

東北蚕糸・昆虫利用研究報告

第 47 号

令和 4 年 12 月

日本蚕糸学会東北支部

No.47 目 次

竹内 悠真 船木 颯斗 佐原 健	盛岡市のキタキチョウにおけるボルバキア感染 1
依田 直哉 藤本 章晃 佐原 健	18S rDNA を含むオオモンシロチョウ BAC クロームの発見と利用 7
小杉 海斗 金児 雄	幼虫マスター遺伝子候補 <i>Chinmo</i> のカイコにおける発現解析 11

盛岡市のキタキチョウにおけるボルバキア感染

竹内 悠真・船木 颯斗・佐原 健*
岩手大学農学部

(2022年12月7日受理)

キタキチョウ (*Eurema mandarina*) は北海道と北東北の一部を除き、日本全土に分布するシロチョウ科の一種である。キタキチョウはかつて、ミナミキチョウ (*E. hecabe*) と同一種と考えられてきたが、現在は別種との見解が受け入れられつつある (KATO, 2000; 加藤・矢田, 2005)。この分類に従えば、ミナミキチョウは奄美大島以南に分布する個体群に限られる。キタキチョウの食草は、ハギ属やネムノキ (*Albizia julibrissin*) が知られている (BANNO, 1984)。北東北における我々の観察では、メドハギ (*Lespedeza juncea*) とヤマハギ (*L. bicolor*) で産卵行動や産下卵、幼虫、蛹の存在が認められた。また、ヤハズソウ (*L. striata*) に対する産卵行動も確認された。一方、ネムノキでの産卵行動や食草としている観察例は今のところない。キタキチョウは、多化性で秋型成虫が越冬する (矢田, 1974)。盛岡市では、越冬成虫の飛翔は通常、翌年の5月頃から確認される。

ボルバキアは主に節足動物を宿主とし、原則、垂直伝搬する細胞内共生細菌である。宿主に対して細胞質不和合、雄殺し、雌化、産雌性単為生殖といった生殖操作を行う (WERREN *et al.* 2008)。細胞質不和合は、最も良く見られる生殖操作であり、非感染雌と感染雄の交配における次世代産生が妨げられる。よって感染雌の適

応度が非感染雌に比べて増加する (WERREN, 1997) とともに、感染個体のミトコンドリアは均質化されていく (RAYCHOUDHURY *et al.*, 2010)。

キタキチョウにおけるボルバキア感染は、細胞質不和合を引き起こす wCI ならびに子が全て雌になる wFem の2種類が知られている (HIROKI *et al.* 2002; 2004)。wCI 感染は広く認められるが、wFem 感染は種子島や沖縄本島の一部に限られ、wCI と共感染している (HIROKI *et al.* 2005; NARITA *et al.* 2006; 2007a)。ミナミキチョウもキタキチョウと同系統のボルバキアに感染している (NARITA *et al.* 2011)。核遺伝子配列に基づいて作成された分子系統樹において、ミナミキチョウとキタキチョウそれぞれ別々のクレードに分岐するが、ミトコンドリア遺伝子配列に基づいて作成すると、ボルバキア感染と非感染とに分岐する (NARITA *et al.* 2006; MIYATA *et al.* 2017; 2020)。これらのことから、キタキチョウにおけるボルバキアの感染由来は、ミナミキチョウからの異種間浸透 (もしくは亜種間浸透) であることが強く示唆される (NARITA *et al.* 2006; MIYATA *et al.* 2020)。

1997年から2000年の調査ではwCI感染キタキチョウ個体群の分布北限は北関東であった (HIROKI *et al.* 2005)。2006年の調査では、対馬を除く、本邦南部から盛岡市までの調査地点

*責任著者

〒020-8550 盛岡市上田 3-18-8

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

全ての個体群が wCI に感染しており (NARITA *et al.* 2007b)、wCI 感染個体の分布が急速拡大し、全国の個体群に浸透したと考えられていた。ところが、2017 年に盛岡市と雫石町で各 1 頭の非感染キタキチョウ個体が確認された(佐々木, 未発表)。また、2020 年には非感染個体群が北東北に分布しているとの総説が発表された (MIYATA *et al.* 2020)。この総説にデータは示されていないものの、現在の北東北地域にボルバキア非感染キタキチョウ個体が分布する可能性は強く示唆される。

そこで本研究では、2021 年と 2022 年に盛岡市内の数地点でキタキチョウを採集し、ボルバキア感染状況を調査した。さらに、昨年度報告した、判別用プライマー (竹内・佐原, 2021) を用いて、感染個体と非感染個体におけるミトコンドリアの由来の特定を試みた。

材料と方法

1. サンプルング

キタキチョウの採集地の位置関係は図 1 に、詳細な採集地情報、採集日などは表 1 (2021 年) および表 2 (2022 年) に示した。



図 1 サンプルング地の地形図 A~H は採集地を示す。A・B・E・F は道路沿いであり、C・D・G・H は雫石川水系河川敷である。電子国土 Web (国土地理院) を加工して作成。

2. DNA 抽出

キタキチョウの脚 2 本と $\Phi 1.5$ mm のビーズ 6 個を 100 μ l STE buffer とともに 1.5 ml チューブに入れ、ビーズクラッシャー (BEADS CRUSHER, TAITEC) を用いて破碎した。破碎後、20 mg/ml の Proteinase K (Promega) を 2 μ l 加え、50°C 30 分、92°C 5 分の熱処理を施した。15,000 rpm にて 5 分間遠心して組織を沈殿させ、上清を DNA 抽出液として PCR テンプレートに用いた。

3. ボルバキア検出

PCR によりボルバキア感染の判定を行った。プライマーは、

wsp81F: AAAAATTAACGCTACTCCA

wsp691R: TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC

を用いた (ZHOU *et al.* 1998)。PCR 条件は 94°C 2 分処理の後、94°C 30 秒、53°C 30 秒、72°C 30 秒を 35 回繰り返し、72°C 5 分で伸長を完了させた。2%アガロースゲル電気泳動により PCR 産物増幅の有無とサイズ確認を行った。

4. ミナミキチョウ型ミトコンドリアの検出

結果と考察

竹内・佐原 (2021) の方法に従い、PCR により検出した。ミナミキチョウ型 ND5 領域を特異的に増幅する以下のプライマーを用いた。

EmND5_F1: TTAATAAGATTAATTTTCGGG

ND5P_R1: ATTAATAACCCAAAC

PCR 条件は 94°C 2 分処理の後、94°C 30 秒、47°C 1 分、72°C 30 秒を 40 回繰り返す、72°C 5 分で伸長を完了させた。2%アガロースゲル電気泳動により PCR 産物増幅の有無とサイズ確認を行った。

1. サンプリング

2021 年と 2022 年に 8 カ所 52 回のサンプリングを行った (表 1, 2)。このうち採集できたのは 18 回である。サンプリング数が 10 頭未満の地点は発見したキタキチョウ全てを採集しており、サンプル数が 10 以上の地点では、必ずしも発見した全ての個体を採集していない。

採集地 A、B、E、F の採集地は道路沿いであ

表 1. 2021 年採集データおよびボルバキア感染率

採集地名	採集地点	採集日	採集個体数	感染率 (%)	食草*
A 浅岸鍋倉	39° 44'30"N 141° 16'10"E	5月6日	1	0	No
B 上田小野松	39° 46'15"N 141° 10'02"E	8月3日	8	25.0	Lj+Lb
		9月7日	0	-	
		5月4日	0	-	
C 上太田上川原	39° 42'03"N 141° 05'11"E	5月6日	0	-	Ls
		5月13日	0	-	
		8月3日	1	100.0	
D 上厨川川原	39° 42'11"N 141° 05'33"E	9月7日	6	100.0	Lj+Ls+Aj
		5月4日	0	-	
		5月6日	0	-	
E 上米内明通	39° 45'49"N 141° 12'14"E	5月13日	0	-	Lj+Lb+Aj
		8月3日	11	0	
		9月7日	15	13.3	
F 新庄上八木田	39° 41'35"N 141° 13'33"E	7月22日	1	100.0	No
		5月4日	0	-	
		5月6日	0	-	
G 中太田新田	39° 42'08"N 141° 07'20"E	5月13日	0	-	Lj+Ls
		8月3日	0	-	
		9月7日	3	66.7	
		5月4日	0	-	
H 中川町	39° 42'08"N 141° 07'33"E	5月6日	0	-	Lj
		5月13日	0	-	
		8月3日	0	-	
		9月7日	0	-	

* 食草なしはNo、メドハギはLj、ヤマハギはLb、ヤハズソウはLs、ネムノキはAjと表記

る(図1)。食草について表1と表2に示した。採集地AとFに食草は確認できなかった。Bで確認された食草は数株のヤマハギとわずかなメドハギ、Eでは大量のヤマハギ、大量のメドハギ、数本のネムノキであった。採集地C、D、G、Hは雫石川水系河川敷である。Cではヤハズソウ、Dではわずかなメドハギ、ヤハズソウ、数本のネムノキがあり、Gではわずかなメドハギとヤハズソウ、Hでは大量のメドハギが確認された。

2021年のサンプリングで、5月に越冬個体を採集できたのがA、7月～9月に夏型個体を採集できたのはB～Gである(表1)。2022年は、

AとFを除くの6地点で行った。5月に越冬個体を採集できたのはE、7～9月に夏型個体を採集できたのはEとG、10月に秋型を採集出来たのはEである(表2)。なお、越冬個体を除く秋型個体のサンプリングはEでのみ行ったが、10月には盛岡市の至る所で秋型個体が散見された。

雫石川水系河川敷(C、D、G、H)およびBにおいて、2021年には少数個体を採集できたものの、2022年には、雫石川水系河川敷での1個体のみとなった。一方Eでは、2021年と2022年ともに安定して採集できた。この差が生まれる理由は、採集地の食草分布の違いに関する

表2. 2022年採集データおよびボルバキア感染率

採集地名	採集地点	採集日	採集個体数	感染率 (%)	食草*
B 上田小野松	39° 46'15"N 141° 10'02"E	5月10日	0	-	Lj+Lb
		8月25日	0	-	
C 上太田上川原	39° 42'03"N 141° 05'11"E	5月10日	0	-	Ls
		5月18日	0	-	
		7月1日	0	-	
D 上厨川川原	39° 42'11"N 141° 05'33"E	8月25日	0	-	Lj+Ls+Aj
		9月12日	0	-	
		5月10日	1	0	
		5月18日	2	50.0	
E 上米内明通	39° 45'49"N 141° 12'14"E	7月1日	5	60.0	Lj+Lb+Aj
		8月17日	10	30.0	
		9月9日	7	14.3	
		9月15日	3	0	
		10月14日	10	50.0	
G 中太田新田	39° 42'08"N 141° 07'20"E	5月10日	0	-	Lj+Ls
		5月18日	0	-	
		7月1日	0	-	
H 中川町	39° 42'08"N 141° 07'33"E	8月25日	1	0	Lj
		5月10日	0	-	
		5月18日	0	-	
		7月1日	0	-	
		8月25日	0	-	

* メドハギはLj、ヤマハギはLb、ヤハズソウはLs、ネムノキはAjと表記

可能性がある（表 1, 2）。盛岡において 5 月に芽吹く食草はヤマハギのみである。雫石川水系河川敷には 5 月に芽吹くヤマハギが存在しない（表 1, 2）ため、越冬世代は産卵することが出来ない。雫石川水系河川敷での採集個体は他所から飛来したか、飛来した個体の次世代である蓋然性が高い。つまり、採集年や採集日によってキタキチョウの存在確率は大きな差が生じてしまうと考えられる。一方、E ではヤマハギが大量に生育しているため越冬世代から繁殖でき、キタキチョウ個体群が定着できる環境がある。B にもヤマハギは存在しているが、数株であり、キタキチョウが産卵する可能性は高くないため、年により採集個体数に変動があったと考えられる（表 1, 2）。雫石川水系河川敷や、食草の存在しない A と F でもキタキチョウが採集されたことから、キタキチョウは食草集落を離れて移動することがあると推定される。

盛岡市での主な食草は、ヤマハギとメドハギであると考えられる。ヤハズソウでの産卵行動確認は 2 度止まりで、ネムノキでは確認できない。ヤハズソウは道路脇や荒れ地、河川敷に群生するが、キタキチョウの個体数はヤハズソウ群生地でも多くないため、BANNO (1984) の報告通り、北東北においても主な食草ではない可能性が高い。また、5 月には芽吹かず、越冬個体の産卵植物にもなりえない。しかし、北東北地域では、キタキチョウの世代を超えた移動の経路地として利用される可能性を否定はしない。

2. ボルバキア感染率とミトコンドリア型

2021 年の感染率について、採集数の少なかった採集地 C、D、F で 100 %となっている採

集地が存在した。一方、採集地 D では、4 個体中 2 個体が非感染、G では 3 個体中 1 個体が非感染の採集日も認められた。なお、A で採集された 1 越冬個体は非感染であった。これらに対し、キタキチョウ個体群が大きく、11 および 15 個体と採集数の多かった E の感染率は、8 月に 0 %、9 月に 13.3 %となった。

2022 年の感染率は、G で 0 %だが、採集できたのは 8 月 25 日の 1 個体のみであった。採集個体数の多かった E では、感染率は 0 %～60 %で推移している。これらのことから、現在の盛岡市のボルバキア感染率は 100 %ではないことが判明した。

雫石川水系河川敷と E でのボルバキア感染率を比較すると大きな差が生じていた。2021 年の雫石川水系河川敷では 8 月に 60 %、9 月に約 92.3 %である。一方、E では 8 月に 0 %、9 月に約 13.3 %である。この差も採集地の食草と飛来により説明できる。越冬世代が産卵できない場所では飛来とその子孫によってのみキタキチョウ個体が存在する。よって、感染個体が飛来・侵入すると感染個体群になる可能性が、非感染個体の場合は非感染個体群となる可能性が高い。2022 年の採集では、雫石川水系河川敷での採集個体が非感染の 1 個体と極めて少ないことも、これらの場所においては移入によってのみキタキチョウ個体が存在する可能性を強く示唆する。一方、E では、採集個体数にばらつきはあるものの、必ず採集でき、越冬集団の存在が推測できる。感染率は、採集月により 10～60 %とばらつきがあった。以上のことから、雫石川水系河川敷での採集個体は、単年性の移入集団であると考えられる。

2017 年に盛岡市で発見された非感染個体（佐々木、未発表）の採集地は、C の雫石川水系河川敷であったことから、移入個体を採集

した場合には、採集年により感染率が大きく異なるとの推測は成り立つ。2006年の盛岡市での採集 (NARITA *et al.* 2007b) は、移入集団を採集した可能性が考えられる。2006年に飛来した個体のほとんどが感染個体であったなら、感染率が100%になったとしても矛盾はない。もしかすると、盛岡市周辺のボルバキア感染キタキチョウ個体分布は、2006年から100%ではなかったのかもしれない。

サンプリング個体のミトコンドリア型を調べたところ感染個体は全て、目的サイズ (134 bp) 付近にPCR産物が検出されるミナミキチヨウ型であり、非感染個体では検出されなかった。このことから、盛岡で採集された非感染個体は、非感染系統であると推定した。つまり、何らかの要因でボルバキアが排除されることにより非感染となった個体を採集したのではない。

盛岡市内には、ボルバキア感染を経験したことのない非感染個体と感染個体が混在して分布すると考えられる。これは、過去のボルバキア感染キタキチョウの分布拡大の速度を考えると感染個体の分布拡大に何らかの抑制がかかっていると考えざるを得ない。抑制要因とそのメカニズムを解明するためにも、今後、さらに北東北の広い範囲でのキタキチョウ採集とボルバキア感染の有無について調査を続ける必要がある。また、広範囲での非感染個体のミトコンドリアタイプの診断も重要である。

文 献

- BANNO H. (1984): *Tyô to Ga*, **35**: 80–90
- HIROKI M. *et al.* (2002): *Naturwissenschaften*, **89**: 167–170
- HIROKI M. *et al.* (2004): *Proc. R. Soc. Lond. B*, **271**: 1751–1755
- HIROKI M. *et al.* (2005): *Evol. Ecol. Res*, **7**: 931–942
- KATO Y. (2000): *Zool. Sci*, **17**: 539–547
- 加藤 義臣・矢田 修 (2005): *蝶と蛾*, **56**: 171–183
- MIYATA M. *et al.* (2017): *Biol. Letters*, **13**: 20170153
- MIYATA M. *et al.* (2020): *Ecol. Evol*, **10**: 8323–8330
- NARITA S. *et al.* (2006): *Mol. Ecol*, **15**: 1095–1108
- NARITA S. *et al.* (2007a): *Appl. Environ. Microbiol*, **73**: 4332–4341
- NARITA S. *et al.* (2007b): *Genome*, **50**: 365–372
- NARITA S. *et al.* (2011): *Ecol. Entomol*, **36**: 309–317
- RAYCHOUDHURY R. *et al.* (2010): *Heredity*, **104**: 318–326
- 竹内 悠真・佐原 健 (2021): *東北蚕糸・昆虫利用研究報告*, **46**: 6–11
- WERREN J.H. (1997): *Annu. Rev. Entomol*, **42**: 587–607
- WERREN J.H. *et al.* (2008): *Nature Rev. Microbiol*, **6**: 741–751
- 矢田 脩 (1974) *蝶と蛾* **25**: 47–54
- ZHOU W. *et al.* (1998): *Proc. Royal Soc. Lond. B*: **265**: 509–515

18S rDNA を含むオオモンシロチョウ BAC クローンの発見と利用

依田 直哉・藤本 章晃・佐原 健*

岩手大学農学部

(2022年12月5日受理)

リボソームは細胞でタンパク質の合成を行うリボ核タンパク質 (RNP) で、大サブユニットと小サブユニットの 2 つのサブユニットで構成される。真核生物の大サブユニットには 28S rRNA、5S rRNA、5.8S rRNA の 3 種類の rRNA が含まれ、小サブユニットには 18S rRNA が含まれている (de la CRUZ *et al.* 2015)。これらの rRNA の配列は種を超えて保存性が高く、系統解析や生物多様性の評価などに用いられている (HADZIAVDIC *et al.* 2014)。rRNA をコードする rDNA は、染色体の核小体形成域 (Nucleolus organizer regions: NORs) に存在することが知られている。ヒトの NORs は、5 対の染色体にコードされる rDNA クラスターより形成される (MCSTAY *et al.* 2016)。NORs の数は種によって異なり、例えばチョウやガで構成される鱗翅目昆虫では、NOR を形成すると推定される rDNA クラスターは染色体の末端もしくは中央に位置し、調査された 63 種のうち 59 種が 1 もしくは 2 つの rDNA クラスターを持つものの、例外として、3, 4, 5, 7, 11 の rDNA のクラスターを持つ種が確認されている (NGUYEN *et al.* 2010; ŠICHOVÁ *et al.* 2013; 2015; de MELLO *et al.* 2021; PROVAZNÍKOVÁ *et al.* 2021)。またツトガ科に属し、穀物の害虫として知られ

るヨーロッパアワノメイガ (*Ostrinia nubilalis*) では個体によって rDNA クラスターの数が異なることが判明している (de MELLO *et al.* 2021)。このように鱗翅目昆虫では、rDNA クラスターの数や染色体上の位置に多様性があり、その変化の原因や機構については不明な部分も多い。

rDNA クラスターの染色体上の位置は、rDNA を含むプローブを用いて染色体標本に FISH (fluorescence *in situ* hybridization) を行うことで視覚的に確認できる。特に 18S rDNA は配列保存性が高いため、コドリシガ (*Cydia pomonella*) の gDNA を用いた PCR により 18S rDNA を含む 1,650 bp の配列を増幅し、増幅産物にラベルしたプローブが広く利用されている (FUKOVÁ *et al.* 2005)。本研究では、18S rDNA を含むタンデム rDNA 配列がクローンされたと考えられるオオモンシロチョウ BAC クローンを発見したので、他種への rDNA クラスター検出に用いることが可能かどうか検証した。

材料と方法

1. PCR による 18S rDNA の検出

OHNO *et al.* (2020) によって作製されたオオ

*責任著者

〒020-8550 盛岡市上田 3-18-8

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

モンシロチョウ BAC ライブラリーに含まれる 01A06 クローンに 18S rDNA 配列が含まれているか否かを確認するため、このクローンをテンプレートとし、FUKOVÁ *et al.* (2005) に準拠して PCR を実施した。プライマーは、

18S-GalF: CGATACCGCGAATGGCTCAATA

18S-GalR: ACAAAGGGCAGGGACGTAATCAAC

を用い、01A06 の BAC-DNA およびカイコ gDNA をテンプレートとした。増幅産物は、1% アガロースゲル電気泳動によって目的産物 (1,650 bp) の有無を確認した。

2. 01A06 の配列解析

01A06 の BAC-DNA の抽出は、NucleoBond® Xtra Midi (TaKaRa) を用いた。シーケンスは、北海道システム・サイエンス株式会社に依頼し、3730xl DNA Analyzer を用いて解析した。解析した配列は、ClustalW を用いてカイコ 18S rDNA (GenBank ID: DQ347470.1) および 5.8S rDNA (GenBank ID: AH000961.2) との配列比較を行った。

3. BAC-FISH

BAC-FISH および画像解析は、YOSHIDO *et al.* (2014) に従って行った。使用した BAC クローンは YOSHIDO *et al.* (2005) にて選抜されたカイコ BAC クローン 7H8B、7E3G およびオオモンシロチョウ BAC クローン 01A06 を使用した。アルカリ SDS 法を用いて BAC-DNA 抽出し、自作した nick translation kit でそれぞれ Orange-dUTP (Abbott)、Green-dUTP (Abbott) および Cy5-dUTP (Cytiva) 蛍光ラベル後、プローブとして用いて FISH を行った。画像解析は、蛍光顕微鏡 DM6000B (Leica) を用いて FISH 標本

を観察し、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 2022 にて行った。

結果と考察

カイコ gDNA もしくは 01A06 の BAC-DNA をテンプレートとする 18S rDNA 増幅 PCR および電気泳動の結果、FUKOVÁ *et al.* (2005) の結果と一致するサイズのバンドが得られ、01A06 には 18S rDNA 特異的な領域が含まれると推定された (図 1)。そこで、01A06 の BAC

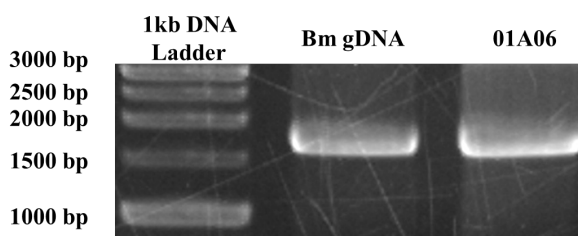


図 1 18S rDNA 特異的な PCR 増幅産物の検出

18S rDNA 増幅用プライマーによりカイコゲノム DNA (Bm gDNA) もしくはオオモンシロチョウ BAC クローン 01A06 の BAC-DNA (01A06) をテンプレートとして増幅される PCR 産物は目的サイズ (約 1,650 bp) 付近に検出される。

エンドシーケンスを行った。その結果、カイコ 18S rDNA 5'末端とカイコ 18S rDNA 3'末端配列の一部およびカイコ 5.8S rDNA にそれぞれ相同な配列の一部を含むシーケンスデータが得られた (図 2)。rDNA はゲノム中でタンデムクラスターを形成する (RICHARD *et al.* 2008) ため、01A06 には rDNA の完全なユニットが複数含まれている蓋然性が高い (図 2)。

カイコは第 11 染色体に NORs と推定される領域が存在する (YOSHIDO *et al.* 2005)。そこで 01A06 およびカイコ第 11 染色体の NOR を挟む部位に特異的なシグナルを示す BAC クローン 7H8B と 7E3G の BAC-DNA を用いた。これらのプローブをカイコ染色体標本に FISH した

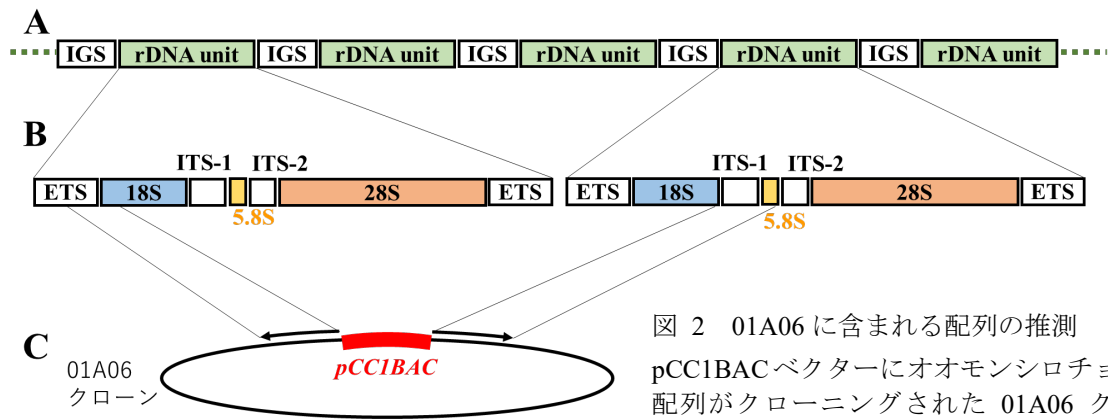


図 2 01A06 に含まれる配列の推測

pCC1BAC ベクターにオオモンシロチョウゲノム配列がクローニングされた 01A06 クローンの BAC エンドをシーケンス (C の矢印部分) したところ、18S rDNA と 5.8S rDNA の一部と考えられる配列が認められた。A: 真核生物に含まれる

rDNA unit のタンデムなりリピートの模式図。B: rDNA unit に含まれる遺伝子と翻訳領域の模式図。C: 01A06 クローンと BAC エンドシーケンス領域の模式図。ETS; external transcribed spacer, IGS; intergenic spacer, ITS; internal transcribed spacer, pCC1BAC; BAC ベクター, 5.8S; 5.8S rDNA, 18S; 18S rDNA, 28S; 28S rDNA

ところ、01A06 はカイコの NOR と推定される領域に特異的なシグナルを示した (図 3)。これらの結果から、01A06 は、オオモンシロチョウ rDNA ユニットを含み、FUKOVÁ *et al.* (2005) が用いた 1,650 bp の 18S rDNA 増幅産物と同様、広く鱗翅目昆虫の NOR 特定に利用可能であると考えられる。

rDNA プローブは、rDNA クラスター数の特定や染色体上の位置の多様性検定に用いられるとともに、鱗翅目昆虫において特定の染色体を識別するマーカーとしても利用されてきた。鱗翅目昆虫における rDNA クラスターの移動や増減のメカニズムは、科などのグループによって異なることが示唆されている (PROVAZNÍKOVÁ *et al.* 2021)。このメカニズムを解明するためには、より多くの種の rDNA クラスター配置を調べる必要がある。今回の研究によって、今後 rDNA クラスターの配置を調べる際に既存の方法 (FUKOVÁ *et al.* 2005) のみならず、本研究で述べた 01A06 クローンを利用することが可能となった。

文 献

- de la CRUZ J. *et al.* (2015): *Annu. Rev. Biochem.*, **84**: 93–129
- FUKOVÁ I. *et al.* (2005): *Genome*, **48**: 1083–1092
- HADZIAVDIC K. *et al.* (2014): *PLoS ONE*, **9**: e87624
- MCSTAY B. *et al.* (2016): *Genes & Dev*, **30**: 1598–1610
- de MELLO D.C.C. *et al.* (2021): *Front. Genet.*, **30**: 661417
- NGUYEN P. *et al.* (2010): *Genetica*, **138**: 343–354
- OHNO M. *et al.* (2020): *Appl. Entomol. Zool.*, **55**: 159–1174
- PROVAZNÍKOVÁ I. *et al.* (2021): *Sci. Rep.*, **11**: 12214
- RICHARD G. F. *et al.* (2008): *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **72**: 686–727
- ŠICHOVÁ J. *et al.* (2013): *PLoS ONE*, **8**: e64520
- ŠICHOVÁ J. *et al.* (2015): *BMC Evol. Biol.*, **15**: 89
- YOSHIDO A. *et al.* (2005): *Genetics*, **170**: 675–685
- YOSHIDO A. *et al.* (2014): CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 219–256

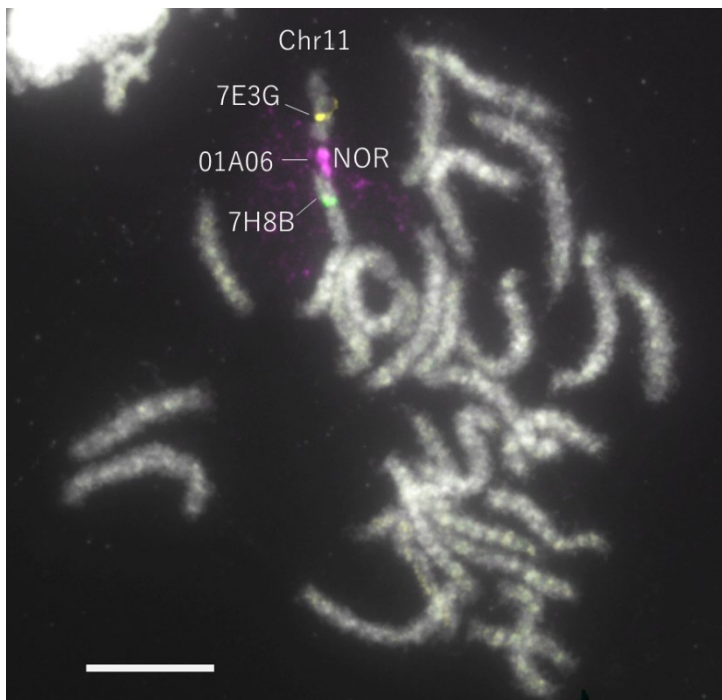


図 3 カイコ染色体標本への FISH

カイコ BAC の 7E3G、7H8B およびオオモンシロチョウ BAC の 01A06 それぞれのプローブは、黄、緑およびマゼンタシグナルとしてカイコ第 11 染色体上に検出される。01A06 シグナルは、カイコ NOR 形成領域に認められる。Chr11: 第 11 染色体, NOR; nucleolar organizer region, スケールバー; 10 μ m

幼虫マスター遺伝子候補 *Chinmo* のカイコにおける発現解析

小杉 海斗・金児 雄*

弘前大学農学生命科学部

(2022年12月6日受理)

完全変態昆虫は、幼虫から蛹、蛹から成虫へと2度の変態を行う。これら3つのステージそれぞれを特徴付けるマスター遺伝子の存在が予想されていた (WILLIAMS and KAFATOS, 1971)。このうち、蛹を特徴付けるマスター遺伝子として、*Broad* がすでに同定されている (TRUMAN and RIDDIFORD, 2019)。また近年、成虫を特徴付けるマスター遺伝子として *E93* が報告された (UREÑA *et al.* 2014; TRUMAN and RIDDIFORD, 2019)。つまり蛹変態は *Broad* が発現することで誘導され、成虫への変態は、*E93* が発現することで誘導される。一方で、幼虫時期を特徴付ける遺伝子は、これまで見つかっていなかった。

Krüppel-homolog 1 (Kr-h1) は、幼虫時期特異的に発現する遺伝子であることから、幼虫時のマスター遺伝子候補として考えられていた。しかしながら、*Kr-h1* が発現しない条件下でもカイコ (*Bombyx mori*) とキイロシヨウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) は幼虫脱皮が誘導されることから、幼虫期のマスター遺伝子であると結論付けるには至っていなかった (DAIMON *et al.* 2015; PECASSE *et al.* 2000)。今年になり、キイロシヨウジョウバエ幼虫時期のマスター遺伝子は *Chronologically inappropriate morphogenesis (Chinmo)* であると報告された (TRUMAN and RIDDIFORD, 2022)。

Chinmo は *Broad* と同じ BTB zinc-finger 型の転写

因子で、キイロシヨウジョウバエにおいて、中枢神経系で幼虫特異的に発現することが報告されていた (ZHU *et al.* 2006)。終齢である3齢後期の中枢神経において、*Chinmo* のタンパク質発現が減少し、入れ替わるように *Broad* タンパク質の発現が生じる (MAURANGE *et al.* 2008)。*Chinmo* タンパク質から *Broad* タンパク質への発現の切り替えは、幼虫状態から蛹変態への切り替えのチェックポイントである critical weight を境に行われる (DILLARD *et al.* 2018)。同様の発現切り替えは、キイロシヨウジョウバエの翅原基でも認められる (NARBONNE-REVEAU and MAURANGE, 2019)。蛹変態時に細胞死を起こす唾液腺でも *Chinmo* タンパク質の発現は終齢初期で消失する (TRUMAN and RIDDIFORD, 2022)。この研究においては、*Chinmo* の RNAi によって、2 齢幼虫への脱皮が阻害され、表皮細胞では蛹のような特徴が誘導された。また、成虫原基特異的な *Chinmo* の RNAi では、早熟な *Broad* タンパク質発現が誘導された。これら一連の結果から、TRUMAN and RIDDIFORD (2022) は、*Chinmo* が幼虫のマスター遺伝子であると結論づけた。

Chinmo 研究の多くはキイロシヨウジョウバエでなされており、*Chinmo* が完全変態昆虫全般に渡る幼虫期のマスター遺伝子であるかどうかを検証するためには、他種での研究が進まなければならない。そこで本研究では、カイコにおける検証を

*責任著者

〒036-8561 弘前市文京町3

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

進めるため、カイコ *Chinmo* の mRNA 発現解析を行なったので報告する。

材料と方法

1. 供試カイコ系統

本研究では、錦秋×鍾和(上田蚕種株式会社)を、シルクメイト 2M (日本農産工業株式会社) を用いて飼育した。飼育温度は 25 °C、明暗周期は 12L:12D とした。齢期は、脱皮初日を 0 日とした。

2. 配列比較

キイロショウジョウバエの *Chinmo* アミノ酸配列 isoform E (NP_001188680.1) をクエリーとして、NCBI tBlastn を用いてカイコ *Chinmo* 塩基配列を探索した。

3. アラタ体除去

4 齢 1 日の個体を水麻酔し、実体顕微鏡下で左右のアラタ体を摘出した。その後、麻酔が覚めると同時に餌を与えた。アラタ体の摘出以外は同様の処理をした個体を、コントロールとした。

4. 遺伝子発現解析

摘出脳から、RNAqueous-Micro Total RNA Isolation kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて、total RNA を抽出した。その後、RevertAid Reverse Transcriptase (Agilent)、100 μM oligo dT primer (12 mer)、0.25 mM dNTPs ならびに 1x reaction buffer を用いた 20 μl 反応液中で cDNA を合成した。cDNA は TE を用いて total RNA 等量 1.5 ng/μl の濃度になるように希釈した。定量 PCR は PikoReal 96 (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。定量

PCR は、Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mixes (Agilent) を用いて、95 °C 10 秒を 1 cycle、60 °C 30 秒を 40 cycles の条件で行った。遺伝子発現量の測定のため、目的遺伝子をクローニングした pBluescript-SK(+) (Agilent) の希釈系列による検量線を利用した。遺伝子のコピー数は *rp49* のコピー数で標準化した。*Chinmo* と *Broad* については、各遺伝子の isoform に共通の領域でプライマーを設計した。用いたプライマーの配列は、それぞれ
Chinmo F; AGCGGCGAGAATTTACAGGT
Chinmo R; CGACCCTGATACCGGACTTG
Broad F; ACGCAACACTTCTGTCTCCGATGG
Broad R; TTGAGGCTTTTCCCGTCGCA
rp49 F; CAGGCGGTTCAAGGGTCAATAC
rp49 R; TGCTGGGCTCTTTCCACGA
である。

結果と考察

1. カイコ *Chinmo* 候補配列の同定

カイコ *Chinmo* 遺伝子の探索のため、キイロショウジョウバエの *Chinmo* アミノ酸配列 (604 残基) を利用し、Blast 検索をした結果、*Bombyx mori* zinc finger protein chinmo (LOC105842315) と transcript variant X2 mRNA (XM_038021863.1) が候補としてヒットした。LOC105842315 の配列から予測されるアミノ酸は 430 残基で、そのうち 351 残基に渡って、キイロショウジョウバエの *Chinmo* と 53.8% の高いアミノ酸配列一致率が認められた。このことから、本配列をカイコの *Chinmo* 遺伝子だと判断した。XM_012694577.3 は、予測アミノ酸が全長 442 残基で、N 末端側に 12 個のアミノ酸残基が付加されていた。そこで、以降の発現解析には、LOC105842315 と XM_038021863.1 の共通領域を用いた。

2. カイコ脳における *Chinmo* と *Broad* の発現解析

キイロショウジョウバエにおいて、*Chinmo* の発現が中枢神経で確認されていたことから、カイコの脳における発現量の変動を4齢から蛹脱皮直前まで解析した。その結果、4齢期では前期で高く、中期に減少し、終期には再び上昇することが確認された(図1)。終齢である5齢への脱皮時に発現量が急激に低下した後、5齢3日には再び上昇し、吐糸開始時期である5齢6日まで中庸な発現量で推移した。その後、蛹脱皮に向けて発現量は漸減した。比較のために *Broad* の発現も同様の条件で検証した。その結果、*Broad* の発現は、4齢後期まで高く、4齢終期から5齢脱皮期に減少した。その後、この発現量をほぼ維持し、5齢6日以降蛹脱皮まで漸増した(図1)。以上の結果、4齢期前半では *Chinmo* の発現も *Broad* の発現も高く、この時期には2つの遺伝子の間での発現の切り替えは認められなかった。キイロショウジョウバエの翅原基における *Chinmo* と *Broad* の発現は、相互抑制される(NARBONNE-REVEAU and MAURANGE, 2019)。そのことから、細胞レベルでは、両者は同時に発現しないと考えられる。それにも関わらず、今回の解析で明確な発現の切り替えが認められなかったのは、脳全体を発現解析の試料として使用したことが原因の可能性はある。一般的に、脳において *Broad* の発現は分化しきった細胞では発現せず、未分化な細胞で発現する(ZHOU *et al.* 2009)。キイロショウジョウバエの幼虫の脳には、2種類の未分化な状態のニューロンがあることが知られており、両者で *Broad* の発現時期が異なる(ZHOU *et al.* 2009)。具体的には、胚発生時に産生されたニューロンでは、幼虫期の間、*Broad* の発現が維持される(ZHOU *et al.* 2009)。一方、幼虫期に産生されたニューロンでは、*Broad* は最終齢である3齢中期で初めて発現する(ZHOU *et al.* 2009; MUBARAK *et al.* 2017)。本報告では、脳全体を対象としたため、4齢期で見られた *Broad* の発現は、胚発生時に産生

されたニューロンでの発現を反映している可能性がある。これまで幼虫期に産生されたニューロンでは、3齢中期において、*Chinmo* タンパク質から *Broad* タンパク質への切り替えが報告されている(MAURANGE *et al.* 2008; MUBARAK *et al.* 2017)。このことから、4齢期で見られたカイコ *Chinmo* の発現は、幼虫期に産生されたニューロンで発現している可能性が考えられる。しかしながら、キイロショウジョウバエ胚発生時に産生されたニューロンにおいては、*Chinmo* の発現解析が十分でなく、*Broad* と *Chinmo* が同時に発現している可能性も否定できない。一方で、5齢5日目以降においては、*Chinmo* の発現減少と *Broad* の発現上昇の開始が一

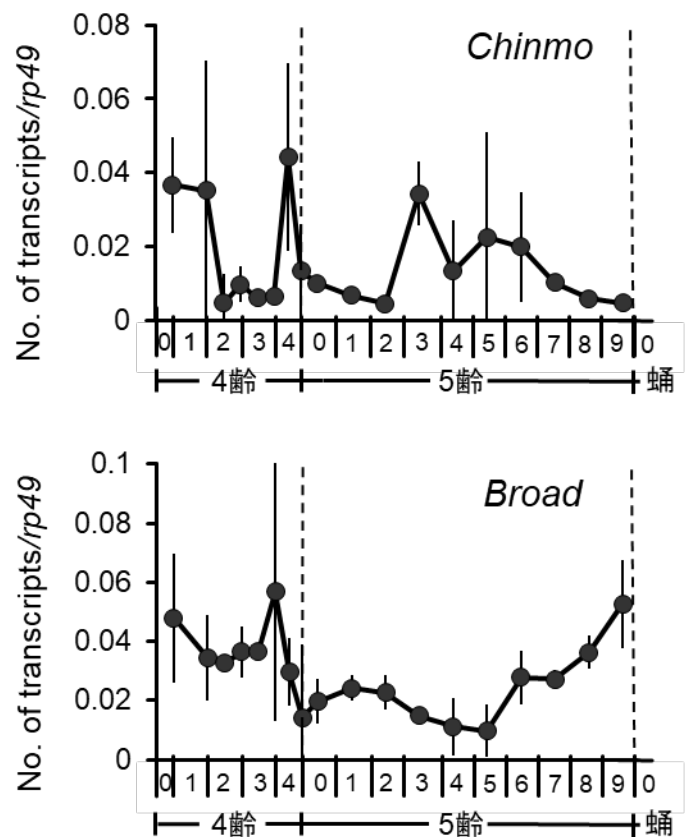


図1 カイコ脳における *Chinmo* と *Broad* の4齢および5齢での発現変動

カイコの脳における *Chinmo* (上) と *Broad* (下) の mRNA 発現量の変動を4齢1日から蛹脱皮直前の5齢9日まで解析した。4齢1日と5齢期間は1日ごとに遺伝子発現量を測定した。4齢2日から5齢脱皮にかけては12時間毎に測定した。両遺伝子の発現量は、*rp49* のコピー数で標準化した値で示した。値は平均値 (n=3)、エラーバーはSDを示す。

致し、それぞれは、*Chinmo* 斬減と *Broad* 斬増がパラレルに認められた。この結果は、キイロショウジョウバエでの報告と同様の切り替えが行われている可能性を強く示唆する。今後さらに詳細な解析を行うことで、よりはっきりとした相関関係が明らかとなる可能性がある。

早熟変態を誘導する条件下での、*Chinmo* と *Broad* の発現量の相関を検証するために、4 齢 1 日の幼虫から幼若ホルモン産生組織であるアラタ体を除去し、その後の両遺伝子の発現量の変化を解析した。4 齢 1 日の幼虫からアラタ体を除去すると、5 齢脱皮することなく早熟な蛹へと変態する。この条件下で、*Chinmo* の発現量を測定したところ、アラタ体除去 5 日後の 4 齢 6 日に上昇し始め、4 齢 8 日にピークを迎え、その後、急減した (図 2)。一方、*Broad* の発現量はアラタ体除去 1 日後から

徐々に上昇し始め、4 齢 8 日から 9 日にピークを迎え、蛹への脱皮後に減少した (図 2)。以上の結果から、アラタ体の除去により 4 齢幼虫を早熟な蛹変態へと向かわせた場合には、蛹変態時に *Chinmo* と *Broad* の双方が同時に発現することが明らかとなった。つまり幼虫と蛹のマスター遺伝子が共存していることになる。

以上の結果から、今回の解析による mRNA の発現パターンと、これまでのショウジョウバエによる報告でのタンパク質発現パターンとは、必ずしも一致しないことが明らかとなった。この結果は、mRNA とタンパク質では *Chinmo* 発現のパターンが異なる可能性を示唆する。キイロショウジョウバエの腹部の neuroblast では、*Chinmo* は転写後調節が行われ、タンパク質レベルが低下することが知られている (DILLARD *et al.* 2018)。今回の実験で、同様の転写後調節がアラタ体除去後に起こっている可能性がある。その一方で、通常の変態とアラタ体除去による早熟変態では、蛹変態を誘導する分子機構が異なっている可能性も否定できない。

今回は、カイコ *Chinmo* が幼虫のマスター遺伝子である確証は得られなかった。今後、皮膚や絹糸腺、翅原基のように蛹変態時に明確な応答を示す組織を対象とすることで、より正確な検証が可能になると考えられる。また、キイロショウジョウバエの発現解析はタンパク質レベルで行われており、加えて上述のように転写後調節が関与する細胞が報告されていることから、他の昆虫種でもタンパク質レベルで解析する必要があると考えられる。今後、これらの発現解析に加えて、機能解析が行われることで、*Chinmo* が完全変態昆虫共通の幼虫マスター遺伝子かどうか明らかになると考えている。

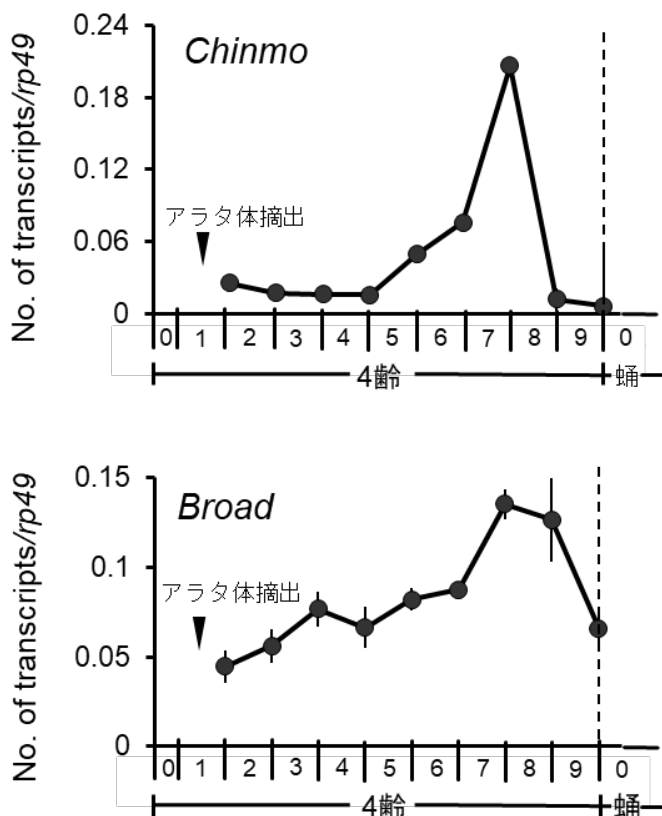


図2 早熟変態が *Chinmo* と *Broad* の遺伝子発現に及ぼす影響

4 齢 1 日でアラタ体を摘出し、脳における *Chinmo* (上) と *Broad* (下) の mRNA 発現量を、4 齢 2 日から蛹 0 日にかけて 1 日ごとに測定した。両遺伝子の発現量は、*rp49* のコピー数で標準化した値で示した。値は平均値 (n=3)、エラーバーは SD を示す。

文 献

DAIMON T. *et al.* (2015): Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 112: E4226-E4235

- DILLARD C. *et al.* (2018): *Development*, **145**: dev154534
- MAURANGE C. *et al.* (2008): *Cell*, **133**: 891–902
- MUBARAK H. S. *et al.* (2017): *eLife*, **6**: e26287
- NARBONNE-REVEAU K. and MAURANGE C. (2019): *PLoS Biol*, **17**: e3000149
- PECASSE F. *et al.* (2000): *Dev. Biol*, **221**: 53–67
- TRUMAN J. W. and RIDDIFORD L. M. (2019): *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci*, **374**: 20190070
- TRUMAN J. W. and RIDDIFORD L. M. (2022): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **119**: e2201071119
- UREÑA E. *et al.* (2014): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**: 7024–7029
- WILLIAMS C. M. and KAFTOS F. C. (1971): *Mitt. Schweiz. Entomol. Ges*, **44**: 151–162
- ZHOU B. *et al.* (2009): *Neural Dev*, **4**: 39
- ZHU S. *et al.* (2006): *Cell*, **127**: 409–422

日本蚕糸学会東北支部 役員

(任期 2023 年度～2024 年度)

支部長

浅野 眞一郎 (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 (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)

委員 (会計担当)

佐原 健 (一般社団法人日本蚕糸学会代議員選出理事)

委員

伴戸 久徳 (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://jsss.or.jp/modules/pico2/index.php?content_id=18
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)、m²、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)、³²P(放射性リン ³²P)などとし、単位は原則として c.g.s 単位系を用いる。
5. 図・表中の文字、記号とともにそのまま印刷となるよう明確に描く。刷り上がりサイズは横 8cm 以内もしくは 17.5 以内 cm、縦 24cm 以内となることを考慮して図中の文字、数字、記号などの大きさに注意する。
10. 図や表の挿入箇所を指定する場合は原稿の本文の右横などに朱書きする。
11. 文献の引用は本文中では著者名(年号)あるいは(著者名、年号)とする。共著者については2人まで両名を並記し、3人以上のときは最初の著者に「ら」を付記してほかを省略する。文献は次のようにまとめて論文の末尾に著者名のアルファベット順に配列する。

[学術雑誌より引用する場合]

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

例: 四方正義・村田武(1969): 日蚕雑. **38**: 1-10.

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

[単行本を引用する場合]

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

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

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

[共著の単行本の一部を引用する場合]

著者名、発行年、本の名前、編者名、引用ページ、発行所、同所在地。

例: 上田光雄(1952): 家蚕遺伝学(田中義麿編), 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@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4年12月28日
発行	令和4年12月28日
編集者	佐原 健
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

