

東北蚕糸・昆虫利用研究報告

第 49 号

令和 6 年 12 月

日本蚕糸学会東北支部

No.49 目 次

前田 麻亜子 浅野 眞一郎 佐藤 昌直	カイコにおける新規バイナリシステムの探索 1
Kim Jungu 金児 雄 佐原 健	錦秋×鍾和において5 齢幼虫脱皮個体を得るアラテクトミー方法 13
四十物 風花 浅野 眞一郎 佐藤 昌直	表皮・脂肪体におけるカイコ Spätzle3 へのメラニン合成応答差異 18

カイコにおける新規バイナリシステムの探索

前田 麻亜子¹・浅野 眞一郎¹・佐藤 昌直^{1,2*}

¹北海道大学農学院、²北海道大学数理・データサイエンス教育研究センター

(2024年12月19日受理)

遺伝子発現の制御は、ゲノムにコードされた遺伝情報が機能する場やタイミングを決定する、生物に共通するメカニズムのひとつである。DNAからの遺伝子発現は転写、mRNAの修飾および翻訳の各段階で制御されるが、転写制御はこれらの律速段階として知られている (ALBERTS *et al.*, 2014)。

特定のDNA配列からの転写制御は主に、転写因子と呼ばれるタンパク質群によって行われる。転写活性化因子はDNA上の特定の配列を認識、結合するDNA結合ドメイン (DNA-binding domain, DBD) と、基本転写因子に作用して転写開始を補助する転写活性化ドメインという2つのドメインを持つ。転写因子の結合配列 (Cis-regulatory elements, CRE) 特異性に関する研究は1990年代以降、モデル生物を中心に進められてきた。転写因子のCRE特異性は多くの場合、DBDによって定義される。DBDの進化速度は極めて遅く、ヒト-マウス間でも転写因子のオルソログが認識するCREは高い相同性を示す (JOLMA *et al.*, 2013)。

転写因子-CRE間の特異性を活かし、他生物由来の転写因子とそのCREの導入により、特異的な遺伝子発現操作を可能にしたバイナリシステムが開発された。例として、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の転写因子 GAL4 と

その CRE (UAS) をキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) に導入した GAL4/UAS system がある (BRAND and PERRIMON, 1993)。この系では、任意のプロモーターによって GAL4 を発現するドライバーシステムと、UAS 下流に任意の遺伝子を持つレポーターシステムを掛け合わせた F₁ 個体において、GAL4 発現細胞でのみ UAS 下流遺伝子が発現する。致死遺伝子の発現システムの確立など簡便な異所発現システムの作製が可能であるという利点から GAL4/UAS system はショウジョウバエの発生学の進展に大きく寄与した。後にアカパンカビ (*Neurospora crassa*) の転写因子を使用した Q-system (POTTER *et al.*, 2010) も開発され、ショウジョウバエでは複数のバイナリシステムを併用したより高度な遺伝子発現操作が可能となった。その後、バイナリシステムはゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) (ASAKAWA and KAWAKAMI, 2008) やアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) (HARTLEY *et al.*, 2002) などのモデル生物を中心に様々な生物に実装されてきた。しかし、転写因子の不十分な転写活性、生体内での毒性、対応転写因子非存在下での発現などの問題により複数のバイナリシステムを併用可能な生物は少ない。ゼブラフィッシュでは GAL4/UAS system は利用可能である一方、Q-system では

*責任著者

〒060-8589 札幌市北区北9西9

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

CRE (QUAS) に含まれる CpG ジヌクレオチドがメチル化され、レポーター遺伝子がサイレンシングされること、QUAS 中に神経系特異的な発現を促進するエンハンサー配列が含まれていること、転写因子 QF を発現するトランスジェニック系統は正常な発生を示さないことが問題となった (GHOSH and HALPERN, 2016)。

キイロショウジョウバエ以外の昆虫では、カイコ (*Bombyx mori*) で GAL4/UAS system がバイナリシステムとして導入されている (IMAMURA *et al.*, 2003)。カイコはモデル鱗翅目昆虫であることに加え、その高いタンパク質生産能力から蛍光絹や組換えタンパク質の生産に用いられており、生物学的のみならず産業的にも重要な昆虫である。しかし、使用可能な転写因子数の制限や、精巢での GAL4 発現による不妊化 (UCHINO *et al.*, 2008) などカイコの内在遺伝子制御への干渉が知られている (CHEN *et al.*, 2022)。また、カイコではショウジョウバエと比較して GAL4 の転写活性が低い。転写活性化ドメインの変更によって転写活性の上昇が試みられたが、転写活性の増強に伴いカイコに対する毒性が増加する問題があった (KOBAYASHI *et al.*, 2011)。

カイコゲノム配列情報は 2004 年に日本と中国の研究チームにより発表された (MITA *et al.*, 2004; XIA *et al.*, 2004)。その後も多くの系統についてゲノム配列決定が報告されており (TONG *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2024)、ゲノム DNA 配列の情報は充実している。本研究では、カイコゲノム情報を活用し、カイコにおける新規バイナリシステムの構築を目的とする。GAL4/UAS system は先行している系統リソースがあることから、新規バイナリシステムの設計に当たって GAL4/UAS に干渉しない (直交する) 転写因子の設計を目指した。そのような

DBD リソースとして、カイコおよび出芽酵母と進化的に遠縁で CRE が種間で多様化しており、かつ DBD-CRE 特異性に関する情報が豊富に存在するヒト転写因子に着目した。ヒト転写因子の DBD とカイコ NF- κ B 由来の活性化ドメイン (p65) を融合させて直交転写因子を作製し、カイコにおけるバイナリシステムの構築・拡張を目指した (図 1)。

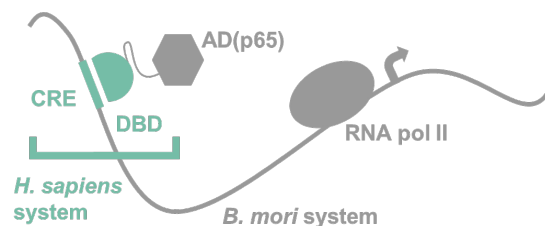


図 1. 本研究で構築するバイナリシステムの概要図
図中の灰色で示された部分はカイコ内在性システム・緑で示された部分はヒトのシステムであることを示している。AD: 活性化ドメイン (Activation Domain), p65: カイコ NF κ B 由来の活性化ドメイン; CRE: 結合配列 (Cis-regulatory elements), DBD: DNA 結合ドメイン (DNA-binding domain), RNA pol II: RNA ポリメラーゼ II。

材料と方法

1. 供試細胞

転写因子発現実験に供試する細胞としてカイコ卵巣由来の BmN 細胞を使用した。BmN 細胞は 10% Fetal Bovine Serum (Gibco) を含む TC-100 培地 (Applichem) を用い、26 °C で培養した。

2. トランスフェクション

コンフルエント状態の BmN 細胞を TC-100 培地で洗浄後、1 ml 当たり 5×10^5 の細胞密度に希釈したのち 100 μ l を 96 ウェルプレート (Iwaki) に播種し、26 °C で 1 時間培養して細胞をウェルに定着させた。DNA 1 μ g

表 1. 本研究で用いたプライマー

プライマー名	配列
ccdB_F2	5'-GTACCGAGCTCGGATCGCTGGCTCTTCGCGGCCCGCGC-3'
ccdB_R2	5'-ACGGCAGGTACTIONACCGAATTCGGGAGCCTGACATTTATATTC-3'
RFP_F	5'-GTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAAATCCCGGCCCTATGCCCAAGAAGAAGCGCAAG-3'
RFP_R	5'-CAAGAAAGCTGGGTCTAGATCGGCCGCGTAACTCG-3'
p65_F	5'-GTACCGAGCTCGGATCGCTGGCTAGCGCTTCAAGGAGATAGAACCAATTCTC-3'
p65_R	5'-CCACGTCACCGCATGTTAGAAGACTTCCTCTGCCCTCTTGCCCGCTGGAGCTGAT-3'
TBX5DBD_F	5'-TACCGAGCTCGGATCGCTGGATGCCCAAGAAGAAGCGCAAGGTGGTGTTCCTCCATGAAAGAGAAGCTG-3'
TBX5DBD_R	5'-TTCTATCTCCTTCGAAGCTGTTGCCCGAAATCCTTTGGC-3'
PAX5DBD_F	5'-TACCGAGCTCGGATCGCTGGATGCCCAAGAAGAAGCGCAAGGTGGGACATGGAGGAGTGAATCAGC-3'
PAX5DBD_R	5'-TTCTATCTCCTTCGAAGCTGTTCCGAATGATCCTGTTGATGGAGC-3'
GAL4_F	5'-AAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCGCTGATGAAGCTACTGTCTTCTATCGAAC -3'
pCR8_F	5'-AAGGGCGAATTCGACCCAGCTTTCT-3'
pCR8_R	5'-CGAATTCGGAGCCTGCTTTTTTGT-3'
KanR	5'-AACGGGACAGATCTCGAGCCTTTTGCTTTGCCACGGAACGGTCTGCG-3'
kanR-r_TBX5CRE	5'-ATACTCCGGCGCTCGACGTCGCTAGCAGGTGTGAAATTCACACCTTTCGAAGACTTAATTCCTGCAGG-3'
kanR-r_TBX5CRE	5'-ATACTCCGGCGCTCGACGTCGCTAGCAGGTTCACGCTTGCTGCTTCGAAGACTTAATTCCTGCAGG-3'
kanR-f	5'-TGCGTGTTCGCATGACCAATTCGAAGACTTAATTCCTGC-3'
kanR-r	5'-CTCGAGATCTTTGCTTTGCCACGGAAC-3'
pGWB7_F	5'-AACGGGACAGATCTCGAGCCTGGGTCTAGAGTTATCAAC-3'
pGWB7_R	5'-TCCGGCGCTCGACGTCGGCCACCATTGTTACAAGAAAG-3'
ccdB-F	5'-GCAAAGCAAAGATCTCGAGCCTGGGTC-3'
ccdB-R	5'-GCCAGTGTGATGGATTAAGAGATCCAGACATGATAAGATACATTGATG-3'

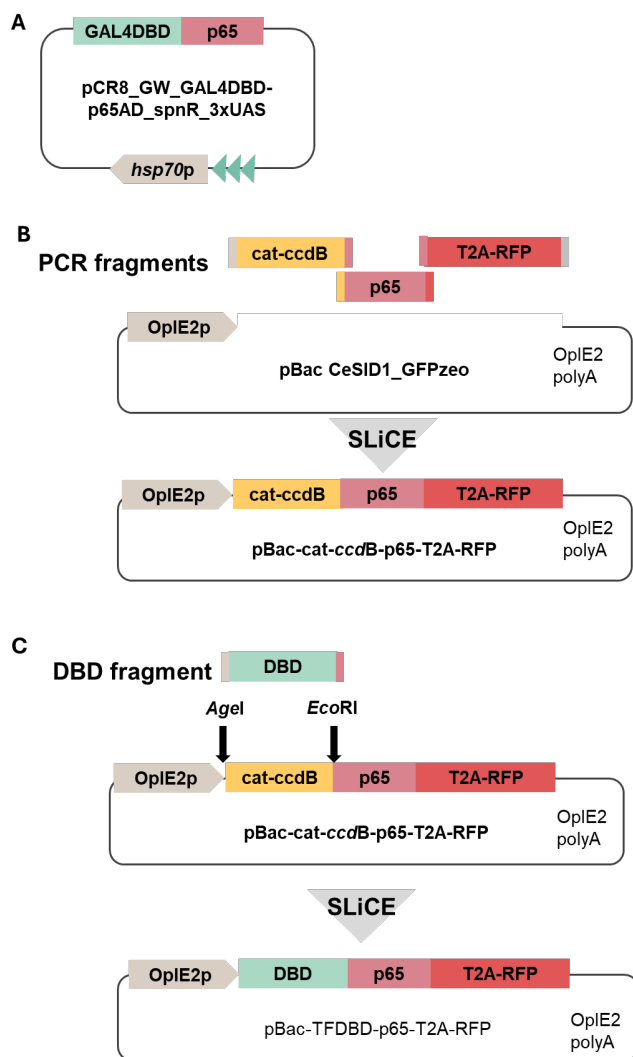
表 2. コンストラクションに使用した PCR 断片

増幅産物	産物長 (bp)	Forward primer	Reverse primer	鋳型DNA	引用文献および分譲元
① p65	552	p65_F	p65_R	pCR8_GW_GAL4DBD-p65AD_spnR_3xUAS	図2A
② cat-ccdB	1307	ccdB_F2	ccdB_R2	pGWB7	NAKAGAWA <i>et al.</i> , 2009
③ T2A-TagRFP	756	RFP_F	RFP_R	pV20-UAS-IVS-nlsGFP-2A-RFP	Li He博士とNorbert Perrimon博士より分譲, HE <i>et al.</i> , 2019
④ TBX5DBD	549	TBX5DBD_F	TBX5DBD_R	tetO-TBX5 (Addgene plasmid # 46032)	John Gearhart博士より分譲, ADDIS <i>et al.</i> , 2013
⑤ PAX5DBD	375	PAX5DBD_F	PAX5DBD_R	Pax5 (Addgene plasmid # 35003)	Malin Parma博士より分譲, PFISTERER <i>et al.</i> , 2011
⑥ GAL4-DBD-p65	1,085	GAL4_F	p65_R	pCR8_GW_GAL4DBD-p65AD_spnR_3xUAS	図2A
⑦ pCR8ベクター	2,810	pCR8_F	pCR8_R	pCR8/GW/TOPO	Invitrogen
⑧ KanR-1xTBX5CRE	1,129	KanR	kanR-r_TBX5CRE	BT3Bac	ONO <i>et al.</i> , 2007
⑨ KanR-1xPAX5CRE	1,129	KanR	kanR-r_PAX5CRE	BT3Bac	ONO <i>et al.</i> , 2007
⑩ attR-cat-ccdB-attR	1,717	pGWB7_F	pGWB7_R	pGWB7	NAKAGAWA <i>et al.</i> , 2009
⑪ attR-cat-ccdB-attR-mCD8-GFP	3,661	ccdB_F	ccdB_R	pBPGw-attR- cat-ccdB-attR-mCD8-GFP	図3D
⑫ カナマイシン耐性遺伝子 (KanR)	1,109	kanR-f	kanR-r	BT3Bac	ONO <i>et al.</i> , 2007

Avalanche-Everyday Transfection reagent (EZ biosystems) 1.25 μ l を加え、TC-100 培地で総液量を 50 μ l に調整後、ボルテックスで懸濁した液を 15 分室温で静置した。これを各ウェルに 10 μ l ずつ加え、プレートを優しく揺らして混合した。25 $^{\circ}$ C で 16 時間静置した後、培地を 10% Fetal Bovine Serum を含む TC-100 培地 150 μ l と交換し培養を続けた。

3. プラスミドの作製

使用したプライマーは表 1 に示す。また、コンストラクトおよびその作成に使用した PCR 断片について、鋳型 DNA、プライマー、引用



文献、譲渡元を表 2 で示した。PCR は PrimeSTAR Max DNA Polymerase (TaKaRa) のプロトコルに従った。変性は 98 $^{\circ}$ C で 10 秒、アニーリングは 55 $^{\circ}$ C で 5 秒、伸長時間は 72 $^{\circ}$ C で 1 kbp あたり 5 秒とした。

① ドライバープラスミドの作製

ベクターには pBac CeSID1_GFPzeo (MON *et al.*, 2012) を *EcoRI* と *HindIII* で制限酵素処理し、OpIE2 プロモーター (THEILMANN and STEWART, 1992) と OpIE2 polyA 配列の間の配列を除去したものを使用した。cat-ccdB、p65、T2A-tagRFP 断片 (それぞれ表 2 の①、②、③) を SLiCE (Seamless ligation cloning extract, MOTOHASHI *et al.*, 2015) によってベクターの

図 2. ドライバープラスミドの作製

A) pCR8_GW_GAL4DBD-p65AD_spnR_3xUAS

B) pBac-cat-ccdB-p65-T2A-RFP の作製フロー

C) ドライバープラスミド (pBac-TFDBD-p65-T2A-RFP) の作製フロー

GAL4DBD: GAL4DNA 結合ドメイン, p65: カイコ NFkB 由来の活性化ドメイン, hsp70p: heat shock protein70 promoter, OpIE2p: OpIE2 promoter, cat-ccdB: クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (chloramphenicol acetyltransferase) と ccdB 遺伝子発現カセット, T2A-RFP: T2A (自己切断ペプチド) と RFP の融合タンパク質をコードした遺伝子, SLiCE: Seamless ligation cloning extract, DBD: DNA 結合ドメイン (DNA-binding domain) 本研究では GAL4DBD の他、TBX5 ならびに PAX5 の DNA 結合ドメインを使用, OpIE2polyA: OpIE2 polyA. SLiCE に供試する PCR 断片は末端に 20~30 塩基の相同配列を付与した。

表 3. pCR8-5xCRE 作製に用いたオリゴ DNA の構成

配列	
1	5'- ggctac GGTCTCAAGGT-CRE- TATTTGAGACC ggctac -3'
2	5'- ggctac GGTCTCTTATT-CRE- TGTAAGAGACC ggctac -3'
3	5'- ggctac GGTCTCTTGTA-CRE- ATTCCGAGACC ggctac -3'
4	5'- ggctac GGTCTCAATTC-CRE- CAAGGGAGACC ggctac -3'
5	5'- ggctac GGTCTCCCAAG-CRE- ATGGGGAGACC ggctac -3'

それぞれ CRE の両側に *BsaI* 認識配列 (5'-GGTCTC-3') と突出末端を付与した。二本鎖 DNA の末端に *BsaI* 認識配列があると切断効率が下がってしまうため、末端に任意の 6 塩基 (表中小文字で示される) を付与した。

OpIE2 プロモーター下流にクローニングし、pBac-cat-*ccdB*-p65-T2A-RFP (図 2B) を得た。次に、pBac-cat-*ccdB*-p65-T2A-RFP (図 2B) を *AgeI* と *EcoRI* での制限酵素処理し、cat-*ccdB* 配列を除去した (図 2C)。TBX5DBD、PAX5DBD、GAL4DBD-p65 断片 (それぞれ表 2 の④、⑤、⑥) をそれぞれ SLiCE によりベクターの OpIE2 プロモーターの下流にクローニングして 3 種類のドライバープラスミド (pBac-TFDBD-p65-T2A-RFP) を得た (図 2C)。

② レポータープラスミドの作製

pCR8-5xCRE の作製

ベクターには表 2 の⑦の PCR 断片を使用した。各転写因子の CRE 配列は、表 3 のように GAL4、TBX5 もしくは PAX5 の CRE を 1 コピーと、CRE の両端に 6 塩基と *BsaI* サイト、*BsaI* サイトの両側に切断効率化のために ggctac の 6 塩基突出末端をそれぞれ付与させたオリゴ DNA を相補鎖配列と合わせて合成した CRE の両末端と *BsaI* サイトの間には 6 塩基は 1~5 の 5 種類の配列ペアとなっている (表 3)。これらのオリゴ DNA を Oligo annealing 反応 (Illumina library prep protocol) によって相補鎖同士をアニールさせ、1 コピーの CRE の 2 本鎖 DNA を得た (図 3C①)。精製した pCR8 断片と 5 つの 2 本鎖 CRE 断片を NEBridge Golden Gate Assembly Kit (*BsaI*-HFv2) (New England Biolabs) のプロトコルに従って連結した (図 3C②)。

レポータープラスミドの作製

Benjamin White 博士から分譲していただいた HJP-224-actin5C[^]Syn21Gal80[^]IVS-Syn21myrtdTomato-10UAS-mCD8GFP-p10w (Addgen plasmid #162481, LUAN *et al.*, 2020) のプラスミドをベクターとして用いた。

1×CRE を持つレポータープラスミドは以下の通り作製した：ベクターを *NaeI* で制限酵素処理したものを使用した。プライマーに 1×CRE 配列を付与し、カナマイシン耐性遺伝子の下流に TBX5 または PAX5 の 1×CRE を付与した PCR 断片 (表 2 の⑧または⑨) をそれぞれ SLiCE によってクローニングし、pBPGw-KanR-1xCRE-mCD8-GFP (図 3B) を得た。

5xCRE を持つレポータープラスミドは以下の通り作製した：ベクターを *NaeI* で制限酵素処理し、Gibson assembly (GIBSON *et al.*, 2009) によって attR-cat-*ccdB*-attR 断片 (表 2 ⑩) をクローニングし、pBPGw-attR-cat-*ccdB*-attR-mCD8-GFP (図 3C) を得た。このプラスミドと pCR8-5xCRE (図 3A) を Gateway LR Clonase II Enzyme mix (Thermo fisher Scientific) のプロトコルに従って Gateway cloning に供試し、cat-*ccdB* 配列と 5×CRE 配列を組換えてレポータープラスミド (pBPGw-5xCRE-mCD8-GFP) 得た (図 3D)。

③ バイナリーベクター間の直交性を確認するためのプラスミドの作製 (図 4)

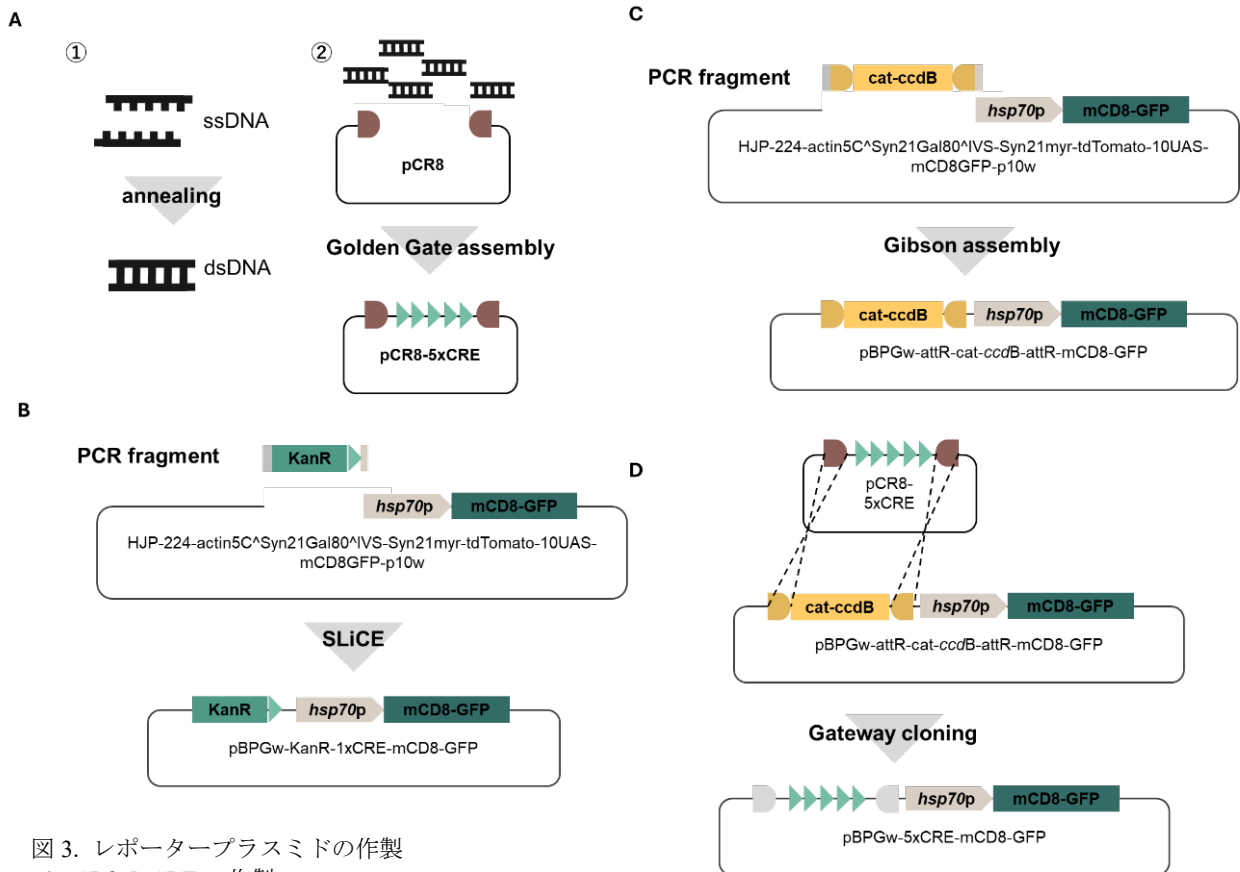


図 3. レポータープラスミドの作製

A) pCR8-5xCRE の作製フロー

B) 1×CRE レポータープラスミド (pBPGw-KanR-1xCRE-mCD8-GFP) の作製フロー

C) pBPGw-attR-cat-*ccdB*-attR-mCD8-GFP の作製フロー

D) 5×CRE レポータープラスミド (pBPGw-5xCRE-mCD8-GFP) の作製フロー

hsp70p: heat shock protein70 promoter, *OpIE2p*: *OpIE2* promoter, *cat-ccdB*: クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (chloramphenicol acetyltransferase) と *ccdB* 遺伝子発現カセット, *mCD8-GFP*: *mCD8* と GFP の融合タンパク質コード遺伝子, SLiCE: Seamless ligation cloning extract, KanR: カナマイシン耐性遺伝子発現カセット。SLiCE、Gibson assembly に供試する PCR 断片は末端に 20~30 塩基の相同配列を付与した。

ドライバープラスミド (図 2C) を *Bg*III で制限酵素処理したものをベクターとした (図 4A)。attR-*cat-ccdB*-attR-mCD8-GFP 断片とカナマイシン耐性遺伝子 (KanR) 断片 (それぞれ表 2 の⑪、⑫) を Gibson assembly によってクローニングし、pBac-TFp65-KanR-attR-*cat-ccdB*-attR-GFP (図 4A) を得た。これと pCR8-5xCRE を Gateway cloning に供試し、*cat-ccdB* 配列 5×CRE 配列を組換えて pBac-TFDBDp65-KanR-5xCRE-GFP を得た (図 4B)。

4. 蛍光観察

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) を用いて蛍光観察を行った。

結 果

1. ヒト転写因子の同定

DNA 結合ドメインのリソースとして、カイコおよび出芽酵母と進化的に遠縁でゲノム DNA 配列の多様性が想定されたヒトの転写因子群を選定した (LAMBERT *et al.*, 2018)。なお、オフターゲットの影響を避けるため、カイコゲノム内に存在しない DNA 配列を CRE とするヒト転写因子を探索した。

DBD と CRE の結合確率は、CRE 内の位置と塩基ごとの結合確率の行列 Position weighted matrix (PWM) で表現できる。LAMBERT *et al.*

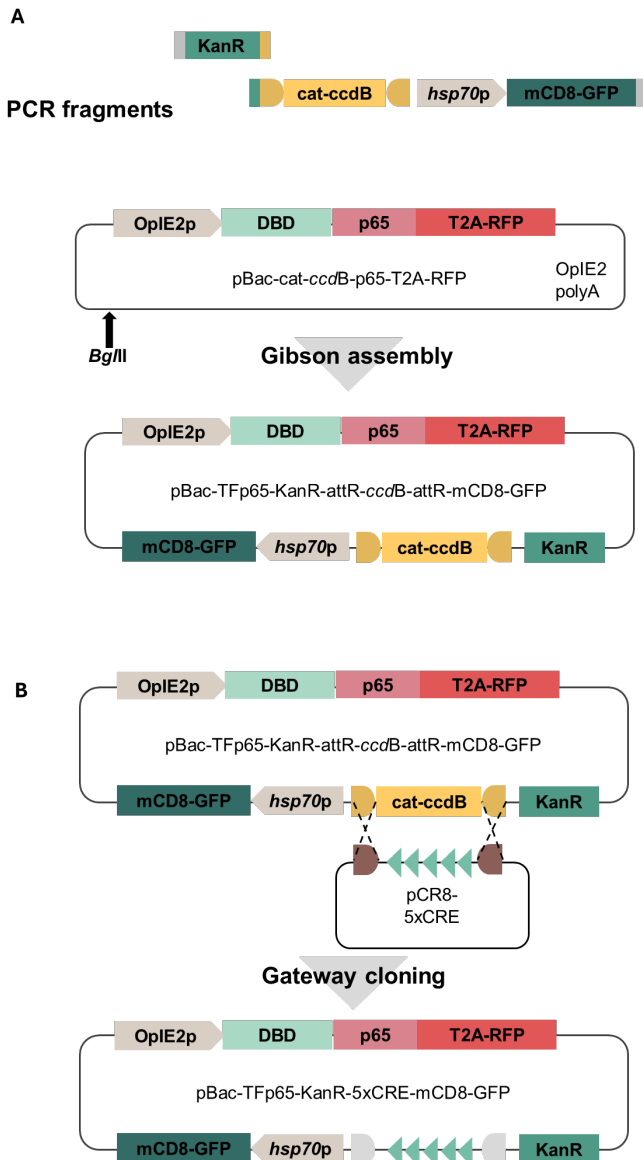


図 4. 転写因子の直交性確認用プラスミドの作製
A) pBac-TFp65-KanR-attR-ccdB-attR-hsp70-GFP の作製フロー
B) pBac-TFDBDp65-KanR-5xCRE-hsp70-GFP の作製フロー

hsp70p: heat shock protein70 promoter, OpIE2p: OpIE2 promoter, cat-ccdB: クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (chloramphenicol acetyltransferase) と ccdB 遺伝子発現カセット, T2A-RFP: T2A (自己切断ペプチド) を付与した RFP 遺伝子, mCD8-GFP: mCD8 と GFP の融合タンパク質コード遺伝子, SLiCE: Seamless ligation cloning extract, p65: カイコ NFκB 由来の活性化ドメイン, DBD: DNA 結合ドメイン (DNA-binding domain), KanR: カナマイシン耐性遺伝子発現カセット。Gibson assembly に供試する PCR 断片は末端に 20~30 塩基の相同配列を付与した。

(2018) のデータから各転写因子 CRE の PWM を取得し、結合確率が高いと想定される候補 CRE を算出し、これらの配列がカイコ白/C ゲノムに存在するかを K-mer 解析によって探索した。その結果、全ての候補 CRE がカイコゲノムに存在せず、モノマーではたらくとされるヒト転写因子を 260 種類同定した (図 5)。

2. カイコ培養細胞における転写因子の活性評価

同定されたヒト転写因子のうち、Addgene (<https://www.addgene.org/>) で入手可能な TBX5 と PAX5 の DNA 結合ドメインを使用して候補となる直交転写因子を作製した (図 2)。カイコ培養細胞 (BmN 細胞) でこれら転写因子の転写活性化能を検証した。

各転写因子についてドライバープラスミド (図 2C) とレポータープラスミド (図 3C) を BmN 細胞にコトランスフェクションした。各転写因子が結合する CRE には、PWM から推測された最も結合確率が高い候補 CRE (表 4) をそれぞれ用いた。48 時間後に蛍光観察を行った結果、ドライバープラスミドとレポータープラスミドをコトランスフェクションした実験区 (+TBX5p65 ならびに+PAX5p65 の▶▶▶▶) ではレポーターの GFP 蛍光が観察され、レポータープラスミドのみをトランスフェクションした実験区 (-TBX5p65 ならびに-PAX5p65) では GFP 蛍光は観察されなかった (図 6)。また、CRE を 1 コピーしか持たないレポータープラスミド (図 3B) をドライバープラスミドとコトランスフェクションした実験区も GFP 蛍光は観察されなかった (+TBX5p65 ならびに+PAX5p65 の▶)。

よって、作製した候補直交転写因子が BmN

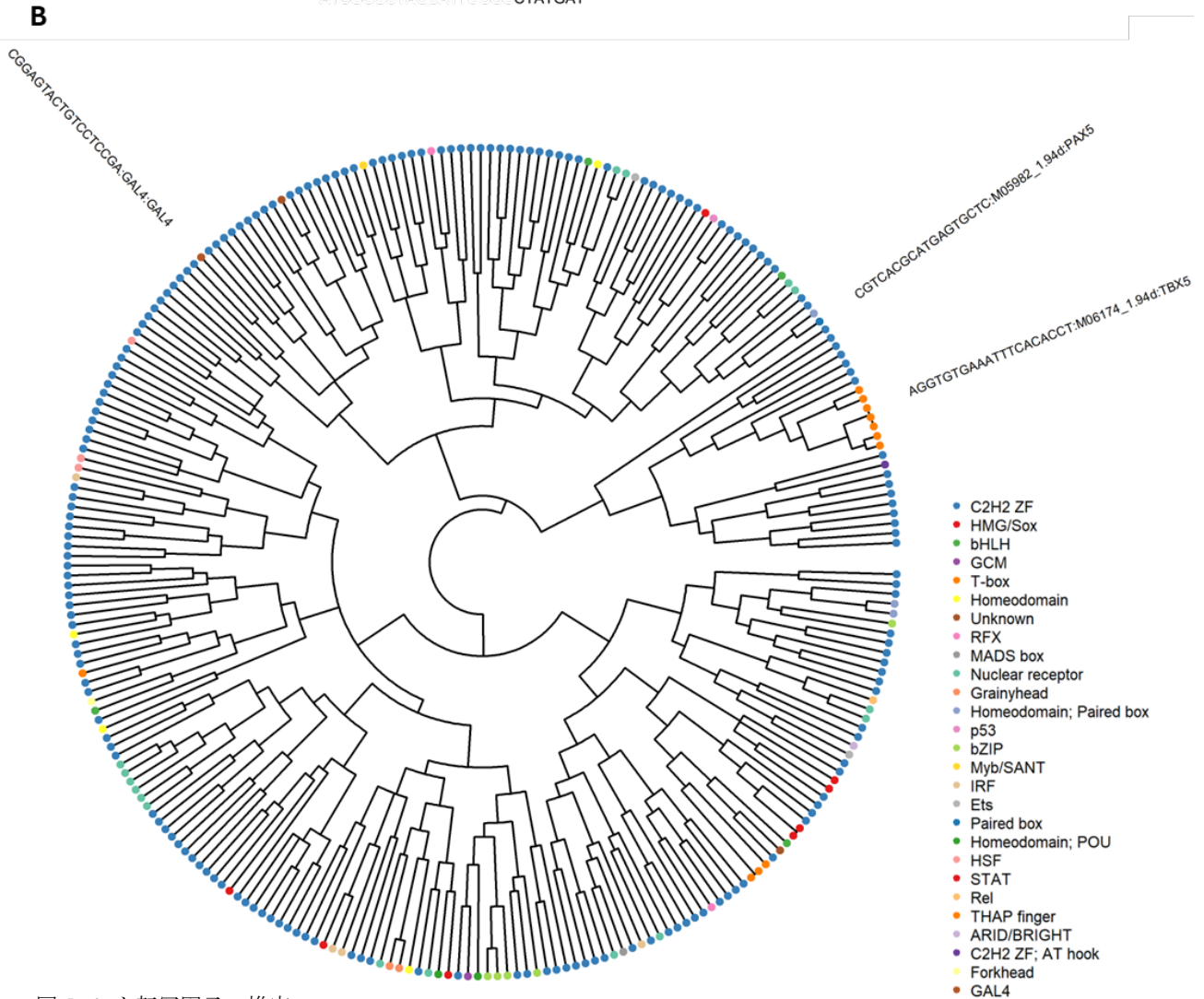
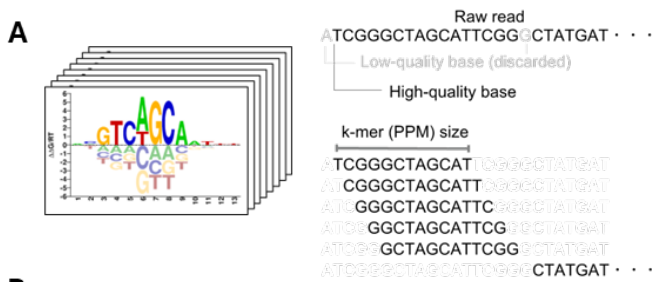


図 5. ヒト転写因子の推定

- A) 解析の概略図。先行研究より各転写因子の結合配列 (CRE) 情報を利用し、カイコゲノムをデータベースに K-mer 解析を行った。
- B) カイコゲノムに直交するヒト転写因子の CRE と UAS のクラスタリング。各転写因子の名前と最も結合確率が高い CRE を示している。レーベンシュタイン距離と完全連結法を用いた階層クラスタリングを行った。各転写因子の DBD を遺伝子ファミリーごとに色分けし、本研究で用いた転写因子をラベルで示した。

細胞内で転写活性化能を持つこと、各候補直交転写因子の CRE をもつレポータープラスミドはカイコ内在性の転写因子によって活性化されないことが示された。さらに、CREのコピー数は1コピーでは候補直交転写因子の転写活性化は不十分であり、複数コピーの CRE が必

要であった。

3. 候補直交転写因子と GAL4/UAS system 間の BmN 細胞における直交性の評価

バイナリシステムでは複数の転写因子の併

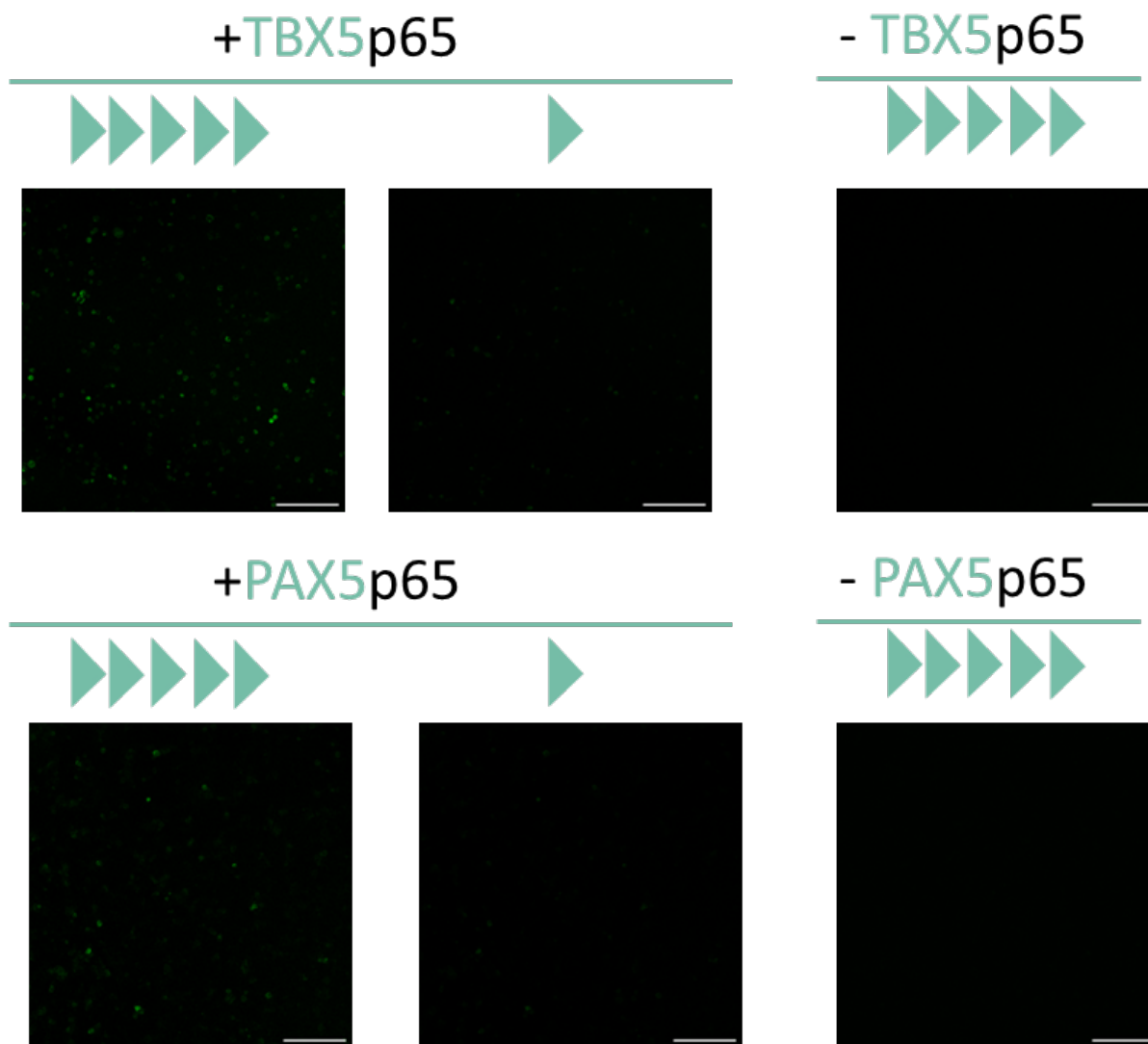


図 6. 培養細胞における直交転写因子の活性評価
 写真の緑色シグナルは GFP 蛍光。写真上部の三角形の個数が結合配列 (CRE) のコピー数を示している。スケールバー: 300 μm 。

用により、更なる複雑な発現制御が可能になる。既にショウジョウバエ (POTTER *et al.*, 2010) や一部のモデル植物 (BROPHY *et al.*, 2022) では複数の転写因子を導入した合成遺伝子発現回路が実装されている。このような系を構築するには、使用する転写因子間で直交性が担保されている必要がある。本研究で作成した転写因子がカイコで併用可能かを明らかにするために、作製した候補直交転写因子と GAL4/UAS system の間の直交性を検証した。

まず、転写因子発現カセットとレポーターカセットを同一プラスミド上に持つ pBac-TFp65-

KanR-5xCRE-hsp70-GFP を作製した (図 4B)。このプラスミドは pBac-TFp65-KanR-attR-*ccdB*-attR-hsp70-GFP (図 4A) に CRE を Gateway cloning によって選択マーカーと CRE を組換えられるよう設計し (図 3D)、3 つの転写因子と 3 つの CRE の全ての組み合わせで pBac-TFp65-KanR-5xCRE-hsp70-GFP を作製した。これらのプラスミドをそれぞれ BmN 細胞にトランスフェクションし、48 時間後に蛍光を観察した。TBX5、PAX5 および GAL4 の DNA 結合ドメインとそれぞれに対応する CRE を持つプラスミドをトランスフェクションした実験区

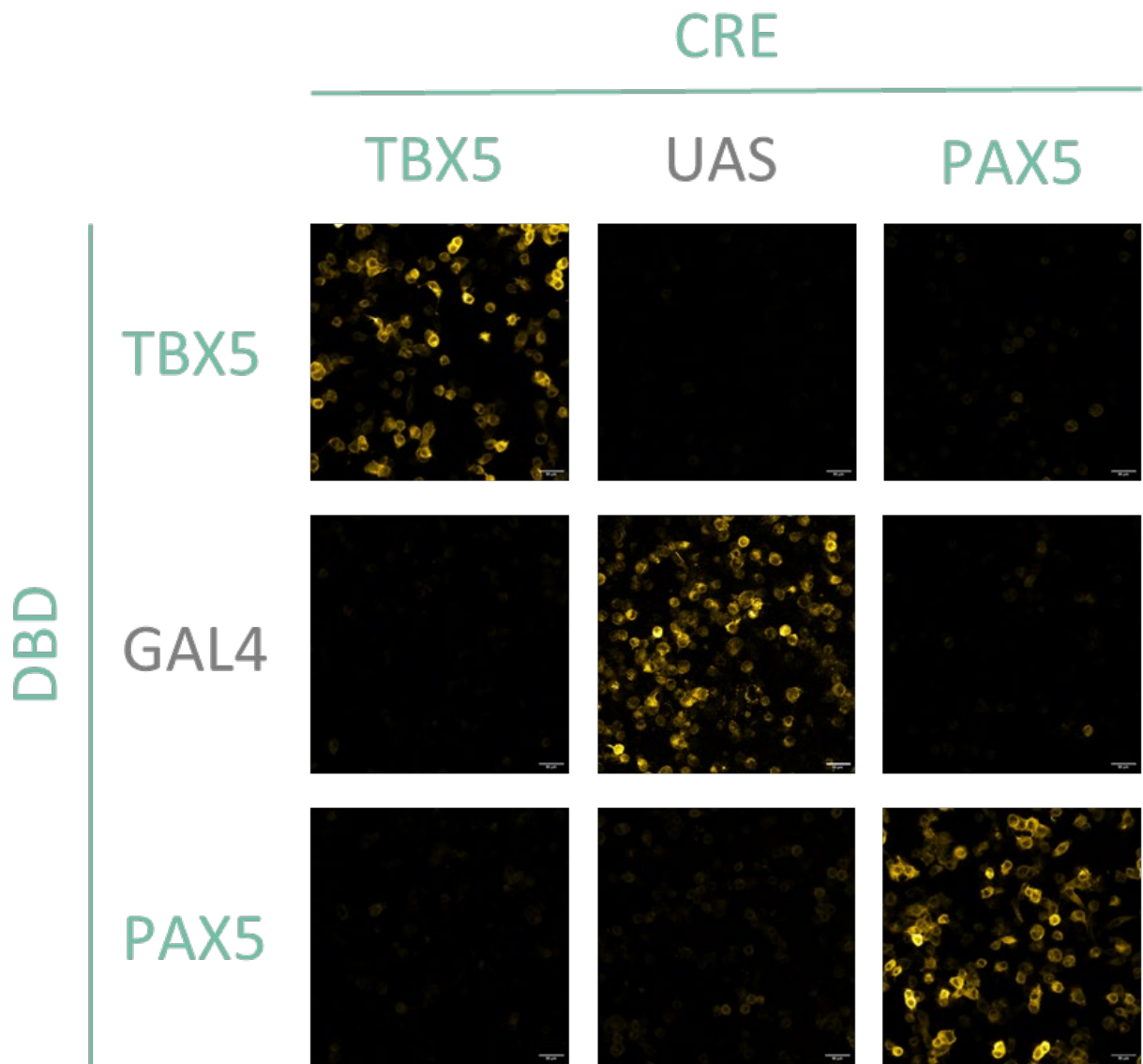


図7. 培養細胞における直交転写因子間の直交性評価
縦は使用した結合配列 (CRE)、横は使用した転写因子の DNA 結合ドメイン (DBD) の種類を示す。写真の黄色シグナルは GFP 蛍光。スケールバー: 50 μm 。

では強い GFP 蛍光が観察されたのに対し、TBX5-DBD に対する GAL4 の CRE もしくは PAX5 の CRE などの対応しない CRE をもつプラスミドをトランスフェクションした実験区では GFP 蛍光強度の低下が観察された (図7)。これらのことから、カイコ細胞における GAL4/UAS system とヒト TBX5 およびヒト PAX5 の DNA 結合ドメインを用いた候補直交転写因子の直交性が示された。加えて、2 種類の候補直交転写因子間の直交性も示された。

考 察

GAL4/UAS system をはじめとするバイナリシステムは遺伝子発現操作に有用なツールだが、カイコにおいては GAL4/UAS system の利用のみにとどまっている。本研究ではヒト転写因子の CRE 情報を活用して、GAL4/UAS system に直交する転写因子を推定した (図5)。このうち、ヒト TBX5 ならびに PAX5 を用いて転写因子を作製し、BmN 細胞での転写活性を検出した (図6)。これらの転写因子は GAL4/UAS

system に交差せずに機能し、ヒト転写因子間でも交差せずに機能することが明らかになった (図 7)。これらの結果は、本研究で使用した 3 つの転写因子を複数同時に発現可能であることを示唆している。カイコでは GAL4 と UAS をゲノムに挿入した数百ものエンハンサー・トラップ系統が作出されており (UCHINO *et al.*, 2008)、本研究で作出した直交転写因子の GAL4/UAS system との併用による相乗効果が期待できる。

従来のバイナリシステムは他の生物の転写因子を経験的に導入し、改良を加えながら使用してきた。一方で、転写因子の毒性や CRE の非特異性により利用できる生物種が限られるという問題点がある。近年ではエンドヌクレアーゼ活性を持たない dCas9 と転写活性化ドメインを融合させた転写活性化システムも開発されており (FARZADFARD *et al.*, 2013)、このシステムではゲノム中の標的配列にマッチするガイド RNA を使用することで dCas9 を標的配列に結合させている。しかし現在利用されている dCas9 は *Streptococcus pyogenes* 由来の spdCas9 と *Staphylococcus aureus* 由来の sadCas9 (RAN *et al.*, 2015) の 2 種類に限られている。

本研究で推定した 260 種類のヒト転写因子とその CRE の距離データは、従来のバイナリシステム確立方法とは異なり、ゲノム情報と合わせて活用することで *in silico* でオフターゲットの可能性を排除しながら直交が推測される転写因子を簡便に作製できることを示している (図 5, 7)。

p65 を使用した直交転写因子の転写活性化能の十分な担保にはタンデムな CRE が必要だった (図 6)。一般的に、転写因子の CRE はコピー数が多いほど強く転写活性化できることが知られている (WANG *et al.*, 2016)。一方で、

CRE のような短いパターンの繰り返し配列や高い GC 含有量を持つ配列の合成は難しい。これは DNA の合成はオーバーラップを持つように設計・合成された短鎖のオリゴ DNA 同士をアニーリングし、一本鎖部分を DNA ポリメラーゼで埋めて長鎖の 2 本鎖オリゴ DNA を作製するためである。本研究の手法のように Gateway cloning を用いて CRE を 1 コピーずつクローニングする方法 (表 3, 図 3A) は CRE 同士をつなぐ配列を付与することになるためカイコゲノム内での CRE の特異性低下につながる可能性がある。直交転写因子の活性化ドメインの変更など少ない CRE のコピー数でも発現量を担保できるような転写因子側の改良も今後必要である。

本研究の成果から、カイコで使用できるバイナリシステムの新規構築と拡張の可能性を示した。本研究で構築された系がカイコの基礎・応用研究の両面において新たな一手をもたらすツールとなることが期待される。

文 献

- ADDIS RC. *et al.* (2013): J. Mol. Cell. Cardiol, **60**: 97
- ALBERTS B. *et al.* (2014): Mol. Biol. Cell, **6** 369-380
- ASAKAWA K. and KAWAKAMI K. (2008): Dev. Growth. Diff, **50**: 391-399
- BRAND AH. and PERRIMON N. (1993): Development, **118**: 401-415
- BROPHY JAN. *et al.* (2022): Science, **377**: 747-751
- CHEN T. *et al.* (2020): bioRxiv, doi: 10.1101/2020.02.17.952523
- FARZADFARD F. *et al.* (2013): ACS Synth. Biol, **2**: 604
- GHOSH A. and HALPERN ME. (2016): Methods Cell

Biol, **135**: 205-218

- GIBSON DG. *et al.* (2009): Nat. Methods, **6**: 343-345
HARTLEY KO. *et al.* (2002): PNAS, **99**: 1377-1382
HE L. *et al.* (2019): eLife, **8**: e46181
IMAMURA M. *et al.* (2003): Genetics, **165**: 1329-1340.
JOLMA A. *et al.* (2013): Cell, **152**: 327-339
KOBAYASHI I. *et al.* (2011): Arch. Insect Biochem. Physiol, **76**: 195-210
LAMBERT SA. *et al.* (2018): Cell, **172**: 650-665
LI WS. *et al.* (2024): Int. J. Mol. Sci, **25**: 12341
LUAN H. *et al.* (2020): eLife, **9**: e53041
MITA K. *et al.* (2004): DNA Res, **11**: 27-35
MON H. *et al.* (2012): RNA Biol, **9**: 40-46
MOTOHASHI K. (2015): BMC Biotech, **15**: 47
NAKAGAWA T. *et al.* (2009): Plant Biotechnol, **26**: 275-284
ONO C. *et al.* (2007): J. Insect Biotech. Seric, **76**: 161-167
PFISTERER U. *et al.* (2011): PNAS, **108**: 10343-10348
POTTER CJ. *et al.* (2010): Cell, **141**: 536-548
RAN FA. *et al.* (2015): Nature, **520**: 186-191
THEILMANN DA. and STEWART S. (1992): Virology, **187**: 84-96
TONG X. *et al.* (2022): Nat. Commun, **13**: 5619
UCHINO K. *et al.* (2008): Insect Biochem. Mol. Biol, **38**: 1165-1173
WANG H. *et al.* (2017): Nat. Methods, **14**: 145-148
XIA Q. *et al.* (2004): Science, **306**: 1937-1940

謝 辞

共焦点レーザー顕微鏡 TCS SP5 (Leica) 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、並びに顕微鏡での撮影に際して技術指導してくださった安井雅範担当職員に御礼申し上げます。

白/C 系統ゲノム配列の解析にあたり御協力いただきました慶應義塾大学 先端生命科学研究所/慶應義塾大学大学院 政策・メディア研究科 教授 荒川 和晴 博士に御礼申し上げます。

転写因子の CRE 解析にあたり高性能計算サーバーを使用させていただきました基礎生物学研究所 超階層生物学センター データ統合解析室に御礼申し上げます。

tetO-TBX5 (Addgene plasmid # 46032)、Pax5 (Addgene plasmid # 35003)、HJP-224-actin5C[^]Syn21Gal80[^]IVS-Syn21myr-tdTomato-10UAS-mCD8GFP-p10w (Addgene plasmid # 162481)、pV20-UAS-IVS-nlsGFP-2A-RFP のプラスミドを分譲していただきましたペンシルベニア大学獣医学部生物医学科 教授 John D. Gearhart 博士、ルンド大学実験医学部 教授 Malin Parmar 博士、アメリカ国立衛生研究所神経機能部門 主任研究員 Benjamin White 博士、ハーバード大学医学部ブラバトニック研究所 研究員 (現 中国科学技術大学 主任研究員) Li He 博士ならびにハーバード大学医学部ブラバトニック研究所遺伝学 教授/ハワード・ヒューズ医学研究所 研究員 Norbert Perrimon 博士に厚く御礼申し上げます。

錦秋×鍾和において5齢幼虫脱皮個体を得るアラテクトミー方法

Kim Jungu¹・金見 雄²・佐原 健^{1*}

¹岩手大学農学部,²弘前大学農学生命科学部

(2024年12月25日受理)

幼若ホルモン (JH) は、昆虫の脱皮と変態を制御する主要なホルモンのひとつである (BOUNHIOL, 1938)。クラシカルスキームに従えば、脱皮ホルモン (20E) とともに JH が存在すれば幼虫脱皮を引き起こし、JH 消失すれば化蛹を誘導する (FUKUDA, 1944)。ゆえに JH は、幼虫を維持する *status quo* ホルモンと呼ばれる (RIDDIFORD, 1996)。タバコスズメガヤカイコにおいて、幼虫脱皮を引き起こすために必要な JH への感受性は、体液中エクジステロイド濃度が急激に上昇する以前に限られている (TRUMAN, 1972; KIGUCHI and AGUI, 1981; SAKURAI, 1983)。この JH 感受性を保つ期間に体内からアラタ体を取り除くと、早熟な蛹への変態が誘導され、この時期よりも後で同様の処理を行った場合は、幼虫脱皮が行われる。

JH はまた、卵黄タンパク質の発現や誘導による卵巣発達の促進 (DAVEY, 1996)、幼虫体色の変化 (FUTAHASHI and FUJIWARA, 2008) や無核精子形成開始のタイミング (LEVIATAN and FRIEDLÄNDER, 1979) などを制御するなどの生理機能も果たす。進化的なチョウ目昆虫は、卵での受精を担う有核精子と核を持たない無核精子の2種類の精子が形成される (MEVES, 1903)。カイコを用いた研究から無核精子は、有核精子の受精を補助する必要不可欠な存在であるこ

とが示されている (SAHARA and KAWAMURA, 2002; SAHARA and TAKEMURA, 2003; SAKAI *et al.*, 2019)。カイコにおける二型精子形成は、5齢初期に有核精子が形成された後に無核精子形成が認められる (SADO, 1961; KAWAMURA and SAHARA, 2002)。ところが、有核精子から無核精子形成への分化の切り替えに関わる分子メカニズムは不明のままである。我々は、JH アナログのカイコ5齢幼虫への塗布実験を行い、JH の無核精子形成への関与を示唆するデータを得ている (data not shown)。この実験では、内在性 JH を排除した実験は行われていない。こうした研究を実施するためには、5齢起蚕からアラタ体のない幼虫を獲得する必要がある。そこで本研究では、早熟変態を誘導しない錦秋×鍾和4齢幼虫のアラテクトミーに適する時期を特定することを目的とした実験を行った。

材料と方法

1. 供試昆虫と飼育条件

本研究には上田蚕種より購入した錦秋×鍾和の冷蔵保存卵を用いた。室温に2日放置した後、温度25℃、湿度70-80%、全明に設定したインキュベーター (MIR-154, PHCBI) にて催青

*責任著者

〒020-8550 盛岡市上田3丁目18-8

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

を行った。幼虫は温度 25 ± 1.22 °C、湿度 60%、明期 12 時間・暗期 12 時間の恒温室で飼育した。湿度が低い場合には加湿器 (HD-RX900A, ダイニチ) により加湿した。4 齢への脱皮は暗期に起こり、その後の明期の始まりを 0 時間とした。餌は人工飼料 (SilkMate 2M, 日本農産工業株式会社) を用いた。

2. アラタ体摘出 (Allatectomy) 実験

ビーカーにいれた純水 (Elix water) にて 4 齢雄幼虫を 13 分間、水麻酔した。麻酔されたカイコを光学顕微鏡下で粘土 (瀬戸製土, レオン油土) と虫ピン (2 号) で固定し、腹面から頭胸間の皮膚 (neck membrane) を切開してアラタ体 (CA) を摘出した。切開および摘出はすべて精密ピンセット (Dumont 5 INOX 08 0108-5-PO ならびに Dumont 5 Dumostar 09 0209-5-PO) を用いた。

アラタ体摘出では、KIGUCHI (1983) を参考に、(1) タイムテーブルもしくは (2) 気門インデックス (spiracle index) を用いてステージングを行った。

3. 気門インデックスの鑑別

飼育ケースごとに幼虫 10 頭を無作為抽出し、光学顕微鏡で腹部第 7 体節の気門を観察した。4 齢 72 時間から観察し、抽出た個体がすべて C₁ になったタイミングでアラタ体摘出を開始した。

結果と考察

KIGUCHI (1983) によると、カイコ 4 齢におけるアラタ体から放出される JH の *status quo* 効果は 4 齢脱皮後 60 時間までとされ、それ以降は幼虫脱皮に JH が必要ない。また、この時間から気門のアポライシスが開始される。これはごく少量のエクダイソンが分泌されることによって誘導される。また、4 齢脱皮後 66 時間までに幼虫脱皮に十分な量のエクダイソンが前胸腺から分泌される。その後、体液中のエクジステロイド濃度は 72 時間で極大に達した後、数時間以内に外表皮 (epicuticle) の形成が開始される。KIGUCHI (1983) のタイムテーブルに従い、4 齢脱皮後 60 時間以降の錦秋×鍾和においてアラタ体除去を 3 回行った。最初の実験では、早熟変態した個体は限られ、5 齢起蚕率は 80%であったものの 2 回目と 3 回目は、



図 1. アラテクトミー実験区における蛹ならびに繭サイズ
早熟変態した -CA 区の蛹と繭サイズは、他 2 区と比較して明らかに小さい。Mock: 無処理区, Sham: 偽手術区, -CA: アラタ体摘出区。バーは 5 cm。

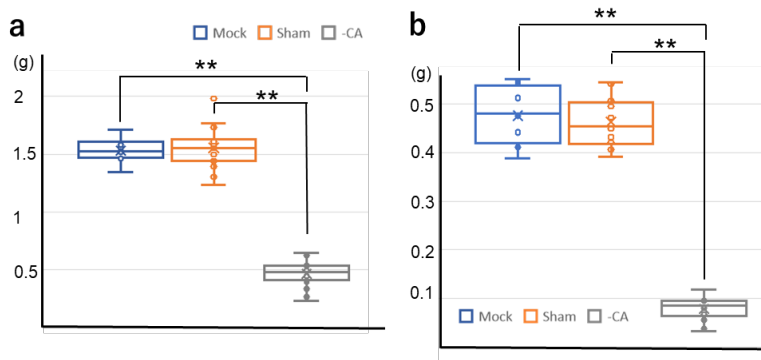


図 2. アラテクトミー実験区における蛹体重 (a) ならびに繭重 (b) の箱ひげ図
Mock: 無処理区, Sham: 偽手術区, -CA: アラタ体摘出区。**: Welch 検定 (sheffe の事後検定後) による 1%水準での有意差あり。

いずれの実験区においても過半数の早熟変態個体が認められた (表 1)。2 回目の実験における無処理 (Mock)、偽手術 (Sham) およびアラタ体摘出 (-CA) の蛹と繭の写真を図 1 に示した。-CA の蛹と繭サイズは Mock ならびに Sham と比較して明らかに小さく、統計的にも有意差が認められた (図 2)。これらのことからアラタ体摘出手術は成功し、内在性 JH の影響のない 5 齢起蚕が得られたと考えられた。一方、実験区 1 以外は、早熟変態が多く認められ、効率面では修正の余地があった。

そこで、錦秋×鍾和 4 齢幼虫において KIGUCHI (1983) の気門インデックス (spiracle index) C_1 に達したところでアラタ体摘出実験を開始することとした。その結果、8 回目の摘出実験の 1 個体を除いて早熟変態は出現しなかった (表 2)。これらの結果は、JH の *status quo* 効果終了後にアラタ体摘出したことと齟齬が無い。その反面、脱皮不全などの異常個体や死亡する個体が目立った。新たな外表皮が形成されると、5 齢皮膚が傷つく蓋然性が高くなり、脱皮不全や皮膚に傷のある個体が出現すると予想される。KIGUCHI (1983) の使用品種は記載がないため不明だが、 C_1 開始から外表皮分泌開始までに 6 時間以上を要するとしている。気門インデックスを基準とした本研究の実験時間 (表 2) は、最長でも 3 時間であった。これらの実験よりも解剖ステージが早かった実

験区 1 と 2 の生存率は実験区 6 を除き上回っていた (表 1, 2)。実験開始が C_1 初期よりも進んでいた可能性は否定できないが、現在の見立てよりも数時間摘出時期を早めることで生存率の改善を図ることは可能であろう。

これまでカイコにおいて複数の研究者が、幼虫脱皮を誘導するための JH 感受性の期間について検証を行ってきた。FUKUDA (1940) は、正白 4 齢幼虫を用いた頭部結紮/断頭を行った個体の胸腹部の脱皮を観察し、4 齢 90 時間までは蛹化個体が生じ、一方で 70 時間から 5 齢脱皮幼虫が生じることを報告している。蛹化が極大になるのは 4 齢 80 時間で、90 時間では激減する一方、90 時間からは 5 齢脱皮個体が急増した。これらの結果を大胆にも気門インデックス (KIGUCHI, 1983) と対応させると、4 齢 80 時間の少し後に気門インデックスが B に到達し、90 時間のやや前に気門インデックス C_1 の始まりが存在すると予測される。

錦秋×鍾和において C_1 に達した時間は 73~79.5 時間と飼育/実験区ごとに異なった (表 2)。本実験における C_1 の見立てが正しいならば、錦秋×鍾和の C_1 開始は平均 76.3 時間となる。ここから 6 時間前が気門インデックス B である (KIGUCHI, 1983) ことを採用すると、錦秋×鍾和において早熟変態の出現を抑えるアラテクトミーのステージは、4 齢 70.3 時間からと算出される。SAKURAI (1983) によれば、4 齢の齡

期を明期始まりとした場合、頭胸部間結紮を72時間以降に行うと全ての個体が5齢へと脱皮しており、上記で算出された時間と大きな矛盾はない。

ただし、KIGUCHI (1983) のデータは全明の飼育環境で行われた。気門インデックスは体液中のエクジステロイドの変動によって進行していくが、タバコスズメガおよびカイコの研究から、前胸腺を刺激するPTTHは暗期に分泌されることが明らかになっている (TRUMAN, 1972; SAKURAI, 1983)。つまりエクダイソンの分泌タイミングが、明暗周期の有無で変わることを示している。これらのことを考慮すると、先に提示した早熟変態の出現を抑えるアラテクトミーの時間である「4齢70.3時間」が、暗期に訪れるのかそれとも明期なのかを勘案する必要がある。本飼育条件では、4齢70.3時間は3日目の暗期に相当することから、すでにPTTHの分泌が行われていると考えられる。

KANEKO *et al.* (2011) は、錦秋×鍾和を用いて気門インデックスの変動を観察している。彼らの飼育では、4齢期は暗期始まりで、4齢48

時間から60時間の暗期にPTTHの分泌がされていると考えられ、4齢60時間には急激にエクジステロイド濃度が上昇した。その結果、4齢76時間には眠の状態であるD₃まで気門インデックスが進行している。本研究でも同様に、PTTH分泌後の明期で急激にエクジステロイド濃度が上昇し、脱皮への準備が進むと考えられる。そのため、今後、錦秋×鍾和を用いて同様の実験を行う場合、できる限り明期開始である72時間前後の早い時間で摘出するのがより適切だと推測される。この推測に基づき今後の実験を進めていきたい。

文 献

- BOUNHIOL JJ. (1938): Bull. Biol. Fr. Belg. Suppl. **24**: 1-199.
- DAVEY KG. (1996): Invert. Reprod. Dev, **30**: 249-254
- FUKUDA S. (1940): Proc. Imp. Acad. Japan **16**: 417-420
- FUKUDA S. (1944): J. Fac. Sci. Tokyo Univ. Sect.

表 1. 4 齢起蚕からの経過時間を基準にしたアラタ体摘出実験

実験区	解剖日	4齢解剖 ステージ (h)	5齢起蚕個体	早熟変態個体	死亡/異常個体	5齢起蚕率 (%)	生存率 (%)
1	2023.8.12	60~72	32	8	5	80	88.89
2	2023.12.2	60~74	68	96	21	41.46	88.65
3	2024.11.8	65~74.6	23	35	-*	39.66	-**

* 不明

** 計算不能

表 2. 4 齢幼虫の気門インデックスを基準にしたアラタ体摘出実験

実験区	解剖日	4齢解剖 ステージ (h)	5齢起蚕個体	早熟変態個体	死亡/異常個体	5齢起蚕率 (%)	生存率 (%)
4	2024.10.29	73~76	25	0	7	100	78.13
5	2024.10.31	78~79.5	17	0	8	100	68
6	2024.11.14	76.6~79.1	19	0	2	100	90.48
7	2024.11.20	74.3~77	14	0	6	100	70
8	2024.11.23	79.5~81.5	20	1	4	95.24	84

- IV, **6**: 477-532
- FUTAHASHI R. and FUJIWARA H. (2008): Science, **319**: 1061
- KANEKO Y. *et al.* (2011): Mol. Cell. Endocrinol, **335**: 204-210
- KAWAMURA N. and SAHARA K. (2002): Dev. Growth Differ, **44**: 273-280
- KIGUCHI K. (1983): JARQ, **17**: 41-46
- KIGUCHI K. and AGUI N. (1981): J insect physiol, **27**: 805-812
- LEVIATAN R. and FRIEDLÄNDER M. (1979): Dev. Biol, **68**: 515-524
- MEVES F. (1903): Arch. Mikrosk. Anat. Entwicklungsmech, **61**: 1-84
- RIDDIFORD L. (1996): Arch. Insect Biochem. Physiol, **32**: 271-286
- SADO T. (1961): Jap. J. Genet, **33**: 283-286
- SAHARA K. and KAWAMURA N. (2002): Zygote, **10**: 23-29
- SAHARA K. and TAKEMURA Y. (2003): J. Exp. Zool, **297A**: 196-200
- SAKAI H *et al.* (2019): PNAS, **116**: 10412-10417
- SAKURAI S. (1983): J. Insect Physiol, **29**: 919-932
- TRUMAN JW. (1972): J. Exp. Biol, **57**: 805-820

表皮・脂肪体におけるカイコ *Spätzle3* へのメラニン合成応答差異

四十物 風花¹・浅野 眞一郎¹・佐藤 昌直^{1,2*}

¹北海道大学農学院、²北海道大学数理・データサイエンス教育研究センター

(2024年12月27日受理)

サイトカインは細胞から分泌される低分子量タンパク質であり、発生や免疫応答など生物の幅広い生理的プロセスに関与する。サイトカインは、特定の受容体に結合することで下流の遺伝子発現を制御している。サイトカインの一種である *Spätzle* 遺伝子ファミリーは、Toll 受容体を介し、下流のシグナル伝達を行う。

Spätzle は受容体に結合するために、セリンプロテアーゼカスケードによる切断 (プロセシング) を受け、発現時の未成熟な前駆体構造から活性型構造への変化が必要である (JANG *et al.*, 2006)。このプロセシングを担うプロテアーゼの発現制御を介することで、*Spätzle* によるシグナル伝達が微調整される。プロセシングされた *Spätzle* が Toll に結合すると、Toll シグナル伝達経路下流の転写抑制因子 Cactus の分解により NF- κ B/REL 転写因子群が核内に移行し、下流の遺伝子発現が変化する (LEMAITRE *et al.*, 1996)。*Spätzle* 遺伝子ファミリーに関する研究は、発生における背腹軸の形成、自然免疫の分野で進んだが (ANDERSON *et al.*, 1985、LEMAITRE *et al.*, 1995)、キイロショウジョウバエでは、*Spätzle* 遺伝子ファミリーメンバーは6種類 (LIMA *et al.*, 2021)、*Toll* 遺伝子ファミリーメンバーは9種類 (CHENG *et al.*, 2008) が同定されており、それらの機能的な差異が報告さ

れている。

f40 系統などのカイコ (*Bombyx mori*) 品種は、虎蚕と呼ばれる縞模様を持ち、*Zebra (Ze)* 遺伝子座に支配される。f40 を用いた KONDO *et al.* (2017) の研究により、*Ze* の原因遺伝子は *spätzle3* であると同定されている。この研究において、*Toll-8* ノックダウンによって縞模様の色素沈着消失が観察されたことから、カイコ *Spätzle3* の受容体は *Toll-8* と推定されている。クチクラでの色素沈着にはチロシンを前駆体とするメラニン合成経路過程が関与しており、昆虫の体色・模様を決定する。キイロショウジョウバエでは、*yellow* と *tan* 遺伝子産物が *Dopa* と *Dopamine* に作用し、体表の色を決定する (JEONG *et al.*, 2008)。カイコ f40 系統表皮の虎蚕模様の場合には、*piggyBac* システムとエレクトロポレーションを組み合わせた somatic transformation (ANDO and FUJIWARA, 2013) による *spätzle3* の過剰発現もしくはノックダウンにより体表のメラニンの蓄積量が増減し、*Spätzle3-Toll-8* シグナル伝達経路が表皮組織でのメラニン合成を活性化することが示された。

ANDO and FUJIWARA (2013) の行った somatic transformation では、表皮だけでなく脂肪体組織への形質転換も報告されており、KONDO *et al.* (2017) によって示された、メラニンが合成さ

*責任著者

〒060-8589 札幌市北区北9西9

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

れた表皮付近の脂肪体組織においても Spätzle3 が過剰発現している可能性がある。昆虫の脂肪体では、抗菌ペプチドの産生に Spätzle-Toll シグナル伝達経路が関与しており (MANFRUELLI *et al.*, 1999)、ショウジョウバエではほとんどすべての Toll 受容体が抗菌ペプチドの産生に関与することが知られている (CHOWDHURY *et al.*, 2019)。脂肪体における Spätzle3 過剰発現は、脂肪体で発現する Toll-8 との結合が想定されるが、脂肪体でのメラニン合成の有無、表皮-脂肪体組織間における Toll および下流の遺伝子発現の違いについては検討されてこなかった。

本研究では、カイコの表皮と脂肪体で Spätzle3 を過剰発現させることで両組織のメラニン合成能の違いを比較した。その結果、表皮では KONDO *et al.* (2017) と同様のメラニンが合成されたのに対し、脂肪体ではメラニン合成が起きなかった。この差異を生む分子メカニズムを解明するために、表皮・脂肪体のトランスクリプトームを比較し両組織での Spätzle3 の受容、メラニン合成に至るシグナル伝達の詳細を検討した。

材料と方法

1. EGFP- Spätzle3 発現プラスミド (pPIG-A3G-Spätzle3) の作成

Spätzle3 配列は人工合成 DNA (Eurofins Genomics) をテンプレートに増幅し、pPIG-A3GR (ANDO and FUJIWARA, 2013) に含まれる DsRed2 配列を切除し Gibson Assembly 法 (GIBSON, 2011) によってクローニングした。これにより、pPIG-A3GR Actin3 プロモーター下流の DsRed2 配列が Spätzle3 配列に置換され、

EGFP- Spätzle3 発現プラスミド (pPIG-A3G-Spätzle3) を得た (図 1 a)。

2. 供試昆虫

本研究では、九州大学大学院農学研究院資源生物科学部門 昆虫ゲノム科学研究室で系統化された虎蚕型縞模様のないチョビヒゲ状 (E^M) 系統 f38 を用いた。飼育は 25 °C、明暗条件は設定せず養蚕室にて桑葉により行った。エレクトロポレーションには 2 齢幼虫を供試し、5 齢まで飼育して経過観察を行なった。

3. pPIG-A3G- Spätzle3 somatic transformation

somatic transformation には、ドナープラスミドとして pPIG-A3GR、pPIG-A3G-Spätzle3、ヘルパープラスミドとして pHA3PIG を用いた (ANDO and FUJIWARA, 2013) (図 1 a-c)。ドナープラスミドとヘルパープラスミド濃度がそれぞれ 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるよう、1×PBS を用いプラスミド溶液を調製した。ニードルプーラー PC-10 (Narishige) を用いてガラス針 GD-1 (Narishige) を作製し、マイクロインジェクター IM-400 (Narishige) を用いてプラスミド溶液 0.5 μl を体腔内に注入した。注入後すぐに、注入部位近傍にエレクトロポレーター Cure-Gene (Cell produce) の白金電極を設置し、PBS 液滴でカイコと電極をつなぎ、20 V、280 ms /パルス を 5 回発生させ、遺伝子導入を行った。エレクトロポレーション実施日 (2 齢 0 日) を 0 日とし、カイコ個体に導入した DNA から発現する EGFP と DsRed2 蛍光観察を 16 日目 (5 齢 0 日) 以降に行った。顕微鏡撮影は、蛍光実体顕微鏡 SteREO Lumar.V12 (Carl Zeiss)、Zyla 5.5 カメラ (Oxford Instruments Andor)、 μ -Manager

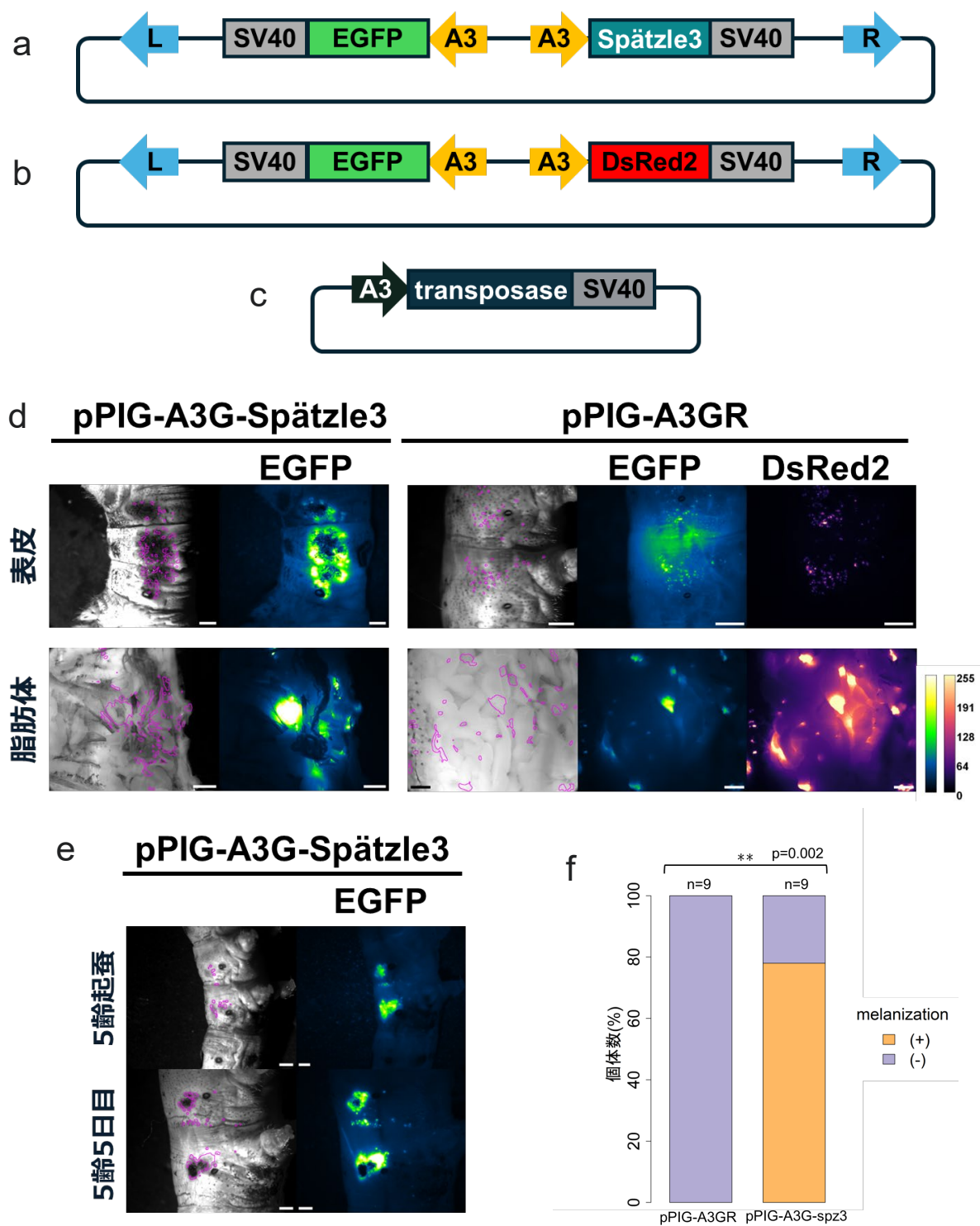


図 1. カイコ表皮・脂肪体の Spätzle3 に対するメラニン合成の差異

カイコ幼虫表皮・脂肪体組織の細胞に導入された Spätzle3 によるメラニン合成、EGFP、DsRed2 の 16 日目における顕微鏡観察画像。a: pPIG-A3G-Spätzle3。b: pPIG-A3GR。c: pHA3PIG。Spätzle3: pro-Spätzle3 配列のうち、CK ドメイン配列を含むシグナルペプチド、EGFP、enhanced green fluorescent protein ; Transposase、piggyBac transposase ; A3、A3 プロモーター ; L/R、piggyBac ITR 配列。d: カイコ表皮・脂肪体蛍光写真。pPIG-A3G-Spätzle3 および pPIG-A3GR 条件における導入された EGFP 蛍光 (緑)、DsRed2 蛍光 (マゼンタ)。e: カイコにおけるメラニン形成の経過。pPIG-A3G-Spätzle3 条件において、5 齢 0 日から 5 日目にかけて導入された EGFP 蛍光とメラニン形成。スケールバー : 1 mm。f: pPIG-A3G-Spätzle3 と pPIG-A3GR 導入におけるメラニン形成個体数の比較。**: Fisher exact test による有意差あり ($p < 0.05$)。

(EDELSTEIN *et al.*, 2010) を用いて行った。各撮影は EGFP 蛍光を励起波長 450-490 nm、DsRed2 蛍光を励起波長 561 nm で行った。露光時間 1 秒で撮影した。

4. 遺伝子発現変動解析

カイコ表皮・脂肪体における遺伝子発現を比較するため、Sequence Read Archive (SRA) から RNA-seq データを検索した。2024 年 11 月 23 日時点で “(“*Bombyx mori*”[Organism] OR *bombyx mori*[All Fields]) AND *epidermis*[All Fields]) AND (“*biomol rna*”[Properties] AND “*library layout paired*”[Properties])” を条件に検索したところ、69 実験が見つかった。このうち、同一系統で表皮と脂肪体が比較でき、且つ、発生ステージ間の比較が可能な実験データを選定した。その結果、Dazao 系統での実験 PRJNA559726 が該当した。この BioProject に含まれる表皮、脂肪体 RNA-seq データ (表 1) をリファレンスのトランスクリプトーム (*Bombyx mori*; GCF_014905235.1) とともに salmon (PATRO *et al.*, 2017) を用いて定量し、

edgeR (ROBINSON *et al.*, 2010) による発現変動解析を行った。以下の一般化線形モデルを定量したカウントデータに当てはめ、組織・各齢の発現変動を推定した:

$$C \sim T + S + T:S + R + \epsilon$$

ここで C は定量されたカウント、 S はカイコ幼虫齢、 T は組織種、 R は反復、 ϵ は残差である。

p 値は Holm 法での多重検定の補正を行い、補正後の p-value < 0.05 を満たす遺伝子を発現変動遺伝子とした。カイコ (*Bombyx mori*; GCF_014905235.1)、ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*; GCF_000001215.4)、センチュウ (*Caenorhabditis elegans*; GCF_000002985.6)、ヒト (*Homo sapiens*; GCF_000001405.40) の全タンパク質のアミノ酸配列をもとに双方向 blast を行い、オルソログならびにパラログ遺伝子を推定し、カイコ遺伝子のアノテーション情報を構築した。構築したアノテーションデータをもとに、ショウジョウバエオルソログ遺伝子シンボルをカイコ遺伝子シンボルとして用いた。

BmToll-8 は、CHENG *et al.* (2008) で報告され

表 1. 表皮・脂肪体 SRARun 情報

サンプル名	SRARun ID
4齢3日目表皮	SRR10035787, SRR10035798, SRR10035809
5齢0日目表皮	SRR10035820, SRR10035831, SRR10035591
5齢3日目表皮	SRR10035754, SRR10035765, SRR10035776
4齢3日目脂肪体	SRR10035705, SRR10035706, SRR10035707
5齢0日目脂肪体	SRR10035708, SRR10035710, SRR10035711
5齢3日目脂肪体	SRR10035692, SRR10035693, SRR10035694

SRA Run ID は Sequence Read Archive ([PRJNA559726](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA559726)) より取得した。

表 2 Toll-8 Accession ナンバー相互表

Toll	Accession	Query Cover	E value	Per. Ident	Gap
BmToll-8	XM_004921685.5	97%	0.0	100%	0%

Query Cover、E-value、Per. Ident、Gap は blast を使用して取得した。

た配列情報をもとに、database の organism を *Bombyx mori* (taxid:7091) とし、blast を用いて同定した (表 2)。

結 果

1. *Spätzle3* 発現によるメラニン合成

KONDO *et al.* (2017) で示された *Spätzle3* 発現によるメラニン合成を f38 系統で追試し、供試系統における *spätzle3* への応答性を検証した。ドナープラスミドには pPIG-A3G-*Spätzle3*、ヘルパープラスミド pHA3PIG (図 1a, 1c) を用い、2 齢幼虫へ somatic transformation を行った。コ

ントロールとして pPIG-A3GR と pHA3PIG (図 1b, 1c) を使用し、比較実験を行った。16 日後、pPIG-A3G-*Spätzle3* を導入した 80 個体のうち、31 個体が生存、このうち 9 個体が 5 齢幼虫の表皮で緑色蛍光を示し、piggyBac トランスポゼーンにより染色体へ転移したプラスミド由来 DNA からの遺伝子発現が確認された (図 1d: pPIG-A3G-*Spätzle3*)。コントロール個体では GFP と共に DsRed2 蛍光が確認された (図 1d: pPIG-A3GR)。pPIG-A3G-*Spätzle3* で形質転換した表皮では、5 齢 0 日で GFP 蛍光発現細胞周辺でのメラニン合成が確認され、観察を続けた 5 齢 5 日目まで色が濃くなった (図 1e)。一方、*Spätzle3* を発現しない pPIG-A3GR 導入表

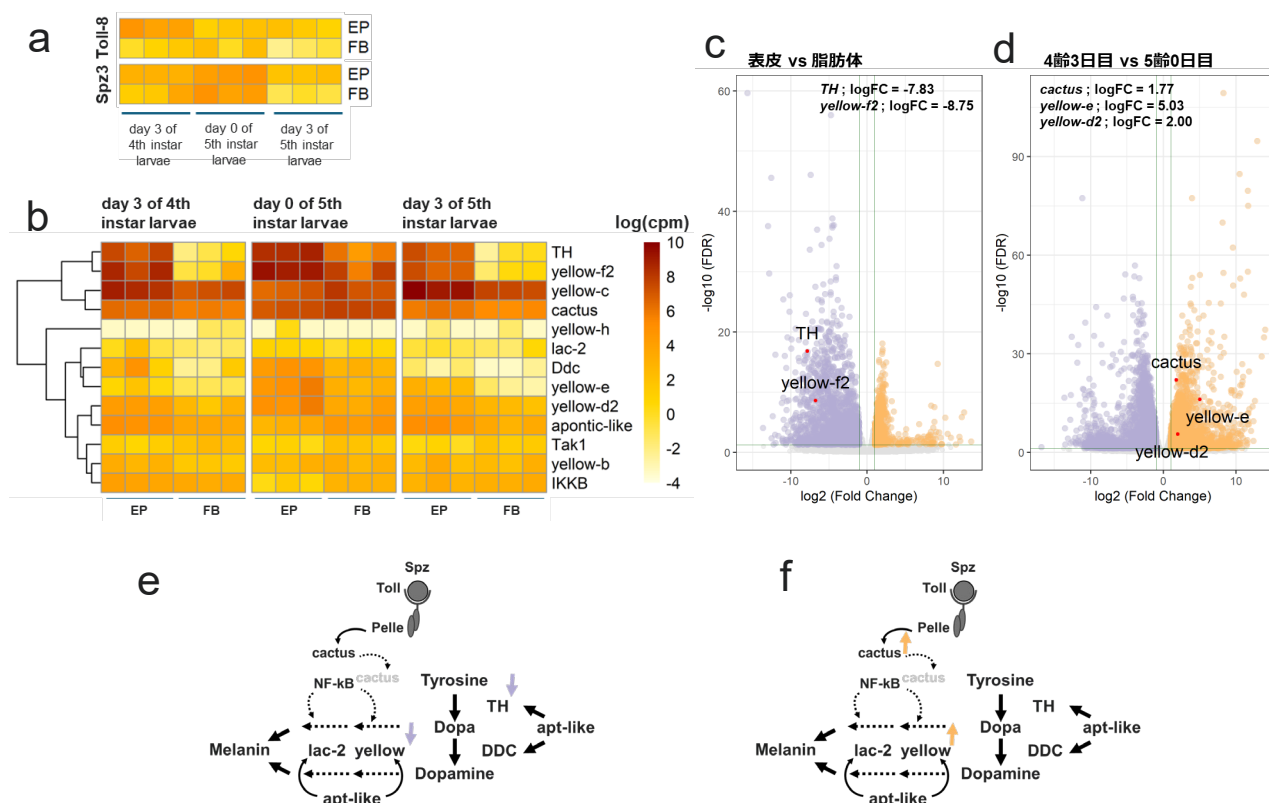


図 2 カイコ表皮・脂肪体における *Toll* 遺伝子群/メラニン形成関連遺伝子発現変動解析

PRJNA559726 を用いたトランスクリプトーム解析を行った。a: カイコ *Toll-8*、*spätzle3* 遺伝子発現量。 *Spz3* ; *spätzle3*。 b: *Spätzle3*-*Toll* 下流のメラニン形成に関与する遺伝子群の発現量。表皮と脂肪体、各齢の遺伝子発現の挙動を示した。 c: 表皮と比較した脂肪体の遺伝子発現変動。 *TH*、*Tyrosine hydroxylase* ; *yellow-f2*、*yellow-f2*。 d: 表皮における 4 齢 3 日目と比較した 5 齢 0 日目で遺伝子発現変動。 e: は表皮と比較した脂肪体での *Spätzle3*-*Toll* シグナル伝達カスケードにおける遺伝子変動。 f: 4 齢 3 日目と比較した 5 齢 0 日目の表皮と脂肪体における各遺伝子の発現変動。橙色がアップレギュレート、紫色がダウンレギュレートを示す。

皮細胞ではメラニン合成が起こらなかった (図 1f, Fisher extract test: $p = 0.002$)。これらの結果より f38 系統でも KONDO *et al.* (2017) と同様、*spätzle3* 強制発現による色素沈着を再現できた。

形質転換による蛍光タンパク質の発現は pPIG-A3GR、pPIG-A3G-*Spätzle3* ともに脂肪体でも確認された (図 1d)。*Spätzle3* 強制発現脂肪体組織では、表皮とは異なりメラニン合成は起こらなかった ($n=7$)。これら表皮と脂肪体での観察から、*Spätzle3* によるメラニン合成は両組織間で異なることが示された。

2. カイコ表皮・脂肪体における *Toll8-Spätzle3* 遺伝子、メラニン合成関連遺伝子の mRNA 発現

Spätzle3 との結合は示されていないが、表皮での色素沈着には *Toll-8* が関与しており (KONDO *et al.*, 2017)、*Toll-8* が *Spätzle3* のレセプターである可能性が高い。当該研究ではプロセシングされた *Spätzle3* を強制発現させていることから、プロテアーゼ関連遺伝子は関与せず、*Spätzle3* による影響を受ける因子の最上流は *Toll-8* である。また KONDO *et al.* (2017) の研究により、カイコの幼虫期で *Toll-8* をノックダウンすると色素沈着が起きないことから、メラニン合成関連遺伝子は *Toll-8* シグナル伝達の発現に影響を受ける。*Spätzle* を受容した *Toll* 下流のシグナル伝達では、*Cactus* のリン酸化、分解の後、*NF-kB* 転写因子の核内移行が起きて下流の遺伝子群の発現が起こる (REACH *et al.*, 1996)。メラニン合成はチロシンに由来し、*Tyrosine hydroxylase (TH)* により *Dopa*、*Dopa decarboxylase (DDC)* により *Dopamine* となり、*laccase-2 (lac-2)*、*yellow* 遺伝子ファミリーの発

現によりメラニンが合成される (FUTAHASHI *et al.*, 2005; 2010)。これらの遺伝子発現は *Apontic (Apt)* 転写因子によって制御される (YODA *et al.*, 2014)。先行研究においてメラニン合成の有無は *Spätzle3* 発現の影響を受けることから、これら遺伝子は *Toll* シグナル伝達経路による制御を受けると考えられる。そこで、脂肪体での *Spätzle3* によるメラニン合成応答の違いが、*Toll-8*、メラニン合成関連遺伝子の発現量の違いである可能性を評価するため、我々の観察でメラニン蓄積が顕著に進んだ 5 齢起蚕前後のカイコ (4 齢 3 日目、5 齢 0 日目および 5 齢 3 日目の *Dazao*) の表皮・脂肪体のトランスクリプトームデータ (表 1) を解析した結果を図 2 に示した。

Spätzle3 受容体と想定される *BmToll-8* の脂肪体における発現量は 5 齢 3 日目に減少し、表皮では 4 齢 3 日目が 5 齢 0 日目より高かった (図 2a)。また *Spätzle3* の発現は、脂肪体・表皮ともに 5 齢 0 日で発現量が高かった (図 2a)。

続いてメラニン生合成遺伝子群の発現に原因がある可能性を検討した。これら遺伝子群の発現量を解析したところ、*TH*、*DDC*、*lac-2*、*yellow*、*apt-like* および *NF-kB* 遺伝子群 (*IKKB*、*Tak1*) について、4 齢 3 日目、5 齢 0 日目ならびに 5 齢 3 日目のいずれも、脂肪体と比較して表皮での発現量が高かった (図 2b)。メラニン合成に関与する遺伝子のうち、*TH* が 1/227 倍 ($p=1.20 \times 10^{-14}$)、*yellow-f2* が 1/108 倍 ($p=7.71 \times 10^{-6}$)、表皮と比較してそれぞれ脂肪体での発現量が小さかった (図 2c, 2e)。また組織にかかわらず、5 齢 0 日目は、4 齢 3 日目と比較し *cactus* が 3.43 倍 ($p=1.57 \times 10^{-19}$)、*yellow-e* が 32.7 倍 ($p=2.40 \times 10^{-13}$)、*yellow-d2* が 4 倍 ($p=0.048$) に発現量上昇が認められた (図 2d, 2f)。

考 察

本研究ではサイトカイン *Spätzle3* の強制発現に対し、表皮と脂肪体ではメラニン合成に違いがあることを示した (図 1f)。*Spätzle3* 過剰発現条件で観察された、5 齢以降急速に進行する表皮でのメラニン合成 (図 1e) について、両組織間での *Spätzle3* 応答の差異を公共データベースに登録されているトランスクリプトームデータから探索した。

本研究では、メラニン合成は表皮でも 5 齢までは進まず、脂肪体では 5 齢以降も観察されなかった (図 1f)。表皮、脂肪体の両組織でトランスポジションされた DNA からのレポーター発現を 5 齢以前にも確認しており、*Spätzle3* は両組織で 5 齢以前から発現しているはずである (図 1d)。この原因を推測するため、*Spätzle3* 受容以降からメラニン合成までに関わる遺伝子の発現を解析した。表皮でのメラニン合成には Toll-8 が必要であり (KONDO *et al.*, 2017)、脂肪体でメラニン合成されない原因として Toll-8 遺伝子の発現を解析した。Toll-8 の発現レベルは表皮・脂肪体間でどのステージにおいても有意差がなかった (4 齢 3 日目; 表皮/脂肪体の発現日 1.07 倍 $p=0.99$, 5 齢 0 日目; 5.06 倍 $p=1$, 5 齢 3 日目; 1.03 倍 $p=1$)。

一方、脂肪体での Toll-8 の発現量は平均 0.34 ± 0.51 と全てのステージを通して低いのにに対し、表皮では 4 齢 3 日目の発現量は平均 4.17 ± 0.26 と高かった (図 2a)。脂肪体を大きく上回る表皮での Toll-8 発現が機能を発揮する必要量と推測される。4 齢 3 日目の表皮での *Spätzle3* 発現レベルはひくいものの、これで十分量だとすると、脂肪体では Toll-8 の発現量が低いため、メラニン合成できない可能性がある。

Toll-8 以外に脂肪体でのメラニン合成阻害の

原因の可能性としては、メラニン合成因子が考えられる。表皮に比べ脂肪体での発現量が顕著に低い *Spätzle3* 受容下流遺伝子が検出された (図 2c)。脂肪体で発現減少したメラニン合成遺伝子 *TH* は、チロシンを DOPA に変換する酵素である。*TH* の変異はメラニン合成不全を起こし、カイコでは孵化直後の体色が赤褐色を呈する赤蟻 (*ch: chocolate*) と呼ばれる変異表現形質の原因となる (LIU *et al.*, 2010)。また同様の発現低下遺伝子として同定された *yellow-f2* (図 2c, 2e) は *yellow* 遺伝子ファミリーの一つであり、ショウジョウバエにおいてドーパクロム変換酵素の働きをもちメラニン合成に関与する (HAN *et al.*, 2002)。カイコ幼虫では、メラニン合成に関与する遺伝子 *yellow* の発現は脱皮期に高くなり、これに伴いメラニン合成が起こる (FUTAHASHI *et al.*, 2008)。メラニン合成不全の原因遺伝子の 1 つである *yellow-y* (FUTAHASHI *et al.*, 2008) のホモログである *yellow-e* と *yellow-d2* 遺伝子は 4 齢 3 日から 5 齢 0 日にかけて表皮で発現が上昇していた (図 2d, 2f)。表皮での発現変動の違いがメラニン合成の違いに関与している可能性や *Spätzle3*-Toll-8 のシグナル伝達がこれらの制御に関わっている可能性も考えられる。脂肪体では上記のように *Spätzle3* 受容からメラニン合成経路の遺伝子までの発現が表皮とは異なり、プロセシングされた *Spätzle3* を somatic transformation により強制発現させた場合でも異なる応答を生んだ可能性がある。

本研究は複数組織での *Spätzle3* への応答性研究の技術的基盤を構築した。本研究で用いた材料、方法の改良・発展を進め、カイコの異なる組織が担う同一シグナル因子の情報処理機構について、研究を展開していきたい。

文 献

- ANDERSON K. *et al.* (1985): *Cell*,**42**: 779-789
- ANDO T. and FUJIWARA H. (2013): *Development*, **140**: 454-458
- CHENG T. *et al.* (2008): *Dev. Comp. Immunol*, **32**: 464-475
- CHOWDHURY M. *et al.* (2019): *J. Biol. Chem*, **294**: 10172-10181
- EDELSTEIN A. *et al.* (2010): *Curr. Protoc. Mol. Biol*, Chapter **14**: Unit14.20
- FUTAHASHI R. *et al.* (2005): *Dev Genes Evol*, **215**: 519-529
- FUTAHASHI R. *et al.* (2008): *Genetics*, **180**: 1995-2005
- FUTAHASHI R. *et al.* (2010): *Evol. Dev*, **12**: 157-167
- GIBSON D. *et al.* (1987): *Methods Enzymol*,**498**: 349-361
- HAN Q. *et al.*, (2002):*Biochem J*,**368**: 333-340
- JANG I. *et al.* (2006): *Dev. Cell*, **10**: 45-55
- JEONG S. (2008): *Cell*,**132**: 783-793
- KONDO Y. *et al.* (2017): *PNAS*, **114**: 8336-8341
- LEMAITRE B. *et al.* (1995): *EMBO J.*,**14**: 536-545
- LEMAITRE B. *et al.* (1996): *Cell*, **86**: 973-983
- LI G. *et al.* (2020): *eLife*, **9**: e52743
- LIMA L. *et al.* (2021): *BMC Genomics*, **22**: 562
- LIU C. *et al.* (2010): *PNAS*, **107**: 12980-12985
- MANFRUELLI P. *et al.* (1999): *EMBO J*, **18**: 3380-3391
- PATRO R. *et al.* (2017): *Nat. Methods*, **14**: 417-419

- REACH M. *et al.* (1996): *Dev. Biol*,**180**: 353-364
- ROBINSON .M *et al.* (2010): *Bioinformatics*, **26**: 139-140
- STEIN D. *et al.* (1991): *Cell*, **65**: 725-735
- YODA S. *et al.* (2014): *Nat. Commun*, **5**: 4936

謝 辞

pPIG-A3GR、pHA3PIGを分譲してくださった東
京大学大学院新領域創成科学研究科 先端生命
科学専攻機能生命科学講座教授(当時)藤原晴
彦博士、京都大学 白眉センター 特定准教授
安藤俊哉博士、エレクトロポレーションの使用にあ
たってご指導いただきました北海道大学大学院
地球環境科学研究院 環境生物科学部門 生態
遺伝学分野/環境科学院 生物圏科学専攻 生
態遺伝学コース教授 越川滋行博士、越川研究
室の皆様がこの場を借りて深く感謝申し上げます。
また、ABI3130 sequence analyzer の利用にあたり
農学研究院「共同利用機器・設備管理運営委員
会」に、高性能計算機を使用させていただきました
基礎生物学研究所 データ統合解析室、自然
科学研究機構 岡崎共通研究施設 計算科学研
究センターに御礼申し上げます。本研究を進める
にあたり、カイコの供試に御協力頂きました九州
大学大学院農学研究院資源生物科学部門 昆虫
ゲノム科学研究室教授 日下部宜宏 博士に、北
海道大学北方圏フィールド科学センター耕地圏
ステーション生物生産研究農場の山田恭裕技術
専門職員に厚く御礼申し上げます。

日本蚕糸学会東北支部 役員

(任期 2025 年度～2026 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

佐藤 昌直 (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6年12月28日
発行	令和6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

