

東北蚕糸・昆虫利用研究報告

第 48 号

令和 5 年 12 月

日本蚕糸学会東北支部

No.48 目 次

飯田 哲也 小杉 海斗 金児 雄	絶食実験によるカイコガにおける minimal viable weight と critical weight に到達する発育時期の検証 1
平岩 玲奈 佐藤 昌直 浅野 眞一郎	Cry トキシン-レセプター結合評価系を用いた Cry3Aa トキシン殺虫活性機構の探索 10
西出 雅成 篠本 栞寧	限性品種系統「黄白」における玉繭形成の条件検討 17
佐原 健 菊池 将騎 吉田 理央 飯沼 諒司 村山 蒼悟 陰山 大輔	人工飼料育によるボルバキア感染ならびに非感染キタキチョウの成長比較 22
本田 楓 浅野 眞一郎 佐藤 昌直	BmN 細胞における人工レセプターを介した膜融合系の評価 26
黒光 玲緒奈 高 ひとみ 浅野 眞一郎 伴戸 久徳 佐藤 昌直	遺伝子クラスター群欠損 BmNPV の BmN における増殖能力 33

絶食実験によるカイコガにおける minimal viable weight と critical weight に到達する発育時期の検証

飯田 哲也¹・小杉 海斗²・金児 雄^{1,2*}

¹ 弘前大学農学生命科学部、² 弘前大学大学院農学生命科学研究科

(2023 年 12 月 8 日受理)

完全変態昆虫の蛹・成虫は体が大きくならないため、最終的な個体の大きさは幼虫期に決まる。その機構がいくつかの昆虫で調べられているが、特にタバコスズメガ (*Manduca sexta*) で詳細に検証されている。タバコスズメガは、最終齢の幼虫期間に、一定の体の大きさを超えることで蛹変態を開始できるようになる (CALLIER and NIJHOUT, 2013; MIRTH and RIDDIFORD, 2007)。この蛹変態のための基準ともいえる体重は 2 段階あり、その存在はいずれも、終齢期に様々な体重の個体を絶食させ変態へ与える影響を解析する実験で明らかとなった。ひとつめの基準となる体重は minimal viable weight (MVW) と呼ばれ、この体重を超えた後は餌を食べなくても 50%の個体が蛹変態まで生存できる体重である (CALLIER and NIJHOUT, 2013)。MVW 未満の個体は餌を食べないと蛹変態できず、いずれ致死する。したがって、幼虫は MVW に達した時点で、変態までに必要な最低限の栄養を得ると解釈されている (NIJHOUT, 1975)。MVW に達した個体は餌を食べなくても蛹変態できるものの、蛹変態までにかかる時間は、十分に餌を食べている個体よりも長くなる。もう一つの蛹変態の基準となる体重は critical weight (CW) と呼ばれる。CW は MVW よりも重い。CW に達した幼虫は餌を食

*責任著者

〒036-8561 弘前市文京町 3

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

べなくても蛹変態ができ、かつ変態までにかかる時間は、十分に餌を食べた個体と同じである (NIJHOUT and WILLIAMS, 1974a)。CW を超えると、変態に関わる内分泌系に変化が起こることが明らかとなっている。幼虫が CW を超えると、まず体液中から幼若ホルモン (JH) が消失する (NIJHOUT and WILLIAMS, 1974b)。この JH の消失は、JH 合成が停止し、同時に JH 分解酵素のひとつである JH エステラーゼが活性化することで引き起こされる。体液から JH が消失すると、それまで JH によって抑制されていた前胸腺刺激ホルモン (PTTH) の分泌が促され、その結果、前胸腺が活性化し、体液中のエクジステロイド濃度が上昇する (NIJHOUT and WILLIAMS, 1974a)。このエクジステロイド濃度上昇によって、幼虫は摂食を停止し、wandering が引き起こされ、蛹変態への準備が進む (CALLIER and NIJHOUT, 2013; NIJHOUT and CALLIER, 2015)。

タバコスズメガと同様に、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) でも蛹変態と体重の関係が解析されているが (MIRTH *et al.* 2005; MIRTH and RIDDIFORD, 2007)、タバコスズメガとキイロショウジョウバエでは、蛹変態を制御する体重の関わる機構は異なることが明らかになっている。キイロショウジョウバエ

の場合、MVW と CW の体重が同じために、絶食実験で区別することができない (MIRTH *et al.* 2005)。キイロショウジョウバエでは、CW に到達した個体は、絶食下では、十分に餌を食べた個体よりも早く蛹変態を起こす (MIRTH *et al.* 2005)。ショウジョウバエの場合も CW に達することで起こる内分泌系の変化が細かく解析されている。蛹変態を誘導するエクジステロイド濃度の上昇は、前胸腺でのエクダイソン合成活性が促進することで引き起こされる。このエクダイソン合成活性の促進は、前胸腺細胞のエンドサイクルが進行し、CW 後に核内の DNA 量が一定以上に達することで引き起こされる。幼虫が CW よりも軽い場合、前胸腺細胞の核内 DNA の倍加は絶食で抑制されるが、CW よりも重い幼虫の場合では、絶食では DNA 倍加は抑制されない (OHARA *et al.* 2017)。また、キイロショウジョウバエの場合は JH の投与は終齢期の長さに影響しない (RIDDIFORD and ASHBURNER, 1991) ことから、タバコスズメガとは異なり CW への JH の関与は限定的だと考えられる。

以上のように、タバコスズメガもキイロショウジョウバエも、蛹変態の基準となる CW が存在するものの、体重が蛹変態を制御する機構の詳細は大きく異なることが明らかとなっている。両者の違いは、生存戦略の違いとなって現れると考えられている (NIJHOUT, 2015)。具体的には、タバコスズメガの場合は、体を大きくすることで次世代を十分に産むことを優先し、一方で、キイロショウジョウバエは個体の生存を優先し、餌が枯渇しても大丈夫なように、一定の大きさ後は速やかに変態できるようにしたと推察されている。

カイコガ (*Bombyx mori*) では、CW の存在が 2015 年に報告された (KESHAN *et al.*, 2015)。カ

イコガの場合、CW に達した幼虫を絶食させると、蛹変態までの期間が短縮した (CHEN and GU, 2006; KESHAN *et al.* 2015)。これはキイロショウジョウバエで見られる特徴と一致する。一方で、カイコガの蛹変態は、終齢時に JH 濃度が低下することで誘導される (SAKURAI, 1984) が、これはキイロショウジョウバエよりもむしろ、タバコスズメガの特徴と一致する。つまり、カイコガの変態は、タバコスズメガとキイロショウジョウバエの両種の特徴を持っていると言える。変態における特徴を昆虫種の間で比較することは、昆虫の進化を理解するための重要な糸口となり得るが、カイコガでは現在までに CW に関する論文はあるものの、MVW に言及した報告はない。そこで我々は、カイコガにおける MVW の検証を始めた。

まず、MVW の指標となりえる現象を決める必要がある。タバコスズメガの場合、MVW の決定の際にエクジステロイドで直接誘導される wandering を指標として用いることが可能という報告がある (Xu *et al.* 2020) が、我々は、wandering ではなく吐糸管着色が指標となるか検討した。カイコガの場合、吐糸管着色は wandering よりも約 8 時間前に観察される (木口ら, 1985) ことから、よりエクジステロイド濃度の上昇に敏感な指標になり得ると考えられる。また、吐糸管着色は観察が容易で、行動を観察する wandering よりも、観察における曖昧さが少ない。我々は吐糸管着色を MVW の推定の基準とし、蛹変態を CW の基準として、それぞれ採用することで、より厳密な検証ができないかと考えている (図 1)。本報告では、カイコガにおいて吐糸管着色と蛹変態を別々に解析することで、カイコガにおいて MVW と CW を区別して観察することが可能かどうか検証したので報告する。

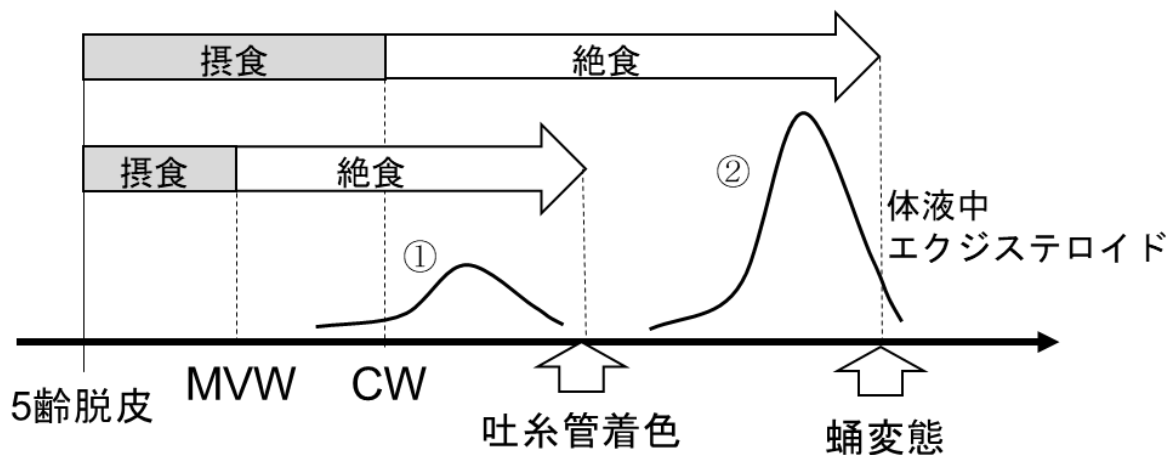


図 1. 作業仮説

吐糸管着色は、終齢期中盤の少量のエクジステロイド（図中の①）によって誘導され、蛹変態に関わる一連の生理現象のうちもっとも早く観察できる。一方、蛹変態は②終齢期後半の大きなエクジステロイドのピーク（図中の②）によって誘導される（木口ら, 1985）。5 齢期間中の様々な時期で絶食を行い、吐糸管着色と蛹変態への影響を調べることで、吐糸管着色を誘導できるようになる体重を **minimal viable weight (MVW)** と、蛹変態を誘導できる体重を **critical weight (CW)** として、区別して設定できるかを検証した。図内の曲線は、体液中エクジステロイド濃度の変動を模式的に示している。

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。終齢へと脱皮した最初の日を明期 0 時間を、齢期の始まりとした。

2. 絶食処理

5 齢 0 日から 5 日にかけて、1 日ごとに絶食開始時期をずらして、その後死亡もしくは蛹変態するまで絶食を継続した。絶食は、各日の明期の始まりに餌を取り除くことで行なった。絶食処理は雌雄各 6 個体ずつ行なった。

3. 吐糸管着色

飼育期間中、明期 2 時から 3 時の間に、実体顕微鏡 (SZ-61、オリンパス株式会社) 下で吐糸管着色の有無を確認した。

4. 体重測定

雌雄各 6 個体ずつ、個体別に 5 齢 0 日から死亡または吐糸管着色が起こる前日まで、毎日測定した。測定は、0.1 mg で測定可能な電子天秤 (GR-120、株式会社 AND) を用いて、明期 3 時から 5 時の間に行なった。

結 果

1. 体重の推移

各実験区間での発育の比較が可能かどうかを検証するために、体重の推移をグラフにした (図 2)。雌雄を分けて、5 齢 5 日まで餌を与え続け 5 日から絶食させた実験区 (5 齢 5 日)、5

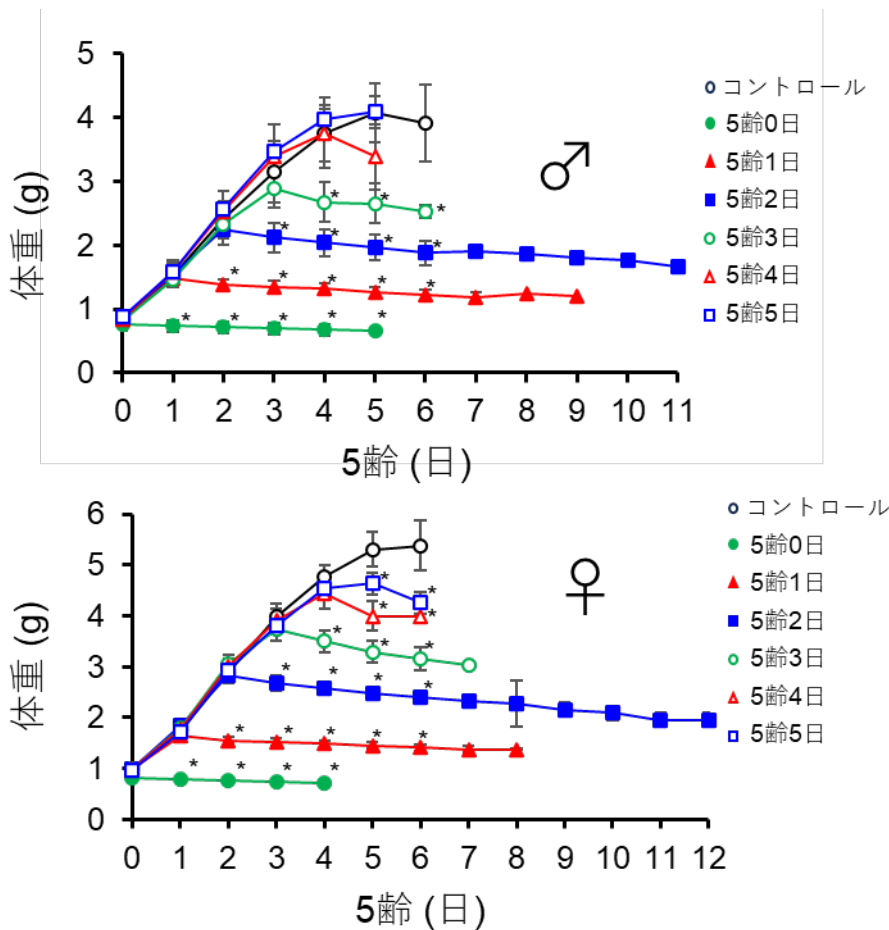


図 2. 絶食処理個体における体重の推移

5 齢 0 日から 5 日にかけて、1 日毎に絶食を開始し、死亡した日もしくは吐糸管着色前日までの体重を、毎日測定した (n=1-6、平均値±SD、ただし個体数が 2 以下については SD を表示してない)。死亡または吐糸管着色した個体については体重を測定していないため、各値の n 数は異なる。各処理区の死亡数と死亡した日は本文参照、また吐糸管着色した個体数は図 3 を参照のこと。グラフの凡例横の発育日は、絶食開始日を示す。*は同日のコントロール区と比較し有意な差があることを示す (student's t-test で $p < 0.05$)。

齢 4 日から絶食させた実験区 (5 齢 4 日)、5 齢 3 日から絶食させた実験区 (5 齢 3 日) というように絶食を開始する日を 1 日ずつずらした。コントロール区では餌を与え続けた。その結果、いずれの絶食区でも摂食期間中はコントロール区と変わらない体重の上昇が確認でき、コントロール区といずれの絶食区も、摂食期間中の発育スピードに大きな差がないと考えられる。このことから、それぞれの実験区の摂食期間の長さは、お互いの発育具合の違いとして比較可能だと考えられる。いずれの区においても、絶食を開始した翌日から体重の減少が認められた。絶食による体重の減少は、絶食を開始する時期が遅いほど大きくなる傾向が認められ、同様の傾向は、河口らによって報告されている (河口ら, 1991) が、その明確な理由は明らかになっていない。

2. 絶食の死亡率、吐糸管着色および蛹変態への影響

吐糸管着色と蛹変態をそれぞれ観察することで、MVW と CW を異なる時期に設定することが可能か検討した。具体的には、絶食によって吐糸管着色に影響を及ぼす時期と、蛹変態に影響を及ぼす時期を検証した。

2-1. 幼虫時の死亡率

5 齢 0 日および 5 齢 1 日から絶食した個体は、全て幼虫のまま死亡した。5 齢 2 日から絶食した個体では約半数が吐糸管着色せずに死亡した。5 齢 3 日以降の絶食処理区およびコントロール区では、全ての個体が蛹変態まで生存した。これらの結果は、全て雌雄いずれも同じで

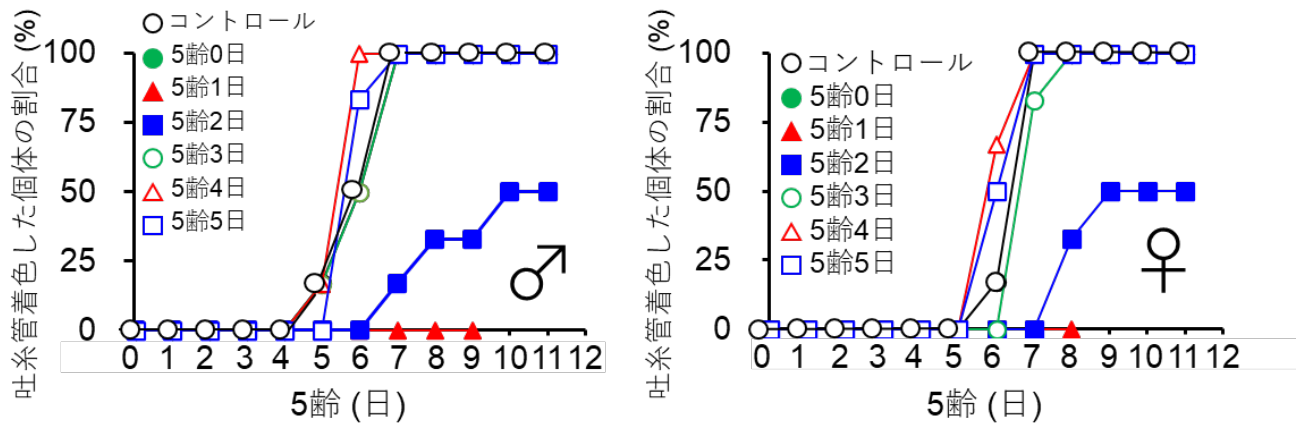


図3. 絶食処理の吐糸管着色への影響

5 齢 0 日から 5 日にかけて、1 日毎に絶食を開始し、吐糸管着色の有無を毎日観察した。縦軸は、各発育日における処理区毎の吐糸管着色個体の割合を表す。グラフ凡例に記載した発育日は、絶食開始日を表す。

あった (図 2)。これらのことから、雌雄ともに 5 齢 2 日以降に MVW と CW に達すると考えられる。

2-2. 吐糸管着色

コントロール区では、雄では 5 齢 5~7 日に、雌では 5 齢 6~7 日に全ての個体で吐糸管着色が確認された (図 3, 白丸)。

5 齢 0 日および 5 齢 1 日から絶食した個体は、雌雄ともに全ての個体で吐糸管着色は確認できなかった (図 3, 緑丸、赤三角)。

5 齢 2 日から絶食した個体では、雌雄ともに処理個体の半数にあたる 3 個体で吐糸管着色が確認され、残りの半数では吐糸管着色は確認されなかった。雄の場合、吐糸管着色は、5 齢 7 日、8 日、10 日に観察された (図 3♂, 青白塗り四角)。5 齢 8 日と 10 日に吐糸管着色した個体は、その後幼虫のまま死亡し、7 日に吐糸管着色した個体は蛹となった。雌の場合では、5 齢 8 日に 2 個体、5 齢 9 日に 1 個体で吐糸管着色が観察された (図 3♀, 青白塗り四角)。また 5 齢 9 日に吐糸管着色した 1 個体は、その後幼虫のまま死亡し、それ以外の個体は蛹となった。雌雄いずれも、絶食によって吐糸管着色の時期がコントロ

ールと比べて遅くなる傾向が認められた。

5 齢 3 日から絶食した雄個体では、吐糸管着色が 5 齢 5~7 日に観察され、これはコントロール区と同じタイミングであった (図 3♂, 緑白塗り丸)。雌の場合では、5 齢 7 日と 8 日に観察され (図 3♀, 緑白塗り丸)、わずかにコントロール区に比べて遅い傾向が認められた。

5 齢 4 日から絶食した雄個体では、吐糸管着色が 5 齢 5 日に 1 個体、5 齢 6 日に 5 個体で観察された (図 3♂, 赤白塗り三角)。雌個体では、5 齢 6 日に 4 個体、5 齢 7 日に 2 個体で観察され (図 3♀, 赤白塗り三角)、雌雄ともにコントロール区に比べて早い傾向が認められた。

5 齢 5 日から絶食処理した雄個体では、吐糸管着色は 5 齢 6 日に 5 個体、5 齢 7 日に 1 個体で観察された (図 3♂, 青白塗り四角)。雌個体では、5 齢 6 日に 3 個体、5 齢 7 日に 3 個体で観察された (図 3♀, 青白塗り四角)。雌雄ともに、コントロール区に比べて早い傾向が認められた。

雌雄ともに 5 齢 2 日からの絶食で吐糸管着色する個体が生じたことから、雌雄に関係なく 5 齢 2 日に吐糸管着色のための最低体重に達すると考えられる。

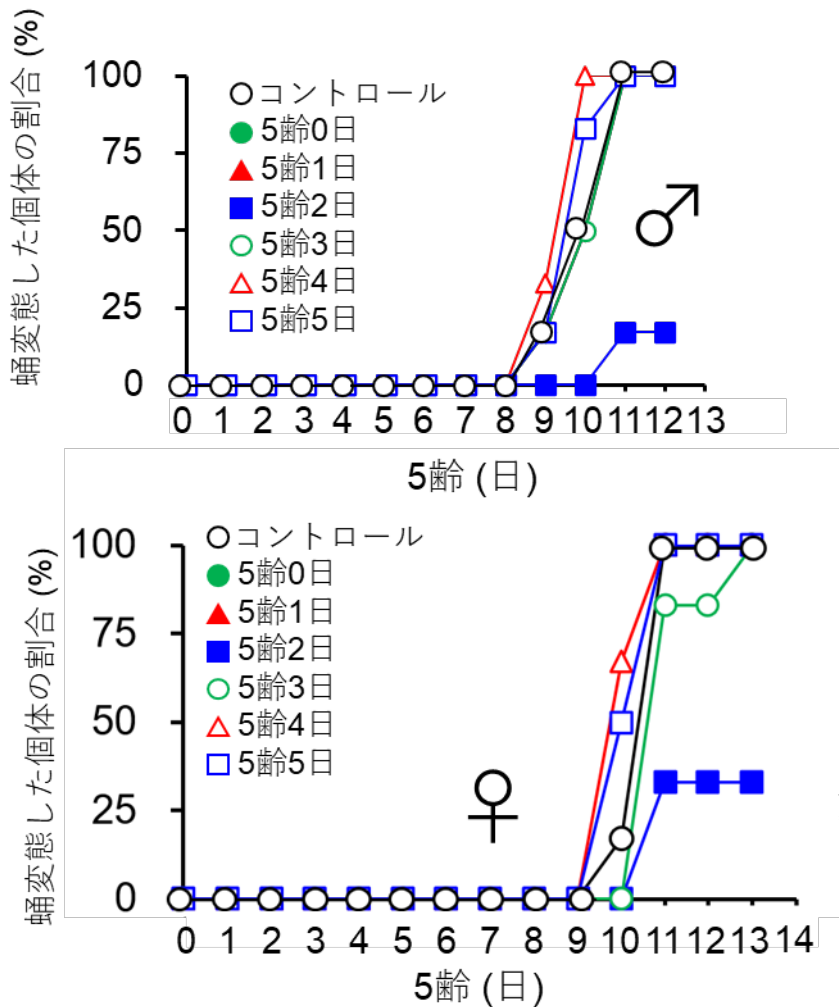


図4. 絶食処理の蛹変態への影響
5 齢 0 日から 5 日にかけて、1 日毎に絶食を開始し、蛹へ変態したかどうか毎日観察した。縦軸は、各発育日における各処理区で蛹の割合を示す。グラフ凡例に記載した発育日は、絶食開始日を表す。

2-3. 蛹変態

コントロール区では、雄は 5 齢 9～11 日に、雌は 5 齢 10～11 日に全ての個体が蛹変態した (図 4, 白丸)。また全ての蛹変態は、吐糸管着色 4 日後にみられた。

5 齢 0 日と 5 齢 1 日から絶食した個体は、雌雄ともに全ての個体が蛹変態しなかった (図 4, 緑丸、赤三角)。

5 齢 2 日から絶食した個体では、雄の場合は 1 個体のみが吐糸管着色から 4 日後の 5 齢 11 日に蛹変態した (図 4♂, 青四角)。雌の場合、2 個体が吐糸管着色から 3 日後の 5 齢 11 日に蛹変態した (図 4♀, 青四角)。吐糸管着色から変態までの期間は、雄はコントロールと同じであ

ったが、雌は 1 日短くなった。

5 齢 3 日から絶食した個体は雌雄ともに全て蛹変態した。雄の場合は、5 齢 9～11 日に蛹変態し (図 4♂, 緑白塗り丸)、そのタイミングは吐糸管着色 4 日後だった。雌の場合は 5 齢 7 日に吐糸管着色した 1 個体が、その 5 日後の 5 齢 13 日に変態し、残りの 5 個体は吐糸管着色から 4 日後の 5 齢 11 日に変態した (図 4♀, 緑白塗り丸)。また、5 齢 13 日に変態した個体の繭は他と比べて薄かったことから、うまく吐糸できなかったために発育が遅れたと考えられる。その個体を除き、雌雄ともに変態のタイミングは、コントロールと差は認められなかった。

5 齢 4 日から絶食した雄のうち、1 個体は吐

糸管着色から3日後の5齢9日に変態し、残りの5個体は吐糸管着色から4日後の5齢9～10日に変態した(図4♂, 赤白塗り三角)。雌の場合5齢10～11日に変態し、全ての個体で吐糸管着色から変態までの期間は4日後だった(図4♀, 赤白塗り三角)。雌雄ともに、変態のタイミングは、コントロールよりも早くなる傾向がみられた。

5齢5日から絶食した雄の1個体は、吐糸管着色から3日後の5齢9日、残りの5個体は4日後の5齢10～11日に変態した(図4♂, 青白塗り四角)。雌の場合、全ての個体が5齢10～11日に変態し(図4♀, 青白塗り四角)、そのタイミングは全て吐糸管着色から4日後だった。雌雄ともに、変態のタイミングは、コントロールよりも早くなる傾向がみられた。

雌雄ともに、蛹変態をする個体が、わずかながら5齢2日からの絶食個体で出現し、5齢3日からの絶食処理区では全ての個体に変態したことから、雌雄とも5齢2日～3日にかけて蛹変態に必要な最低体重に達することが示唆された。

考 察

以上の結果から、カイコガにおいてもCWとMVWを区別して観察することが可能であると考えられ、雄の結果をもとに図5にその概略をまとめた。5齢2日から個体を絶食させるとその半数で吐糸管着色は誘導されるが、蛹変態が誘導されなかったことから、この2つの現象は区別できることが明らかとなった。吐糸管着

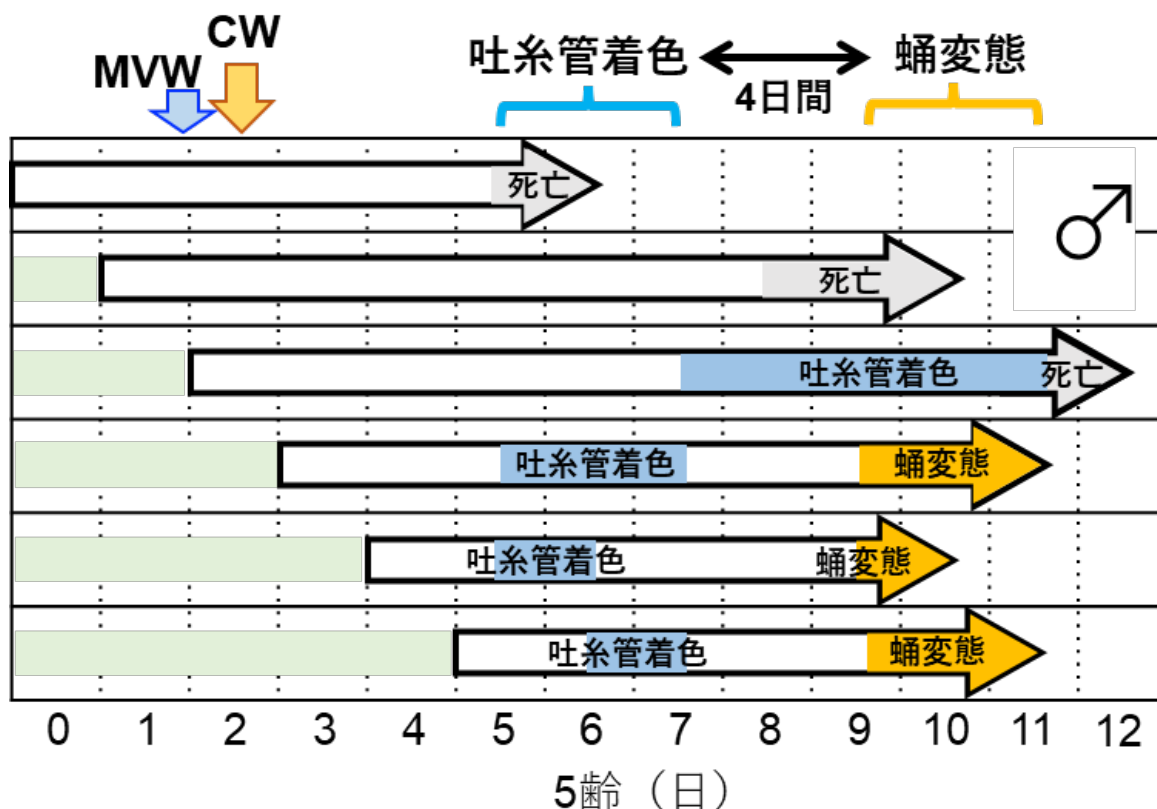


図5. 雄個体の結果から推定されるカイコガのMVWとCW

摂食期間を薄緑色で、横向き白矢印は、絶食期間を表す。大まかな吐糸着色と蛹変態の観察された時期を、それぞれ青色とオレンジ色で示す。十分に餌を食べている個体の吐糸着色と蛹変態のタイミングを、図の外上部に示した。本実験で得られた結果から想定されるMVWとCWの時期は、縦向き矢印で示した。

色を誘導するために必要な体重を MVW、蛹変態が誘導されるために必要な体重を CW と設定することで、カイコガも MVW と CW を分けて観察することが可能であると考えられる。河口ら (1991) は、5 齢 72 時間からの絶食において 92%の個体が営繭し、83%が蛹変態したと報告しており (河口ら、1991)、今回の報告と一致する。河口らは、絶食の営繭にかかる時間に与える影響については報告していなかったが、今回の 5 齢 2 日から絶食した結果から、絶食処理が吐糸管着色までにかかる時間を延長させる傾向を確認した。この結果は、絶食によって MVW の個体の変態にかかる時間が延長されるというタバコスズメガの MVW の特徴 (NIJHOUT, 1975) と一致し、吐糸管着色を誘導するために必要な体重を MVW と設定することの裏付けとなる。カイコガでは、幼虫が MVW に達するのは 5 齢 2 日、CW に達するのは 5 齢 2 日~3 日ごろであると考えられる。5 齢 2 日から絶食した個体において、吐糸管着色のみの個体と蛹変態に達した個体が混在していたことから、MVW と CW の体重が近接していることが示唆される。今回は用いた個体数が少なかったため、今後、より多くの個体を用いた絶食実験を行うことで、詳細な MVW と CW の体重の決定ができると考えている。

カイコガにおいて、CW 後に絶食すると、CW に達してから蛹変態までの時間が短縮されると報告されていた (CHEN and GU, 2006; KESHAN *et al.* 2015)。本研究では、5 齢 4 日以降に絶食を開始した実験区で蛹変態のタイミングが早まる傾向が認められた。これらの個体の多くで、吐糸管着色から蛹変態までの期間はコントロールと同じ 4 日であったことから、蛹変態のタイミングが早まったのは、主に吐糸管着色までの期間が短縮された結果だと考えられる。吐糸

管着色は体液中のエクジステロイド濃度の上昇によって引き起こされることから、吐糸管着色のタイミングが早まったのは、CW 後の絶食によって、エクジステロイド濃度上昇のタイミングが早まったためだと考えられる。このことは、5 齢 3 日から絶食を開始するとエクジステロイド濃度の上昇のタイミングは早くなるという以前の報告と一致する (CHEN and GU, 2006)。

カイコガでは、5 齢初期でも PTHH は放出され続けている (MIZOGUCHI *et al.* 2015)。また 5 齢 1 日から絶食処理しても、その 1 日後と 2 日後の脳は、4 齢 1.5 日の前胸腺を刺激するのに十分な PTHH を放出するとの報告 (CHEN and GU, 2006) があることから、MVW 以下の個体でも前胸腺を刺激するのに十分な量の PTHH が放出されていると考えられる。一方でカイコガの 5 齢初期の前胸腺は、JH により PTHH への応答とエクダイソン分泌活性が抑制されていると考えられている (GU *et al.* 1997; TAKAKI and SAKURAI, 2003)。これらのことから、カイコガでは、MVW を超えるまでは前胸腺は活性が低く PTHH 応答能も無いが、MVW を超えると前胸腺がエクダイソン分泌活性を回復し、吐糸管着色を生じる少量のエクダイソンを産生できるようになると考えられる。一方、CW を超えることで PTHH への応答性を獲得し、変態に十分なエクダイソンの産生が可能になると考えられるが、実験的な検証はいまだ不十分で、推察の域を出ない。今後、MVW と CW の体重を超えることで起こる前胸腺内での変化を解析することで、カイコガにおける蛹変態機構の解明に寄与できる。

今回の報告で、カイコガにおいてもタバコスズメガと同様に MVW と CW が異なる体重で存在することが示唆された。そこで今後、MVW

に達する前だと考えられる 5 齢 1 日暗期から、CW に到達する 5 齢 3 日明期の間で、様々な体重のカイコガ幼虫を絶食させることで、MVW と CW の値を明確にすることを旨指したい。

文 献

- CALLIER V. and NIJHOUT H.F. (2013): *Biol. Rev.* **88**: 944-954
- CHEN C.H. and GU S.H. (2006): *J. Insect Physiol.* **52**: 968-974
- GU S.H. et al. (1997): *Mol. Cell. Endocrinol.* **127**: 109-116
- 河口 豊ら (1991): *九大農学芸誌*, **45**: 135-143
- KESHAN B. et al. (2015): *Eur. J. Entomol.* **112**: 632-641
- 木口憲爾ら (1985): *蚕糸報*, **30**: 83-100
- MIRTH C.K. and RIDDIFORD L.M. (2007): *BioEssays*, **29**: 344-355
- MIRTH C. et al. (2005): *Curr. Biol.* **15**: 1796-1807
- MIZOGUCHI A. et al. (2015): *Insect Biochem. Mol. Biol.* **58**: 39-45
- NIJHOUT H.F. (1975): *Biol. Bull.* **149**: 214-225
- NIJHOUT H.F. (2015): *BMC Biol.* **13**: 57
- NIJHOUT H.F. and CALLIER V. (2015): *Annu. Rev. Entomol.* **60**: 141-156
- NIJHOUT H.F. and WILLIAMS C.M. (1974a): *J. Exp. Biol.* **61**: 481-491
- NIJHOUT H.F. and WILLIAMS C.M. (1974b): *J. Exp. Biol.* **61**: 493-501
- OHARA Y. et al. (2017): *PLoS Genetics*, **13**: e1006583
- RIDDIFORD L.M. and ASHBURNER M. (1991): *Gen. Comp. Endocrinol.* **82**: 172-183
- SAKURAI S. (1984): *J. Insect Physiol.* **30**: 657-664
- TAKAKI K. and SAKURAI S. (2003): *Insect Biochem. Mol. Biol.* **33**: 1189-1199
- XU L.C. et al. (2020): *Insect Biochem. Mol. Biol.* **119**: 103335

Cry トキシンレセプター結合評価系を用いた Cry3Aa トキシン殺虫活性機構の探索

平岩 玲奈・佐藤 昌直・浅野 眞一郎*
北海道大学大学院農学院

(2023 年 12 月 8 日受理)

ウエスタンコーンルートワーム (*Diabrotica virgifera virgifera*) は北米において主要なトウモロコシ害虫であり、常に防除が求められている。これまでに *Bacillus thuringiensis* (Bt) を用いた防除資材として Cry3Aa、Cry3Bb、Cry34/35Ab、eCry3.1Ab、mCry3A を発現する遺伝子組換えトウモロコシが開発され、商品化されてきた (TABASHNIK *et al.* 2009)。しかし、Bt 防除資材の標的昆虫が抵抗性を獲得する事例が多数報告されている (TABASHNIK *et al.* 2009)。ウエスタンコーンルートワームにおける抵抗性獲得の速度は速く、米国では 2003 年に Cry3Bb トウモロコシによる防除が開始されたが、2009 年には圃場で抵抗性が確認された。現在、商品化されている Bt トウモロコシすべてにおいて抵抗性が確認されている (GASSMAN and REISIG, 2023)。

Bt 防除資材の標的昆虫が Cry トキシンへの抵抗性を獲得する要因として、様々な Cry トキシン受容体遺伝子の変異が報告されている (宮本ら, 2013)。ウエスタンコーンルートワームは Cry3Aa に対する受容体分子として DvABCB1 を持つ。HEK293 細胞において ATP バインディングカセット (ABC) トランスポーターである DvABCB1 を

発現させ、Cry3Aa の溶解度増強バリエーションである IP3-H9 処理を行うと、容量依存的な細胞死が観察された。ウエスタンコーンルートワーム幼虫の RNAi による DvABCB1 ノックダウンにより、Cry3Aa トキシンの感受性低下が確認された (NIU *et al.* 2020)。Cry トキシン受容体分子は複数あるが、ABC トランスポーターを受容体とする Cry トキシンとして Cry1 に対する ABCC2、Cry2 に対する ABCA2 などが知られており (SATO *et al.* 2019)、Cry トキシン受容体の候補として検討されることが多い。標的昆虫の Cry トキシンへの抵抗性には ABC トランスポーターに生じたアミノ酸変異が関与すると報告されており (ATSUMI *et al.* 2012; LIU *et al.* 2021)、変異による構造変化が抵抗性の要因であると考えられている (HECKEL, 2021)。以上の知見から、Cry3Aa トキシンでも上記のように ABC トランスポーターの変異が抵抗性獲得の要因であると示唆される (NIU *et al.* 2020)。

本研究は、ウエスタンコーンルートワームの抵抗性獲得要因となっている DvABCB1 の変異箇所を同定し、抵抗性に対抗する新たな防除方法や防除資材を提案することを目的とした。そこで、Cry トキシンと受容体の相互作用による細胞損傷を蛍

*責任著者

〒060-8589 札幌市北区北 9 西 9

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

光観察により定量可能な ABC トランスポーター発現培養細胞を用いた系で、「トキシン感受性 DvABCB1 受容体とトキシンの相互作用による細胞死」と「トキシン抵抗性 DvABCB1 変異受容体とトキシンの相互作用消失による死細胞の減少」を比較した。抵抗性獲得要因のクリティカルな変異部分を同定するため、上述の系に用いるプラスミドに変異を導入し、変異受容体発現用プラスミドを作製した。変異導入箇所は、甲虫目と比較してより研究が進んでいる鱗翅目昆虫のカイコ (*Bombyx mori*)、アワヨトウ (*Mythimna separata*)、ツマジロクサヨトウ (*Spodoptera frugiperda*) の ABC トランスポーターのアミノ酸配列とのアライメントおよび先行研究 (ENDO *et al.*, 2018; SATO *et al.* 2019; NIU *et al.* 2020; LIU *et al.*, 2021) に基づき、細胞外ループ 4 (ECL4) 推定箇所内とした。Cry3Aa トキシンで処理した培養細胞の蛍光状態および生細胞数を感受性受容体 DvABCB1、変異受容体 DvABCB1ΔECL4 間で比較することで、抵抗性獲得の要因となっている DvABCB1 内の変異をアミノ酸レベルで検証した。

材料と方法

1. 供試菌株およびバクミド

北海道大学農学院応用分子昆虫学研究室保存の組換え体 Bt51/[pHY/IAaP-III A] (橋本ら, 1996)、p10-EGFP-Bacmid (NAKAISHI *et al.* 2018) を使用した。

2. 組換え AcMNPV の調製

2-1. 変異受容体 DvABCB1ΔECL4 作製におけるアミノ酸配列変異部位の検討

必要があった。DvABCB1 の配列は同定されているが、立体構造の配列中のどの箇所かは明らかにされていない。ウエスタンコーンルートワームが Bt トキシンに抵抗性を示す要因となるアミノ酸配列変異箇所を同定するため、より研究が進んでいる他の昆虫の ECL 配列での抵抗性要因変異箇所と比較し、変異導入箇所の決定を試みた。検討の過程は結果に示した。

2-2. 組換えバクミドの作製

DvABCB1-AcMNPV を作製するため、Bac to Bac Baculovirus Expression System (Invitrogen) を用いて、本研究室の所有する pFastBacDual (pFBD (Invitrogen))-DvABCB1-FLAG-EGFP (図 1) で DH10Bac を形質転換した。QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN) のマニュアルに従い組換えバクミドを抽出し、得られた組換えバクミドを DvABCB1-Bacmid とした。

また、DvABCB1 変異体発現ウイルス DvABCB1ΔECL4-AcMNPV を作製するため、上述の pFBD-DvABCB1-FLAG-EGFP をテンプレートとして pFBDΔECL4 プライマー (5'-CCGTTTTT TAGCATTTTGGGGACATTAGCAAATG G-3'、5'-AAAATGCTAAAAACGGGCATTCCA CAACCAAC-3')、KOD FX Neo (TOYOBO) を用いて Inverse PCR を行った。反応条件は 94 °C 2 分; 40 cycles (98 °C 10 秒, 68 °C 7 分 30 秒); 72 °C 2 分とした。得られた PCR 産物各 50 μL につき制限酵素 *DpnI* 1 μL を加え、37 °C で 2 時間反応させることで鑄型プラスミドを消化した。PCR 産物末端の相同配列を用いて SLiCE 法で連結し、DH5α を形質転換した。QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用い、抽出したプラスミドで DH10Bac を形質転換

した。QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN)を用いて組換えバクミドを抽出し、得られたバクミドを DvABCB1 Δ ECL4-Bacmid とした。変異の導入箇所は、シーケンシングにより配列を確認した。

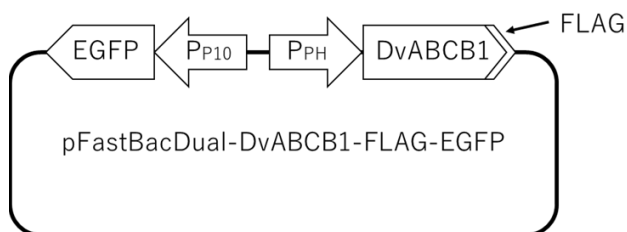


図 1. DvABCB1 発現用 pFBD-DvABCB1-FLAG-EGFP の構築図

DvABCB1: DvABCB1 遺伝子、EGFP: EGFP 遺伝子、FLAG: FLAG タグ、PP10: *p10* プロモーター、PPH: *polyhedrin* プロモーター

3. 組換えウイルスの作製

TC-100 (+)を用いて 26 °Cで培養している Sf9 細胞を TC-100 (-)で 2 回 wash して TC-100 (-)に培地を置換した。12 well plate (Greiner bio-one)に 0.5×10^6 個/well の密度で播種した Sf9 細胞に DvABCB1-AcMNPV、EGFP-AcMNPV、DvABCB1 Δ ECL4-AcMNPV を接種した。2 時間後上清を捨てて TC-100 (+)を加え、96 時間培養したのち GFP 蛍光を蛍光ユニット BT-ExMiBG (BioTools)を取り付けた倒立顕微鏡 BS-2090T (BioTools)を用いて倍率 100 倍で観察した。画像は E31SPM03100KPA (Toup View)を用いて取得した。

4. Bt51/[pHY/IaaP-III A]を用いた Cry3Aa の発現

Cry3Aa を発現するために作製された組換え体 Bt51/[pHY/IaaP-III A]を CYS 培地 (1% Peptone, 0.3% Yeast Extract, 39mM Glucose, 37 mM KH_2PO_4 , 0.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM CaCl_2 , 0.05 mM MnCl_2 , 0.05 mM ZnSO_4 , 0.05 mM FeCl_3) で 96 時間、30 °Cで培養し、

胞子形成を促した。Bt51/[pHY/IaaP-III A]を産生した胞子および結晶タンパク質を遠心分離 (5000 rpm, 10 分, 4 °C) によりペレットとして回収し、NaCl wash buffer (0.2 M NaCl, 0.2 M Tris, 2 mM EDTA pH 7-8)で懸濁し、遠心分離 (5000 rpm, 10 分, 4 °C) を行った。上清を捨ててバッファーとして 1×PBS (137 mM NaCl, 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 2.7 mM KCl, 1.8 mM KH_2PO_4)を加え、遠心分離 (5000 rpm, 10 分, 4 °C) によりペレットを得た。ペレットを純水で懸濁し、得られた Cry3Aa タンパク質懸濁液に、氷上で 0.5 M EDTA 100 μL , 100 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride 250 μL , 2-Mercaptoethanol 200 μL をそれぞれ加えて懸濁し、氷上に 30 分静置した。その後、2 M NaOH 1 mL を加えて遠心分離 (12500 rpm, 30 分, 4 °C) し、上清に HCl を溶液が白濁するまで加え塩析させ、これを Cry3Aa 溶液とした。得られた Cry3Aa を 10%アクリルアミドゲル SDS-PAGE に供試した。泳動したゲルは CBB 染色液 (0.25% CBB G-250, 45% Methanol, 9% Acetic acid) で染色したのち、CBB 脱色液 (5% Methanol, 10% Acetic acid) でバンドが確認できるまで脱色した。分子量マーカーとして Ez Protein Ladder (ATTO)を用いた。

5. 組換え AcMNPV 接種 Sf9 細胞と Cry3Aa トキシンの EGFP 蛍光観察による相互作用確認

TC-100 (+)を用いて 26 °Cで培養している Sf9 細胞を TC-100 (-)で 2 回 wash して TC-100 (-)に培地を置換した。12 well plate (Greiner bio-one)に 0.5×10^6 個/well の密度で播種し、DvABCB1 Δ ECL4-AcMNPV を接種した。またコントロールとして、DvABCB1-AcMNPV、EGFP-AcMNPV も同様に接種した。接種後 2 時間培養し、上清を捨てた後 TC-100 (+)1 mL/well を加えて 72 時間培養した。10

$\mu\text{L}/\text{well}$ の Cry3Aa 溶液と混合させ、10 時間後に蛍光ユニット BT-ExMiBG (BioTools) を取り付けた倒立顕微鏡 BS-2090T (BioTools) を用いて観察した。画像は、E31SPM03100KPA (Toup View) を用いて取得した。

結果と考察

1. 組換えウイルスの発現確認

1.1 変異受容体 DvABCB1 Δ ECL4 作製におけるアミノ酸配列変異部位の検討

これまで Niu *et al.* (2020)により、ウエスタンコーンルートワームと同様にコウチュウ目昆虫であるポプラハムシ (*Chrysomela tremulae*) は Cry3Aa トキシンに感受性を示すが、ポプラハムシの中には Cry3Aa トキシンに抵抗性を示す株も出現しており、その原因は受容体 CtABCB1 に生じたアミノ酸変異であり、DvABCB1 と CtABCB1 の細胞外ループ ECL4 はアミノ酸配列の相同性が高い。コウチュウ目では抵抗性獲得要因研究が進んでいないが、より進んでいる鱗翅目昆虫では ABC トランスポーター内の細胞外ループ構造 ECL4 でのアミノ酸配列変異が Cry トキシンの選択的結合に重要で

あるとされている。以上より、DvABCB1 においても ECL4 でのアミノ酸配列変異が抵抗性獲得要因となっている可能性があると考えられる。

鱗翅目昆虫のうちカイコ (*Bombyx mori*)、アワヨトウ (*Mythimna separata*)、ツマジロクサヨトウ (*Spodoptera frugiperda*) では、ABC トランスポーターが Cry トキシンの受容体であり、ECL 内のアミノ酸配列変異が標的昆虫の抵抗性獲得要因である。またアミノ酸配列および ECL ドメインの配列が明らかにされている (ENDO *et al.*, 2018; SATO *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2021)。これらのことから、カイコ BmABCC2、アワヨトウ MsABCC2、ツマジロクサヨトウ SfABCC2 のアミノ酸配列と DvABCB1 アミノ酸配列をアライメントした。カイコ BmABCC2 での 774-809 番の配列、アワヨトウ MsABCC2 での 768-810 番の配列、ツマジロクサヨトウ SfABCC2 での 769-811 番の配列と DvABCB1 の対応配列を探索し、DvABCB1 ECL4 ドメインを推定した。その結果、ECL4 推定箇所内において、上記の 3 受容体の ECL4 範囲は完全には一致していなかったため、3 受容体すべての ECL 範囲に該当する DvABCB1 中の 2140-2154 番の配列に変異導入範囲候補を設定した。

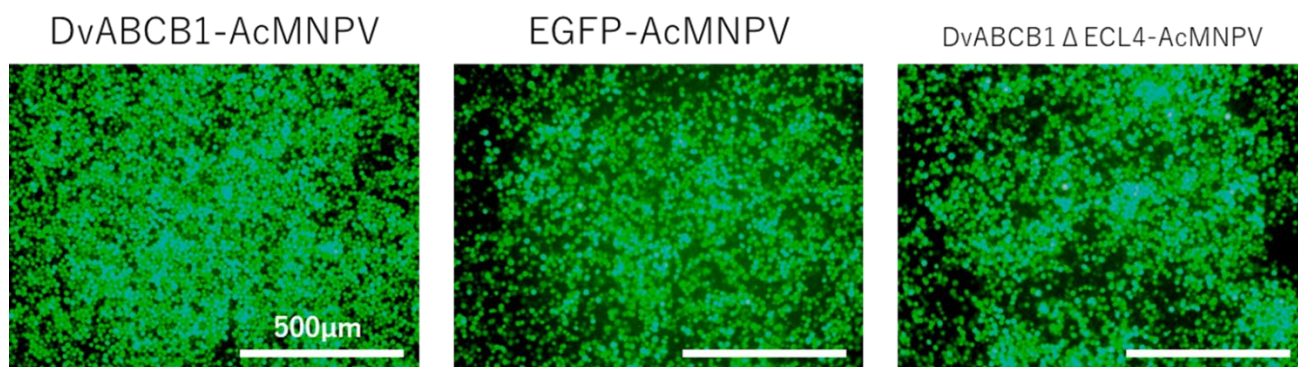


図 2. DvABCB1-AcMNPV、EGFP-AcMNPV、DvABCB1 Δ ECL4-AcMNPV 感染 96 時間後の Sf9 の観察
Sf9 細胞において、*p10* プロモーター由来の EGFP の発現を蛍光観察により確認した。

1.2 EGFP 蛍光観察による発現確認

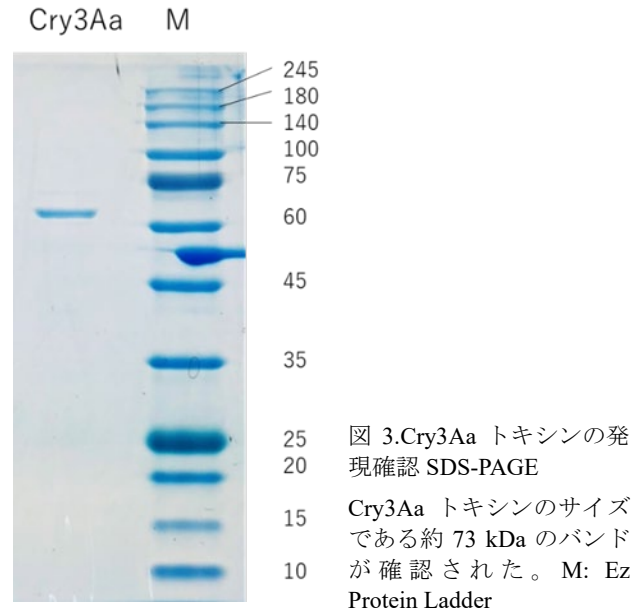
DvABCB1、DvABCB1 変異体の発現状況を確認するため、DvABCB1-AcMNPV、EGFP-AcMNPV、DvABCB1 Δ ECL4-AcMNPV 感染後 96 時間培養した Sf9 細胞を倒立顕微鏡で観察した。egfp 遺伝子はバキュロウイルスの感染後後期発現遺伝子である p10 遺伝子のプロモーター下流に導入しているため、EGFP が発現した細胞では、同じく感染後後期発現遺伝子である polyhedrin 遺伝子のプロモーター下流に導入した dvabcb1 遺伝子も発現していると仮定した (PENG *et al.* 2007; BAI *et al.*, 2019)。AcMNPV 感染のレポーター遺伝子である EGFP の蛍光を発する細胞が視野一面に観察された (図 2)。従って DvABCB1-AcMNPV、EGFP-AcMNPV、DvABCB1 Δ ECL4-AcMNPV の感染が視野全体で起きており、DvABCB1-AcMNPV、DvABCB1 Δ ECL4-AcMNPV 感染 Sf9 細胞では DvABCB1、DvABCB1 変異体が高い割合で発現していると考えられた。

2. Bt51/[pHY/IaaP-IIIa]を用いた Cry3Aa の発現

次に、DvABCB1-AcMNPV、DvABCB1 Δ ECL4-AcMNPV 感染 Sf9 細胞を用いて Cry トキシン添加による細胞損傷を試験するため、Cry3Aa トキシンを調製した。SDS-PAGE に供試した結果、Cry3Aa トキシンのサイズである 73 kDa のバンドが確認された (図 3)。

3. 組換え AcMNPV 接種 Sf9 細胞と Cry3Aa トキシンの相互作用観察

上記の調製トキシンとレセプターを用いてそれらの相互作用を暗視野にて蛍光細胞の観察により



評価した。DvABCB1 Δ ECL4-AcMNPV、DvABCB1-AcMNPV、EGFP-AcMNPV を播種し 72 時間培養した Sf9 細胞に Cry3Aa 溶液を混合し、10 時間後に蛍光位相差顕微鏡を用いて蛍光の維持および減少を観察した。その結果、DvABCB1 発現 Sf9 細胞では蛍光細胞数の減少が観察されたのに対し、DvABCB1 Δ ECL4 発現 Sf9 細胞では蛍光細胞数の維持が観察された (図 4)。この結果から、DvABCB1 の ECL4 に導入した変異により Cry トキシンとの結合が阻害されたことが明らかとなった。

4. ウエスタンコーンルートワームの抵抗性獲得要因

以上の結果より、本研究においてウエスタンコーンルートワームの抵抗性獲得要因となるアミノ酸配列変異箇所は、DvABCB1 中の 2140-2154 番の配列であると予想された。この結果を踏まえ、AlphaFold 2 (<https://alphafold.com/>)を用いて感受性受容体 DvABCB1、変異受容体 DvABCB1 Δ ECL4 の立体構造を予測し、得られた PDB ファイルを

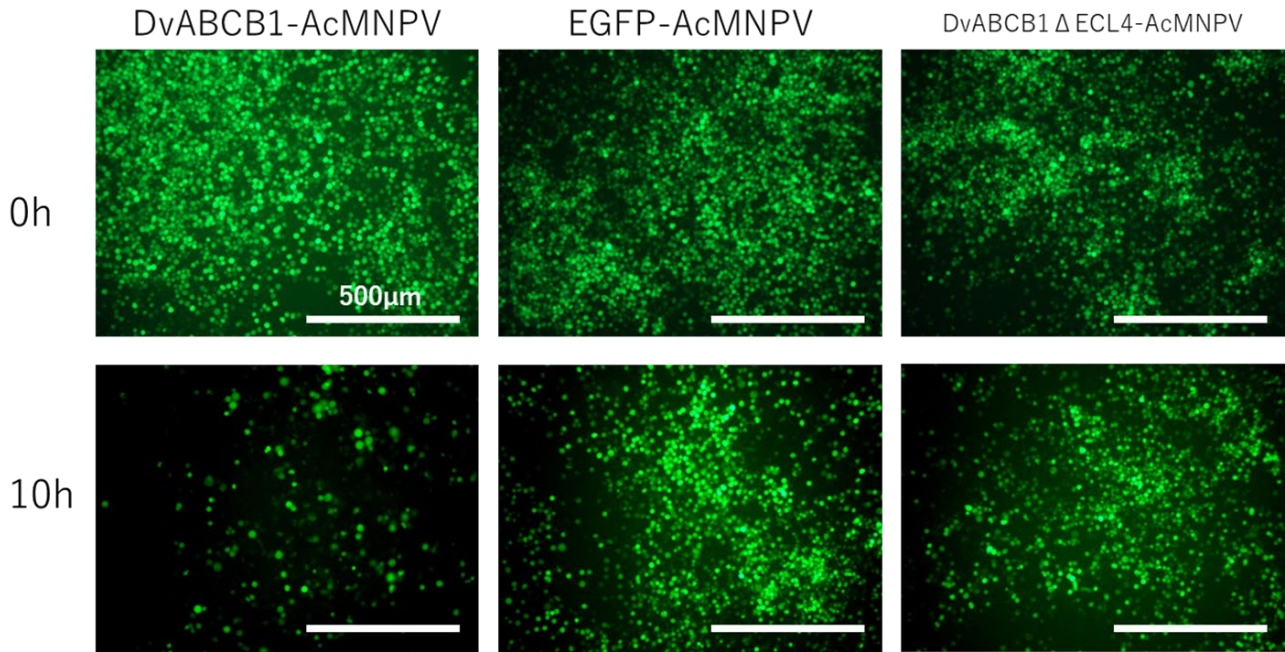


図4. DvABCB1-AcMNPV、EGFP-AcMNPV、DvABCB1ΔECL4-AcMNPV 感染細胞に Cry3Aa トキシン添加後（10 時間後）細胞の観察
 感染 72 時間後の Sf9 細胞に 10μL/well の Cry3Aa 溶液を混合させ、10 時間後に DvABCB1 発現細胞では蛍光細胞数が減少した一方、DvABCB1ΔECL4 発現細胞では蛍光細胞数が維持されていた。MOI=0.01。

PyMOL (<https://pymol.org/2/>)に供試した。立体構造をアライメントし、得られた RMSD 値は 0.413 Å であった。このことは、SATO *et al.* (2019)による先行研究の、変異体において ECL4 を含む膜貫通ドメインの構造には影響しないとの報告にも合致している。しかし先行研究において、ウエスタンコーンルートワームと同様に ABC トランスポーターが Cry トキシンの受容体として機能しており、また Cry トキシン抵抗性獲得要因が受容体変異である他の昆虫では、受容体変異箇所が 1 アミノ酸に絞られた報告もある (LIU *et al.* 2018)。つまり、本研究において変異受容体作製のため導入した変異範囲は過分である可能性がある。変異導入範囲を 1 アミノ酸単位で前後に操作した変異受容体を作製し、同様に Cry3Aa トキシンとの相互作用を比較することで、よりクリティカルな変異箇所の同定に繋がると期待できる。

文 献

- ATSUMI S. *et al.* (2012): Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **109**: E1591-E1598
 BAI H. *et al.* (2019): Virus Res, **273**: 197758
 ENDO H. *et al.* (2018): J. Biol. Chem, **293**: 8569-8577
 GASSMAN A. and REISIG D. (2023): Ann. Rev. Entomol, **68**: 31-49
 橋本直樹ら (1996): 日蚕雑, **65**: 185-191
 HECKEL D. (2021): Insects, **12**, 389
 LIU Y. *et al.* (2018): Insect Biochem. Mol. Biol, **100**: 59-65
 LIU Y. *et al.* (2021): Insect Biochem. Mol. Biol, **135**: 103608
 宮本和久ら (2013): 植物防疫, **67**: 27-34
 NAKAISHI Y. *et al.* (2018): J. Insect Biotech. Seric, **87**: 45-51
 NIU X. *et al.* (2020): Sci. Rep, **10**: 15830
 PENG Y. *et al.* (2007): J. Biotechnol, **131**: 180-187
 SATO R. *et al.* (2019): Toxins, **11**: 124

TABASHNIK B. *et al.* (2009): J. Econ. Entomol, **102**: 2011–2025

限性品種系統「黄白」における玉繭形成の条件検討

西出 雅成*・篠本 葉寧
北海道科学大学高等学校

(2023年12月11日受理)

1990年代にNHKで岡谷市の製糸所の特別番組が放映された。その番組で宮坂製糸所の宮坂輝彦さんは、玉繭からつくられる玉糸を手にとられ、その光沢と風合いのすばらしさを語られた。その一言が本研究の発端である。

当時は、「黄白」の人工飼料育研究を行っており、偶発的にできる玉繭には黄色系のものが多いという印象を持っていた。この記憶を20年ほど引きずって、最近年になり本研究を目論んだ。

玉繭(図1a)から紡がれた糸で作る絹織物(図

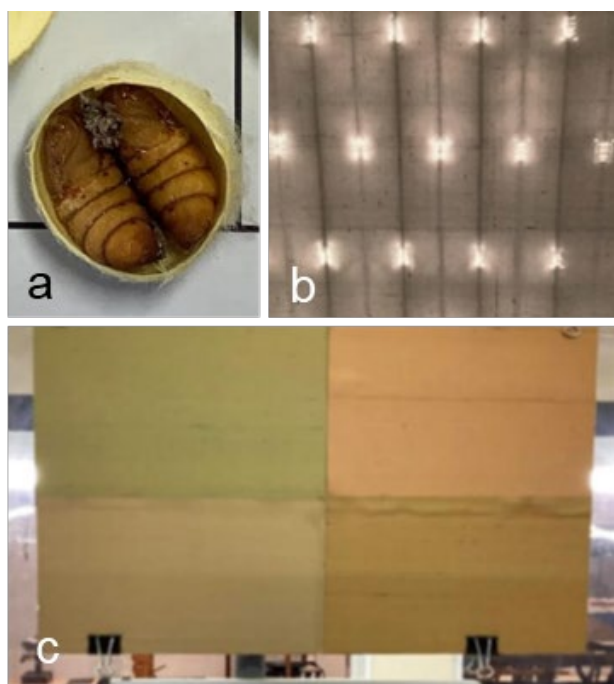


図1. 玉繭とその生産物

a: 「黄白」の玉繭; b: 絹織物; c: 絹壁紙 (bとcは岡谷蚕糸博物館より許諾を得て掲載)

1b)には、節があり風合いが醸しだされるため、絹壁紙(図1c)、高級織物やちりめんを使用される。しかし、偶発的にできる玉繭は少なく、楕円球や球形を呈さない場合がある。

玉繭多発系統のひとつとして「琉球多産繭」があげられる。この系統から育種された玉繭多発実用系統の「珠里丸」を用いて、飯塚ら(2015)が行った研究がある。玉繭用ボール簇で回転簇として上簇させた場合、「珠里丸」の玉繭率は60%を超える。一方、対照区とした「日137号×支146号」では、水平置きにした玉繭用ボール簇に蓋をして上簇させた場合でも玉繭率は20%強にとどまった(飯塚ら, 2015)。

本研究では玉繭多発系統由来ではない実用品種での効率的な玉繭生産を目指した。玉繭ができる最適条件の解明を目指して、簇のサイズや雌雄の組み合わせ、上簇のタイミングなどの条件を設定した。

材料と方法

本研究では、四元交雑の「黄白」[(日03号×日04号)×(中03号×中04号)]を市販の人工飼料(くわのはな:群馬県蚕糸技術センター)で25℃の飼育器(図2)にて飼育した。限性系統の「黄白」は、幼虫の脚の色ならびに繭色で雌雄を判別することができる(図3)。

飯塚ら(2015)に準じて本研究では、水平置き

*責任著者

〒006-0817 札幌市手稲区前田7条15丁目4-2

e-mail: t202003@hst.hus.ac.jp



図 2. 飼育台と飼育容器



図 3. 限性系統の「黄白」

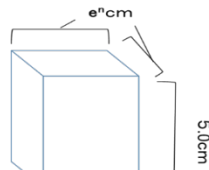


図 4. 蔎のサイズ

自作ボール蔎にガラス板で蓋をする上蔎方法を用いた。ボール蔎の深さは 5 cm とし、断面正方形の一边サイズを 5 つ設定した (図 4)。

つまり、ネイピア数 e に基づき① $e^{0.6} \approx 1$ cm、② $e^{0.8} \approx 2.2$ cm、③ $e^{1.0} \approx 2.7$ cm、④ $e^{1.2} \approx 3.3$ cm ならびに⑤ $e^{1.4} = 4.1$ cm とした。

結蔎率の調査実験 (実験 1) として、10 個体を上蔎できる各サイズの蔎 (図 5) を 10 セット用意して、雌雄ペアを 20 個体ずつ上蔎させた。

玉蔎形成に関する実験 (実験 2) には結蔎率が最高でかつ玉蔎形成も認められた④サイズのボール



図 5. 実験 1 の蔎と上蔎初期の様子

左 5 列が雄+雄ペア、中央 5 列が雄+雌ペア、右 5 列が雌+雌ペアの上蔎

蔎を用いた。縦 10 列×横 5 列の 50 区画の蔎を 3 セット自作した。雌雄の組み合わせを雄+雄 (♂♂)、雄+雌 (♂♀) および雌+雌 (♀♀) とした各 50 ペアを上蔎させた。

透明感のあらわれた熟蚕で給餌を停止し、吐糸の前兆である頭胸部を持ち上げ左右に振る行動が認められたタイミングで上蔎させた。繭が作られる様子は、Motion Activated Camera (Brinno MAC200DN) にて 2 秒間隔で撮影した動画観察を行った。

実験 2 で得られた玉蔎 (図 6) は、結蔎を確認してから数日後に繭を取り出し、個数、全繭重、長径ならびに短径を記録した。



図 6. 球形に近い玉蔎

熟蚕が確認されてからすべての個体が吐糸するまでの時間を計測したところ約 48 時間であったため、この時間で上蔎した「黄白」の玉蔎形成率を調査した (実験 3)。④サイズへの上蔎を熟蚕後 48 時間とした以外は実験 2 と同様に行った。

5 齢起蚕を 0 日として毎日雌雄別体重変化を調査するために、2023 年 4 月 28 日から 6 日間、午前 10 時に雌雄 180 個体を電子天秤 (EJ-610B) で測定した (図 7)。

さらに、実験 3 で得られた 5 齢起蚕後の体重変化に基づき各日齢における成長度合いを揃えた「黄白」を用いて、雄 ($3.90\text{g} \pm 0.20\text{g}$) および雌 ($4.75\text{g} \pm 0.15\text{g}$) の範囲で熟蚕 12、24 および 36 時間後の上蔎と玉蔎形成との関係を調査した (実験 4)。④サイズへの上蔎時間以外は実験 2 と同様に

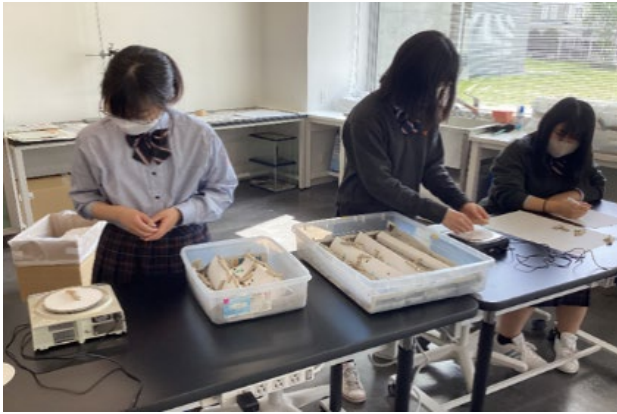


図7. 体重測定

実施した。ただし、実験4では雄+雌(♂♀)ペアの上蔭実験は行っていない。

結 果

実験1の④サイズにおいては事故により19ペアの上蔭にとどまったが、ほかの区では20ペアが上蔭できた。その結果、縦横サイズの増加に伴い、結繭率は高くなり④サイズで100%となった(表1)。ただし、最も大きな⑤サイズでは90%へと結繭率の低下が認められた。玉繭は、②、④および⑤にそれぞれ1つ認められるにとどまった。その他は、単独営繭であり、それらの繭サイズは、①で極めて小さく、②でも通常サイズに比較し小さくなった。⑤サイズで玉繭となった幼虫の一方は化蛹しなかった。

表1. 蔭サイズと結繭割合 (n=20 ペア)

蔭サイズ*	結繭率 (%)	玉繭数
① ($e^{0.6}$)	25	0
② ($e^{0.8}$)	80	1
③ ($e^{1.0}$)	75	0
④ ($e^{1.2}$)	100**	1
⑤ ($e^{1.4}$)	90	1

*蔭の正方形断面の1辺長
**事故により検体数はn=19

実験1で結繭率が100%を示した④サイズの蔭を用いて、上蔭実験(実験2)を行った結果、雄+

雄(♂♂)、雄+雌(♂♀)および雌+雌(♀♀)各50ペアにおいて、それぞれ27、32および34個の玉繭が得られた(表2)。このうちペアで化蛹した玉繭は、それぞれ24、30および30、一方が化蛹したのは(♂♀)の1ペアで、残るそれぞれ3、1および4繭では双方とも蛹になれない死にごもりであった。なお、ペアが別々に結繭した単繭は、20ペア(♂♂)、17ペア(♂♀)および12ペア(♀♀)で、すべての個体が蛹化した。

表2. 実験2の玉繭、化蛹および単繭ペア割合(n=50 ペア)

	玉繭率 (%)	玉繭の化蛹率*	単繭ペア率 (%)
雄+雄(♂♂)	54	88.89	40
雄+雌(♂♀)	64	93.75	34
雌+雌(♀♀)	68	88.24	24

*玉繭の中で2頭とも化蛹したもの

動画を確認したところ、吐糸タイミング(図5)は(♂♂)が最も早く、次いで(♂♀)、(♀♀)の順となった。玉繭の平均全繭重は、(♂♂) < (♂♀) < (♀♀)となった(表3)。なお長径と短径は(♂♂)、(♂♀)、(♀♀)の順にそれぞれ3.00 cm、2.99 cm、3.05 cmならびに2.48 cm、2.45 cm、2.48 cmであり長径/短径比はそれぞれ1.22前後となった(表3)。

表3. 実験2における玉繭の全繭重、長径-短径、長短径比

	玉繭数	全繭重平均(g) ±SD	長径-短径(cm) ±SD	長径/短径比
雄+雄(♂♂)	24	3.33 ± 0.28	0.52 ± 0.30	1.21
雄+雌(♂♀)	30	3.68 ± 0.46	0.54 ± 0.26	1.22
雌+雌(♀♀)	30	3.90 ± 0.63	0.57 ± 0.31	1.23

実験2では、繭づくりのタイミングが雌雄で異なっていたため、タイミングを揃えることに注目した。その過程で5齢幼虫の雌雄成長差を調査し

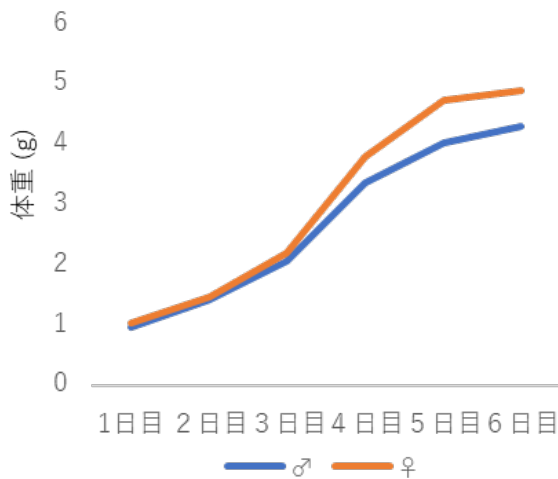


図7. 「黄白」における5齢起蚕後の体重変化

たところ、5齢起蚕から2日目までは顕著な差が認められなかった。雌雄体重差は3日目から現れ、6日目の雌雄の平均体重はそれぞれ4.89 gと4.29 gとなり雌が約0.6 g重くなった(図7)。5齢期間中に240頭に与えた人工飼料は3.84 Kgに達した。

熟蚕を確認した後、全頭が吐糸を開始するまでの時間は48時間と計測され、実験2の吐糸開始時間にもとづき実験3では、上簇48時間ですべての



図8. 熟蚕48時間で上簇させた「黄白」(実験3)

左2列が雄+雄ペア、中央2列が雄+雌ペア、右2列が雌+雌ペアの上簇

ペアを簇に入れ、ガラス板で蓋をした(図8)。

「黄白」(n=20ペア)における玉繭出現数は雄+雄(♂♂)、雄+雌(♂♀)および雌+雌(♀♀)それぞれ19、15および13個であった(表4)。このうち、(♀♀)の2ペアの一方が化蛹せず、死にござりとなった。単繭を形成したのは1ペア(♂♂)、5ペア(♂♀)ならびに5ペア(♀♀)で、(♀♀)では、双方が繭を形成しない2ペアも認められた。

表4. 実験3の玉繭、化蛹および単繭ペア割合(n=20ペア)

	玉繭率 (%)	玉繭の化蛹率* (%)	単繭率 (%)
雄+雄 (♂♂)	95	100	5
雄+雌 (♂♀)	75	100	25
雌+雌 (♀♀)	65	84.62	25

*玉繭の中で2頭とも化蛹したもの

実験3では熟蚕が吐糸を開始するまでの時間約48時間に結繭を開始させた。実験4では、それよりも上簇のタイミングを早めた場合の「黄白」における玉繭形成率の変化を調査した。ステージの揃った熟蚕を12時間、24時間もしくは36時間経過させてから、雄+雄と雌+雌の20ペアを上簇させ、ガラス板で蓋をした(図9)。



図9. 実験4での上簇

左(黄ラベル)が雄+雄ペア、右(白ラベル)が雌+雌ペア。上10列2行が12時間上簇、中10列2行が24時間上簇、下10列2行が36時間上簇。

雄+雄 (♂♂) ペアでは、12 時間と 36 時間後の上蔭で 9 個、24 時間後の上蔭で 5 個の玉繭形成が認められた。雌+雌 (♀♀) ペアでは、上蔭 12、24 ならびに 36 時間でそれぞれ 5、10 ならびに 8 個の玉繭が得られた (表 5)。

実験 3 の熟蚕 48 時間経過後の上蔭で得られた玉繭 19 (♂♂) と 13 (♀♀) に比べ、いずれのペアにおいても玉繭形成率は低い値であった。

表 5. 吐糸開始前の上蔭での玉繭形成割合(実験 4, n=20 ペア)

時間/ペア	12時間後上蔭 玉繭率(%)	24時間後上蔭 玉繭率(%)	36時間後上蔭 玉繭率(%)
雄+雄 (♂♂)	45	25	45
雌+雌 (♀♀)	25	50	40

考 察

実験 1 では、玉繭がほとんど形成されなかったものの、④サイズ (一辺 e1.2 cm 高さ 5 cm) の蔭が「黄白」の化蛹において比較的最適な条件と考えられた。実験 2 において④サイズの蔭を使用して玉繭形成率の向上をはかったところ、熟蚕からの上蔭タイミングが大きな影響を及ぼすと考えられた。

各区 50 ペアを用いた実験 2 では、雌雄の組み合わせによって玉繭形成率に差が生じる可能性を見出した (表 2)。動画による分析において吐糸タイミングは (♂♂) が最も早く、(♂♀)、(♀♀) の順になる傾向が観察され、吐糸タイミングが早い方ほど玉繭形成率が向上するとの関係が認められた。

動画観察により熟蚕 48 時間経過したところで、50 ペアすべてが吐糸することを確認した。この時間にペアで上蔭させる実験を行った (実験 3) ところ、雌+雌ペア (♀♀) 以外で玉繭形成率は向上した (表 4)。一方、熟蚕から 12 時間、24 時間もしくは 36 時間で上蔭させる (実験 4) と、(♂♂) と

(♀♀) いずれも熟蚕 0 時間の上蔭と考えられる実験 2 よりも玉繭形成率は低下した。この結果は一見相反すると判断されかねない。しかしながら、本研究では熟蚕後のペアの上蔭タイミングのみ注視して飼育環境 (温度、湿度、日長等の条件) の考慮が不足している。これは高校の施設という限られた設備での実験のため完全にそろえることは容易ではないことに起因する。ただし、測定は可能であるため、今後、飼育環境も測定して玉繭形成条件の設定を行ってゆきたい。

実験 3 の雄+雄ペアは吐糸開始からかなり時間を経過した後、上蔭させたと考えられる。吐糸後の上蔭が玉繭形成の条件ならば、通常熟蚕上蔭においては、雄同志の玉繭形成は限られるだろう。一方雌は、熟蚕で上蔭しても雄よりも玉繭になる率が高かった (表 2)。これが事実なら、通常の上蔭でもある程度玉繭が認められることになる。大胆に考えるならば、雄同士よりも雌を含むペアが玉繭になりやすいと言える。「黄白」における偶発的な玉繭に黄色が多いと感じたのはこうした所以かも知れない。

限性品種「黄白」において、偶発的にできる玉繭には黄色系のものが多いという 20 年ほど前の印象をより検討する方法として、雌雄による吐糸タイミング、5 齢起蚕後の体重差、熟蚕後の経過時間、蔭サイズについてより詳細に調査することで今後、玉繭形成の条件を明らかにしてゆきたい。

謝 辞

岡谷蚕糸博物館には、飼育と玉繭に関する情報ならびに撮影写真の論文掲載許諾をいただいた。この場を借りて感謝申し上げる。

文 献

飯塚哲也ら (2015): 日本シルク学会誌, 23: 37-40

人工飼料育によるボルバキア感染ならびに非感染キタキチョウの成長比較

佐原 健^{1*}・菊池 将騎¹・吉田 理央¹・飯沼 棕詞¹・村山 蒼悟¹・陰山 大輔²

¹岩手大学農学部・²農研機構

(2023年12月20日受理)

キタキチョウ (*Eurema mandarina*) はシロチョウ科の多化性種であり、北海道と東北北部の一部地域を除く日本全土に分布する。奄美大島以南に分布するミナミキチョウ (*E. hecabe*) と同一種と見なされていたが、Kato (2000) の報告以降、別種とされる。キタキチョウは、細胞質不和合を引き起こすボルバキア wCI の感染が認められる。1997～2000年の調査では、感染の北限は北関東あたりと推定されていた (Hiroki *et al.* 2005)。その後、2006年の調査では対馬を除く石垣島から盛岡までのすべての調査地点で 100%感染と報告された (Narita *et al.* 2007)。ただし、仙台での調査は行われていない。その前年に発表された Narita *et al.* (2006) には、仙台で採集した 2 個体がいずれも非感染であったと記されている。この論文を根拠として、Miyata *et al.* (2020) は、東北北部における非感染個体群の存在を図示している。我々は 2017 年に盛岡市と雫石町で非感染個体を確認し、北東北地域における感染と非感染キタキチョウ個体群の動態を継続的に調査している。

本研究では、2021 年以降の我々の調査ですべての個体がボルバキア感染であった仙台市の個体群と、すべての個体が非感染であった釜石市の個体群を用いて、人工飼料育における感染個体と非感染個体のパフォーマンスを調査した。

材料と方法

*責任著者

〒020-8550 盛岡市上田 3 丁目 18-8

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

1. 人工飼料作製

キタキチョウ幼虫飼育用人工飼料のベースには嗜好性原料未添加の食植生昆虫用インセクタ F-II (NOSAN) を用い、ネムノキ (*Albizia julibrissin*) 粉末を 30%添加した。ネムノキ葉は、2019 年 6 月につくば市にて採集した。細い枝付きの葉を 1 週間ほど風乾させた後、シリカゲルとともに 2 週間密封乾燥させた。乾燥葉は、細かな網の上に乗せ麺棒で挽き粉碎した。冷凍保存された粗粉末は、人工飼料作製時に液体窒素にて凍結させ、乳鉢と乳棒を用いてパウダー粉末にした。人工飼料作製は、加藤・坂倉 (1994) を参考に以下の通り行った。インセクタ F-II 粉末 35 g にサラダ油を葉さじ 1 杯加え攪拌した後、ネム粉末 15 g を加えてさらに攪拌し、0.25%プロピオン酸水溶液 130 ml を徐々に加え均質に混合した。混合された人工飼料をサララップで包み、株式会社オクト製ポリプロピレン容器 (EasyFlap 200ML) に入れた。この容器に蓋をして、家庭用蒸し器で 30 分間蒸した。蒸し終わると冷める前に速やかに攪拌し、再びサララップで包み、粗熱をとってから使用するまで冷蔵保存した。

2. キタキチョウ採集と産卵

飼育に供試したキタキチョウ幼虫は、野外採集した成虫雌の子供を用いた。非感染候補雌成虫は

2023年9月19日に釜石市唐丹町大曾根周辺（釜石個体群）にて採集した。感染候補雌成虫は、2023年9月24日に仙台市青葉区大倉岩下付近（仙台個体群）にて採集した。採集した雌成虫は、15個体前後を直径30 cmの円筒形昆虫ケージ（ $\phi 30 \times 35$ cm）（Norwind）にポット植えの緑化用メドハギ（紅大貿易株式会社）とともに入れ、産卵させた。産卵中は毎日2回、午前と午後にメッシュ状の天井部分にティッシュに含ませたポカリスエット（大塚製薬）を給餌した。

3. 幼虫飼育

孵化した幼虫は、スチロール角型ケース1型（ $36 \times 36 \times 14$ mm）（アズワン）に人工飼料とともに1個体を入れ、蓋をした。それらの飼育ケースは、プラスチックケース（ハイパック S-138, 株式会社エンテック）内に整列させ、湿らせたティッシュによる加湿を行い、常温の室内にて飼育した。

4. キタキチョウ生育と飼育環境の記録

化蛹日を記録した個体は、化蛹1~2日にEJ-123B パーソナル電子天秤（株式会社エー・アンド・ディ）にて体重を計測した。測定後、蛹を飼育ケースに戻し、羽化まで保護した。羽化個体は、孵化日を記録するとともに雌雄を判別した。飼育温度と湿度は、おんどとり ease（ティーアンドディ）により10分毎のデータを記録した。

5. DNA抽出

産卵後の雌個体は -25°C に冷凍保管して判定に供試した。DNA抽出は各個体の2脚から行った。 $\phi 1.5$ mmのジルコニアボール（ニッカトー）6個とSTE buffer（1.7 mM Tris (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0), 0.1 M NaCl）100 μl とともに1.5 ml プラスティックチューブに入れ、ビーズクラッシャー

（BEADS CRUSHER, TAITEC）にて3,200 rpm 60秒間破碎した。破碎後、0.4 mg/mlのProteinase K（Promega）で 50°C 30分処理した。処理後、 92°C 5分で酵素を失活させた。15,000 rpmで5分間遠心分離した上清をDNA溶液としてPCRに使用するまで 4°C で保存した。QuantusTM Fluorometer（Promega）のプロトコールに従って、抽出したDNA濃度を決定し、0.5 ngをPCRテンプレートに用いた。

6. PCRによるボルバキア感染判定

ボルバキア感染判定には、wsp81F（5'-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3'）ならびにwsp691R（5'-AAAAATTAAACGCTACTCCA-3'）のプライマーペアを用いたPCR（Zhou *et al.* 1998）により行った。本PCRによる増幅サイズは602 bpである。COI配列を増幅するプライマーペアCOI321F（5'-GATTTTTTGGACATCCTGAAG-3'）COI689R（5'-CTAAAATTACTCCTGTAAATCC-3'）（Kageyama *et al.* 2008）を用い、369 bpの増幅産物によりDNA抽出の確認を行った。NEB社製のTaq DNA polymerase（#M2073）を用い、 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るPCRを行った。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によるボルバキア感染判定を行った。

7. 統計検定

本研究の統計検定にはEZR（Kanda Y, (2013); https://toukeidesign.sozaiya-san.com/category/advance_stats）を用いた。

結果と考察

ボルバキア感染判定の結果、産卵に用いた釜石

表 1. 産卵親の感染率

	ポルバキア 非感染	ポルバキア 感染
釜石 (非感染個体群)	26	0
仙台 (感染個体群)	0	17

個体群雌 26 個体はすべて非感染、仙台個体群雌 17 個体はすべて感染であった (表 1)。このため釜石個体群ならびに仙台個体群それぞれの子を非感染ならびに感染個体群とした。

2023 年 9 月 26 日～28 日に孵化した感染 24 個体ならびに 2023 年 9 月 28 日～30 日に孵化した非感染 23 個体をネムノキ粉末入り人工飼料にて飼育した。すべての個体の孵化から羽化まで (2023 年 9 月 26 日～11 月 4 日) の飼育平均気温は 23.95 °C (中央値 24 °C、最高 27.9 °C、最低 19 °C)、平均湿度は 42.96% (中央値 42%、最高 63%、最低 32%)

表 2. 人工飼料育によるキタキチョウの生存率

	飼育個体数	化蛹率 (%)	羽化率 (%)
非感染個体群 (釜石)	24	83.33	85
感染個体群 (仙台)	23	86.96	90

であった。非感染および感染それぞれ 20 個体が化蛹し、それぞれ 17 個体 (雌 6、雄 11) と 18 個体 (雌 13、雄 5) が羽化した (表 2)。Fisher の正確検定の結果、非感染と感染個体群の化蛹率と羽化率には有意差が認められなかった。

表 3. 人工飼料育による非感染および感染キタキチョウのパフォーマンス

	雌雄	羽化数	蛹体重 (g) ±SD	孵化から蛹 (日) ±SD	蛹から成虫 (日) ±SD
非感染個体 (釜石)	♀	6	0.2±0.02	19.17±4.17	9.5±0.84
	♂	11	0.196±0.02	21.55±3.78	8.73±0.79
感染個体群 (仙台)	♀	13	0.205±0.03	16.77±1.92	10.31±0.48
	♂	5	0.201±0.19	17.6±1.82	8.8±0.45

羽化した個体の平均蛹体重、孵化から蛹までの日数、蛹から羽化までの日数を表 3 に示した。雄成虫はいずれの個体群でも夏型であったのに対し、雌は非感染の 1 個体を除き秋型であった。同一個体群内での雌雄比較 (t 検定) を行った結果、感染個体の蛹から羽化までの日数に有意差 ($p<0.00002$) が認められた。蛹から羽化までの平均日数は夏型で 8.71 ± 0.69 (SD) (雌 1、雄 16) と秋型の 10.17 ± 0.51 (SD) (雌 18) に対して有意に短かった (Mann-Whitney の U 検定, $p<0.000003$) ため、雄がすべて夏型、雌がすべて秋型の感染個体群で有意差が認められた可能性がある。ただし、秋型の羽化が夏型に比べて遅いか否かについては、非感染と感染個体群それぞれ、雌雄について夏型ならびに秋型を詳細に調査する必要がある。

雌雄間の有意差が認められなかった蛹体重ならびに孵化から蛹までの日数については、非感染と感染個体群間での統計検定を行った。平均蛹体重は、非感染が $0.197 \text{ g} \pm 0.021$ (SD)、感染が $0.204 \text{ g} \pm 0.021$ (SD) と有意差は認められなかった。一方、孵化から蛹までの平均日数は、非感染個体群 ($20.71 \text{ 日} \pm 3.96$ (SD)) が感染個体群 ($17 \text{ 日} \pm 1.88$ (SD)) よりも有意差に長かった (Welch 検定, $p<0.002$)。つまり、ネムノキ人工飼料で飼育した場合、キタキチョウ感染個体は非感染個体よりも成長パフォーマンスが良好であると示唆された。そこで、各個体の蛹体重を孵化から蛹までの日数で割って、日平均成長指数 (g/日) を算定した。非感染個体群は平均 9.87 ± 2.15 (SD)、感染個体群は平均 12.12 ± 1.60

(SD)であった。Mann-Whitney の U 検定を行ったところ、平均成長指数は感染個体群が有意に高かった ($p < 0.004$)。さらに、雌雄別に Kruskal-Wallis 検定 ($p < 0.02$) を行い、2 群間比較として Mann-Whitney の U 検定と Bonferroni の事後検定を行った結果、感染個体雌が非感染個体雄を上回るパフォーマンスを示した ($p < 0.01$)。一方、他の組み合わせには

有意差が認められなかった (図 1)。これらの結果により、キタキチョウ感染個体の成長高パフォーマンスには雌雄差が影響する可能性が残された。今後、飼育サンプル数を増やすとともに雌雄個体数差の少ないデータによる比較を行うことで、はっきりとした結論が得られることが期待される。

文 献

- Hiroki M. *et al.* (2005) *Evol. Ecol. Res.*, **7**: 931-942
 Kageyama D. *et al.* 2008 *Microb. Ecol.*, **56**: 733-741
 Kanda Y. (2013) *Bone Marrow Transplant*, **48**: 452-458
 Kato Y. (2000) *Zool. Sci.*, **17**: 539-547
 Miyata M. *et al.* (2020) *Ecol. Evol.*, **10**: 8323-8330
 加藤義臣・坂倉文人 (1994) *蝶と蛾*, **45**: 21-26
 Narita S. *et al.* (2006) *Mol. Ecol.*, **15**: 1095-1108
 Narita S. *et al.* (2007) *Genome*, **50**: 365-372
 Zhou W. *et al.* (1998) *Proc. Royal Soc. Lond. B*, **265**: 509-515

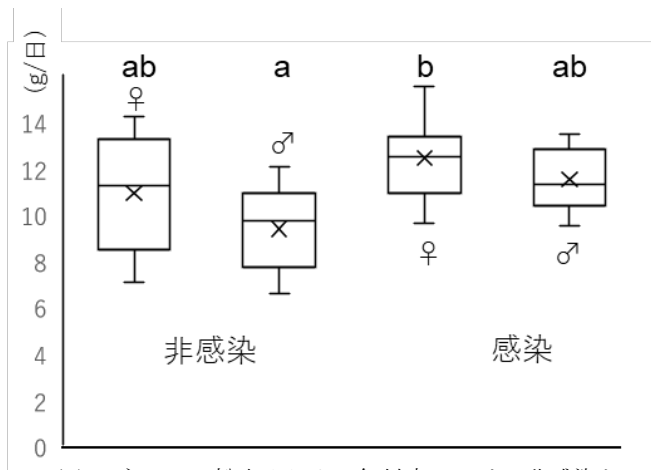


図 1. ネムノキ粉末入り人工飼料育における非感染と感染キタキチョウの成長指数×: 平均値; a, ab, b: 異なるアルファベットに有意差あり。

BmN 細胞における人工レセプターを介した膜融合系の評価

本田 楓・浅野 眞一郎・佐藤 昌直*
北海道大学農学院

(2023 年 12 月 25 日受理)

ウイルスは自己増殖が不可能であり、自身の遺伝情報を複製し子孫ウイルスを産生するためには宿主細胞への侵入を行わなくてはならない。脂質二重膜をもつウイルスは細胞表面の糖タンパク質を介して特定の細胞表面分子（レセプター）に結合する。その後、ウイルスエンベロープと宿主細胞膜が膜融合し、ウイルス粒子を細胞内に輸送して感染を進行させる。膜融合の機構はウイルスによって異なり、構造的基準により主に 3 つのクラスに分類される。クラス I 膜融合タンパク質にはインフルエンザウイルスのヘマグルチニン (HA) や麻疹ウイルスの F タンパク質が属し、もっともよく研究されているグループである。クラス I 膜融合タンパク質は、コイルドコイルの安定した棒状構造にフォールディングされた三量体の *prefusion* 構造として折り畳まれている。*prefusion* 構造はレセプター結合や低 pH 等のトリガーにより *postfusion* 構造へと不可逆的に構造変化する。ダニ媒介脳炎ウイルスの融合タンパク質 E などが属するクラス II 膜融合タンパク質は、*prefusion* および *postfusion* の立体構造の両方が三量体であるクラス I 融合タンパク質と異なる。 β シートで構成される準安定な融合前の二量体が低 pH によって安定なホモ三量体へ変化し *postfusion* 構造へと不可逆的に構造変化する。水泡口炎ウイルス (VSV) の G タンパク質の構造の発見 (ROCHE *et al.* 2006) により分類されたクラス III の膜融合タンパク質は、 α ヘリッ

クスと β シートの両方を備えた三量体であり、融合による構造変化はクラス I と II とは異なり、可逆的である (WHITE *et al.* 2023)。VSV の G タンパク質単体で膜融合能 (シンシチウム形成能) を持つことが明らかとなり (JEETENDRA, 2002)、膜融合能とウイルス感染能の関係を検証したところ、ウイルス膜融合タンパク質発現による宿主膜融合能がウイルス膜と宿主膜の融合を介するウイルス感染能と相関していた (JEETENDRA, 2003)。

哺乳動物に感染するウイルスの膜融合メカニズムは、他の生物に感染するウイルスのそれらよりも研究が進んでおり、膜融合タンパクにおけるウイルス因子 (リガンド) と宿主のレセプター間の特異性を改変する段階まで研究が進んでいる。

NAKAMURA *et al.* (2005) は人工リガンドレセプターによって抗体特異的な膜融合機構を作り出し、麻疹ウイルス (MV) の侵入を制御することに成功している。MV はエンベロープ上にヘマグルチニン (H) タンパク質と融合 (F) タンパク質という 2 種類の糖タンパク質を持っている。H タンパク質は宿主細胞膜上のレセプターに結合し、その後三量体 F タンパク質が *prefusion* 形態から *postfusion* 形態へと構造変化する、ウイルスと細胞の膜融合が起こる (LIN and RICHARDSON, 2016)。Nakamura *et al.* (2005) は H タンパク質レセプター

*責任著者

〒060-8589 札幌市北区北 9 西 9
satou@agr.hokudai.ac.jp

である SLAM や CD46 との結合に必須なアミノ酸残基を置換して結合性を低下させ、代わりに結合部位として 6×His (His タグ) を提示するように融合した。この改変 H タンパク質を発現する MV は抗 His タグ抗体を細胞膜上に発現する細胞のみへ侵入し、MV のトロピズム改変が可能となった。昆虫ウイルスでのトロピズム改変はほとんど例がない。昆虫細胞 Sf9 は SLAM や CD46 を持たない。KITAGAWA *et al.* (2005) は、H レセプター SLAM や CD46 を提示する組換え Autograph californica multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) の AcMNPVΔgp64/ SLAM や AcMNPVΔgp64/ CD46 では、MV の H、F を発現させた Sf9 細胞に対し、リガンド指向的なウイルストロピズム改変が成立することを示した。この研究は昆虫細胞での MV の H、F を介した侵入メカニズムを昆虫細胞にも移植できることを示した。本研究では KITAGAWA *et al.* (2005) が示した、MV の H、F を介した AcMNPV でのリガンド指向的な侵入機構を、より人工的な侵入メカニズムとしてさらに発展させるべく、NAKAMURA *et al.* (2005) の抗体を介した系が昆虫細胞で機能しうるかを検討した。

材料と方法

表 1. プライマー一覧

プライマー名	配列
H_fwd	5'- AGAACTCACACACAAAGCTCAAAAATGTCACCACAACGAGACCGG -3'
H_rev	5'- TTAGCTATTACACACAAGGCAGTCGACTTAGTGATGGTGATGGTGGGCAGGCTGAGCGGCCCTCCCTCGAT -3'
F_fwd	5'- AAGAAGAACTCACACACAAAGCTCGATGGGATTAAGGTGAATGT -3'
F_rev	5'- AGCTATTACACACAAGGCAGTCGACCTTAGAGACTTCGCACATAGCT -3'
pSK_H・His6/F_fwd	5'- ATTTACTCGAGGGGGGGCCCGTACGAGCTCTTACGCGTGCTAGC 3'
pSK_H・His6/F_rev	5'- TACGACTCACTATAGGGCGAATTGGCTCGAGTAAATCTATAGTCG -3'
pBac_H・His6/F_fwd	5'- TCTGTTTCAATTTAAAGCTTGGTACATGTCACCACAACGAGAC -3'
pBac_H・His6/F_rev	5'- TTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAGATTTAGAGACTTCGCACATAG -3'
αHis6_fwd	5'- AAGAAGAACTCACACACAAAGCTCGATGGAGACAGACACACTCCT -3'
αHis6_rev	5'- AGCTATTACACACAAGGCAGTCGACCTAACGTGGCTTCTTCTGCC -3'
mScarlet-I_fwd	5'- TTGAACAGCATCTGTTTCAATTTAAATGGCCTCACCGTTGACCCG -3'
mScarlet-I_rev	5'- TTAGGGATAGGCTTACCTTCGAACCTAGTACAGCTCGTCCATGC -3'

1. pBac-H::6×His-F-NLS::GFPpSK-αHis6-mCD8::mScarlet-I の作製

MV-H タンパク質の ORF は、pTNH6-H (NAKAMURA *et al.* 2005) をテンプレートに、C 末端に 6×His タグを付加するように設計した H_fwd/rev プライマーペア (表 1) で PCR により増幅した。この断片を、*Bam*HI と *Pst*I で制限酵素処理し gp64^{T3} を除いた pSK-gamillus-gp64^{T3} (関口, 2023) の SK16 プロモーター (小島・伴戸, 2020) 下流に SLiCE (MOTOHASHI *et al.* 2015) を用いたクローニングにより pSK-H::His6 を作製した。MV-F タンパク質は人工合成 DNA (GenScript) をテンプレートに F_fwd/rev プライマーペア (表 1) で PCR 増幅した。この断片を *Bam*HI と *Pst*I で制限酵素処理し、gp64^{T3} を除いた pSK-gamillus-gp64^{T3} の SK16 プロモーター下流に SLiCE を用いてクローニングした (pSK-F)。pSK-H::His6 の SV40 ターミネーター下流にある *Kpn*I で制限酵素処理し、pSK_H・His6-F_fwd/rev プライマーペア (表 1) で PCR 増幅した。pSK-F のプロモーターからターミネーターまでの領域 (SK16 プロモーター、F、SV40 ターミネーター) を、SLiCE を用いてクローニングし、pSK-H::His6-F を得た。また、pSK-H::His6-F の H::His6、SV40

ターミネーター、SK16プロモーター、Fまでの領域を pBac_H・His6-F_fwd/Rev プライマーペア (表1) でPCR増幅した。この断片を *KpnI* と *EcoRV* で制限酵素処理し、CeSID1を除いた pBac IE2-CeSID1_GFPzeo (MON *et al.* 2012) の OpIE2プロモーター (THEILMANN and STEWART, 1992) 下流に SLiCE を用いてクローニングした。その結果得られた pBac-H::His6-F-NLS::GFP は、OpIE2プロモーターから H・His6 を、SK16プロモーターから F を、OpIE1プロモーター (THEILMANN and STEWART, 1991) から核局在シグナル (NLS) 融合 GFP をそれぞれ発現する。

抗 His タグ抗体は、pDisplay- α His6 (NAKAMURA *et al.* 2005) をテンプレートに膜貫通ドメインを含む領域を α His6_fwd/rev プライマーペア (表1) でPCR増幅した。*BamHI* と *PstI* で制限酵素処理し gp64^{T3}を除いた pSK-gamillus-gp64^{T3} の SK16プロモーター下流に SLiCE でクローニングした。さらに、pSK-gamillus-gp64^{T3} を *HindIII* と *SacII* で制限酵素処理し、NLS::gamillus を除き、pSKp:mCD8::mScarlet-I をテンプレートに mScarlet-I_fwd/rev プライマーペア (表1) でPCR増幅した膜局在シグナル (mCD8) 融合 mScarlet-I を OpIE2プロモーター下流に

SLiCE を用いてクローニングし、pSK- α His6-mCD8::mScarlet-I を作製した。PCRによる伸長は全て PrimeSTAR Max DNA Polymerase (TaKaRa) を用いて行った。PCRの反応条件は 98 °C 2 分の後、98 °C 10 秒、55 °C 5 秒、72 °C 5 秒を 30 サイクル行い、72 °C 5 分とした。

2. トランスフェクション

12 ウェルプレート (Iwaki) に 1 ウェルあたり 4×10^5 細胞の BmN 細胞を播種した。トランスフェクションには、pBac-H::His6-F-NLS::GFP のみ 1 μ g または pBac-H::His6-F-NLS::GFP と pSK- α His6-mCD8::mScarlet-I を 1:1 の割合で混合した DNA 2 μ g に、Avalanche-Everyday Transfection Reagent (EZ biosystems) 3 μ l と TC-100 培地 (Gibco) 100 μ l を混合した導入試薬を使用した。これら試薬を細胞に添加した後、26 °C でインキュベートし、トランスフェクションを開始した。12 時間後、上清を抜き取り、10% FBS (Biosera) を含む TC-100 培地に交換し、この時間をトランスフェクション 0 時間とした。

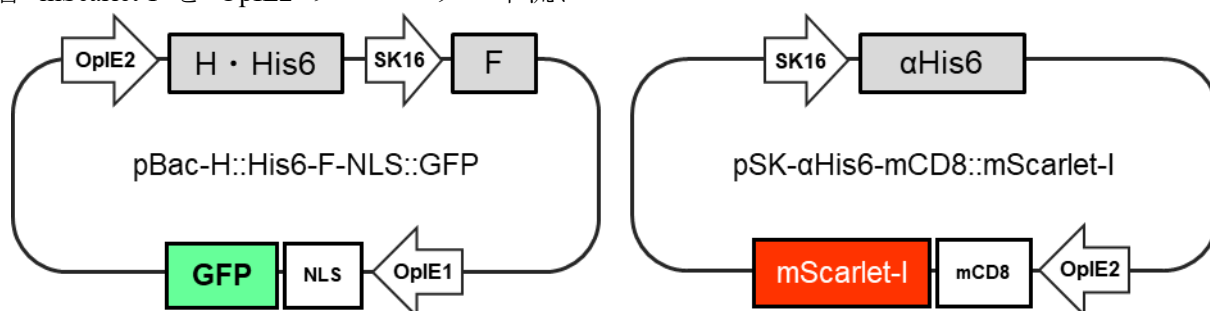


図 1. 本研究で用いた 2 種のプラスミド

pBac-H::His6-F (::は融合タンパク質であることを示している)は、MV-H タンパク質と 6xHis タグの融合タンパク質を *Orgyia pseudotsugata* nucleopolyhedrovirus Immediate early gene 2 promoter (OpIE2) から発現し、麻疹ウイルス F タンパク質を SK16 プロモーターから発現する。また、pBac-H::His6-F はレポーターとして核局在シグナル (NLS) 融合 GFP を *Orgyia pseudotsugata* nucleopolyhedrovirus Immediate early gene 1 promoter (OpIE1) から発現する。pSK- α His6 は抗 His タグ抗体 (α His6) を SK16 プロモーターから、膜局在シグナル (mCD8) 融合 mScarlet-I を OpIE2 プロモーターから発現する。図の矢印はプロモーターを表している。

3. 膜融合観察

トランスフェクション 48 時間後、共焦点レーザー顕微鏡 TCS SP5 (Leica) で pBac-H::His6-F-NLS::GFP のみをトランスフェクションしたコントロールと、pBac-H::His6-F-NLS::GFP および pSK- α His6-mScarlet-I をコトランスフェクションした細胞についてランダムに各 5 視野を撮影した。得られた蛍光画像から、核局在する GFP 蛍光と膜局在する mScarlet-I を指標とし、mScarlet-I ラベルされた細胞膜に囲まれた領域内に GFP ラベルされた核を 2 個以上含む細胞をシンシチウムと定義した。各画像でシンシチウム形成細胞数とそれ以外の GFP 発現細胞数をカウントし、シンシチウム形成率を膜融合効率として算出した。また、MV の F タンパク質は 37 °C での膜融合活性が促進され、25 °C では膜融合を誘導しないことが報告 (WATANABE *et al.* 2015) されているため、本研究では 26°C と 37°C で膜融合試験を実施し、膜融合効率の比較と温度の BmN 細胞の生育への影響を評価した。

4. 統計解析

膜融合試験で得られた GFP 発現細胞、核を 2 個以上含む GFP 発現細胞の数に以下の一般化線形モデルを当てはめ、各条件における核が複数個含まれる GFP 発現細胞 (シンシチウム) 数の割合を推定した。

$$S_{ijkl} \sim T_i + P_j + T : P_{ij} + offset + (R_k | I_l) + \varepsilon_{ijkl}$$

S、T、P、R、I、 ε はそれぞれシンシチウム数、温度条件、プラスミド条件、反復、画像、残差を示している。

Offset は自然対数で変換した GFP 細胞数である。モデルフィッティングは、R および lme4 パッケージ内 glmer 関数を用いて行なった。

結果と考察

26 °C で pBac-H::His6-F-NLS::GFP と pSK- α His6-mScarlet-I (図 1) をコトランスフェクションした結果、核を複数内包した細胞が観察された (図 2)。これらには核の数が 3 個以上あり、2 個の核を持つ分裂中の細胞とは明らかに異なるシンシチウムが含まれた (図 2 a)。核数が 2 個の細胞については分裂中の細胞とシンシチウムを厳密に区別できない (図 2b,c)。そのため、核数が 2 個と 3 個以上の細胞を分け、pBac-H::His6-F-NLS::GFP と pSK- α His6-mScarlet-I のコトランスフェクション依存的にシンシチウム形成がなされたか統計的に検定した。シンシチウム形成細胞を応答変数、GFP 蛍光細胞数、温度、トランスフェクション条件、温度とトランスフェクション条件の交互作用を説明変数とした一般化線形モデルを当てはめ、膜融合効率を推定した。その結果、核の個数が 2 個の細胞では、膜融合効率の推定値は 26 °C で pBac-H::His6-F-NLS::GFP と pSK- α His6-mScarlet-I のコトランスフェクションした条件で pBac-H::His6-F-NLS::GFP のみのトランスフェクションに比べ 1.46 倍高かった ($p=0.0012$) (図 3a)。この結果から、pBac-H::His6-F-NLS::GFP と pSK- α His6-mScarlet-I のコトランスフェクション条件での核数 2 個の細胞は細胞分裂中の細胞に加え、シンシチウムが形成されている可能性が示唆された。分裂中の細胞との区別できる核数が 3 個の細胞では、pBac-H::His6-F-NLS::GFP と pSK- α His6-mScarlet-I のコトランスフェクションした条件で pBac-H::His6-F-NLS::GFP

のみのトランスフェクションに比べ 5.38×10^8 倍高かった ($p=4.38e^{-8}$) (図 3a)。3 個以上でも同様に pBac-H::His6-F-NLS::GFP と pSK- α His6-mScarlet-I のコトランスフェクションした条件で pBac-H::His6-F-NLS::GFP のみのトランスフェクションに比べ 713 倍高かった ($p=0.0084$) (図 3a)。また、37 °Cでの pBac-H::His6-F-NLS::GFP と pSK- α His6-mScarlet-I のコトランスフェクション条件では膜融合した細胞の割合が、核の数が 2 個の細胞において、26 °Cの培養条件に比べ 2 倍高くなった ($p=1.86e^{-6}$) (図 3a)。37 °Cにおける、コトランスフェクション条件と H::His6、F のみトランスフェクションした条件では 3 個、および 3 個以上の核を含む細胞についての検定は温度条件による有意な差は見られなかった(それぞれ $p=0.1135$ および $p=0.7526$) が、次に述べる統計モデリング上の問題から差が実際には大きい可能性は否定できない。これら条件では pBac-H::His6-F-NLS::GF のみのトランスフェクションで観察されたシンシチウム数は

0 であった (図 3a) が、統計モデルによる推定ではゼロではない小さな値が推定され、加えて大きな標準誤差が推定されている。この推定精度の問題を緩和し、本研究におけるトランスフェクション条件、温度条件について結論を出すために、シンシチウム細胞の数を合計し、核数が 2 個以上の細胞の合計値で検定を行った。26 °Cかつ pBac-H::His6-F-NLS::GFP と pSK- α His6-mScarlet-I のコトランスフェクション条件で pBac-H::His6-F-NLS::GFP のみに比べ 1.69 倍高く、最も高いシンシチウム形成率は 37 °Cかつコトランスフェクションした条件で観察される結果となった (図 3b)。哺乳類細胞では、野生型 MV の F タンパク質が 37 °Cの条件下で融合前 F タンパク質の三量体の構造が不安定化され、融合活性を促進することが示唆されており (WATANABE *et al.* 2015)、本研究の BmN 細胞でも 25 °Cよりも 37 °Cで膜融合効率が高かった。一方、WATANABE *et al.* (2015)は、哺乳類細胞において 25 °Cで膜融合を誘導できない結果を

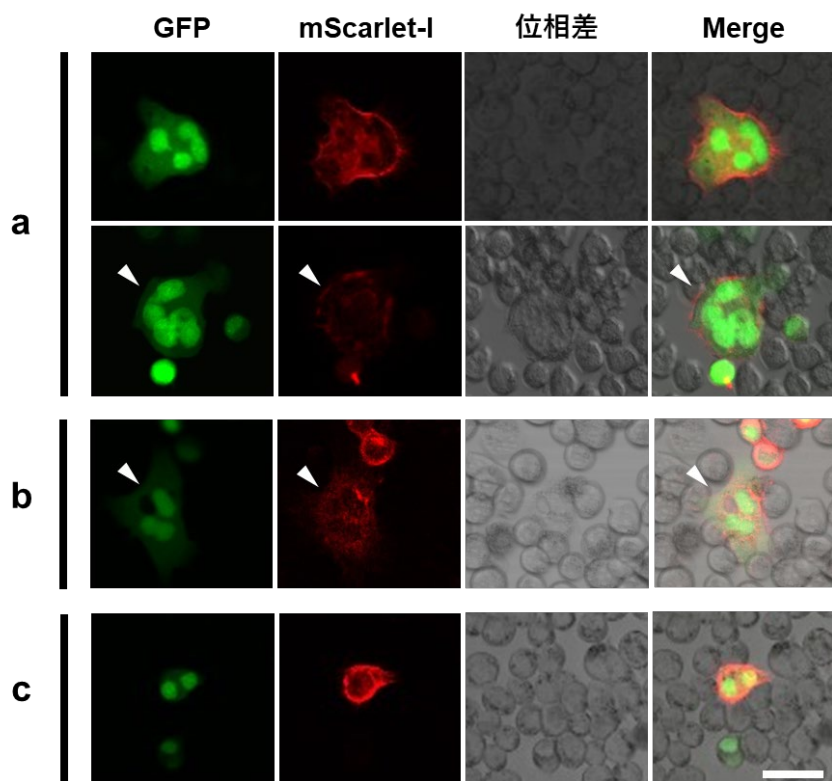


図 2. シンシチウムの判定基準となる細胞

トランスフェクション 48 時間後に、共焦点レーザー顕微鏡で撮影を行った。蛍光画像は明視野画像 (位相差) とともに撮影し、重ね合わせて示している (merge)。スケールバーは 50 μ m。a: pBac-H::6 \times His-F-NLS::GFP と pSK- α His6-mCD8::mScarlet-I のコトランスフェクションによって、3 個以上の核 (緑, GFP) が確認され、シンシチウムと判定された細胞。b: 2 個の核を含み膜 (赤, mScarlet-I) 融合していると判定された細胞。c: 2 個の核を含み、核のサイズが均等で細胞の形態も安定している、細胞分裂中と推測される細胞。分裂中と推測される細胞も 2 個の核を含む細胞として統計解析を行った。GFP は pBac-H::6 \times His-F-NLS::GFP、mScarlet-I は pSK- α His6-mCD8::mScarlet-I から発現している。

示したが、本研究の BmN 細胞での実験では 25 °C でも膜融合活性が観察された。この違いの原因について、1) 哺乳類・昆虫の細胞の違い、2) リガンド-レセプターの違い（本研究では H::6×His タグ、F、抗 His タグ抗体）、また、3) MV 分離株の違いなどが挙げられ、今後の解析が必要となる。

37 °Cでの膜融合活性の促進は、昆虫細胞での応用には検討が必要である。BmN 細胞は高温条件下では細胞周期が G2 期で停止することが示されており (KIUCHI *et al.* 2007)、本研究での観察でも 37 °C

で BmN 細胞を培養した場合、細胞内に液胞様の構造が形成され、BmN 細胞の生理状態が変化している兆候が観察された。WATANABE *et al.* (2015) は、F タンパク質の T461I および S103I/N462S/N465S の変異により 25 °Cでの膜融合活性を観察しており、H::6×His タグ、F、抗 His タグ抗体の系を、25 °Cで培養を行う昆虫細胞を対象に応用する場合は F タンパク質変異体の導入を検討しなくてはならない。本系をバキュロウイルス等のウイルスベクターに応用した際に 25 °Cでの感染性に問題がなけ

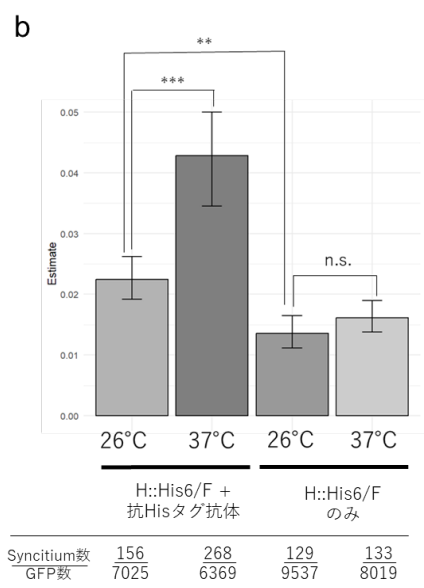
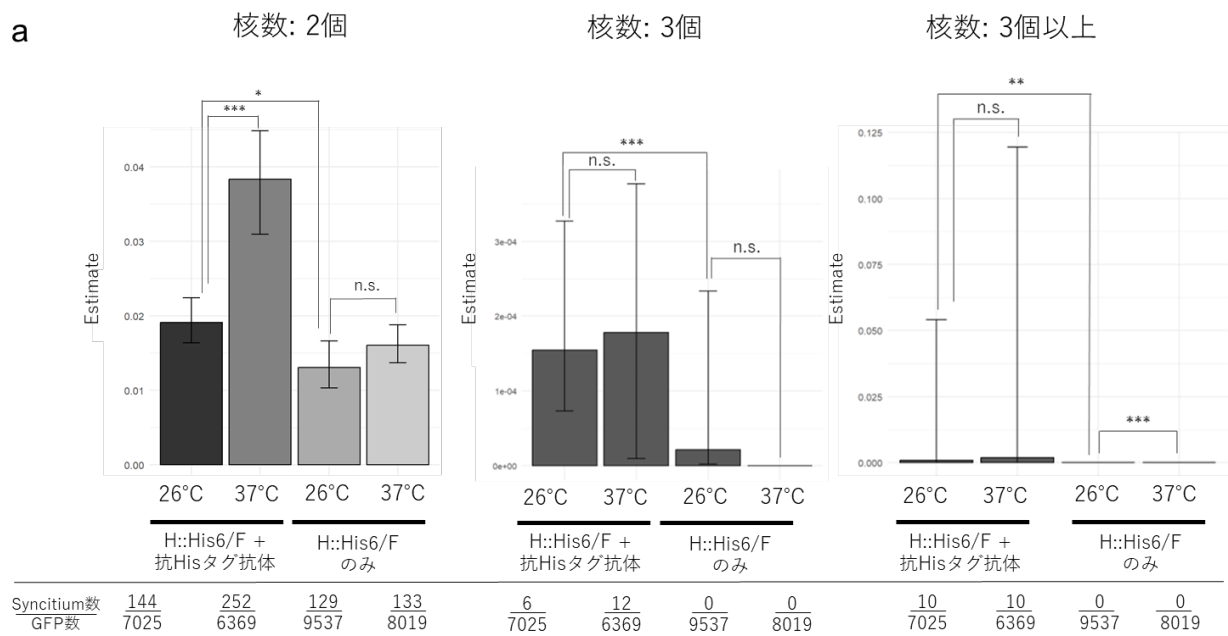


図 3. BmN 細胞での H、F、抗 His タグ抗体を介した膜融合活性

トランスフェクション 48 時間後に、共焦点レーザー顕微鏡で撮影を行った画像を使用し GFP 発現細胞のカウントを行った。a: シンシチウムと判定した細胞が含む核の個数の内訳ごとの膜融合効率の推定値。負の二項分布を仮定した一般化線形モデルによって各条件での膜融合効率を推定した。エラーバーは推定値の標準誤差を示している。b: 細胞内の核の個数で分けて算出した膜融合効率の推定値。

れば不要だが、そうではない場合は F タンパク質変異体の導入が必要となる。

本研究は抗体を用いた人工レセプターとリガンドによる膜融合を昆虫細胞で初めて示した。人工的な膜融合制御は組換えバキュロウイルスの感染性・拡散の制御等への応用展開ができる。Nanobody の発見以降、抗体に関する技術開発・タンパク質工学は進展がめざましい (CASTERMAN *et al.* 1993; HIE *et al.* 2023)。本研究の成果は昆虫における、抗体をベースとしたタンパク質工学と膜融合制御の技術開発の起点になることが期待される。

謝 辞

pTNH6-H および pDisplay- α His6 を提供して下さった鳥取大学医学部医学科ゲノム再生医学講座ゲノム医療学分野教授 中村貴史博士、pBac IE2-CeSID1_GFPzeo を提供して下さった九州大学農業生物科学講座教授 日下部宜宏博士、pSK-gamillus-gp64^{T3} を提供して下さった北海道大学大学院農学院 関口真理博士にこの場を借りて深く感謝申し上げます。

また、共焦点レーザー顕微鏡の利用にあたり、北海道大学農学研究院生物構造解析センターに、サンガーシーケンサーの利用にあたり、北海道大学農学研究院「共同利用機器・設備管理運営委員会」に感謝申し上げます。

文 献

- CASTERMAN C. *et al.* (1993): *Nature*, **363**: 446-448
- HIE B.L. *et al.* (2023): *Nat. Biotech.* <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01763-2>
- JEETENDRA E. *et al.* (2002): *J. Virol*, **76**: 12300-12311
- JEETENDRA E. *et al.* (2003): *J. Virol*, **77**: 12807-12818
- KITAGAWA Y. *et al.* (2005): *J. Virol*, **79**: 3639-3652
- KIUCHI M. *et al.* (2007): *Physiological Entomology*, **32**, 3, 212-218
- 小島 桂・伴戸久徳 (2020) 東北蚕糸・昆虫利用研究報告,**45**: 14-21
- LIN L.T. and RICHARDSON C.D. (2016): *Viruses*, **8**: 250
- MON H. *et al.* (2012): *RNA Biology*, **9**: 40-46
- MOTOHASHI K. (2015): *BMC Biotechnol*, **15**: 47
- NAKAMURA T. *et al.* (2005): *Nat. Biotechnol*, **68**: 287-320
- ROCHE S. *et al.* (2006) *Science*, **313**: 187-191
- 関口真理 (2023) 北海道大学大学院農学院 博士論文, 126pp
- THEILMANN D.A. and STEWART S. (1991): *Virology*, **180**: 492-508
- THEILMANN D.A. and STEWART S. (1992): *Virology*, **187**: 84-96
- WATANABE S. *et al.* (2015) *Ann. Rev. Virol*, **89**: 2710-2717
- WHITE J.M. *et al.* (2023) *J. Virol*, **10**: 139-161

遺伝子クラスター群欠損 BmNPV の BmN における増殖能力

黒光 玲緒奈・高 ひとみ・浅野 眞一郎・伴戸 久徳・佐藤 昌直*

北海道大学大学院農学院

(2023 年 12 月 25 日受理)

ウイルスは宿主に依存した完全寄生性の病原体であり、ゲノムサイズ、遺伝子数には進化的な制約がある。しかし、ウイルスゲノムサイズは、DNA ウイルスの間でも 100 倍以上の違いがある。2023 年 12 月現在、National Institute for Biotechnology Information の Nucleotide データベースに登録される脊椎動物と無脊椎動物から同定されたウイルスでは、最小は 1,063 塩基 (NC_027990; Circoviridae; ROSARIO *et al.* 2015)、最大は 359,853 塩基対 (NC_005309; Avipoxvirus; TULMAN *et al.* 2004) とされる。ウイルスがコードする遺伝子数も 1 遺伝子 (putative replication initiation protein) から 335 遺伝子であり、DNA として維持されるための最小の機能から、宿主をハイジャックして子孫ウイルスを産生する機能まで多岐に渡る。DNA ウイルスとして宿主で増殖する戦略は、ゲノムにコードする遺伝子の機能とその組み合わせが規定している。昆虫に感染する DNA ウイルスに限定しても、1,628 塩基 (1 遺伝子; 未分類ウイルス; DAYARAM *et al.* 2014) から 30,7691 塩基対 (335 遺伝子; Betaentomopoxvirus; THÉZÉ *et al.* 2013) とゲノムサイズ、遺伝子数に同様な幅がある。

主に昆虫を宿主とするバキュロウイルス科に属するウイルスは、100 を超える遺伝子群をゲノム

にコードする大型二本鎖 DNA ウイルスである (JEHLE *et al.* 2006)。このウイルスは宿主内外での感染をそれぞれ担う二種類のウイルス粒子を形成する。バキュロウイルスのうち、核多角体病ウイルスはポリヘドリンと呼ばれるタンパク質を高発現する特徴を持つ。カイコ核多角体病ウイルス (*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus: BmNPV) はカイコを宿主とするバキュロウイルスであり、その生活環を 143 遺伝子で担っている。BmNPV T3 系統に関しては 141 遺伝子のそれぞれについてノックアウトウイルスの作製、表現型解析が行われた (ONO *et al.* 2012)。これらのうち 86 遺伝子は、ノックアウトしてもカイコ卵巣由来の培養細胞 (BmN 細胞) でのポリヘドリン産生・二次感染に大きな影響を与えず、我々はこれらを Type-A 遺伝子と分類した。BmNPV と同じバキュロウイルス科に属する *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) では、20 遺伝子、合計 17.2 kb を欠失しても培養細胞での増殖が確認された (GUO *et al.* 2022)。これらの研究からバキュロウイルスゲノムには、削除可能な遺伝子群が多数存在する可能性が示された。一方、BmNPV の Type-A 遺伝子はポリヘドリンプロモーター活性化、増殖に一見、非必須であった。しかしながら、ゲノ

*責任著者

〒060-8589 札幌市北区北 9 西 9

satou@agr.hokudai.ac.jp

ム上に隣接して存在する Type-A 遺伝子群 (Type-A 遺伝子クラスター) である *orf11-orf14* をノックアウトした場合には、BmN 細胞での遺伝子プロモーターの活性化能が減少した (TAKA *et al.* 2013)。つまり、BmNPV の遺伝子群は、単独の遺伝子ノックアウトではポリヘドリン産生・二次感染に影響がないか、あるいは影響が小さい遺伝子でも、他のウイルス遺伝子によってその機能喪失が補償されていることが示された。また、BmNPV では同時ノックアウトにより BmN 細胞での遺伝子プロモーターの活性化能が減少した *orf11* と *orf12* (TAKA *et al.* 2013) の AcMNPV ホモログである *Ac20 (arif-1)*、*Ac21 (pif-2)* は、AcMNPV では培養細胞での増殖能を維持した状態で削除可能 (Guo *et al.* 2022) であり、ウイルス種あるいはコンテキスト依存的に欠失可能な遺伝子レパートリーは異なる可能性がある。バキュロウイルスの各遺伝子の機能、進化的意義、さらには遺伝子のレパートリー・相互作用の進化を明らかにするには、実験的に様々な遺伝子組み合わせを検証する必要がある。

本研究では、任意のゲノム領域の組み合わせを

表 1. ノックアウトカセット作製用 primer 一覧

primer名	配列 (5' → 3')
44-49_up	TTAAACAAGCATTCTTATTTCAATAATTGGAGACAGTTGTATCCACAATTgtgtaggctggagctgcttc
44-49_down	TTACGCACCATATACGCATCGGGTTGATATAATTAATATGGATCAATTTGcatatgaatcctccttag
92a-104_up	CGCGATGTATATGTCTTACTTCATTAGACTTTAGATTTTAAATTTGTGAACgtgtaggctggagctgcttc
92a-104_down	TAATTACAAAATATCTTAGGCGATATGATTATGTTCCAAATAGCGAGAGAcatatgaatcctccttag
106-108_up	GCATCTTATATACCCGACCGCTATTTGGCCACGTGACACAAGGCACGTTGgtgtaggctggagctgcttc
106-108_down	GCTTATTTTGTGTCAACGTTCCCGTGAGTATATTTTGATATCGTTAACcatatgaatcctccttag
110a-115_up	TAAAATGATAAATCTTTAATTATATCTTTTATTATACATTAATTTTATgtgtaggctggagctgcttc
110a-115_down	TCTAATAAATATTTTCAATTATATCGTTGTTTAAATTTAAGTCATATATAACcatatgaatcctccttag
132-134_up	TTACAACGACGCGTGACGATTCGACGAAAAGCGCGAAACAACTGAACGGAgtgtaggctggagctgcttc
132-134_down	TCTTGCACCAGCGGTTCCCGATTCGACTAACGGTCGATTGGATGGCTTAATcatatgaatcctccttag

ノックアウトカセットの作製に使用した primer 名と配列の一覧。各 primer 名の左はノックアウトした BmNPV 遺伝子クラスター範囲の ORF 番号を示す。

効率よく削除するために JENSEN *et al.* (2015)の方法を援用した BmNPV バクミドノックアウト系を確立し、BmNPV の遺伝子レパートリーの削減可能性を更に検討した。

材料と方法

1. BmNPV pif-7 コーディング領域の決定

AcMNPV 上で同定されている *pif-7 (orf110)* の配列と、BmNPV T3 complete genome 配列を使用して BLAST (ALTSCHUL *et al.* 1990) を行い、*pif-7* の BmNPV でのゲノム領域を決定した。

2. 供試ウイルス

BmNPV T3 バクミド (ONO *et al.* 2007) を改変した EGFP 発現 BmNPV バクミド Bmbac^{+egfp} (BmGFP) (T3 株、ONO *et al.* 2012)、または、*lef-5* プロモーター、ポリヘドリンプロモーター下流からデグロン融合 superfolder GFP (sfGFP::PEST) (PÉDELACQ *et al.* 2005; ROGERS *et al.* 1986; LI *et al.* 1998)、mScarlet-

I (BINDELS *et al.* 2016)を発現する *lef-5 dual reporter* バクミド (中西, 未発表) を使用した。

3. 供試細胞

培養細胞は、カイコ卵巣由来の BmN 細胞を使用した。BmN 細胞は、10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco)を含む TC-100 培地 (Applichem) を用い、26 °Cで培養した。

4. トランスフェクション

12 ウェルマイクロプレート (Iwaki) に1 ウェルあたり $4.0 \sim 7.0 \times 10^5$ の BmN 細胞を播種し、細胞がウェルの底面に接着するまで一時間以上 26 °Cのインキュベーター内で静置した。接着した細胞を、血清を含まない TC-100 培地で2度洗浄後、500 μ l

の無血清 TC-100 培地を加えた。次にバクミド DNA 1 μ g を含む 100 μ l の無血清 TC-100 培地を調製し、X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (Roche)を 3 μ l 加え、15~30 分室温で静置した。このトランスフェクション混合液を上記の培養細胞に加え、26 °Cで6時間培養した。その後、培地を全て除き、血清を含む TC-100 培地を加えて培養を続けた。

5. 各ノックアウト BmGFP バクミドを導入した BmN 細胞の経時的な EGFP 蛍光観察

4×10^5 個の BmN 細胞に各種バクミド DNA が 0.8 μ g になる量の混合液を使用してトランスフェクションし、血清を含む TC100 培地に交換した後、0時間、24時間、48時間、72時間、96時間ならびに120時間において励起波長 489 nm、蛍光波長 520 nm の条件で infinite M200PRO (Tecan) で検

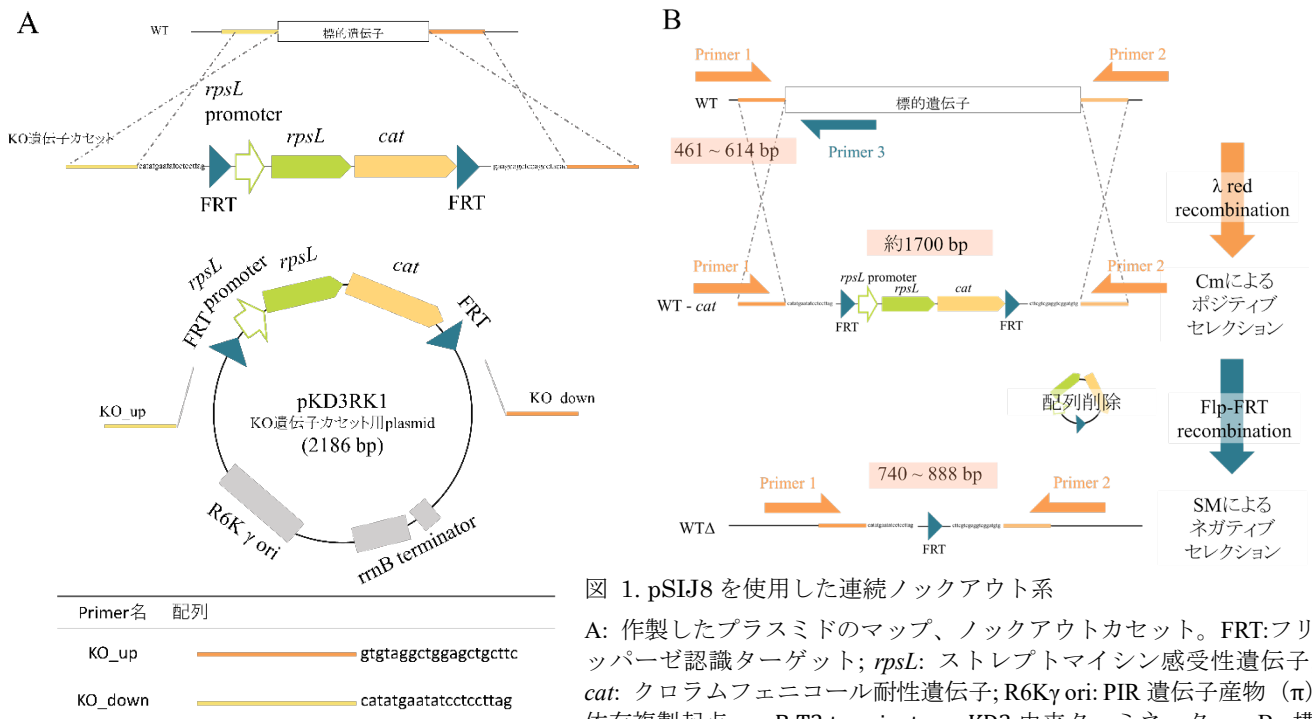


図 1. pSIJ8 を使用した連続ノックアウト系

A: 作製したプラスミドのマップ、ノックアウトカセット。FRT: フリッパーゼ認識ターゲット; *rpsL*: ストレプトマイシン感受性遺伝子; *cat*: クロラムフェニコール耐性遺伝子; R6K γ ori: PIR 遺伝子産物 (π) 依存複製起点; rrnB T2 terminator: pKD3 由来ターミネーター。B: 構築した連続ノックアウト系のワークフロー。WT: 野生型 BmNPV; WTA: ノックアウトした BmNPV; flp: フリッパーゼ; Cm: クロラムフェニコール; SM: ストレプトマイシン。

WT-cat: 標的遺伝子にノックアウトカセットを挿入した BmNPV; WTA: ノックアウトした BmNPV; flp: フリッパーゼ; Cm: クロラムフェニコール; SM: ストレプトマイシン。

相同組換えの確認は PCR によって行った。Primer1 と 2 のペア (表 2) での PCR により、ノックアウトバクミドでは 740~888 bp の増幅産物が検出できる (図 2)。これに対し、対象クラスターに欠損のないバクミドは Primer1 と 3 のペア (表 2) での PCR により、461~614 bp の増幅産物が得られる (図 2)。

出した。

6. BmNPV 遺伝子のノックアウト

BmNPV 遺伝子のノックアウトは、JENSEN *et al.* (2015)に準じて行った。ノックアウト用遺伝子カセット作製用プラスミド pKD3RK1 (図 1A) と、標的 非必須遺伝子領域の 5'非遺伝子領域 (50 塩基) と 3'非遺伝子領域 (50 塩基) を含むプライマー (表 1)、PrimeSTAR Max DNA Polymerase (TaKaRa)を使用した PCR によりノックアウト用遺伝子カセットを調製した。pSIJ8、*lef-5 dual reporter* バクミドを保持した DH10B を OD₆₀₀ が 0.3 になるまで培養し、終濃度 15 mM アラビノース (Wako) を添加し、コンピテントセル化した。そのコンピテントセルに精製 PCR 産物 1.7 µg をエレクトロポレーションし、SOC 培地を 1 ml 加えて 30 °C で 4 時間以上培養した。400 µl を遠心分離で濃縮し、アンピシリン (20 µg/ml)、カナマイシン (10 µg/ml)、クロラムフェニコール (25 µg/ml) を含む LB プレートに塗布して、30 °C で培養した。

FLP 誘導によるノックアウト用遺伝子カセット

削除は、形質転換で得られたコロニーをアンピシリン (20 µg/ml)、カナマイシン (10 µg/ml) を含む LB を用いて 30 °C で培養し、OD₆₀₀ の値が 0.1~0.4 の間に終濃度 50 mM のラムノース (東京化成工業) を添加して行った。

pSIJ8 のキュアリングは、37 °C でのプレート培養で行った。遺伝子クラスター削除の確認は、常法のコロニーPCR (図 1B, 表 2) で行い、増幅断片長の違いにより確認した (図 2)。

7. 蛍光顕微鏡観察

5×10⁵ 個の BmN 細胞に各種バクミド DNA が 1 µg になる量のトランスフェクション混合液を使用してトランスフェクションし、血清を含む TC100 培地に交換した後、2 日目 (day2)、3 日目 (day3)、4 日目 (day4) において蛍光観察を行った。トランスフェクションを行った細胞の蛍光観察には、蛍光ユニット BT-ExMiBG (BioTools) を取り付けた倒立顕微鏡 BS-2090T (BioTools) を用いた。画像は E31SPM03100KPA (Toup View) を用いて取得した。

表 2. ノックアウト確認用 primer と増幅サイズ一覧

	Primer名	図2での表示	配列 (5' → 3')	Primer 1とのペアでの増幅サイズ
Δ44-49	44-49 flp_up	Primer 1	TCTCAATTACGGCGGCATCC	
	44-49 flp_down	Primer 2	TTGAGGAACACGTTGGACGG	871 bp
	44-49 flp_bacmid	Primer 3	TAATCTCGCTTGCCGACCAC	567 bp
Δ92a-104	92a-104 flp_up	Primer 1	AGTTGTTGGTCAGGAGCACG	
	92a-104 flp_down	Primer 2	TTTGGATCCGACCATCGGC	888 bp
	92a-104 flp_bacmid	Primer 3	ACAACGGACGTGTTCAACGG	461 bp
Δ106-108	106-108 flp_up	Primer 1	CACGTCCTTTTGCAGCGTTT	
	106-108 flp_down	Primer 2	TCGCTTGATCTGCGCACA	740 bp
	106-108 flp_bacmid	Primer 3	GGTGACATGATTTTGCGGC	476 bp
Δ110a-115	110a-115 flp_up	Primer 1	CTCAAACAGTCGGGAAGCGT	
	110a-115 flp_down	Primer 2	GCGCAATCACGTTTCCTTCG	882 bp
	110a-115 flp_bacmid	Primer 3	TTTGGACGCTGTGGAGTGG	504 bp
Δ132-134	132-134 flp_up	Primer 1	TGTGCTCGGTAAATGTCGCA	
	132-134 flp_down	Primer 2	AACCAAAACCCCGCCATTGT	809 bp
	132-134 flp_bacmid	Primer 3	AGGTCTACTGCACGGATTTCTG	614 bp

相同組換えの確認に使用した primer 名と配列の一覧。背景の色は、図 1B で示されている primer2 と 3 の色に対応。各 primer 名の左はノックアウトした BmNPV 遺伝子クラスター範囲を ORF 番号で示す。

8. 増殖したノックアウトウイルスの遺伝子型確認

各ノックアウトバクミドをトランスフェクションした BmN 細胞を蛍光顕微鏡で mScarlet-I 蛍光

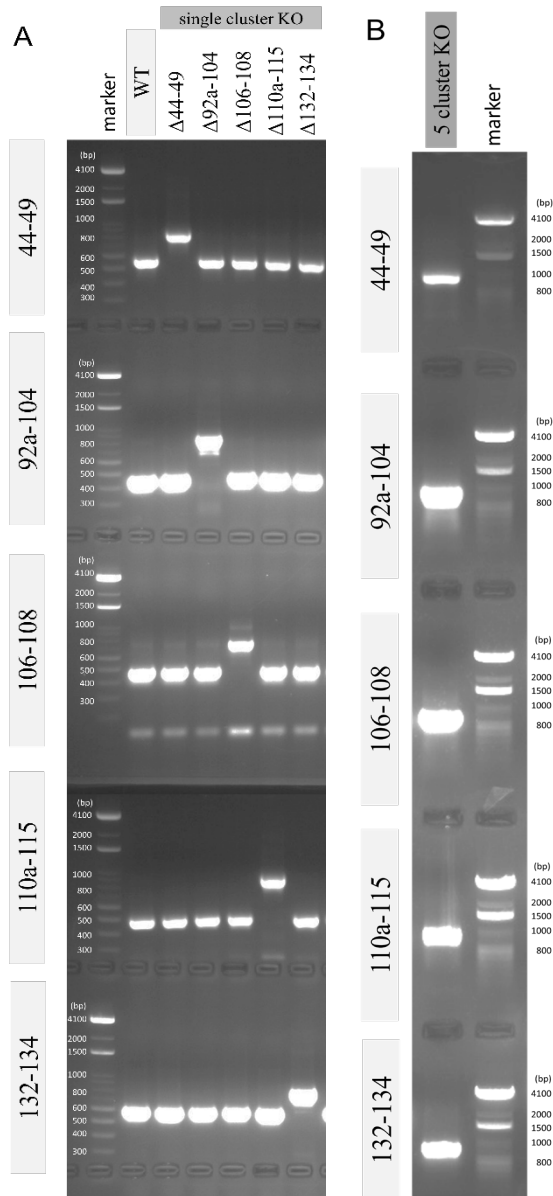


図 2. 各遺伝子クラスターノックアウトの確認

標的領域での相同組換え、Flp による選択マーカー遺伝子削除を確認するためにコロニー-PCR を行った。ノックアウト領域を標的にした PCR 産物長は 740-888 塩基となるようプライマーを設計している (表 2)。2%アガロースゲルを使用し、100 V、30 分で電気泳動を行った。サイズマーカーは HENRICI *et al.* (2017) にしたがって作製した。図中脇に示されている数字はサイズマーカー断片長を、単位 bp で示している。図中左にはノックアウトを確認している遺伝子領域を示している。

を経時的に観察し、トランスフェクション 5 日後に培養上清を回収した。上清を回収後、10 μ l の培養上清を等量の 0.1% SDS で変性し、BmNPV 遺伝子のノックアウト確認用プライマーセット (図 1B, 表 2) で標的配列が欠損したバクミドのみが存在することを確認した。

結果と考察

1. ノックアウト領域の選定

Type-A 遺伝子クラスターは、BmNPV 遺伝子上に 10 領域存在する (*bm7~bm14*、*bm18~bm24*、*bm32~bm38*、*bm44~bm49*、*bm56~bm58a*、*bm92a~bm104*、*bm106~bm108*、*bm110a~bm115*、*bm124~bm130* ならびに *bm132~bm134*)。高 (2017) が、ポリヘドリンプロモーターから *egfp* を発現する BmNPV バクミド (BmGFP) をもとに、Type-A 遺伝子クラスターノックアウトバクミドを作製し、ポリヘドリンプロモーターの活性化、二次感染能を評価したところ、10 領域のうち、*bm44~bm49*、*bm92a~bm104*、*bm106~bm108*、*bm110a~bm115* および *bm132~bm134* の 5 領域についてトランスフェクション後 48 時間から 120 時間にかけて EGFP 蛍光の増加が観察された。これらノックアウトウイルスはトランスフェクション後 120 時間目の EGFP 蛍光強度が、コントロールである BmGFP と比較し、*bm44~bm49* が 47%、*bm92a~bm104* が 62%、*bm106~bm108* が 52%、*bm110a~bm115* が 64%、*bm132~bm134* が 72%と減少を示した (高, 2017)。減少するものの GFP 蛍光が観察されたことは、これらノックアウト BmNPV が培養細胞で後後期遺伝子発現まで感染進行することを示していた。また、蛍光強度の増加が 3 桁以上であることから二

次感染により GFP 発現細胞数が増加したと推測される。一方、上記以外の 5 領域をそれぞれノックアウトした BmNPV バクミドトランスフェクション細胞において、*bm32~bm38* ノックアウトバック

ミドではトランスフェクション 96 時間後においても全く蛍光が認められなかった。また、その他 4 つのそれぞれの領域をノックアウトしたバックミドは、トランスフェクション 120 時間目の EGFP

表 3. 本研究で欠損させた Type-A 遺伝子群の ORF 番号、遺伝子名ならびに機能一覧

cluster	ORF No	gene name	gene functions (previous research)	引用文献
44-49	44			
	45			
	46		ウイルスDNA複製には影響なし、BVの効率的な産生・ヌクレオカプシドの集合と形態形成に関与	LI <i>et al.</i> , 2020
	47		BV・ODVの構造タンパク質 (AcMNPVホモログである <i>ac58/59</i>)	BRAUNAGEL <i>et al.</i> , 2003; WANG <i>et al.</i> , 2010
	48		DNA結合タンパク質との報告がある (AcMNPV <i>orf60</i> ; 大腸菌由来 <i>ChaB</i> と相同)	LI <i>et al.</i> , 2006
	49	<i>few polyhedra (fp)</i>	感染後期に起こる幼虫の液状化に関与	KATSUMA <i>et al.</i> , 1999
92a-104	92a	<i>pif-7</i>	<i>per os infectivity factor</i> (AcMNPV <i>pif-7</i> とBmNPVの相同検索によって同定)	
	93		<i>Trichoplusia ni</i> 幼虫への感染力・生存時間へのみ特異的に関与、機能は不明	LI <i>et al.</i> , 2018
	94		BV・ODVの構造タンパク質 (AcMNPVホモログである <i>ac114</i>)	BRAUNAGEL <i>et al.</i> , 2003; WANG <i>et al.</i> , 2010
	95	<i>pif-3</i>	<i>per os infectivity factor</i>	PENG <i>et al.</i> , 2010
	95a			
	96		感染個体の徘徊行動に影響	GOMI <i>et al.</i> , 199
	97	<i>pif-1</i>	<i>per os infectivity factor</i>	PENG <i>et al.</i> , 2010
	98		感染性BV産生に必須ではないが重要、詳細な機能は不明	CHEN <i>et al.</i> , 2021
	98a			
	99			
	100	<i>protein kinase 2 (pk2)</i>		
	101		ウイルス複製の開始には非必須だが、感染サイクル中のウイルスDNA複製・感染性BV産生にとって重要な因子との報告有り AcMNPVホモログAc124は、細胞での増殖・感染性BV産生に非必須であるが、生存時間やキチナーゼの転写に関与との報告有り	CHEN <i>et al.</i> , 2014 LIANG <i>et al.</i> , 2015; FANG <i>et al.</i> , 2019
	102	<i>lef-7</i>	欠損したウイルスは DNA 合成量が減少する。	GOMI <i>et al.</i> , 1997
	103	<i>v-cath</i>		
104	<i>chitinase</i>	感染した宿主個体を溶解させる。	LEE <i>et al.</i> , 2006	
106-108	106	<i>p24</i>	感染個体の生存時間が延長される。	GOMI <i>et al.</i> , 1999
	107	<i>gp16</i>	ヌクレオカプシドのエンベロープに関与している。	GROSS <i>et al.</i> , 1993
	108	<i>pp34</i>	AcMNPVホモログ (<i>ac131</i>) 欠損で空洞のある多角体ができるため包埋体の安定性に関与する可能性。詳細は不明。	GROSS <i>et al.</i> , 1994
110a-115	110a			
	111		感染個体の生存時間が延長される。	HAN <i>et al.</i> , 2014
	112	<i>p35</i>	感染時にアポトーシスを抑制する。 BmNPV必須遺伝子・重要遺伝子の分布密度が高いゲノム座標の50 k ~ 95 kntの <i>visRNA</i> の蓄積を減少させ、発現を促進する。	CLEM <i>et al.</i> , 1991 ZHAO <i>et al.</i> , 2022
	113	<i>p26</i>	AcMNPVにおいて欠損しても、培養細胞と幼虫の両方で影響がない。	SIMÓN <i>et al.</i> , 2008
	114	<i>p10</i>	ポリヘドリンと同様に感染後後期に発現する遺伝子であり、発現ベクターに利用されるプロモーターを持つ	
115	<i>pif-0 (p74)</i>	<i>per os infectivity factor</i>	OIKAWA <i>et al.</i> , 2005	
132-134	132	<i>bro-e</i>	個体感染に影響はない。機能は不明である。	KANG <i>et al.</i> , 1999
	133			
	134		欠損しても増殖可能、但し、ODVに関与していることが報告されている。	SHEN <i>et al.</i> , 2018

灰色は機能未知、青色は BV・ODV へ関与、黄色は経口感染性へ関与、橙色は宿主個体の溶解、赤は感染個体の生存時間・徘徊行動へ関与する遺伝子を示す。

蛍光強度が、*bm7~bm14* がコントロールの 6.7%、*bm18~bm24* が 7.9%、*bm56~bm58a* が 4.9%および *bm124~bm130* が 6.1%と、EGFP 蛍光が極端に低下した (高, 2017)。この結果は、これら 5 領域の遺伝子群ノックアウトが BmNPV の培養細胞におけるポリヘドリンプロモーター活性化あるいは二次感染能に影響を与えたことを示している。

欠失してもウイルス増殖能を保持していた遺伝子クラスター、*bm44~bm49*、*bm92a~bm104*、*bm106~bm108*、*bm110a~bm115* および *bm132~bm134* に存在する既知遺伝子機能の多くは、個体レベルでの感染に関する機能であった (表 3)。*bm92a* (*pif-7*: AcMNPV *pif-7* の BmNPV ホモログ)、*bm95* (*pif-3*)、*bm97* (*pif-1*) (PENG *et al.* 2010)、*bm115* (*pif-0*; *p74*) (OHKAWA *et al.* 2005)は、感染個体間での経口感染因子 *per os infectivity factor* (*pif*)遺伝子である。*bm103* (*v-cath*)、*bm104* (*chitinase*)、*bm49* (*few polyhedra*; *fp*) は個体感染時において、感染後期に起こる幼虫の液状化に関与していることが報告されている (KATSUMA *et al.* 1999; LEE *et al.* 2006)。また、幼虫の徘徊行動に関与している *bm96* (GOMI *et al.* 1999) や、感染個体の生存時間に影響する *bm106* (GOMI *et al.* 1999)、*bm111* (HAN *et al.* 2014)もこれらクラスター群に存在する。ポリヘドリンと同様に感染後期に発現する *p10* (*bm114*)や、BV・ODV の構造タンパク質 *bm47* (AcMNPV *ac58/59* の BmNPV ホモログ)、*bm94* (AcMNPV *ac114* の BmNPV ホモログ) (BRAUNAGEL *et al.* 2003; WANG *et al.*, 2010)、感染性 BV 産生への関与が示された *bm46* (LI *et al.*, 2020)、*bm98* (CHEN *et al.*, 2021)、*bm101* (CHEN *et al.*, 2014)、DNA 結合タンパク質であることが示唆されている *bm48* (AcMNPV *orf60* の BmNPV ホモログ; 大腸菌由来 *ChaB* と相同 (LI *et al.* 2006))や、アポトーシス抑制 (CLEM *et al.* 1991) やウイルスゲノムに相同

な siRNA の蓄積阻害を介したウイルス遺伝子発現促進 (ZHAO *et al.* 2022) を担う *p35* (*bm112*)が含まれている。

33 遺伝子中 8 遺伝子は機能未知であるが上記の各遺伝子クラスターノックアウトウイルスの増殖性が培養細胞で確認できたこと、それら遺伝子群の既知機能の約半数が個体での感染過程に関わる遺伝子群であったことから、本研究では、これら *bm44~bm49*、*bm92a~bm104*、*bm106~bm108*、*bm110a~bm115* および *bm132~bm134* の 5 領域を全て削除することを目論んだ。

2. BmNPV バクミド遺伝子の連続ノックアウト系の確立

BmNPV 遺伝子・遺伝子クラスターノックアウトはこれまで、 λ Red recombination システム (DATSENKO and WANNER, 2000) を用いて作製されてきた (ONO *et al.* 2012; TAKA *et al.* 2013; 高, 2017)。本研究では、Type-A 遺伝子クラスター群の 5 重ノックアウトを効率よく行うため、改良を検討した。

従来 of BmNPV ノックアウトクローンの選抜には抗生物質耐性遺伝子を利用して、標的配列と組換え、選択マーカーとしてクローン選抜を行ってきた。従来法を多領域に拡張していくには、相同組換えでノックアウトする標的領域の数だけ選択マーカーが必要となる。しかし、相同組換えに利用する抗生物質耐性遺伝子以外にも、BmNPV バクミド保持菌体を選抜するためのカナマイシン耐性遺伝子、相同組換え酵素群を誘導発現する pKD46 保持菌体を選抜するためのアンピシリン耐性遺伝子の 2 種が不可欠である。つまり、5 領域のノックアウトに独立した抗生物質耐性遺伝子を使用する場合、耐性メカニズムが互いに干渉せず、組み合わせで使用しても大腸菌の生育に影響を及

ぼさない計 7 種類の抗生物質の組み合わせが必要となる。現在使用できる抗生物質レポーターからこの 7 種を選ぶことは出来ず、本研究では標的領域と組換えした抗生物質耐性遺伝子を逐次削除し、リサイクルする戦術を選択した。

次の課題として、抗生物質耐性遺伝子マーカー削除・リサイクリングには、pKD46 のキュアリング、FLP 発現誘導用プラスミド pCP20 (CHEREPANOV and WACKERNAGEL, 1995) の導入およびマーカー削除クローンの選抜、pCP20 のキュアリングが必要となる。これらを含めたノックアウトの工程には 1 領域につき 10 日が必要となり、5 領域ノックアウトクローンの構築におよそ 46 日を要する試算となる。そこで本研究では、pSIJ8 プラスミドを使用し、相同組換えとマーカー削除を連続して行える JENSEN *et al.* (2015) の方法の導入し、改変した。

る相同組換え酵素と、Flp-FRT システムで使用される酵素の両方の遺伝子を持つプラスミドである。各酵素がそれぞれアラビノース、ラムノース誘導プロモーター下に挿入されており、対応する誘導物質の添加により各酵素の発現が誘導できる。これにより相同組換え誘導とマーカー削除誘導の間に形質転換を経ずに連続して標的配列をノックアウトできる。また、JENSEN *et al.* (2015) の方法を援用し、相同組換えが起きたクローンからのマーカー削除時にカウンターセクション可能な系とした。本研究で用いる大腸菌 DH10B 株はストレプトマイシン耐性を示す *rpsL* 変異を持っている。このストレプトマイシン耐性変異は潜性であり、*rpsL* 野生型配列の導入によってストレプトマイシン感受性が復帰する。そこで、*rpsL* を含むノックアウト用 DNA 断片調製のための鋳型プラスミド

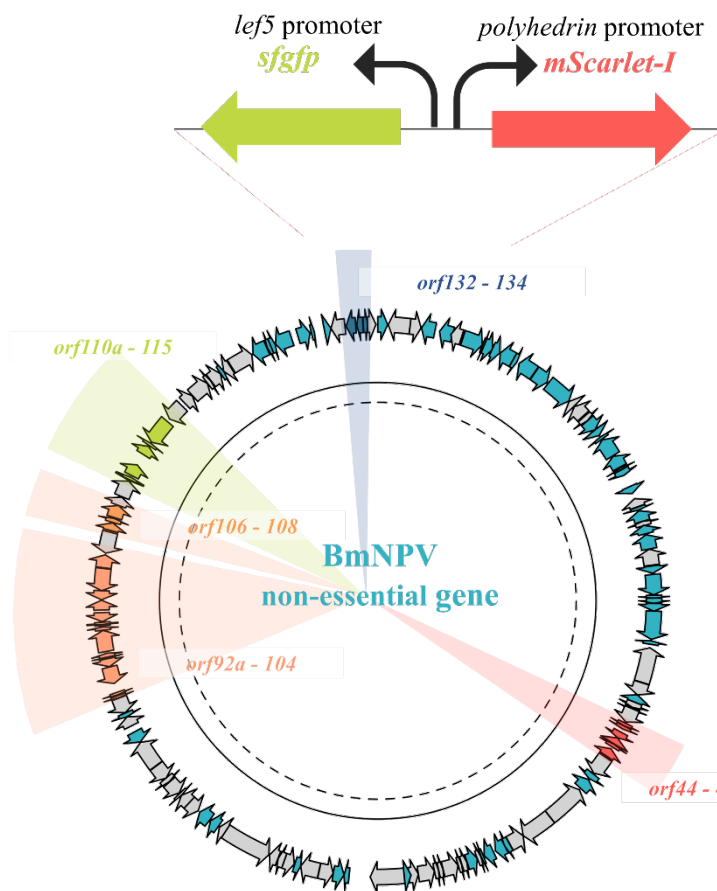


図 3. BmNPV Type-A 遺伝子クラスター

遺伝子クラスターノックアウトに用いた *lef-5* dual reporter BmNPV バクミドの概略。BmNPV T3 系統が持つ 143 遺伝子のうち、多角体遺伝子領域がレポーター遺伝子群、ベクター配列と組換えられている。培養細胞での増殖に単独で非必須な BmNPV 遺伝子を色付きの矢印で示している。背景をハイライトした遺伝子群が本研究で対象とした 5 領域の Type-A 遺伝子クラスター。クラスターを形成している遺伝子群は ORF 番号で示されている遺伝子で挟まれる遺伝子群である。

pSIJ8 は、λ Red recombination システムで使用され

(pKD3RK1) を作製した (図 1A)。pKD3RK1 は、pKD3 より FRT 配列・*cat* 遺伝子を含むプラスミド配列、DH5α より *rpsL* を PCR で増幅し、それらを連結して作製した。*rpsL-cat* を選択マーカーとすることでノックアウト時には *cat* 遺伝子によるポジティブセレクションが、*rpsL-cat* を削除した際には DH10B のストレプトマイシン耐性によるネガティブセレクションが可能となった (RUSSELL and DAHLQUIST, 1989; BIRD *et al.* 2012)。

3. Type-A 遺伝子クラスター群をノックアウトした BmNPV

上記連続ノックアウト系を使用して、培養細胞で増殖可能であることが確認された Type-A 遺伝子クラスター5 領域 (図 3: *bm44~bm49*、*bm92a~bm104*、*bm106~bm108*、*bm110a~bm115* および *bm132~bm134*) のそれぞれをノックアウトし、細胞でのポリヘドリンプロモーター活性ならびに

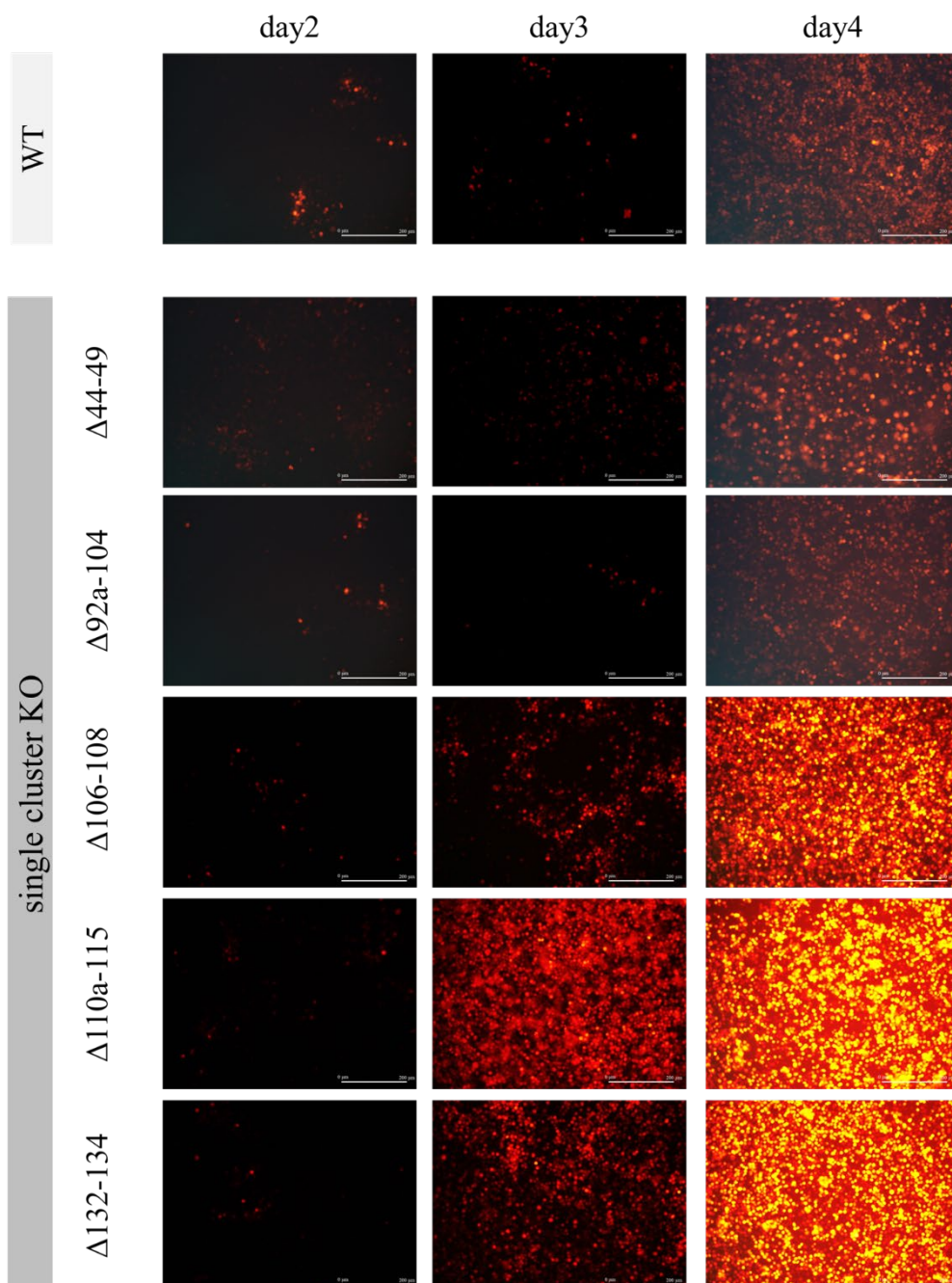


図4. Type-A 遺伝子クラスターシングルノックアウト BmNPV の感染性

5 種類の Type-A 遺伝子クラスターノックアウト BmNPV バクミドの BmN 細胞へのトランスフェクション 2 日目から 4 日目までの蛍光顕微鏡観察像。ポリヘドリンプロモーター下に挿入した mScarlet-I の蛍光を観察した。スケールバーは 200 μm。左に欠損している遺伝子クラスター (single cluster KO) を ORF 番号で示している。WT は野生型 BmNPV。

感染性 BV の産生による二次感染を観察した。マーカー除去を連続して、簡便に行える上記の改変系によって、これら 5 領域それぞれのノックアウトクローンの構築を 29 日で達成した。

作製した 5 種類のバクミドをそれぞれ BmN 細胞にトランスフェクションし、2 日目、3 日目ならびに 4 日目にポリヘドリンプロモーター下に挿入した mScarlet-I の蛍光を観察した (図 4)。いずれのバクミドトランスフェクション細胞でも mScarlet-I の蛍光が観察され、ポリヘドリンプロモーターが活性化する感染後期まで感染ステージが進んだことが示された。トランスフェクション 2 日目から 4 日目にかけて蛍光細胞数が増加したことから、高 (2017) とは独立に、上記 5 つ各々の Type-A 遺伝子クラスター群ノックアウト BmNPV の二次感染を確認できた。

4.5 領域 Type-A 遺伝子クラスターノックアウト BmNPV の感染性

Type-A 遺伝子クラスターノックアウト BmNPV バクミドである、BT3_polhp:mScarlet-I_lef-5p:sfGFP::PEST_Δ44-49 を出発材料に、選抜した全 5 領域 Type-A 遺伝子クラスターを連続ノックアウトし、このノックアウトウイルスが感染性を維持しているか、ポリヘドリンプロモーター活性と二次感染の観点から評価した。トランスフェクション 4 日目に微小な蛍光が観察された (図 5) ことから、この 5 領域 Type-A 遺伝子クラスターノックアウトウイルスは BmN 細胞でポリヘドリンプロモーター活性ならびに二次感染能力の低下は著しいものの、両者を保持している可能性が示唆された。

これらクラスターの塩基数は、2,907 bp (ORF44-49)、10,808 bp (ORF 92a-104)、2,069 bp (ORF 106-108)、7,267 bp (ORF 110a-115)、1,633 bp (ORF132-

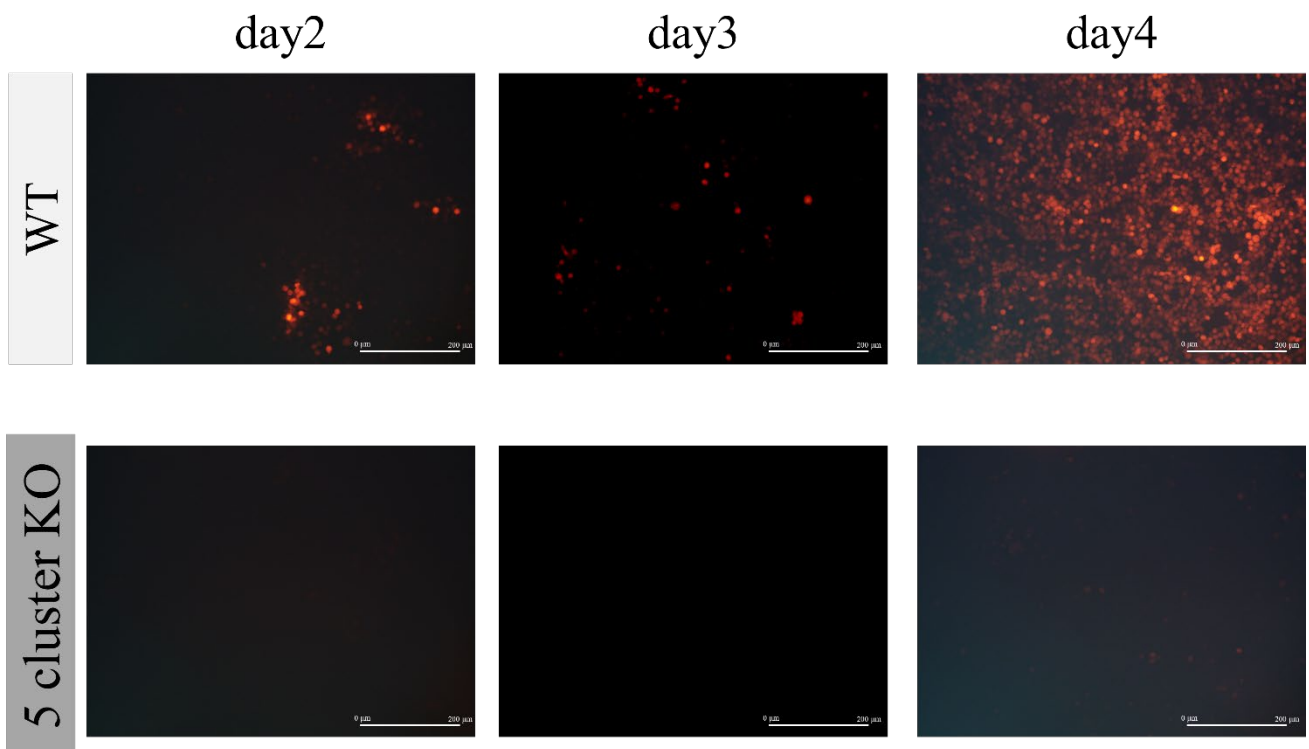


図 5.5 クラスターノックアウト BmNPV の感染性

Type-A 遺伝子 5 クラスターノックアウト BmNPV バクミドの BmN 細胞へのトランスフェクション 2 日目から 4 日目までの蛍光顕微鏡観察像。ポリヘドリンプロモーター下に挿入した mScarlet-I の蛍光を観察した。スケールバーは 200 μ m。WT はウイルスゲノム領域が野生型 BmNPV である lef-5 dual reporter BmNPV。

134)であり、5領域を全て合算すると24,684 bpであり、BmNPV 遺伝子長の17.2%にあたる。この結果は、Guo *et al.*, (2022) が示した二次感染可能なAcMNPVの欠失サイズ17.2 kbを超えた。

バキュロウイルスは、進化的に遺伝子の獲得・喪失のターンオーバーが早く (HILL and UNCKLESS, 2017)、機能未知の遺伝子も多い。本研究でノックアウトされた遺伝子のうち *bm44*、*bm45*、*bm93*、*bm95a*、*bm98a*、*bm99*、*bm132* の8遺伝子が機能未知である。これら遺伝子は、野生型ウイルスからの単独ノックアウトでは明確な表現型の違いが観察されなかった (ONO *et al.* 2012)。本研究で作製した5領域 Type-A 遺伝子クラスターノックアウト BmNPV は、これら機能未知遺伝子の機能同定を容易にする可能性がある。ポリヘドリンプロモーター活性、二次感染能力は低下したものの、レスキュー実験のベースラインとなる感染性を保持しており、単独遺伝子ノックアウトでは観察できなかった軽微な表現型の変化も検出できると考えられる。

5領域 Type-A 遺伝子クラスターノックアウト BmNPV は、BmNPV のミニマムゲノム同定にも寄与する。ミニマムゲノムに近づけるための戦略の1つは、削除可能な機能に関与する遺伝子群を推定し、削除していくことである。ウイルスベクターとしてのミニマムバキュロウイルスゲノムを目指す場合に経口感染能は削除可能な機能であり、*per os infection factor (pif)* 遺伝子群が対象となる。BmNPV では *pif-4 (bm79)*、*pif-8 (bm69)* を除いて単独では、非必須であることが示されており (ONO *et al.* 2012)、これら *pif* 遺伝子のノックアウトが可能と推測される。これら標的遺伝子は BmNPV ゲノム上で離れて存在しており、本研究で構築した連続ノックアウト系が有用な手段である。

さらに5領域 Type-A 遺伝子クラスターノックアウト BmNPV を用いた興味深い展開としてカイコ個体でのウイルス増殖・病原性の解析がある。*bm8* (KATSUMA *et al.*, 2012)、*bm49 (few polyhedra; fp)* (KATSUMA *et al.* 1999)、*bm103 (v-cath)*・*bm104 (chitinase)* (LEE *et al.* 2006)、*bm96*・*bm106* (GOMI *et al.* 1999)は病原性、ウイルスのトロピズムへの関与が報告されている。また、BmNPV では、感染サイクル中のウイルスDNAの複製・感染性BV産生に重要な因子である *bm101* (CHEN *et al.* 2014)の、AcMNPV ホモログである *Ac124* は、培養細胞での増殖には非必須であるが、感染個体の生存時間を延長する (LIANG *et al.* 2015)。*Ac124* を欠失させることでキチナーゼの転写が減少する (FANG *et al.*, 2019) との報告もある。これらがすべてノックアウトされている5領域 Type-A 遺伝子クラスターノックアウト BmNPV が BmNPV の個体レベルでの感染機構解明の新たな材料となり得る。また、*bm93 (Ac111)* は BmNPV・AcMNPV 両ウイルスで非必須である一方、AcMNPV *Ac111* は欠失することで、*Trichoplusia ni* 幼虫への感染力・生存時間にのみ特異的に関与するという報告がある (LI *et al.*, 2018)。この結果は、培養細胞ではなく、宿主を使用した個体実験の重要度を後押しする結果である。

以上のように本研究で構築した連続ノックアウト技術は従来の BmNPV 遺伝学の技術的障壁を突破し、新たな研究リソースを生み出すことができる。今後、本研究を起点にバキュロウイルス研究に広く波及効果を与える研究を展開していきたい。

謝 辞

ABI3130 sequence analyzer の利用にあたり、北海道大学農学研究院「共同利用機器・設備管理運営

委員会」に御礼申し上げます。また、*lef-5 dual reporter* バクミドを提供していただいた同研究室所属中西 登志紀氏に深謝します。本研究を進めるにあたり実験に不可欠であるカイコの供試に御協力頂きました北海道大学北方生物圏フィールド科学センター生物生産研究農場の山田恭裕氏に厚く御礼申し上げます。

文 献

- ALTSCHUL S.F. *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.*, **215**: 403-410
BIRD A.W. *et al.* (2012) *Nat. Methods*, **9**: 103-109
BINDELS D.S. *et al.* (2016) *Nat Methods*, **14**: 53-56
BRAUNAGEL S.C. *et al.* (2003) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **100**: 9797-9802
CHEN H. *et al.* (2014): *Cytotech*, **66(6)**: 1021-1029
CHEN T. *et al.* (2021) *Viol. Sinica*, **36**: 762-773
CHEREPANOV P.P. and WACKERNAGEL W. (1995) *Gene*, **158**: 9-14
CLEM R.J. *et al.* (1991) *Science*, **254**: 1388-1390
DATSENKO K.A. and WANNER B.L. (2000) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **97**: 6640-6645
DAYARAM A. *et al.* (2014) *Infect.Genet.Evol*, **22**: 134-141
FANG Z. *et al.* (2019) *Virus Res*, **263**: 151-158
GOMI, S. *et al.* (1997): *Virology* **230**: 35-47
GOMI S. *et al.* (1999) *RIKEN Rev*, **22**: 39-41
GUO Y. *et al.* (2022) *Viruses*, **14 (12)** : 2780
GROSS, C. H. *et al.* (1993): *Virology* **192**: 386-390
GROSS, C. H. *et al.* (1994): *J. Gen. Virol* **75**: 1115-1123
HAN Y. *et al.* (2014) *Curr. Microbiol*, **69**: 56-62
HENRICI RC. *et al.* (2017): *Sci Rep*, **26;7(1)**: 2438
HILL T. and UNCKLESS R.L. (2017): *J. Virol*, **91**: e01319-17
JEHLE J.A. *et al.* (2006): *Arch. Virol*, **151**: 1257-1266
JENSEN S.I. *et al.* (2015): *Sci. Rep*, **5**: 17874
KANG, W. *et al.* (1999): *Journal of Virology*, **73**: 10339-10345
KATSUMA S. *et al.* (1999) *J. Gen. Virol*, **80**: 783-791
KATSUMA S. *et al.* (2012) *J. Virol*, **86**: 2545-2555
LEE K.S. *et al.* (2006) *Biotech. Lett*, **28**: 645-650
LI S. *et al.* (2018) *Viruses*, **10**: 527
LI Y. *et al.* (2020) *Virus Res*, **289**: 198145
LI, X. *et al.* (1998) *J. Biol. Chem*, **273**: 34970-34975
LI Z. *et al.* (2006) *Gene*, **372**: 33-43
LIANG C. *et al.* (2015) *Arch. Virol*, **160**: 275-284
OHKAWA T. *et al.* (2005) *J. Virol*, **79**: 15258-15264
ONO C. *et al.* (2007) *J. Insect Biotech. Seric*, **76**: 161-167
ONO C. *et al.* (2012) *Virus Res*, **165**: 197-206
PÉDELACQ J-D. *et al.* (2005) *Nat. Biotech*, **24**: 79-88
PENG K. *et al.* (2010) *J. Virol*, **84**: 9497-9504
ROGERS S. *et al.* (1986) *Science*, **234**: 364-368.
ROSARIO K. *et al.* (2015) *Front. Microbiol*, **6**: 696
RUSSELL C.B. and DAHLQUIST F.W. (1989) *J. Bacteriol*, **171**: 2614-2618
SHEN, Y. *et al.* (2018): *Journal of General Virology*, **99(5)**: 717-729
SIMÓN, O. *et al.* (2008): *Virus Res* **136**: 202-205
TAKA H. *et al.* (2013) *J.Insect Biotech. Seric*, **82**: 25-32
高 ひとみ (2017) 北海道大学 博士論文 68pp
THÉZÉ J. *et al.* (2013) *J. Virol*, **87**: 7992-8003
TULMAN E.R. *et al.* (2004) *J. Virol*, **78**: 353-366
WANG R. *et al.* (2010) *J. Virol*, **84**: 7233-7242
ZHAO S. *et al.* (2022): *Front. Immunol*, **18**: 845268

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5年12月28日
発行	令和5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

