.* 2011)、血中に JH が十分に存在する条件下で、20E による脱皮誘

導活性が働くためである。このことを利用し、20E を含む餌を与える時期を変えて、成虫原基の変化を観察した。

材料と方法

1. 供試カイコ系統

本研究では、錦秋×鍾和を使用し、シルクメイト 2M (日本農産工業株式会社) を与えて、25°C、12L:12D の明暗周期で飼育した。

2. 20E 含有人工飼料

シルクメイト 2M の粉末を 2.6 倍量の蒸留水に混ぜ、70 分蒸した後に、20E 溶液 (三鷹製薬株式会社、神村学氏による分譲) を添加した。20E は、シルクメイト 2M の粉末の重量に対して、200 ppm になるように添加した。

結果と考察

20E を 200 ppm 含む人工飼料を 5 齢 0 日から与えた区と、5 齢 0 日から 1 日間は通常の人工飼料を与え、その後、5 齢 1 日から 20E を 200 ppm 含む人工飼料を与えた区を、それぞれ 5 個体ずつ用意した。その結果、5 齢 0 日から 20E 含有人工飼料を与えた区では、1 日後に全ての個体が眠に入り、5 齢 3 日に 6 齢幼虫へと過剰脱皮した。5 齢 1 日から 20E 含有人工飼料を与えた個体のうち、4 個体は 5 齢 2 日に眠に入り、5 齢 3 日に幼虫脱皮した。残りの 1 個体は、他の個体から 1 日遅れて眠に入り、5 齢 4 日に幼虫脱皮した。20E 摂食による脱皮のタイミングは、Kamimura *et al.* (2003) の報告とよく一致していた。Kamimura *et al.* (2003) は、本報告とは異なる系統の C145×N140 を使用

していたことから、20E 摂食による脱皮誘導は系統を超えた再現性の高い方法であると言える。

20E 非添加区は 5 齢 6 時間で、20E 添加区は、複眼、触角、胸脚、翅原基における蛹クチクラの形成を、過剰脱皮後に観察した (図 1-4)。チョウ目昆虫において、翅原基とそれ以外の原基では、成虫原基の形成過程に違いがある (比留間, 2018; TRUMAN and RIDDIFORD, 2019)。翅原基は、胚の時期に形成され、細胞塊として幼虫体内に存在している。それに対して、複眼、触角、胸脚は、幼虫細胞と混在している primordium から、5 齢期に原基が形成され、その後、成虫の組織へと分化する。

(1) 翅原基

カイコにおける翅原基のコミットメントの時期は、4 齢幼虫への移植によるコミットメント検定法で詳細に明らかにされている。蛹コミットメントは、5 齢脱皮後 16 時間までに終了する (OBARA *et al.* 2002; KOYAMA *et al.* 2004)。本検証では、5 齢 0 日から 20E を含む人工飼料を与えても、5 齢 6 時間の翅原基 (図 1A) 同様、蛹クチクラは観察されなかったが (図 1B)、5 齢 1 日から与えた区では、全ての個体において蛹クチクラの合成が見られ (図 1C)、コミットメント検定法とほぼ同様の結果となった。

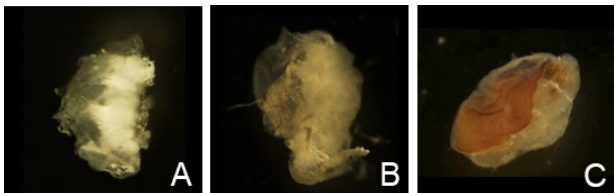


図 1. 20E 含有人工飼料の摂食が翅原基の蛹クチクラの形成にもたらす影響. A, 20E 非添加飼料育; B, 5 齢 0 時間より 20E 添加飼料育; C, 5 齢 1 日より 20E 添加飼料育。

(2) 触角

5 齢 0 日から 20E 含有人工飼料を与えた際に 5

個体中 4 個体において、5 齢 6 時間では認められない (図 2A) 触角の基部の蛹クチクラが観察された (図 2B)。このことから、触角を形成する細胞の蛹コミットメントは、5 齢への脱皮直後から進行していることが示唆される。5 齢 1 日から与えた個体では、幼虫の触角とは形態が異なり、蛹様の形態が見られた (図 2C)。しながら、触角の位置は幼虫と同じであったことから、5 齢 1 日の段階ではまだコミットメントが終了していないことが示唆される。この結果は、*Precis coenia* で観察された触角の蛹コミットメントの推移と類似していた (KREMEN and NIJHOUT, 1998)。

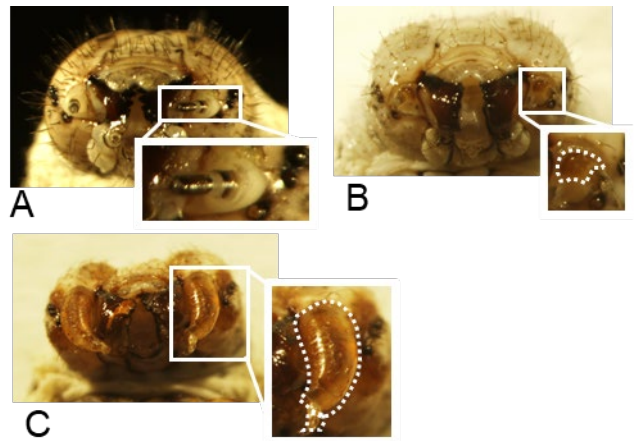


図 2. 20E 含有人工飼料の摂食が触角の蛹クチクラの形成にもたらす影響. A, 20E 非添加飼料育; B, 5 齢 0 時間より 20E 添加飼料育; C, 5 齢 1 日より 20E 添加飼料育。拡大図の中の点線は、蛹クチクラが観察された部位。

(3) 胸脚

5 齢 0 日から 20E 含有人工飼料を与えても、5 齢 6 時間の胸部第 1 体節 (図 3A) と同様、蛹クチクラは全く観察されなかった (図 3B)。一方、5 齢 1 日から与えた際には、すべての個体の胸脚で部分的な蛹クチクラが認められた (図 3C)。胸脚にある primordium は一様に分布しているわけではなく、各節の特定の場所にあることが知られており (TANAKA and TRUMAN, 2005; SINGH *et al.* 2007)、5

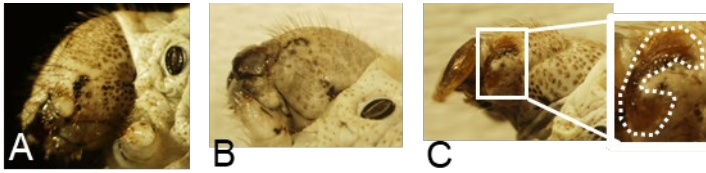


図 4. 20E 含有人工飼料の摂食が複眼形成にもたらす影響. A, 20E 非添加飼料育; B, 5 齢 0 時間より 20E 添加飼料育; C, 5 齢 1 日より 20E 添加飼料育。

齢 1 日では、まだすべての細胞における蛹コミットメントは完了していないことが示唆される。蛹コミットメントの開始時期は、アラタ体除去実験と同様に、翅原基の蛹コミットメントとほぼ同時期に見られた。

(4) 複眼

5 齢 0 日からの 20E 含有人工飼料を与えた場合、5 齢 6 時間の個体（図 4A）と同様、将来の複眼領域における蛹クチクラの形成は、認められなかった（図 4B）。一方、5 齢 1 日から与えた際には、全ての個体において、個眼の前方部において蛹クチクラの形成が見られた（図 4C、頭部側面）。しかし胸脚の場合と同様に、部分的な複眼しか観察されなかったことから、5 齢 1 日ではまだ原基が十分に形成されていないことが推察される。

20E 含有人工飼料を 5 齢 0 日および 5 齢 1 日の個体への与えることで、各種成虫原基の蛹コミットメントの時期が推定できた。それらの結果は、これまで他の方法で検証された時期とほぼ一致していた。このことから、本方法はコミットメント時期の検証に使用できると考えられる。特に、組織の移植が難しい primordium から産生される成虫

原基の解析には有効だと考えられる。

20E 摂食による JH 合成活性の促進効果は、20E の濃度上昇より遅れて起こると考えられることから、本方法は厳密な時期の推定には向かない。また、20E 摂食による JH 合成活性の促進効果は、5 齢 0 日より 5 齢 1 日の方が弱く (KANeko *et al.* 2011)、その後、アラタ体の JH 合成活性が完全になくなる 5 齢 3 日にかけて、その効果はほとんどなくなると推測される。このことから、本方法が適応できるのは、蛹コミットメントが 5 齢 1 日までに起こる組織に限定される。そのため、5 齢 2 日以降においてコミットメントの検証をする際には、JH の投与と組み合わせることが有効だと考えられる。その際は、すでにコミットメントの時期が解明されている表皮を指標として、実験方法の妥当性を検証することが必要となる。

大まかな時期の検証とは言え、これまで技術の必要な外科的手術を必要としていたコミットメントの解析に、簡易的な方法を提示することができた。今後は、さらに検体数を増やし、方法の妥当性を検証していきたいと考えている。

文 献

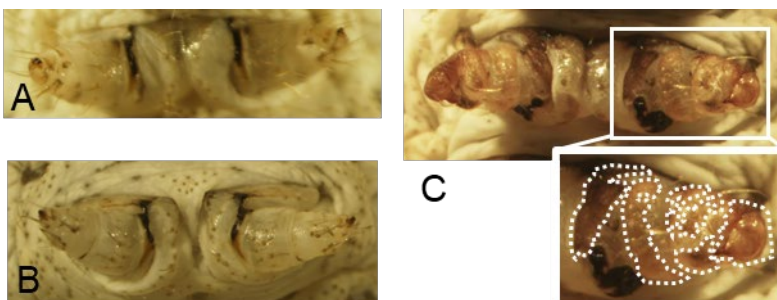


図 3. 20E 含有人工飼料の摂食が胸脚の蛹クチクラの形成にもたらす影響. A, 20E 非添加飼料育; B, 5 齢 0 時間より 20E 添加飼料育; C, 5 齢 1 日より 20E 添加飼料育。拡大図の中の点線は、蛹クチクラが観察された部位。

- FUKUDA S. (1944): J. Fac. Sci. Tokyo Imp. Univ, **6**, 477-532.
- FUKUDA S. (1952): J. Seric. Sci, **21**, 145-146.
- HIRUMA K. (2003): Encyclopedia of Hormones. Vol. 2, pp. 528-535. Academic Press.
- 比留間 潔 (2018): 応動昆, **62**, 161-169.
- KAMIMURA M. *et al.* (2003): J. Insect Biotech. Sericol, **72**, 197-201.
- KANEKO Y. *et al.* (2011): Mol. Cell. Endocrinol, 335, 204-210.
- KOYAMA T. *et al.* (2004): J. Insect Physiol, **50**, 123-133.
- KREMEN C. and NIJHOUT H.F. (1998): J. Insect Physiol, **44**, 287-296.
- NIJHOUT H.F. (1994): Insect Hormones, pp. 61-81. Princeton University Press.
- OBARA Y. *et al.* (2002): J. Insect Physiol, **48**, 933-944.
- OHTAKI K. *et al.* (1971): Jap. J. Med. Sci. Biol, **24**, 251-255.
- OHTAKI K. *et al.* (1986): J. Insect Physiol, **32**, 635-642.
- RIDDIFORD L.M. (1976): Nature, **259**, 115-117.
- RIDDIFORD L.M. (1978): Gen. Comp. Endocrinol, **34**, 438-446.
- SINGH *et al.* (2007): Genesis, **45**, 169-176.
- TANAKA K. and TRUMAN J.W. (2005): Dev. Genes Evol, **215**, 78-89.
- TRUMAN J.W. and RIDDIFORD L.M. (2019): Phill. Trans. R. Soc. B, **374**, 20190070.
- TRUMAN J.W. *et al.* (1974): Dev. Biol, **39**, 247-262

BAC-FISH を用いたトビケラ類ゲノムアセンブルの試行

藤本 章晃¹・大野 瑞紀²・佐原 健^{1*}

¹岩手大学農学部・²岩手大学大学院連合農学研究科

(2020年12月21日受理)

2000年初頭に登場した次世代シーケンサーは短いDNA断片を超高速で配列決定することで、多様な生物のドラフトゲノム解析を実現可能にした。次世代シーケンサーによるゲノム解析は、ゲノムを短いDNA断片状にした後に配列決定を行い、コンピューター上で整理・集積することで全ゲノム配列を決定する解析法(Whole Genome Sequencing)が広く実行され、2019年3月時点でゲノム解析数は昆虫だけで約1,200種のデータがNational Center for Biotechnology Informationに公開されている(Li *et al.* 2019)。公開された全ゲノムデータの質は種間差が大きく、シーケンスデータの指標であるコンティグサイズのN50が数kb程度から数Mbに相当するものまで幅広い。コンティグサイズは次世代シーケンサーの技術革新によって、シーケンスできる塩基数が約100 baseから100 kbに拡大され、現在は1回のシーケンスでMbレベルのコンティグデータも取得可能である。次世代シーケンサーの登場前から遺伝情報基盤の整備が進んでいたチョウ目昆虫は、次世代シーケンスデータと蓄積してきた遺伝情報を組み合わせることで非常に高品質な全ゲノム情報の発表が続いている(HELICONIUS GENOME CONSORTIUM, 2012; AHOLA *et al.* 2014; KAWAMOTO *et al.* 2019; HILL *et al.* 2019)。特に、モデ

ルチョウ類昆虫であるカイコ(*Bombyx mori*)は、2004年にドラフトゲノム情報が公開され(XIA *et al.* 2004; MITA *et al.* 2004)、2008年にBACやフォスミドの配列情報や遺伝子情報の追加(INTERNATIONAL SILKWORM GENOME CONSORTIUM, 2008)、2019年のリシーケンスにより696スキファールドのN50が16,796 kb、コンティグのN50が12,201 kbと充実したゲノム情報が発表された(KAWAMOTO *et al.* 2019)。

このようなゲノム情報は、それぞれの発表ステージに応じて全染色体の同定(YOSHIDO *et al.* 2005)、TALENやCRISPR-Cas9などのゲノム編集技術(TAKASU *et al.* 2013; WANG *et al.* 2013)、他の昆虫類とのゲノム比較など多くの研究基盤として利用されている。一方、充実したシーケンスデータには至っていない種も多い。特に、遺伝学の基盤情報が整備されていない昆虫類は、染色体とシーケンスデータとの対応付けが困難なため、染色体レベルに連結したゲノム情報を構築できない。断片的なゲノム情報では部分的なゲノム比較しか行えず、染色体レベルのゲノム比較から進化を考察することは不可能である。これは、カイコが属するチョウ類と姉妹系統関係にあるトビケラ類にも認められる。トビケラ類はドラフトゲノムが7種発表さ

*責任著者

〒020-8550 盛岡市上田3-18-8

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

れ、その内 3 種はコンティグの N50 が 1,297 kb (*Stenopsyche tienmushanensis*)、2,190 kb (*Hydropsyche tenuis*) および 869 kb (*Plectrocnemia conspersa*) と Mb レベルもしくはそれに近いシーケンスデータが発表された (Luo *et al.* 2018, HECKENHAUER *et al.* 2019)。これらのシーケンスデータを染色体に対応付けることができれば、チョウ類との染色体レベルにおけるゲノム比較も実現可能となる。特に、ヒゲナガカワトビケラ科の 1 種 *S. tienmushanensis* は、BAC ライブラリーを構築したヒゲナガカワトビケラ (*S. marmorata*) (FUJIMOTO *et al.* 2018) と同属別種の近縁種であり、各コンティグに対応する配列情報を獲得し、染色体へのマッピングが可能であると考えられる。

そこで、*S. tienmushanensis* のゲノムデータについてヒゲナガカワトビケラ染色体上へのオルソログマッピングを通じた染色体レベルのゲノムアセンブルを目指した。本研究では、*S. tienmushanensis* コンティグデータとヒゲナガカワトビケラの配列情報を対応付けるために、ヒゲナガカワトビケラ蛹个体から抽出した全 RNA を用いて RNAseq を行った。さらに、獲得した配列情報を用いてカイコ遺伝子と 1 対 1 対応のオルソログもしくは *S. tienmushanensis* コンティグデータに対応する配列を持つヒゲナガカワトビケラの BAC セレクションを行った。

材料と方法

1. 供試昆虫

2019 年 5 月に岩手県盛岡市の雫石川にて採集したヒゲナガカワトビケラ幼虫と蛹を使用した。

2. 染色体標本作製

TRAUT (1976) を一部改変して、ヒゲナガカワトビケラの終齢幼虫および蛹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を作製した。

3. 全 RNA 抽出

全 RNA はヒゲナガカワトビケラの雌蛹 1 個体の胸部を使用し、NucleoSpin® RNA (TaKaRa) のプロトコールに従って行った。

4. RNAseq

抽出した全 RNA は、北海道システム・サイエンス株式会社に依頼して、Illumina HiSeq による次世代シーケンス解析と Trinity による *de novo* アセンブルを行った。

5. BLAST 解析

獲得したヒゲナガカワトビケラ RNAseq データとカイコ gene model (SilkBase) は BmTOP (OHNO *et al.* 2020) による解析を行い、1 対 1 対応となる配列データの特定を行った。さらに、ヒゲナガカワトビケラ RNAseq データは、*S. tienmushanensis* コンティグデータに対して blastn 解析を行い、各コンティグに対応するヒゲナガカワトビケラ遺伝子配列を特定した。

6. BAC セレクション

カイコの gene model もしくは *S. tienmushanensis* コンティグデータに対応するヒゲナガカワトビケラの配列情報をもとに、プライマーを設計した。これらを用いて、ヒゲナガカワトビケラ BAC ライブラリー (FUJIMOTO *et al.* 2018) から標的配列を有する BAC を PCR セレクションした。PCR セレクションは、YOSHIDO *et al.* (2014) に記載の方法を一部

変更して行った。

7. FISH (Fluorescence *in situ* hybridization)

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 NucleoBond®uXtra Midi (TAKARA)で抽出したプラスミッド DNA を自作した nick translation kit で蛍光ラベル後、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、白黒 CCD カメラの DFC350FX (Leica)にて画像をデジタルデータとして保存後、Adobe photoshop CS6 にて画像の解析を行った。

結果と考察

北海道システム・サイエンス株式会社に依頼したヒゲナガカワトビケラの RNAseq 解析より、総コンティグ数 54,452、総コンティグ長 54.51 Mb の発現遺伝子配列情報を獲得した。カイコ遺伝子と 1 対 1 対応するオルソログの選抜に特化した BmTOP (OHNO *et al.* 2020)の解析によって、ヒゲナガカワトビケラオルソログ 1,395 個の特定に成功した。この値は、チョウ類において行った解析と大差がなく、チョウ類間のオルソログ解析に特化した BmTOP がトビケラ類においても利用できることを示している。BmTOP を使用することで、オルソログを効率的に獲得することができるため、より多くの候補から染色体比較に使うオルソログを選抜することが可能となると考えられる。

カイコ Z 染色体に対応する 34 オルソログを新規に特定し、その配列情報を基に設計したプライマーを用いて BAC セレクションを行った。新規に 12 BACs の獲得に成功し、2 BACs を FISH マッピングしたところ、ヒゲナガカワトビケラの Z 染色

体と常染色体に各々の BAC がマップされた。FUJIMOTO *et al.* (2018)で選抜された BAC 数が 1 だったカイコ第 2, 6, 14, 16 および 20 番染色体に対応する BAC も本解析で追加されたオルソログを用いてさらなる BAC 選抜をすることで、チョウ類とトビケラ類の詳細な染色体レベルのゲノム比較解析が実行可能となる。

ヒゲナガカワトビケラ RNAseq データをクエリーにした *S. tienmushanensis* コンティグデータとの blastn 解析によって、*S. tienmushanensis* の全 552 コンティグ中 519 コンティグに対応するヒゲナガカワトビケラの配列情報を獲得することに成功した。3つのコンティグデータは数 kb 以下の小さいコンティグデータだったため、発現遺伝子が含まれていない配列だった可能性がある。3つのコンティグ長の合計は 38.56 kb 相当であり、BAC ライブラリーから対応する BAC がすべてセレクションできた場合、*S. tienmushanensis* ゲノムサイズ 451.5 Mb 中 99.99%以上のゲノムデータをマッピング可能である。

BAC ライブラリーが構築され、N50 のコンティグサイズが Mb レベルに相当している生物は本研究と同様な手法をとることで、ドラフトゲノムの染色体マッピングを実現できる可能性がある。今後もドラフトゲノムの発表数はさらに増加し、1回のシーケンスから作製されるコンティグデータは数 Mb 規模に大きくなることが推測される。コンティグサイズが大きくなることで総コンティグ数は反比例して減少することから、BAC-FISH による染色体へのマッピングもより容易かつ効率的に実行可能となり、ゲノムアセンブルツールとして FISH マッピングが利活用される可能性は大いにある。

文 献

- AHOLA V. *et al.* (2014): Nature Comm, **5**: 4737
- FUJIMOTO T. *et al.* (2018): J. Insect Biotech. Seric, **87**: 61-69
- HECKENHAUER J. *et al.* (2019): Genome Biol. Evol, **11**(12): 3445-3451
- HELICONIUS GENOME CONSORTIUM (2012): Nature, **487**: 94-98
- HILL J. *et al.* (2019): Sci. Adv, **5**(6): eaau3648
- INTERNATIONAL SILKWORM GENOME CONSORTIUM (2008): Insect Biochem. Mol. Biol, **38**(12): 1036-1045
- KAWAMOTO M. *et al.* (2019): Insect Biochem. Mol. Biol, **107**: 53-62
- LI F. *et al.* (2019): Insect Mol. Biol, **28**(6): 739-758
- LUO S. *et al.* (2018): GigaScience, **7**: giy143
- MITA K. *et al.* (2004): DNA research, **11**(1): 27-35
- OHNO M. *et al.* (2020): J. Insect Biotech. Seric. **89**(1), 1-7.
- TAKASU Y. *et al.* (2013): PLoS ONE, **8**(9): e73458.
- TRAUT W. (1976): Chromosoma, **58**: 275-284
- WANG Y. *et al.* (2013): Cell Research, **23**(12): 1414-1416
- XIA Q. *et al.* (2004): Science, **306**(5703): 1937-1940
- YOSHIDO A. *et al.* (2005): Genetics, **170**(2): 675-685
- YOSHIDO A. *et al.* (2014): CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 219-256

改変 BmNPV ie1 プロモーター (SK16p) を用いたカイコ培養細胞 BmN におけるタンパク質高発現プラスミドベクターの構築

小島 桂^{1,2*}・伴戸 久徳^{1*}

¹北海道大学大学院農学研究科 応用生命科学科・²国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 新産業開拓研究領域

(2020年12月26日受理)

昆虫培養細胞を用いた外来遺伝子の発現系には、プラスミドベクターを用いたものおよび、組換えバキュロウイルスを用いたもの（バキュロベクター系）がある。

バキュロベクター系は、はじめに *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) の組換えウイルスを用いてインターフェロンβの発現が報告され (SMITH *et al.* 1983)、後に家蚕核多角体病ウイルス (*Bombyx mori* NPV: BmNPV) を用いたインターフェロンαのカイコ個体での発現が報告される (前田, 1985) に至り、これらのバキュロウイルスを利用した組換えタンパク質発現系は広く利用されるようになった。

バキュロベクター系は、ウイルスのポリヘドリンタンパク質遺伝子プロモーターなど、強力な発現活性を示す後期遺伝子プロモーターを利用する効率の良い発現系である。一方で、発現が一過性で、プロテアーゼなどのウイルス由来産物が外来タンパク質の発現自体や精製時に問題になること、糖タンパク質や分泌型および膜結合型タンパク質

は必ずしも効率的に発現できないこと等の欠点もある (HORIUCHI *et al.* 1987)。これらはウイルス感染による遺伝子発現や、細胞破壊によってもたらされるので、その克服は容易ではない。加えて、組換えウイルスの作製は煩雑な作業であることも否めない。

一方、プラスミドベクターを用いた発現系では、組換えウイルスベクターには無い、いくつかの優れた点がある。すなわち、プラスミドベクターの構築・増殖が容易で、ウイルスタンパク質のような余計なタンパク質の発現を伴わないこと、そして持続的発現系の構築にも利用できることなどである (JARVIS *et al.* 1990)。また、プラスミドベクターを用いた培養細胞での外来遺伝子発現系は、遺伝子組換え実験に当たらないという取り扱い上のメリットもある。しかし、プラスミドベクター系には、バキュロウイルスの爆発的な増殖に支えられる後期プロモーターに匹敵する強力なプロモーターが無く、プラスミドベクターを用いた外来遺伝子の発現効率は、バキュロベクター系と比較し

*責任著者

〒060-8589 札幌市北区北9条西9丁目 / 〒305-8634 つくば市大わし1-2
e-mail: hban@abs.agr.hokudai.ac.jp / kojikei@affrc.go.jp

て極めて低いことが知られている。プラスミドベクターを外来遺伝子の大量発現に利用するためには、バキュロウイルスの後期プロモーターに匹敵する高い転写活性を持つプロモーターの構築が大きな課題といえる。

単体で高い転写活性を持つことが知られているプロモーターにバキュロウイルスの *iel* 遺伝子プロモーターがある。本研究では、主に BmNPV の *iel* プロモーター配列 (BmNPV *iel*p) 直近に転写制御因子の結合配列やエンハンサー、そして mRNA の 5'末端非翻訳領域等を配置することでプロモーター活性の改善を試みた。また、ポリ (A) 付加領域についても検討を加え、カイコ卵巣由来培養細胞 BmN において高い外来遺伝子発現活性を持つプラスミドベクターを構築した。

材料と方法

1. pSK16Fb-Luc の構築

pIEp-Luc (KOHJIMA *et al.* 2001)は、ルシフェラーゼ発現ユニット (BmNPV *iel*p の制御下にルシフェラーゼ遺伝子 (*luc*) を置き、その下流に SV40 のポリ (A) 付加配列 (SV40 p (A)) を配置したものを pBluescriptII SK- (Agilent)に組み込んだルシフェ

ラーゼ発現プラスミドである。本研究では、pIEp-Luc における BmNPV *iel*p (以後 Bmie1p) の内部、および 5'側と 3'側に様々な改変 (以下に示す 1-1-1.~1-1-4.) を施すと同時に、SV40p (A) をカイコ Fibroin H 鎖遺伝子のポリ (A) 付加シグナル配列 (FibHp (A)) (1-2.) に置換したものを pSK16Fb-Luc とした。pIEp-Luc および最終産物である pSK16Fb-Luc の構造を、図 1 に示した。

1-1. 改変 Bmie1p (SK16p) の作製

SK16p は、Bmie1p の 5' 側に [*iel*-cis activation-region (ICR)]を 2 コピー付加し、さらに 3'側に[IFV-5'末端非翻訳領域 (IFV 5'UTR) (逆向き)]と[ショウジョウバエ *hsp70* 遺伝子 5'末端非コード領域 (*hsp70* 5'NCR)]を配置したものであり、Bmie1p 内部及び IFV 5'UTR にはそれぞれ 5 および 3 カ所の点変異が導入されている (図 2)。ここで用いた挿入配列は以下のように作製した。

1-1-1. ICR 配列: pIEp-Luc を鋳型として、プライマー (5'-GGGGAGATCTTCGACCTCAGATTAATA-3', 5'-GGGGGATCCGCCGACATACAATGTTA-3') を用いて増幅し、*Bgl* II 及び *Bam* HI (ともにプライマー下線部分) で切断した断片 (82 bp) を ICR 配

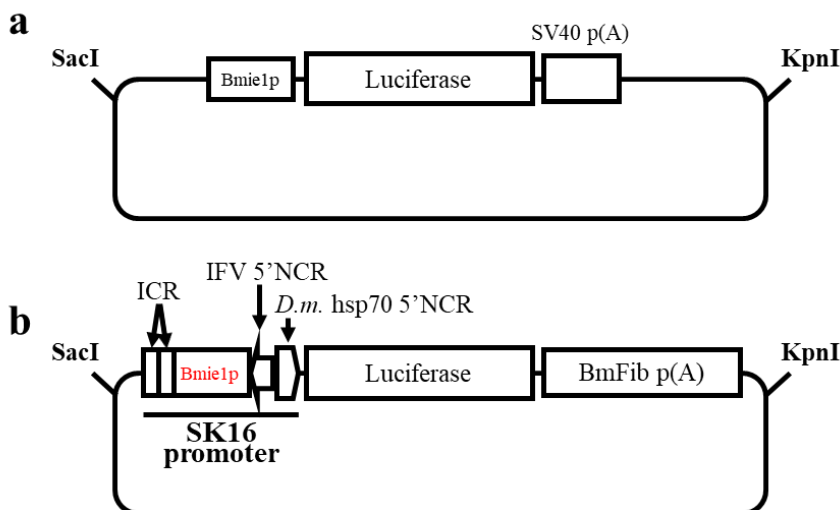


図 1. pIEp-Luc と pSK16Fb-Luc の構造
(a) pIEp-Luc, (b) pSK16Fb-Luc (SK16 プロモーターに含まれる Bmie1p (赤字) は pIEp-Luc の Bmie1p に複数の変異を導入したものである。本文参照)

列とした。

1-1-2. 変異導入 Bmie1p: pGEM-IE1 (MATSUYAMA *et al.* 2003) をテンプレートとし、プライマー (5'-TAGATCTGATGTCTTTGTGATG-3' ならびに 5'-TAAGCTTATCGTGTGCGCCGCAATGTC-3') で増幅し、*Bgl* II, *Hinc* II で切り出した 565 bp の Bmie1p 配列 (GBID L33180.1 nt. 116395-116955) を得た。なお、SK16p においては、プライマー (5'-CATtgGgcccTATAAATTGACG-3' ならびに 5'-TTATAggcgCCcAATGGCGAAC-3') を用いた PCR により変異導入することで、Bmie1p の TATA-box 上流に TFIIB 結合機能を有することが報告されている BRE (SMALE and KADONAGA, 2003) のコンセンサス配列 (SSRCGCC) を導入 (プライマー内下線部、小文字は変異塩基) したものを変異導入 Bmie1p 配列とした (図2 緑領域内の小文字)。

1-1-3. IFV 5'UTR 配列: IFV ゲノムの 5'非翻訳領域配列を含むプラスミド pie5'NLUC (伊澤, 1998) を鋳型として、プライマー (5'-CTGCAGCTTTGTgTGCAAAAGCTC-3' ならびに 5'-GGGCCCTCAgATGATAAACC-3') を用いて 2 カ所の点変異 (プライマー内小文字) を導入した IFV 5'UTR 配列を増幅し、Bmie1p 下流に挿入した。さらに、プライマー (5'-GGTCACACACAAGAAAGCTCAGG-3') を用いた *in vitro* mutagenesis 法 (Alterd SitesII *in vitro* mutagenesis System, Promega) によって 1 塩基の変異を導入したのち、プライマーの下線部を *Pst* I および *Apa* I で切断後、末端平滑化した 156 bp のもの (GBID AB000906.1 nt. 1-156, 3 カ所の点変異有) を IFV 5'UTR 配列とした。

1-1-4. hsp70 5'NCR 配列: ショウジョウバエ由来培養細胞 S2 から抽出したゲノム DNA を鋳型として、5'-TCTAGAATCCCAAACAAACTGG-3' および 5'-AAGCTTTGTGTGTGAGTTCTTCTTTCTCGG-3' プライマーを用いて PCR で増幅した hsp70 プロモーター配列を pGEM-t ベクターにクローニングしたのち、*Pst* I (プロモーター内のイニシエーター下流) および *Eco* RI (ベクター内) で切断した断片 (GBID AE014297.3 nt. 12505882-12506034) を hsp70 5'NCR 配列とした。

1-2. FibHp (A) 配列

カイコ養細胞 BmN から抽出したゲノム DNA を鋳型として、プライマー (5'-GTCGACTGCCTTGTGTGAATaGCTAAT-3', 5'-GGTACCCTATACACGACGTAGACGTATAG-3') を用いて増幅し、pGEM-t ベクターにクローニングした (GBID DQ459409.1 nt. 107-1585)。内部にある *Hind* III で切断・末端平滑化の後セルフライゲーションにより同制限酵素サイトを欠失したのち、*Sal* I, *Kpn* I (ともにプライマー内下線部) で切断したものを FibHp (A) 配列とした。

2. トランスフェクション

培養細胞へのプラスミド DNA のトランスフェクションは、LIPOFECT AMINE™ REAGENT (GIBCO BRL) を用いたリポフェクション法によって行った (KOJIMA *et al.* 2001; 2007)。すなわち、あらかじめ 6-well プレートに播いた BmN 細胞 (1×10^6 cells/well) を一晩培養した。これを、抗生物質および牛胎児血清 (FBS) を含まない TC-100 (GIBCO BRL: 以下 TC-100 とする) で 3 回洗浄した後 800 μ l の TC-100 を加えた。これとは別に精製プラスミド DNA 2 μ g を含む 100 μ l の TC-100 と、

あらかじめ 100 μ l の TC-100 で懸濁しておいた LIPOFECT AMINE™ REAGENT 10 μ l とを混合したものを 30 分間室温に放置した後、先に用意した培養細胞の培養液に加えた。これを 26 $^{\circ}$ C で 16 時間培養した後、培養液を抗生物質および FBS を含む TC-100 に交換した。なお、トランスフェクションに用いたプラスミド DNA は QIAGEN Plasmid Midi KIT (QIAGEN) を用いて精製した。

3. ルシフェラーゼ (Luc) 活性の測定

トランスフェクション後、24~72 時間培養した BmN 細胞を PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 5.3 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄) で 3 回洗浄し、200 μ l の Passive Lysis Buffer (Promega) を加え 10 分間室温に放置することで細胞を溶解した。この細胞溶解液を回収し、15,000 rpm, 1 分, 遠心分離した上清 4 μ l にルシフェリン溶液 (Promega) 40 μ l を加え、10 秒間の発光量をルミノメーター (Lumat LB9501, Berthold) を用いて、Relative Light Unit

(RLU) として出力される Luc 活性を測定した。

結果と考察

SK16p の作製過程で付加あるいは変更した各機能配列 (材料と方法、1-1-1.~1-1-4., 2.) の効果について、BmN 細胞におけるルシフェラーゼ遺伝子発現に及ぼす影響を指標として調査した結果は以下のとおりである。

IFV 5'UTR の利用及び点変異導入: 家蚕伝染性軟化病ウイルス (IFV) の 5'末端非翻訳領域 (5'UTR) にプロモーターの活性化能があることが示唆されていた (未発表) ため、IFV 5'UTR を Bmie1p の下流に結合したレポータープラスミドを構築した。その結果、IFV 5'UTR を本来の方向に組み込んだ場合にはルシフェラーゼの発現活性が約 4 倍に、また、逆向きに結合した場合には約 13 倍に上昇した。この現象のメカニズムについては不明である



図 2. SK16 プロモーターの配列

赤: ICR, 緑: Bmie1p, 青: IFV 5'UTR (逆向き), 黄: ショウジョウバエ hsp70 5'NCR, ボックス外小文字: 構築に用いた制限酵素サイト, ボックス内小文字: 変異導入配列, 黒四角: BRE, 赤四角: TATA-box およびイニシエーター, 黒丸: DPE-like 配列

が、正逆何れの向きに接続した場合でも IFV-5'UTR 内からの新規 mRNA 転写の昂進が認められた。さらに、IFV-5'UTR を逆向きに接続した場合には、DPE (downstream promoter element: G (+24) NNNRGWYGT (+33) (KUTACH and KADONAGA, 2000)) 様の配列 (G (+24) CTCGtACaa (+33) , 大文字は共通した塩基, 図 2 黒円) が転写開始点から約 30 bp 下流の適切な位置に生じることから、この DPE 様配列が転写活性の上昇に関与している可能性が考えられた。

また、IFV 5'UTR を逆向きに結合した場合には、その両末端にそれぞれ 1 カ所ずつ“ATG”配列が出現する。目的とするルシフェラーゼ遺伝子の翻訳を阻害してしまう可能性が高いのでこれらを別の配列に変えたところルシフェラーゼ活性がさらに 2 倍程度上昇した。最も高い活性を示した配列は、2 カ所の“ATG”をそれぞれ“GTG”および“CTG”に変換した配列 (図 2 小文字) であった。また、同配列内にはポリ (A) 付加モチーフ“AATAAA-N (10-30) -CA” (ZHAO *et al.* 1999) も存在していた。この配列で転写終結してしまう可能性を考慮して、この“AATAAA”についても“AAgAAA”に変換したところ (図 2 小文字) ルシフェラーゼ発現量は変異導入前の約 1.3 倍に増加した。このように、これら ATG と AATAAA への変異導入効果は予想外に低かった。この点については、2 カ所の ATG 配列が効率的な翻訳開始に必要なコザック配列 (Rcc-ATG-G (KOZAK, 1984)) から外れていたことおよび、“AATAAA”上流に T/TG リッチ配列 (ZHAO *et al.* 1999) が不十分で、もともと阻害効果が大きくなかったためと考えられる。

hsp70 5'NCR の利用: キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の *hsp70* 遺伝子プロモ

ーターは高い外来遺伝子発現活性をもっており、昆虫培養細胞における外来遺伝子の発現に広く用いられている。その高い転写活性を担う配列は、転写開始点下流の 5'末端非コード領域 (5'NCR) に存在する (未発表)。そこで、改変プロモーターの IFV 5'UTR 下流に *hsp70* 5'NCR 領域を結合したところ、ルシフェラーゼ発現量が約 1.4 倍に増加した。mRNA の 5'末端非翻訳領域の配列が、翻訳を活性化 (PESTOVA *et al.* 2001) や mRNA の安定化に寄与することが知られている (FARGO *et al.* 2000; GUHANIYOGI and BREWER, 2001)。本実験結果は、キイロショウジョウバエ *hsp70* 5'NCR が、カイコ培養細胞というヘテロな環境でも mRNA の翻訳あるいは安定性に寄与する可能性を示唆している。

コアプロモーター領域の改変: 転写開始複合体が結合するコアプロモーターは、TATA-box、イニシエーター、DPE および BRE (TFIIB recognition element) がその要素として知られており (SMALE *et al.* 2003)、昆虫においても保存されている (PUGH and TJIAN, 1992; BURLEY and ROEDER, 1996; BURKE and TJIAN, 1997)。Bmie1p は昆虫におけるコンセンサス配列に完全に一致する TATA-box (5'-TATAAAT-3') およびイニシエーター (5'-TCA₍₊₁₎ GTT-3') を持つプロモーターであるが (図 2 赤四角)、DPE や BRE はもともと含まれていない。しかし、DPE については既に述べたように、逆向きの IFV 5' UTR の導入により結果的に DPE-like 配列を付与することとなった。そこで、BRE についても PCR 法で新たに Bmie1p の TATA-box の 5' 側に BRE のコンセンサス配列 (SSRCGCC-TATA-box) を変異導入したところ、ルシフェラーゼ活性が約 1.4 培に上昇した。

これらの結果は、クラス II プロモーターのコア

プロモーターの構成要素となる TATA-box、イニシエーター、DPE ならびに BRE が独立に機能することを示唆しており、これらの要素別に改変を加えることで、コアプロモーターの活性を操作できることが示された。

ICR の利用: Bmie1p 内部の転写開始点から上流 160~170 bp に見出された領域は、Bmie1p から除かれることでプロモーター活性が約 1/6 に低下する (KOJIMA *et al.* 2007)。本配列には知られている転写制御因子の結合配列は認められず、そのメカニズムは不明であるが、この領域を含む配列を ielp cis-activation region (ICR) として、Bmie1p 上流に複数結合することで、プロモーター活性の向上を試みた。ICR 断片 1 もしくは 2 コピーをプロモーターの上流に結合した結果、それぞれルシフェラーゼ発現量が 1.11 倍、及び 1.54 倍に増加し、エンハンサーとして機能することが示唆された。ICR を 3 コピー以上結合することでさらなる活性上昇が期待されたが、そのようなコンストラクトは得られなかった。

ポリ (A) 付加シグナルの最適化: プロモーター自体の改変ではないが、転写終結の効率も mRNA の合成活性には重要である。そこで、転写終結に関するポリ (A) 付加シグナル領域を変更することでさらに外来遺伝子の発現活性を高めることを試みた。大量の mRNA を合成する遺伝子として、シヨウジョウバエ *hsp70* 遺伝子 (Dm*hsp70*) と、カイコフィブロイン H 鎖遺伝子 (Bm*FibH*) のポリ (A) 付加シグナル領域を検討した。その結果、これまで用いてきた SV40 p (A) に比べて、Dm*hsp70* p (A) では約 5 倍に、Bm*FibH* p (A) を用いた場合では、約 10 倍にルシフェラーゼ活性が

上昇した。いずれも高い効果を得たが、カイコ培養細胞系にはカイコ由来のシグナル配列の利用がより効果的だったと考えられる。

これらの結果を踏まえて構築したものがルシフェラーゼ発現プラスミド pSK16Fb-Luc (図 1) である。そこで、BmN 細胞におけるルシフェラーゼの発現量について pSK16Fb-Luc と改変を加える前の pIEp-Luc とを比較した。BmN 細胞に各プラスミドをトランスフェクション後 72 時間においてルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、1 細胞あたりのルシフェラーゼ活性は、pIEp-Luc が約 1,600 RLU であったのに対し、pSK16Fb-Luc では約 155,000 RLU に達し、その改変効果は約 97 倍となった (図 3)。ただ、上記のそれぞれ個別の改変で認められた効果が相乗的に得られた場合の改変効果の期待値は、約 1380 倍であることから、改変効果は極めて限定的ではあったと言える。改変の効果が限定的であった原因として、本研究で利用した挿入配列の組み合わせにおいて、プロモーター活性に対する何らかの負の相互作用が生じた可能性やルシフェラーゼタンパク質の急激な細胞内蓄積による細胞障害などが考えられるが、詳細は不明である。

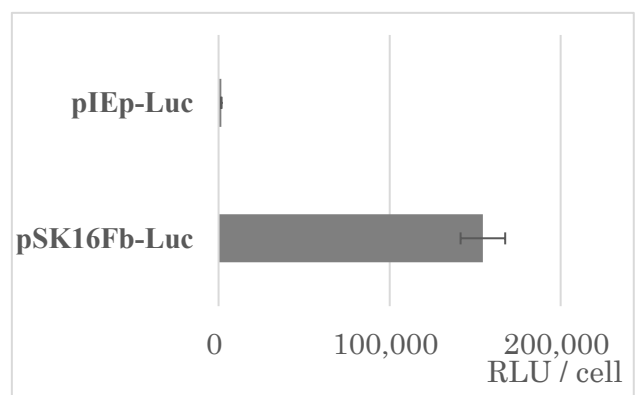


図 3. pIEp-Luc 及び pSK16Fb-Luc のルシフェラーゼ発現効率 (平均値と±SD) RLU: Relative Luciferase Unit

今後、本研究で Bmie1p の改変に用いた各配列のルシフェラーゼ発現促進効果に関わる分子メカニズムを明らかにすることで、さらに強力なプロモーターの設計指針構築に繋げることが可能であると考えられる。

要 約

組換えタンパク質高発現プラスミドベクター構築を目的として、様々な機能配列および点変異が BmNPV の *iel* 遺伝子プロモーター (Bmie1p) の活性に及ぼす影響を、ルシフェラーゼ遺伝子の発現を指標として調査するとともに、発現ユニットに組み込むポリ (A) 付加配列の最適化を試みた。それらの結果を統合してルシフェラーゼ発現プラスミドベクター pSK16Fb-Luc を構築したところ、BmN 細胞における Luc 発現量は、改変前のルシフェラーゼ発現プラスミド (pIEp-Luc) の約 100 倍であった。以上の結果は、多様な機能配列の外来遺伝子発現に及ぼす影響とその分子メカニズムを深く理解することで、さらに強力な外来遺伝子発現プラスミドベクターの構築が可能であることを示唆している。

Summary

The effects of various functional sequences and point mutations on a BmNPV *iel* promoter (Bmie1p) activity were investigated using a luciferase gene as an indicator. Integrating these results, the luciferase expression plasmid pSK16Fb-Luc was constructed. The luciferase activity of the pSK16Fb-Luc in BmN cells was about 100 times higher than that of the original expression plasmid, pIEp-Luc. These results imply the

possibility for further improvement of the plasmid vector system through deep insight into the functions of various cis-regulating elements.

文 献

- SMITH G.E. *et al.* (1983): *Mol. Cell. Biol.*, **3**(12): 2156-2165
- 前田 進 (1985): *細胞工学*, **4**: 767-780
- HORIUCHI T. *et al.* (1987): *Agr. Biol. Chem. Tokyo*, **51**(6): 1573-1580.
- JARVIS D.L. *et al.* (1990): *Bio-Technol.*, **8**(10) 950-955
- KOJIMA K. *et al.* (2001): *Arch. Virol.*, **146**(7): 1407-1414
- MATSUYAMA T. *et al.* (2003): *J. Insect Biotech. Sericol.*, **72**(2): 87-94
- SMALE S.T. and KADONAGA J.T. (2003): *Annu. Rev. Biochem.*, **72**: 449-479
- 伊澤 晴彦 (1998): 北海道大学大学院農学研究科 博士論文
- KOJIMA K. *et al.* (2007): *Virus Res.*, **130**(1-2): 202-209
- KUTACH A.K. and KADONAGA J.T. (2000): *Mol. Cell. Biol.*, **20**(13): 4754-4764
- ZHAO J. *et al.* (1999): *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**(2): 405-445
- KOZAK M. (1984): *Nature*, **308**(5956): 241-246
- PESTOVA T.V. *et al.* (2001): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**(13): 7029-7036
- FARGO D.C. *et al.* (2000): *Mol. Gen. Genet.*, **264**(3): 291-299
- GUHANIYOGI J. and BREWER G. (2001): *Gene*, **265**(1-2): 11-23
- BURLEY S.K. and ROEDER R.G. (1996): *Annu. Rev. Biochem.*, **65**: 769-799

PUGH B.F. and TJIAN R. (1992): J. Biol. Chem, **267**(2):
679-682

Burke T. W. and KADONAGA J.T. (1997): Genes Dev,
11(22): 3020-303

日本蚕糸学会東北支部 役員

(任期 2021 年 1 月 1 日～2022 年 12 月 31 日)

支部長

佐原 健 (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)

浅野 真一郎 (一般社団法人日本蚕糸学会東北選挙区選出代議員)

委員 (編集担当)

金児 雄 (一般社団法人日本蚕糸学会東北選挙区選出代議員)

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2年12月28日
発行	令和2年12月28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

