

東北蚕糸・昆虫利用研究報告

第 39 号

平成 26 年 12 月

日本蚕糸学会東北支部

No.39 目 次

高野 恵美子 高橋 瑛 伴戸 久徳 浅野 眞一郎	Cry2A の殺虫活性について 1
小野山 雄亮 伴戸 久徳 浅野 眞一郎	ネッタイシマカ ABC トランスポーターについて 3
石橋 大樹 佐藤 昌直 高 ひとみ 武内 潤一 浅野 眞一郎 伴戸 久徳	バキュロウイルスゲノム人工合成系の確立に向けて 5
石川 小百合 河野 佳子 浅野 眞一郎 伴戸 久徳	BmNPV の必須膜タンパク質 GP64 の違いによる増殖特性変化の調査 8
川俣 智美 浅野 眞一郎 伴戸 久徳	BmNPVorf67 遺伝子の機能解析 10
大野 瑞紀 藤川-小島 典子 柴田 洋 中野 亮 石川 幸男 安河内 祐二 佐原 健	ヨーロッパアワノメイガのカイコとの染色体比較 12

高木 圭子
渡会 直人
金見 雄
比留間 潔

新しいタイプの農薬開発 ―気門と腹脚のかぎ爪を阻害するイソチオシアネート化合物―
.....15

Cry2A の殺虫活性について

高野 恵美子・高橋 瑛・伴戸 久徳・浅野 眞一郎
北海道大学大学院農学院

Bacillus thuringiensis はグラム陽性の土壌細菌で、孢子形成期に産生する結晶タンパク質 (Cry タンパク質) には、特定の昆虫や線虫にのみ殺虫活性を示すものがある。Cry2Aa は鱗翅目昆虫および双翅目昆虫に対し殺虫活性を示す Cry タンパク質である。このように 2 つの目に対し殺虫活性を示す Cry タンパク質は少なく、他の Cry トキシンと中腸上皮細胞膜上に存在するレセプター分子を共有していない (HERNANDEZ *et al.* 2013) ということから、Cry2Aa は両目昆虫に対し異なる殺虫活性機構をもつと考えた。一方、HD-1 株由来の Cry2Ab は、Cry2Aa とアミノ酸配列の相同性が高いにもかかわらず、鱗翅目昆虫にのみ殺虫活性を示す。

本研究では双翅目昆虫への殺虫活性の違いに注目し、Cry2Aa と Cry2Ab の諸性状を比較した。すなわち、ハマダラカ幼虫に対する殺虫活性試験、消化液によるトキシン化のプロセッシング様式、中腸上皮細胞刷子縁膜小胞 (BBMV) との結合試験の比較を行った。

材料と方法

B. thuringiensis kurstaki HD-1 のゲノム DNA をテンプレートに、*cry2Ab* 遺伝子のクローニングを行い、Cry2Ab 発現プラスミドを作製した。発現プラスミドを結晶非産生株 Bt51 株 (YAMAMOTO *et al.* 1988) にトランスフェクションして、Cry2Ab を発現させた。Cry2Ab の発現は SDS-PAGE、Cry2A 抗体を用いたウエスタンブロッ

ットにより確認した。

国立感染症研究所より分与していただいたハマダラカを継代飼育し、2 齢幼虫を用いて殺虫活性試験を行った。24 ウェルタイタープレートの各ウェルに滅菌水およびハマダラカの 2 齢幼虫を 5 匹ずつ入れ、段階希釈した Cry2Aa、Cry2Ab をそれぞれ加えて 1 ml とし、室温で緩やかに振盪した。24 時間後に死虫数を計測した。各濃度あたりの幼虫数は 20 匹ずつとし、試験は 3 回繰り返し行い、プロビット法により半数致死濃度 (LC₅₀) を算出した。

ハマダラカ消化液による Cry2Aa、Cry2Ab のプロセッシング様式を調査した。Cry2Aa、Cry2Ab に対し 20% (w/w) となるようにハマダラカ幼虫消化液を加え、室温で 2 時間静置し、SDS-PAGE、Cry2A 抗体を用いたウエスタンブロットに供試した。

Cry2Aa、Cry2Ab において予想されたハマダラカ消化液切断部位を含む 50kDa の断片をクローニングし、GST 融合発現プラスミドを作製した。発現プラスミドで形質転換した大腸菌 BL21 株に IPTG を添加して 22°C 16 時間振盪培養し、組換え GST 融合タンパク質の発現を誘導し、不溶画分を回収した。GST 融合タンパク質を不溶画分から凍結融解、超音波破碎により可溶化し、GST Trap HP カラムを用いて精製した。SDS-PAGE、GST 抗体、Cry2A 抗体を用いたウエスタンブロットにより発現を確認した。

ハマダラカ中腸上皮細胞刷子縁膜小胞 (BBMV) と、GST 融合 Cry2Aa、Cry2Ab トキシシンを用い

て結合試験を行った。ハマダラカ BBMV とトキシン (1 µg, 0.5 µg, 0.2 µg, 0.1 µg) を加えて 200 µl の結合 buffer 中、室温にて 1 時間静置した。遠心分離(15,000 rpm, 10 min, 4°C) 後、ペレットを wash し、BBMV に結合しなかった Cry トキシンを除いた。ペレットは GST 抗体を用いたウエスタンブロット解析に供試した。

結果と考察

作出した発現プラスミドは Bt51 において Cry2Ab と Cry2Aa は、65 kDa のプロトキシンとして発現されていることが確認された。Cry2Aa と Cry2Ab のアミノ酸配列を比較したところ、ドメイン 2 の領域に 23 アミノ酸の違いが確認された。

殺虫活性試験の結果、Cry2Aa のハマダラカ幼虫に対する LC₅₀ の値は 9.42 µg/ml、Cry2Ab は 20 µg/ml でも殺虫活性を示さなかったことから Cry2Aa は、双翅目に対して殺虫活性を有することが確認された。

Cry2Aa、Cry2Ab をハマダラカ幼虫消化液で処理したところ、どちらも 50 kDa のトキシンの生成が確認された。Cry2Aa においては、カイコ幼虫消化液による切断部位が明らかにされており、50 kDa のトキシンが生成される(OHSAWA *et al.* 2012)。この切断部位付近のアミノ酸配列は Cry2Ab でも保存されているため、Cry2Aa と Cry2Ab のプロセシング様式は同じであり、カイコ幼虫消化液とハマダラカ幼虫消化液による切断

部位も同じであると考えられる。

プロセシングにより生じる 50 kDa のトキシンを GST 融合タンパク質として大腸菌にて発現、精製した。SDS-PAGE、GST 抗体、Cry2A 抗体を用いたウエスタンブロットにより 78 kDa の GST 融合 Cry2Aa、Cry2Ab トキシンの発現を確認した。

ハマダラカ BBMV と GST 融合 Cry2Aa、Cry2Ab トキシンを用いて結合試験を行った結果、Cry2Aa のハマダラカ BBMV に対する結合量は Cry2Ab の結合量に比べ、約 2 倍であった。このことから Cry2Aa の方が BBMV への結合力が強いと言える。

以上のことから、Cry2Aa と Cry2Ab は、プロセシング様式は同じであるが、中腸上皮細胞膜上のレセプター分子との結合が Cry2Aa の方が強く、殺虫活性に差が出たと考えられる。また、Cry2Aa と Cry2Ab のアミノ酸配列の違いもレセプター分子との結合に関与していると言われるドメイン 2 の領域に存在していることから、レセプター分子との結合の段階に差があることが示唆された。

文 献

- HERNANDEZ CS. *et al.* (2013): PLoS ONE, e68164.
- OHSAWA M. *et al.* (2012): Appl. Environ. Microbiol. **78**, 4755-4757.
- YAMAMOTO T. *et al.* (1988): Curr. Microbiol., **17**, 5-12.

ネッタイシマカ ABC トランスポーターについて

小野山 雄亮・伴戸 久徳・浅野 眞一郎
北海道大学大学院農学院

熱帯地域において蚊類は様々な熱帯感染症を引き起こすウイルスの媒介者となっている。ネッタイシマカなどの *Aedes* 属が媒介するデングウイルスはデング熱を引き起こし、年間 1 億人の人々が発症しているとされている。今年に入り、日本でも 69 年ぶりに蚊による媒介が確認され、防除対策が必要となっている。蚊類の防除として、芽胞形成細菌である *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) が産生する結晶タンパク質を Bti 殺虫剤として用いる手法がある。Bti の産生する結晶タンパク質のうち、Cry11Aa は蚊類に対して強い殺虫活性を示す (REVINA *et al.* 2004)。Cry タンパク質が感受性昆虫に摂食されると昆虫中腸内のアルカリ条件下で可溶化し、プロテアーゼにより活性化が行われ Cry トキシンとなり、中腸上皮細胞に存在するレセプターと結合し、オリゴマー化した Cry トキシンが中腸膜表面上に挿入され細孔を形成することでイオンの流入により細胞死を引き起こし、昆虫を死に至らしめる。このような作用機構モデルが提唱されているが、その詳細は未だに不明な点が多い。今後、効率的で安定な Bti 殺虫剤の使用のために殺虫活性機構の解明は必要である。殺虫活性機構の中でも昆虫中腸上皮細胞のレセプターが重要であると考え、Cry11Aa トキシン殺虫活性機構を解明するうえでレセプターの同定は重要である。カイコにおいては ABCC2 トランスポーターが Cry1Ab トキシン抵抗性獲得に関わるレセプターとして新たに同定された (TANAKA *et al.* 2013)。

本研究ではネッタイシマカにおいても ABC トランスポーターが Cry11Aa トキシンレセプター

であると想定し、ネッタイシマカゲノムデータベースに登録されている ABC トランスポーターのうち、カイコ ABCC2 トランスポーターに構造が類似しているものをクローニングした。カイコ ABCC2 トランスポーターの構造の中で Cry1Ab トキシン抵抗性獲得に影響を与えられているアウターループ 2 領域に注目し、クローニングしたネッタイシマカ ABC トランスポーターのアウターループ 2 領域にあたるアミノ酸配列を推定した。この配列に対する抗体を作製し、中腸上皮細胞において ABC トランスポーターの発現を確認した。この配列を含む *aeabc* 遺伝子を大腸菌で発現させ、Cry11Aa トキシンとの結合実験を行った。

材料と方法

Cry1Ab トキシンレセプターとして報告されているカイコ ABCC2 トランスポーターのアミノ酸配列 (BAK82126.1) をもとにネッタイシマカゲノムデータベースを用いて相同性検索を行い、スコアの高いネッタイシマカ ABC トランスポーター (AAEL005937-PA) を AeABC として調査の対象とした。AeABC の構造予測は AeABC のアミノ酸配列をもとに TMHMM version2.0、SOSUI および Phobius を用いて行った。また、推定されたアウターループ 2 領域のペプチドを合成し、ウサギに免疫化しポリクローナル抗体 (抗 AeABC 抗体) を作製した。

ネッタイシマカ中腸より抽出した total RNA を RT-PCR を行い cDNA の合成を行った。これを鋳

型にし、AeABC の塩基配列をもとに合成したプライマーを用いた PCR によって *AeABC* のクローニングを行った。中腸刷子縁膜小胞 (BBMV) を作製し、抗 AeABC 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。アウターループ 2 領域を含む 300bp の遺伝子を GST 融合タンパク質として発現させ、精製した (GST-AeABCloop2)。

GST-AeABC と Cry11Aa トキシンを用いてドットブロットアッセイを行った。

結果と考察

AeABC の膜貫通部位を TMHMM version3.0, SOSUI, Phobius を用いて予測することで、AeABC は膜貫通部位を 12 個持つ ABC トランスポーターであると考えた。カイコ ABCC2 トランスポーターは膜貫通部位を 12 個持つ ABC トランスポーターである (ATSUMI *et al.*, 2012) ことから、AeABC はカイコ ABCC2 トランスポーターと構造が類似していると考えた。また、カイコ ABCC2 トランスポーター遺伝子で Bt 抵抗性に重要であると考えられているアウターループ 2 領域に注目し、AeABC のアウターループ 2 領域のアミノ酸配列を TMHMM version2.0、SOSUI ならびに Phobius を用いて推定した。その結果、各々で予測されるアミノ酸配列を網羅する 9 アミノ酸 (211GVILYIEIGVAGLI²²⁴) が推定された。ネッタイシマカ中腸より抽出した total RNA から合成した cDNA を鋳型にし、PCR 増幅 *AeABC* 断片のクローニングを行い、シーケンス解析を行った。その結果、今回クローニングした配列にはゲノムデータベース上に含まれない塩基配列が 3 か所に挿入されていた。挿入部位のうち、2 か所はゲノム塩基配列に存在することから、スプライシングバリエーションであり、1 か所はゲノム塩基配列に存在しない配列であることから変異であると考えた。

クローニングした *AeABC* が中腸で発現してい

るのかを確認するために、ネッタイシマカ中腸より BBMV を作製し、抗 AeABC 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。その結果、推定される約 150 kDa のバンドが得られたことから、中腸上皮細胞上で AeABC の発現を確認した。

AeABC のアウターループ 2 領域を含む約 300bp の断片を GST 融合タンパク質として発現させ、精製し、抗 GST 抗体と抗 AeABC 抗体を用いたウエスタンブロット解析に供試した。その結果、約 30 kDa のバンドが各々の抗体で検出され、GST-AeABCloop2 の発現を確認した。

GST-AeABCloop2 とビオチンで標識した Cry11Aa トキシンを用いたドットブロットアッセイを行った。その結果、GST-AeABCloop2 の段階希釈ごとに Cry11Aa トキシンのシグナルが弱くなることから、AeABC と Cry11Aa トキシンの結合を確認した。

以上の結果より、AeABC がカイコ ABCC2 トランスポーターと構造が類似しており、中腸上皮細胞上での発現が確認され、Cry11Aa トキシンとの結合が確認できることから AeABC は Cry11Aa トキシンレセプターとして機能していると考えた。

今後、AeABC の機能を調査するためにバキュロウイルス発現系や培養細胞上での一過性発現系を利用して、培養細胞上で AeABC を発現させ、AeABC の Cry11Aa トキシンに対する機能を調査したいと考えている。

文 献

- ATSUMI S. *et al.* (2012): PNAS **25** E1591-E1598.
GEORGHIOU GP. and WIRTH MC. (1997): Appl. Environ. Microbiol., **63**(3), 1095-1101.
REVINA L. *et al.* (2004): Biochemistry (Moscow), **69**(2), 181-187
TANAKA S. *et al.* (2013): FEBS. J., **280**(8), 1782-1794

バキュロウイルスゲノム人工合成系の確立に向けて

石橋 大樹¹・佐藤 昌直²・高 ひとみ¹・武内 潤一¹・浅野 眞一郎¹・伴戸 久徳¹

¹北海道大学大学院農学院・²基礎生物学研究所

バキュロウイルスは昆虫をはじめとする節足動物に感染する DNA ウイルスであり、宿主昆虫に強い病原性を示すことから生物農薬として利用されている。また、近年では核多角体病ウイルス (Nucleopolyhedrovirus: NPV) が産生するウイルス包埋体 (多角体) のマトリックスタンパク質 (Polyhedrin: Polh) 遺伝子の強力な発現能を活かした外来遺伝子発現ベクターとしての利用法も注目されている。

バキュロウイルスの高次利用に向けた機能開発を進める上でウイルスゲノムの改変技術は不可欠なものである。現在、バキュロウイルスのゲノム改変にはトランスポゾンを利用した Bac-to-Bac Baculovirus Expression System (CICCARONE *et al.* 1997) や相同組換え酵素を利用した λ red recombination system (DATSENKO and WANNER, 2000) 等が利用されているが、複数の変異を導入するには繁雑な作業が必要であり、複雑な改変を行うのは容易ではない。そこで、我々は酵母が持つ DNA の修復機構を利用してバキュロウイルスゲノムの完全人工合成系を確立し、ウイルスゲノム改変の自由度を格段に向上させることを計画した。我々はこのゲノム人工合成系の確立をカイコ核多角体病ウイルス (*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus: BmNPV) を用いて行うこととした。

この人工合成系の構築では、まず、隣り合う DNA 断片の両末端 50~80 塩基がオーバーラップするように BmNPV バクミドゲノム DNA を数 kbp に断片化し、さらに、DNA 断片の両端には制限酵素の認識配列を付加し、プラスミドベクター

を用いてクローニングする。制限酵素で切り出した各 BmNPV DNA 断片を酵母内に導入すると、オーバーラップする相同配列が認識され、連結されてウイルスゲノムが再構築される。ここで、導入する DNA 断片に任意の変異を導入しておけば、任意の変異を導入したウイルスゲノムを酵母内で合成できることから、BmNPV ゲノム改変の限界はほぼ無くなると考えられる。BmNPV バクミドは大腸菌内での複製起点を持つ (ONO *et al.* 2007) ことから、酵母内で構築されたバクミドゲノム DNA は大腸菌に導入することで大量に調製することができると考えられる。ただし、再構築されたバクミド DNA を回収するためには、それが酵母内で増幅される必要があるため、このバクミド DNA に酵母内での複製起点を導入する必要がある。

本研究の最終目標は BmNPV ゲノムの全配列をカバーする複数の DNA 断片を酵母に一挙に導入し、環状化したウイルスゲノム DNA を得ることである。しかし、BmNPV のゲノムサイズが約 130kbp と巨大であること、また、連結せねばならない断片 (kbp) の数が 39 断片と多いことから、ここでは、まず試験的に数断片の DNA の酵母内でのアッセンブルを試みた。すなわち、酵母、大腸菌双方での複製起点を含む配列 (1 断片) と BmNPV ゲノム断片 (4 断片) を酵母へ導入して正確に環状化させ、これを大腸菌へ導入して複製させることを試みた。

材料と方法

1. 供試細胞

培養細胞には、当研究室で継代培養されているカイコ (*Bombyx mori*) 卵巣由来の BmN 細胞を使用した。

2. 酵母内における複製起点の BmNPV バクミドへの導入

EGFP 発現 BmNPV バクミド (BmGFP) に、 λ red recombination system を利用して、大腸菌での複製起点と隣接する形で酵母での複製起点を導入した (BmGFP/Yori)。このバクミドをテンプレートとして PCR により酵母、大腸菌での複製起点を含む DNA 断片を得、酵母内で DNA 断片をアッセンブルするためのベクター配列 (Yori) とした。

3. 酵母を利用した DNA 断片の環状化

2~5kbp の BmNPV ゲノム DNA 断片 4 種と Yori を、GeneArt® High-Order Genetic Assembly System (Invitrogen) を用いて酵母細胞内に導入しアッセンブルを行った。得られた酵母のコロニーから目的のアッセンブル配列 (プラスミド状態) を含むものを PCR で選抜し、そのコロニーから得られた酵母細胞のライセートを用いて、アッセンブルされた環状 DNA をエレクトロポレーション法により大腸菌に導入した。大腸菌内で複製し、増幅したアッセンブル配列 (プラスミド状態) を大腸菌から抽出し、各 DNA 断片の連結部分の配列をシーケンシングにより確認した。

結果と考察

λ red recombination システムを用いて構築したバクミド BmGFP/Yori を BmN 細胞に導入したところ、感染性ウイルス粒子の産生が確認された。また、BmGFP/Yori を酵母および大腸菌に導入し、バクミドを持つ酵母の栄養要求性またはバクミドの有する薬剤耐性遺伝子を指標として、選抜培地で培養したところコロニーが形成された。このこ

とから、BmGFP/Yori が酵母および大腸菌で複製可能であることが確認された。

BmGFP/Yori をテンプレートとして得た Yori と 4 種の DNA 断片を酵母に導入し、得られた酵母のコロニーについて PCR により各連結部分の有無を調査したところ、およそ 80% の確率で連結部分を含むプラスミドを持ったコロニーが存在することが判明した。この目的配列を含むプラスミドを大腸菌に導入して増幅させた後、抽出し、シーケンスを確認したところ、各断片のジャンクション部分 5 カ所全てが正確に連結されていることが判明した。

以上の結果により、酵母細胞内で Yori と 4 つの DNA 断片のアッセンブルは問題なく行えることが分かった。この方法をもとにして、現在 BmNPV ゲノム全領域をカバーする 39 断片について、これらを環状化させることによる BmNPV (バクミド) ゲノムの再構築を試みている。これまでに、酵母の DNA 修復機構を利用した 38 の DNA 断片のアセンブリー (GIBSON, 2009)、また約 580kbp に及ぶ *Mycoplasma genitalium* ゲノムの合成 (GIBSON, *et al.* 2008) が報告されているが、前者では構築される DNA 配列がおおよそ 1kbp と小さく、後者では酵母でのアセンブリーに使用する DNA 断片を 2 断片にまで減らしている。これまでに、比較的大きな (数 kbp の) 断片を多数 (39 断片) 用いて、一挙にアッセンブルして巨大な DNA 分子 (約 130kbp) の合成に成功した例はない。今後、BmNPV ゲノムの効率の良い、簡便な人工合成系の確立に向けて、細かな条件検討が必要と考えられる。

文 献

- CICCARONE VC. *et al.* (1997): *Methods Mol. Med.*, **13**, 213-235.
DATSENKO KA. and WANNER BL. (2000): *PNAS*, **97**, 6640-6645.

GIBSON DG. *et al.* (2008): *Science*, **319**(5867),
1215-1220.

GIBSON DG. (2009): *Nucleic Acids Res.*, **37**(20),

6984-6990.

ONO C. *et al.* (2007): *J. Insect Biotech. Sericol.*

76, 161-167.

BmNPV の必須膜タンパク質 GP64 の違いによる増殖特性変化の調査

石川 小百合・河野 佳子・浅野 眞一郎・伴戸 久徳
北海道大学大学院農学院

カイコ核多角体病ウイルス (*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus) はカイコを宿主とし、強力なポリヘドリンプロモーター制御下で外来遺伝子を発現させる高効率な外来遺伝子発現ベクターとして利用されている。BmNPV の標準株である T3 とは異なる増殖能を示す H4 が本研究室で近年分離された。両ウイルスをカイコ卵巣由来 BmN 細胞に感染させると、H4 は T3 に比べて感染末期における培養液中のウイルス量および多核体タンパク質発現量が極めて少なく、形成するプラークの大きさも小さいなど本培養細胞系でのウイルス増殖能が著しく低かったが、H4 をカイコ個体に感染させると、T3 より高い増殖能を示した (角谷, 2006)。これらの観察結果は、ウイルスの個体への感染・増殖過程について、少なくとも単一の培養細胞系を用いた実験のみからは明らかにできないことを示唆しており、H4 は個体での増殖が有利になるウイルス遺伝子構造の解明や、BmNPV ベクターの有用性を向上させるためのウイルス改変技術の確立に有効な研究材料だといえる。本研究室では、現在両者の増殖能の違いを生み出す要因の特定を進めている。これまで、両者が形成するプラークの大きさに違いが見られたことから、まずはウイルスの二次感染過程に違いのある可能性に着目し、二次感染に必須である BmNPV の膜タンパク質 GP64 の解析を進めてきた。GP64 は主に発芽ウイルス (BV) の宿主細胞膜への認識・結合や、エンドサイトーシス、ウイルス膜と宿主細胞膜との膜融合に重要な役割を果たしており、両者の GP64 を比較すると 6 箇所がアミノ酸に違い

が認められた。本研究では、両株の GP64 遺伝子 (*gp64*) を入れ替えた組換えウイルスを作製し、組換えたことによるウイルス増殖に与える影響を、ウイルス DNA 量、ポリヘドリン遺伝子プロモーター (*polhp*) 制御下に挿入したルシフェラーゼの発現量を指標に調査した。

材料と方法

〈供試細胞〉

供試細胞は、当研究室で継代培養されているカイコ卵巣由来の BmN 細胞を用いた。BmN 細胞は、TC100 培地 (Applichem) に 10% ウシ胎児血清 (Biowest) を加えた血清 TC100 培地を用いて 26°C で培養した。

〈供試ウイルス〉

供試ウイルスは、北海道大学大学院農学院応用分子昆虫学分野で継代保存されている BmNPV T3 株 (GOMI *et al.* 1999)、および本研究室で分離された BmNPV H4 株 (織谷, 2005) を用いた。

〈組換えウイルスの作製〉

T3 bacmid (ONO *et al.* 2007) および H4 bacmid (未発表) の *gp64* を *CAT* 遺伝子に置換えた T3 Δ *gp64* bacmid、H4 Δ *gp64* bacmid を構築した。Bacmid システムを利用して大腸菌内で、これらの bacmid のポリヘドリンプロモーター (*polhp*) 下流に分泌型ルシフェラーゼ (*Luc*) 遺伝子を挿入し、さらにその下流にそれぞれ T3 の *gp64* あるいは H4 の *gp64* をプロモーター領域も含めて復帰

させた T3-T3gp64、T3-H4gp64、H4-T3gp64、H4-H4gp64 を作製した。作製した BmNPVbacmid DNA を BmN 細胞にトランスフェクションして培養後、上清を回収することで、それぞれの組換えウイルスを得た。

結果と考察

GP64 の違いによる増殖能への影響を調査する目的で、各ウイルス (T3-T3gp64, T3-H4gp64, H4-T3gp64, H4-H4gp64) を BmN 細胞に MOI (multiplicity of infection) =1 で感染させ、0 時間から 120 時間まで 24 時間ごとに培養上清を回収し、qPCR 法で培養液中のウイルス DNA を定量・比較した。その結果、すべてのウイルスにおいて時間の経過とともにウイルス DNA 量の増加が確認され、何れの組換えウイルスも BmN 細胞で増殖可能であることが明らかとなった。ホモの組換え体である T3-T3gp64 と H4-H4gp64 を比較すると、感染後 48 時間から両者に差が現れ始め、120 時間においては T3-T3gp64 感染細胞培養液中には大量のウイルス DNA が検出された。この結果は、T3bacmid と H4bacmid を比較した結果と一致したことから、T3-T3gp64 および H4-H4gp64 において、本来の GP64 の機能が復帰していることが確認された。

また、これらのウイルスと H4-T3gp64 を比較すると、H4-T3gp64 感染細胞培養液には T3-T3gp64 と同程度のウイルス DNA の蓄積が確認された。このことから、H4 株が BmN 細胞で増殖しにくい要因の少なくとも一つが、GP64 の構造であることが推定された。一方、T3-T3gp64 と T3-H4gp64

間ではウイルス DNA の蓄積に違いが認められなかったことから、T3 においては H4 の GP64 も T3 本来の GP64 と同様に機能することが示唆された。これらの結果を考え合わせると、培養細胞でのウイルス増殖に関わる GP64 の機能発現には GP64 以外のウイルス因子が関わっており、H4 の GP64 の機能発現に必要な因子が T3 により補われる可能性が考えられた。

polhp 下流に挿入した Luc 遺伝子の発現量を感染後 120 時間まで 24 時間ごとに比較したところ、T3-T3gp64 の Luc 発現量は H4-H4gp64 と比較して顕著に高く、感染細胞培養液中のウイルス DNA 蓄積量を比較した結果と一致した。一方、BmN 細胞における H4-T3gp64 の増殖能は、T3-T3gp64 と遜色のなく、十分に改善されたと考えられるにもかかわらず、polhp 制御下での Luc 発現量は改善が認められず、T3-T3gp64 と比較すると顕著に低かった。このことは、BmNPV 発現ベクターのゲノム改変による増殖能の向上が、必ずしも外来遺伝子発現量の増加に結びつかないことを示している。

文 献

- GOMI S. *et al.* (1999) : J. Gen. Virol., **80**(5), 1323–1337.
- 角谷 聡 (2006): 北海道大学農学部, 卒業論文
- ONO C. *et al.* (2007): J. Insect Biotech. Sericol. **76**, 161-167.
- 織谷 幸太 (2005): 北海道大学大学院農学研究科, 修士論文

BmNPV *orf67* 遺伝子の機能解析

川俣 智美・浅野 眞一郎・伴戸 久徳
北海道大学大学院農学院

カイコガを宿主とするカイコ核多角体病ウイルス (*Bombyx mori* nucleopolyhedro virus: BmNPV) はバキュロウイルス科に属し、環状 2 本鎖のゲノム DNA 上に約 140 個の遺伝子を持つ大型のウイルスである。NPV は個体間の感染に関与する包埋体由来ウイルス (occlusion derived virus: ODV) と個体内の感染に関与する出芽ウイルス (budded virus: BV) の 2 つの形態のウイルス粒子を産生し、感染を拡大させる。NPV は宿主特異性の高さを活かした害虫防除資材や外来遺伝子発現ベクターとして利用されている。特に BmNPV はカイコ個体を利用した外来タンパク質の発現ベクターとして注目されており、効率の良いベクターを開発するためには包埋体タンパク質であるポリヘドリンの大量発現の仕組みの解明が必要である。

既に塩基配列が判明しているバキュロウイルスが共通して保持している遺伝子は 30 個程度あり、それらの遺伝子はコア遺伝子と呼ばれる。進化の過程で保存されてきたコア遺伝子は、2 種類のウイルス粒子の産生や包埋体タンパク質の大量発現といったバキュロウイルスに特徴的な性質に大きく関わっていると考えられる。多くのコア遺伝子について研究が行われており、コア遺伝子はウイルス DNA の転写複製に関わる遺伝子、ウイルス粒子の構造タンパク質やウイルス粒子の構築に関わるタンパク質をコードする遺伝子、細胞周期の制御に関わる遺伝子、経口感染に関わる遺伝子に

大別できる。BmNPV においては、経口感染に関わる遺伝子群と *gp41* を除くコア遺伝子は培養細胞でのウイルスの細胞間感染に必須であることが報告されている (ONO *et al.* 2012)。

BmNPV *orf67* (*bm67*) もコア遺伝子の一つであり、*Autographa californica* MNPV (AcMNPV) と *Neodiprion sertifer* NPV (NeseNPV) の相同遺伝子では、ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus type1: HIV-1) の転写制御等に関わる *tat* タンパク質と類似する領域がある (ROHMANN, 2013)。*bm67* は ODV および BV どちらのウイルス粒子からも検出されず、細胞質に局在し、宿主のアクチンと相互作用しているという報告がある (CHEN *et al.* 2007) が、BmNPV の感染増殖においてどのような役割を担っているのかは不明である。当研究室で行われた研究では *bm67* ノックアウトウイルスの性状調査しか行っていないため、本研究では新たに *bm67* レスキューウイルスを構築し、野生型およびノックアウトウイルスとの比較を行った。また、*bm67* の機能を推測できるようなアミノ酸配列モチーフや他のタンパク質との類似配列は殆ど無いが、AcMNPV や NeseNPV の相同遺伝子と同様に HIV の *tat* と類似する 8 アミノ酸 (*tat* 類似領域) が存在する。*tat* の機能においてこの 8 アミノ酸がどのような働きを持つのかという報告はまだ無いが、本研究ではこの領域に注目し、*tat* 類似領域のアミノ酸を置換したウイルスを作製し、培養細胞

における性状を調査した。

材料と方法

1) 供試ウイルス、供試細胞

BmNPV T3 株のウイルス DNA をテンプレートとして用いた。また、ウイルスの感染実験にはカイコ卵巣由来の BmN 細胞を利用した。

2) 組換えウイルスの構築

4 種類の組換えウイルスを構築した。λ red recombination system によりクロラムフェニコール耐性遺伝子を導入することで *bm67* のノックアウトウイルス ($\Delta bm67$) を構築した。ウイルス感染のレポーターとして *polh* プロモーター下に *egfp* を導入した。培養細胞において野生型と同等の増殖を示すものを BmGFP とした (Ono *et al.* 2012)。さらに $\Delta bm67$ の *polh* に *egfp* と共に *orf* の上下数百塩基を含む *bm67* を組換え、*bm67* 復帰ウイルス ($\Delta bm67^{res}$) を構築した。*bm67* 配列中の *tat* 類似領域 (His-Pro-Gly-Ser-Gln-Pro-Arg-Thr) の一部をアラニンに置換 (Ala-Pro-Gly-Ala-Ala-Pro-Ala-Ala) し、 $\Delta bm67^{res}$ と同様に *polh* に組み換えたウイルスを $\Delta bm67^{res-tatsubA}$ とした。

3) 培養細胞への感染実験

各ウイルス DNA をトランスフェクション試薬を用いて BmN 細胞に導入し、トランスフェクション後 120 時間に培養上清を回収することでウイルス液を得た。感染多重度 0.01 に希釈したウイルス液を BmN 細胞に接種し、感染後 0 時間から 120 時間まで 24 時間毎の EGFP 蛍光強度を蛍光プレートリーダーで測定した。

培養上清中のウイルス DNA コピー数を定量 PCR により測定した。

結果と考察

bm67 に関する先行研究では、*bm67* をノックアウトすることで細胞間感染能力が失われると報告されていた (Ge *et al.* 2008; Ono *et al.* 2012)。しかし本研究では $\Delta bm67$ の細胞間感染が確認され、BmGFP と比較して感染拡大が遅いという結果が得られた。蛍光顕微鏡による観察および定量 PCR から、 $\Delta bm67$ 感染細胞一つ一つは BmGFP と同程度の EGFP 蛍光を発しており、*bm67* のノックアウトにより *polh* プロモーターの活性は低下しないが、BV の放出や他の細胞への侵入が阻害されたと考えられる。 $\Delta bm67^{res}$ は培養細胞において BmGFP と同等の蛍光強度の増加を示した。以上より、効率的な細胞間感染の進行に *bm67* タンパク質が必要であることが分かった。

bm67 の *tat* 類似領域をアラニンに置換した $\Delta bm67^{res-tatsubA}$ は、培養細胞において $\Delta bm67$ と同様に細胞間感染が遅れるという結果が得られた。*tat* による HIV の RNA 転写制御は宿主細胞の核内で起こる一方で、*bm67* は宿主細胞の細胞質に局在することから、2 つのタンパク質が類似する領域を持つからといって全く同じ機能を持つとは考え難い。しかし、*tat* 類似領域は *bm67* のホモログでも特によく保存されている領域中にあり、*tat* 類似領域が *bm67* と宿主の因子やウイルスの他の因子との相互作用に重要である可能性が示唆された。

文 献

- CHEN HQ. *et al.* (2007): *FEBS letters*, **581**, 5836-5842.
GE JQ. *et al.* (2008): *J. Gen. Virol.*, **89**: 766-764.
ONO C. *et al.* (2012): *Virus Res.*, **165**(2), 197-206.
ROHMANN GF. (2013): *National Center for Biotechnology Information* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK49>

ヨーロッパアワノメイガのカイコとの染色体比較

大野 瑞紀¹・藤川・小島 典子²・柴田 洋²・

中野 亮⁴・石川 幸男⁴・安河内 祐二³・佐原 健¹

岩手大学農学部¹・元北海道大学農学部²・

農業生物資源研究所³・東京大学大学院農学生命科学研究科⁴

鱗翅目昆虫の染色体数は、 $n=5\sim 255$ が報告されており、基盤染色体数は $n=31$ であると推測されている(ROBINSON 1971)。 $n=31$ の鱗翅目昆虫はこれまで 5 種においてモデル鱗翅目昆虫であるカイコ ($n=28$)との染色体比較が行われており、数カ所のリアレンジメントが見られるものの、カイコとの高い染色体対応関係が認められている(BAXTER *et al.* 2011; VAN'T HOF *et al.* 2012; SAHARA *et al.* 2013; AHOLA *et al.* 2014)。これら $n=31$ 鱗翅目昆虫種はカイコ第 11、第 23 および第 24 染色体に対応する染色体がそれぞれ二本ずつであり、その他染色体は 1 対 1 対応する。*Melitaea cinxia* の次世代シーケンシング結果により、カイコ第 11 染色体は 5,410,160~5,798,000bp、23 染色体は 17,180,240~17,247,200bp、24 染色体は 9,953,070~10,742,570bp に対応する *M. cinxia* の領域が、2 染色体のそれぞれリード端に対応することが示された(AHOLA *et al.* 2014)。

ヨーロッパアワノメイガは欧米におけるトウモロコシの重大害虫として知られており、また、性フェロモン合成やその認識システムと種分化に関して興味の対象となっている(LASSANCE 2010)。これまでに、嗅覚受容遺伝子の染色体マッピングが行われている(YASUKOCHI *et al.* 2011a)が、カイコとの染色体比較は未だ完全では行われていなかった。

そこで、本研究では染色体数 $n=31$ である本種の減数分裂パキテン期の染色体を用いて、カイコ

との染色体の対応関係を明らかにすることを目的とした。特に、カイコに至る進化過程で付着したと推測される第 11、23 ならびに 24 染色体の対応する領域に注目して BAC/fosmid-FISH 解析を行った。

材料と方法

1) 供試昆虫

本研究には、農林水産省植物防疫所から特別に許可を得た東京大学大学院農学生命研究科応用昆虫学研究室で飼育したヨーロッパアワノメイガを用いた。また、アワノメイガは日本の関東地域に生息する野生種を採集した。双方の種とも、インセクタ LFS (Nosan)により飼育した。カイコは桑の葉で飼育した p50 系統を使用した。

2) 染色体標本

これら昆虫の 5 齢幼虫の体腔内から抽出した生殖巣より、TRAUT (1976)の方法を改変して減数分裂染色体をスライドガラス上に作製した。

3) ライブラリー

ヨーロッパアワノメイガ BAC ライブラリーは Clemson 大学の Genomics Institute より購入した。アワノメイガの fosmid ライブラリーは新たに構築した。

4) オルソログ特定とクローン選抜

FISH プローブに用いる BAC クローンは、ESTs パブリックデータベースと Kaikobase の blastX 検索からカイコ単一遺伝子オルソログ配列を PCR 選抜した(YASUKOCHI *et al.* 2011b)。アワノメイガは *de novo* に決定したゲノム配列を query とした blastX 解析により kaikobase のオルソログを特定し、fosmid 選抜用の STS プライマーを設計した。これらプライマーを用いて、YASUKOCHI (2002) に準じた PCR 選抜を行った。

5) FISH (Fluorescence *in situ* hybridization)

それぞれのクローンより Genopure Plasmid Midi Kit (Roche) の精製キットを用いてプラスミドを精製した。Nicktranslation Kit (Abbott) により、蛍光色素ラベルした BAC および fosmid をプローブとして FISH を行った。FISH は SAHARA *et al.* (2013) に準じて行った。FISH した染色体標本は蛍光顕微鏡 DM6000B (Leica) を用いて顕鏡し、顕微鏡に装着した DX350 白黒 CCD カメラにより特異蛍光を取得してデジタル保存した。保存した画像は Adobe photoshop CS6 により疑似カラーを施すとともに染色体画像と統合した。

結果と考察

カイコオルソログを含むヨーロッパアワノメイガ BAC ならびにアワノメイガ fosmid-FISH により得られた染色体マッピングデータより、ヨーロッパアワノメイガ染色体とカイコ染色体との対応関係が明らかになった。その結果、これまでに研究された $n=31$ 鱗翅目昆虫種と同様に、カイコ第 11、23 ならびに 24 染色体にヨーロッパアワノメイガの染色体が二本ずつ、それ以外は 1 対 1 の関係で対応していた。従って、先例 (BAXTER *et al.* 2011; VANT HOF *et al.* 2012; SAHARA *et al.* 2013) に習いカイコ第 11、23 および 24 染色体に対応するヨーロッパアワノメイガ各 2 染色体を第 11 と

29、23 と 30、24 と 31 染色体とし、他の染色体はカイコに対応する染色体番号を付した。

アワノメイガ fosmid はヨーロッパアワノメイガ染色体に対してクロスハイブリダイゼーションが認められた。カイコ染色体に存在する遺伝子とそれぞれのオルソログを含む BAC と fosmid のプローブシグナルの位置関係はよく一致した。このため、双方のプローブを用いた、祖先における付着が予測されるカイコ第 11、23 ならびに 24 染色体とそれぞれに対応するヨーロッパアワノメイガ 2 染色体の対応関係を FISH により調査した。その結果、カイコ第 11、23 ならびに 24 染色体の付着が予測される部位は、Kaikobase 上 5,445,770 ~ 5,732,931bp、17,155,881 ~ 17,195,618bp と 9,237,493 ~ 10,769,257bp の範囲に絞りこまれた。

これらは、第 11 と 23 染色体は同スキャフォールドの *Bm_scaffold59* と *Bm_scaffold12* に位置し、約 287Kb と 40Kb のギャップが存在する。一方、カイコ第 24 染色体では、この範囲に 3 つの scaffold が存在している。なかでも *Bm_scaffold43* と *Bm_scaffold103* に挟まれた約 400kb ほどの *Bm_scaffold147* は転写領域が一つも知られていない。ゆえに、間に *Bm_scaffold147* を含む 1.5Mb ほどのブランクが有る *Bm_scaffold43* と *Bm_scaffold103* の端の転写配列を用いたため、他よりも付着の推測範囲が広がった。

カイコの AK386872 を含む BAC をカイコの染色体に FISH した結果、第 24 染色体のヘテロクロマチン領域 (YOSHIDO *et al.* 2005 の Figure 2 参照) にシグナルが得られた。祖先の $n=31$ 鱗翅目昆虫種の染色体が付着してカイコ核型が成立したと仮定すると、染色体の末端にあったサブテロメリックリピートが、ヘテロクロマチン領域としてカイコに残っているのではないかと推測できる。

M. cinxia はアゲハチョウ上科、ヨーロッパアワノメイガはメイガ上科に属し、いずれもカイコの所属するカイコガ上科とは近縁な関係にない。本研究結果を AHOLA (2014) の結果と比較すると、こ

の 2 染色体が向き合う領域はほぼ同じで、第 11 染色体では 388Kb、第 23 染色体では 67Kb、第 24 染色体では 790Kb のギャップが存在した。

本研究により $n=31$ である *O. nubilalis* において、*M. cinxia* と同様に、上記カイコ 3 染色体との対応部位の一致が認められた。遠縁な 2 種においてカイコの 3 染色体の付着による生成論の根拠が得られたことから、カイコ染色体が $n=31$ の祖先種からの付着により $n=28$ へと変化したとの説の確度が強まったと考えられる。また、これまでに解析された $n=31$ を持つ種の染色体対応関係の保存性を考慮するとこれら核型は鱗翅目昆虫全体に広がる $n=31$ 種の基本形であるとの推定が成り立つ。

本研究の結果、メイガ上科に属する種において初となる染色体マッピングが完成した。また、次世代シーケンサーによる領域特定と FISH の物理マッピング融合は、染色体変異領域の特定に非常に有用であることが示された。

- AHOLA V. *et al.* (2014) *Nature Communications*, **5**, 4737.
- BAXTER SW. *et al.* (2011) *PLoS ONE*, **6**, e19315.
- LASSANCE JM. *et al.* (2010) *J. Chem. Ecol.*, **36**, 1155–1169.
- ROBINSON R. (1971): Pergamon, Oxford
- SAHARA K. *et al.* (2013): *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **43**, 644–653.
- TRAUT W. (1976): *Chromosoma*, **58**, 275-284
- VANT HOF AE. *et al.* (2012): *Heredity*, **110**, 283–295.
- YASUKOCHI Y. (2002): *PCR Cloning Protocols*, **192**, 401-410.
- YASUKOCHI Y. *et al.* (2011a): *PLoS ONE*, **6**, e18843.
- YASUKOCHI Y. *et al.* (2011b): *J Biomed. Biotechnol.*, 165894.
- YOSHIDO A. *et al.* (2005): *Genetics*, **170**, 675-685.

文 献

新しいタイプの農薬開発 —気門と腹脚のかぎ爪を阻害するイソチオシアネート化合物—

高木圭子^{1*}・渡会直人^{1*}・金児雄^{1,2}・比留間潔^{1,2}

¹弘前大学農学生命科学部・²岩手大学大学院連合農学研究科

日本の農業において東北地方が果たす役割は非常に重要である。米の収穫量のおよそ27%が東北産であり、また、リンゴを代表とする果樹の作付面積が全国の約2割を示すという事実からも、その重要性がうかがえる(2012, 2013年度農林水産省調べ)。このように東北の基幹産業ともいえる農業において、害虫対策が重要であるということは言うまでもない。特にメイガ、ハモグリガなどのチョウ目昆虫は稲・果樹に被害を与える害虫として知られており、対策が不可欠である。更に、2002年の農林水産省の報告によると、地球温暖化によるニカメイガの発生回数の増加が予想されており、今後ますます有効な害虫対策が求められる。

最近では農薬を使用しない有機農法などが注目を浴びているがこれらはごく特殊な例で、害虫制御の主たるものは農薬であり、農薬無くしては世界の農業は成り立たない。しかし長年の使用で環境汚染やその毒性が問題となっており、総合防除の考えを取り入れてその使用量を減少する努力がなされている。一方、哺乳類には存在せず、節足動物に特異的なエクダイソンや幼若ホルモンなどの生理活性物質のアゴニストを使用しての防除方法の開発も長年試みられており、一部では成功を収めている(DHADIALLA *et al.* 2005)。

我々は、農業の主たる害虫を含むチョウ目昆虫の代表としてタバコスズメガ(*Manduca sexta*)をモデル昆虫として使用し、環境や哺乳類に比較的安全であり、作用のユニークな新規農薬の候補

としてイソチオシアネート化合物に注目して研究を続けてきた。驚くべきことに、イソチオシアネートの処理により幼虫は発育阻害を起こすものも見られたが、多くの場合致死量以下の投与量でも、幼虫期の気門と腹脚のかぎ爪形成が阻害される事を見出した(MATOLCSY *et al.* 1986; UJVARY *et al.* 1988; 1989; 1995)。発育阻害は気門生成の阻害やクチクラの損傷によるものと考えられる。故に、たとえ健全に発育したとしても、かぎ爪の形成阻害により農作物に幼虫が付着できず落下して死に至る効果が得られると想定される。よって、イソチオシアネートは有用である可能性のあることを示している。我々は新規化合物を含む多くのイソチオシアネート誘導体を合成して、新しいタイプの防除剤となり得る化合物の探索をしていた。しかし、主たる有機化学者のGyörgy Matolcsy博士の不慮の死で、タバコスズメガでのプロジェクトは頓挫してしまった。

イソチオシアネート作用の研究は新しい作用機構を持つ殺虫剤開発のアイデアを提供するものであり、イソチオシアネート及びその誘導体自身が有効な農薬候補にもなりえると考えられる。そこでイソチオシアネート化合物がタバコスズメガだけでなく、多くの害虫を含むチョウ目昆虫に対して同様な作用を普遍的に引き起こすことができるかどうかを明らかにする研究の一環として、本研究では、ゲノム解析が終了しており、多くの生理生化学的な知見が蓄積されているカイコを用いた

*equal contribution

イソチオシアネートの評価を行った。

材料と方法

供試虫

カイコ（錦秋×鐘和 F1 世代）を、シルクメイト（日本農産工業株式会社）を与え飼育した。明期 12 時間、暗期 12 時間の光周期下、25℃で飼育した。この条件下で飼育した場合、3 齢脱皮後約 36 時間で体液中のエクダイソン濃度が急上昇し始め、約 84 時間でほとんどの個体が 4 齢へと脱皮する (TAKAKI and SAKURAI, 2003)。

薬剤塗布実験

1,3-Propane-diisothiocyanate (Santa Cruz Biotech) (図 1) (以後 NCS と記述) をアセトンに溶解して使用した。必要な量の NCS を 2 µl のアセトンに溶かし、幼虫の背側正中線にそって塗布した。コントロールとして同量のアセトンを同様に塗布した。

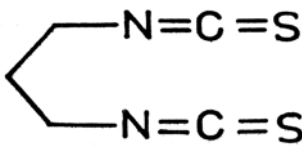


図 1. 1,3-Propane-diisothiocyanate の構造式

結果と考察

NCS の濃度依存的影響

3 齢脱皮後 24 時間の幼虫に NCS を塗布し、その後の形態と死亡率を調べた。塗布後、3 齢期に死亡した個体の割合は、5µg と 7µg で 5%以下、10µg で約 40%、100µg で 100%と濃度依存的に上昇した (図 2A, B)。死亡した個体は全て眠に入る事は無く、形態的には異常が認められなかった。明らかに高濃度の NCS はカイコに対して殺虫効果を示した。タバコスズメガでは 3 齢脱皮 6 時間後の幼虫へ 25µg の NCS 塗布で 58%、100µg では 100%の死亡率を示したので (UJVARY *et al.* 1988)、

カイコでの NCS の殺虫効果に及ぼす作用はタバコスズメガに及ぼす作用とほぼ同等と考えられる。

NCS 塗布後に 3 齢で死亡せず 4 齢に脱皮した個体の形態を観察した (図 2C)。NCS を塗布した個体は 4 齢幼虫への脱皮のタイミングにばらつきが見られたため、塗布後の時間に関係なく 4 齢に脱皮した後に観察した。その結果、5 µg 以上の NCS を塗布すると異常な形態を持つ個体が観察された。また濃度が上昇するに従って異常を持つ個体の数も上昇した。異常はほとんどが気門に生じ、気門の異常は全体あるいは半分欠損、湾曲したものなど様々であった (図 2D)。全ての気門に異常を持つ個体もあれば、体の片側のみであったり一部に異常が現れたり等、個体によりばらつきが見られた。このようなばらつきはタバコスズメガでも観察されている (UJVARY *et al.* 1989)。

気門とかぎ爪両方に異常を生じる個体もごく少数出現したが、かぎ爪のみに異常を持つ個体は認められなかった (図 2C)。しかしこのかぎ爪の異常はタバコスズメガのように完全に消失するのではなく (MATOLCSY *et al.* 1986)、配置に乱れが見られた程度で、気門と比べて厳しいものではなかった (図 2D)。ごく少数ではあるが、腹脚そのものが消失した個体も確認できた (図 2C)。タバコスズメガでは 3 齢幼虫に 2.5µg の NCS 塗布で 80% の 4 齢幼虫の気門に異常が見られ、10µg 以上ではすべての個体に気門の異常が見られた。また 10 及び 25 µg の塗布でそれぞれ 70%、100%の個体がかぎ爪に異常が見られた (UJVARY *et al.*, 1988)。これらの結果は NCS の形態異常を引き起こす作用は、カイコよりタバコスズメガの方が感受性が高いことを示している。

なお NCS 塗布により、脱皮までに必要な時間は延長されたが、脱皮時の体のサイズは通常の個体とほぼ同じであった。また気門に異常を持つ個体のほとんどが 5 齢へと脱皮した。

NCS の時期特異的作用

NCS に対するカイコとタバコスズメガの感受性の違いは、両種における器官や組織の感受性が発育時期により異なることに起因する可能性がある。そこで幼虫の発育時期による NCS の影響を調べた。3 齢に脱皮した後それぞれ 6, 12, 24, 36, 48, 60 時間で 10 μ g の NCS を塗布し、その影響を観

察した (図 3A, B)。我々の飼育環境では、3 齢幼虫は脱皮後 96 時間前後で 4 齢へと脱皮した。脱皮 6 時間後に NCS を塗布した時は 90%以上の個体が眠に入ることなく死亡した。また脱皮後 24 時間での塗布で 30%が死亡、それ以降の塗布では 3 齢で死亡する個体は現れなかった。つまり、塗布のタイミングが早いほど 3 齢での致死率が高かった。これは脱皮直後の 3 齢幼虫のクチクラはまだ形成途中であるために薄く、薬剤が体内に浸透しやすいことが原因の一つと考えられる。コントロールとして同じ数の個体にアセトンを 2 μ l 塗布したところ異常は全く見られず正常に発育したことから (結果省略)、死亡要因は NCS そのものの作用と考えられる。

NCS 塗布のタイミングが早いと死亡率は高かったが (図 3B)、生き残った個体は正常に 4 齢に脱皮する個体の割合が多かった。しかしほとんどすべての個体に気門の異常が見られ、その中には少数ではあるが腹脚や腹脚のかぎ爪に異常を起こす個体が出現した (図 3C)。脱皮不全を起こした個体の割合は NCS 塗布のタイミングが遅くなるに従って上昇し、脱皮後 48 時間以降の処理では 90%以上に達した (図 3C)。脱皮不全を起こした個体のクチクラをはがして詳細に観察したところ、大部分は apolysis を起こしており簡単に剥離することが出来たが、一部剥離できない部分が存在した (図 3Db)。剥離できない部位は 4 齢のクチクラが正常に形成されておらず、これが脱皮不全の要因であると考えられる。また脱皮不全を起こした個体には気門の消失・欠損が同様に認められたが (図 3E)、かぎ爪には異常はほとんど認められなかった。以上すべての結果から、NCS は気門、皮膚のクチクラ形成を阻害するが、カイコではタバコスズメガで見られたようなかぎ爪への作用は非常に限定的である事がわかった。

クチクラとかぎ爪の形成はエクダイソンによって誘導されるが、気門の形成はエクダイソンの上昇初期に始まり濃度依存的に形成される

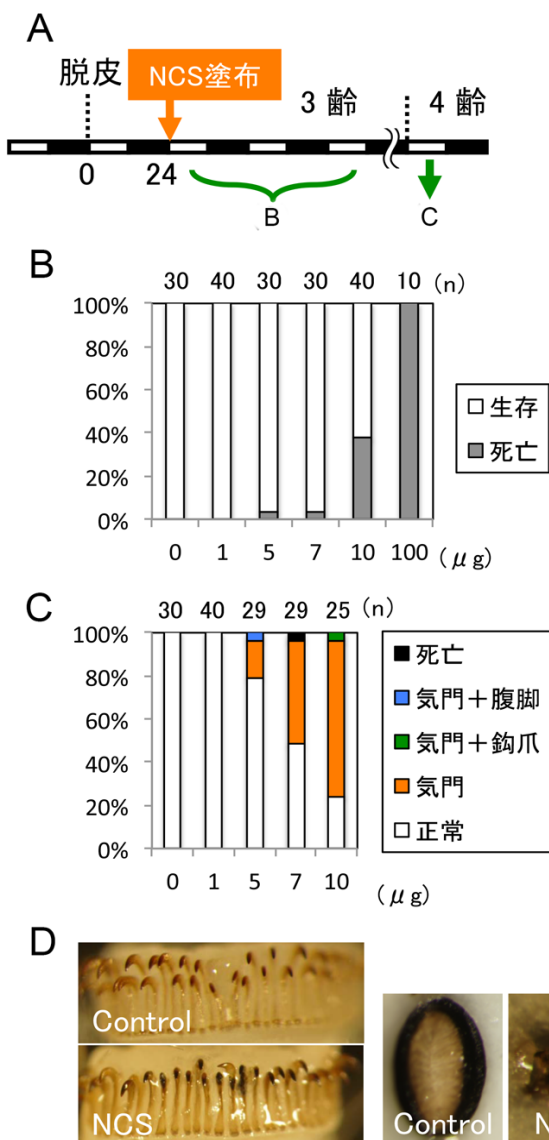


図 2. A; 実験のスケジュール。NCS 塗布の時間をオレンジで、観察した時期を緑で示す。B; NCS 塗布後の 3 齢での生存率。C; NCS 塗布後、4 齢に脱皮した個体の異常の割合。死亡した個体は気門に異常をきたしていた。それ以外の個体は全て 5 齢に脱皮した。D; NCS により誘導された異常を示したかぎ爪 (左) と気門 (右)。コントロールは溶媒であるアセトンを塗布した。

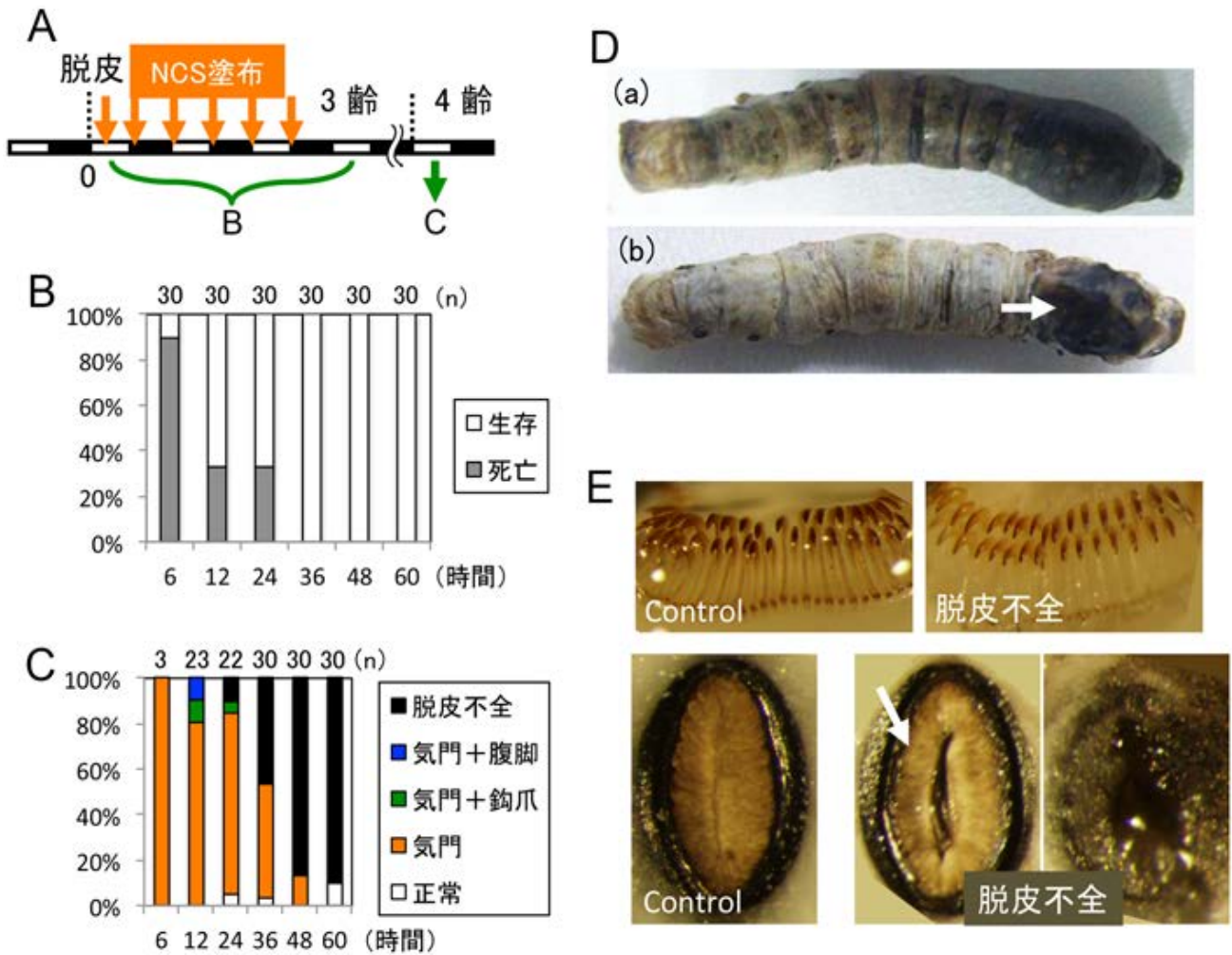


図 3. A; 実験のスケジュール。NCS 塗布の時間をオレンジで、観察した時期を緑で示す。B; NCS 塗布後の 3 齢での生存率。C; NCS 塗布後、4 齢に脱皮した個体の異常の割合。脱皮不全は 3 齢幼虫の皮膚を脱ぎ去ることが出来ず、幼虫自身で 4 齢に脱皮できなかった個体を示す。D; 脱皮不全の個体の写真。(a) 外部形態、(b) 表のクチクラをピンセットではがした後の写真。矢印の部分はアポリシスが起きておらず、剥離出来なかった。E; 脱皮不全の個体の腹部のかぎ爪（上）と気門（下）の写真。コントロールはアセトンを塗布した個体で、正常に脱皮して気門とかぎ爪の形態は正常である。矢印の部分は異常な間隙を示す。脱皮不全個体の気門写真の背景は一部着色してある。

(KIGUCHI and AGUI, 1981)。カイコ 3 齢幼虫の場合ではエクダイソン濃度が上昇し始める 3 齢 36 時間頃 (TAKAKI and SAKURAI, 2003) から気門形成が開始されると考えられる。エクダイソンの上昇前の 3 齢脱皮後 6 時間から 36 時間で NCS を塗布しても、気門形成を阻害できた事から (図 3C)、NCS は気門形成細胞がエクダイソン不在化でも障害を与えることが判った。しかし気門は NCS に対して皮膚よりも感受性が高いので (図 2C)、3 齢 36 時間以前に検出される極少量のエクダイソ

ンにさらされた結果、NCS により気門形成細胞が損傷を受けた可能性もある。

一方、エクダイソンにより誘導されるクチクラとかぎ爪の形成は、タバコスズメガではホルモンに対する反応のタイミングが両組織で異なり (LANGELAN *et al.* 2000)、カイコでも同様なことが観察された。NCS によるクチクラの障害も、気門形成の障害が 4 齢幼虫の気門に起こるのと同様に、新たに生成される 4 齢幼虫のクチクラに対して起った。図 3C に見られるように、3 齢 36 時間

あたりから上昇するエクダイソン (TAKAKI and SAKURAI, 2003) に曝された後の NCS 処理のみが真皮細胞に損傷を与え、正常なクチクラ形成が阻害された結果、脱皮不全が引き起こされたと考えられる (図 3D)。すなわち比較的高濃度のエクダイソンにさらされる 3 齢 36 時間前には NCS は真皮細胞にほとんど影響を与えず、高濃度のエクダイソンにさらされた後のみに損傷を与えたと考えられる (図 3C)。これは上述した気門に対する作用とは異なっていた。

3 齢脱皮後 6 時間目の処理と 12 時間目の処理とで死亡率に大きな差が見られるなど (図 3B)、NCS の反応性の結果から NCS 活性は塗布後数時間で失われ、NCS はカイコの血中内では速やかに代謝されると思われる。

上述のように気門とかぎ爪の形成はエクダイソンの制御化にあり、タバコスズメガで示されたように両器官は脱皮時に最初にエクダイソンに反応する極めて感受性の高い器官である (FAIN and RIDDIFORD, 1976; 1977)。クチクラを含めてエクダイソンへの感受性が高い器官が特異的に NCS に形態形成が阻害されることは興味深い、そのメカニズムの解明は将来の研究に待たなければならない。かぎ爪への反応性がカイコとタバコスズメガで異なるのはその産生細胞のエクダイソンへの感受性が異なるのが原因の一つであることが考えられる。この仮定はかぎ爪形成を誘導するエクダイソンの詳細な dose response などを明らかにすることにより解明できると思われる。

我々は NCS がカイコの発育遅延を導き、気門と幼虫のクチクラ形成を阻害することを確認した。タバコスズメガで見出されている腹脚のかぎ爪の顕著な阻害作用はカイコでは誘導できなかったが、多くの共通した現象が引き起こされたことから、広く他のチョウ目昆虫へも同様な効果があると期待できる。現在流通している 90% 以上の農薬、特に合成有機農薬のほとんどすべては神経毒であり、正常な神経伝達を遮断することにより昆虫を死に

至らしめる。環境汚染は言うまでもないことだが、最大の欠点は作用点が我々を含む哺乳類と共通していることである。イソチオシアネートの 1 つであるアリルイソチオシアネートはカラシやダイコンの辛み成分であり、その上イソチオシアネートには抗癌作用や抗菌作用を示すものもあり、哺乳類にとっては健康に害を及ぼすというよりむしろ有用ですらある。実験に使用した 3 齢期に限った場合であるが、イソチオシアネートはどの発育時期に処理したとしても、その時期に応じた異常を誘導した。これらのことは昆虫発育制御剤のように発育時期特異的に作用する化合物と比べて、農薬として用いる場合その使用が容易であると考えられる。

もし農薬として使用に耐える有効なイソチオシアネートの誘導體が「害虫防除剤」として開発されたならば、たとえ直接の殺虫効果がなく害虫が生理的には正常に発育したとしても、形態的に植物上にとどまることが出来ずに落下 (腹脚のかぎ爪の異常)、あるいは気門形成の不備により酸欠状態の誘導やクチクラの形成阻害などによる発育遅延・環境耐性の低下を導くことが出来る。結果的に害虫の生存率や食害を劇的に減少させることが可能と考えられる。また使用濃度はかなり下げられる可能性があるとして推定され、人畜に比較的安全な新しいタイプの殺虫剤になるであろう。今後他の多くのチョウ目に属する害虫へのイソチオシアネートの作用を研究することが期待される。

文 献

- DHADIALLA TS. *et al.* (2005): In "Comprehensive Molecular Insect Science" (Gilbert LI, Iatrou K, and Gill SS. ed), vol. 6, pp. 55-115. Elsevier, Oxford.
- FAIN MJ. and RIDDIFORD LM. (1976): Gen. Comp. Endocrinol., 30, 131-141.
- FAIN MJ. and RIDDIFORD LM. (1977): Wilh.

- Roux's Arch. Dev. Biol., **181**, 285-307.
- KIGUCHI K. and AGUI N. (1981): J. Insect Physiol., **27**, 805-812.
- LANGELAN RE. *et al.* (2000): Dev. Biol., **227**, 481-494.
- MATOLCSY G. *et al.* (1986): Z. Naturforsch., **41**, 1069-1072.
- TAKAKI K. and SAKURAI S. (2003): Insect Biochem. Mol. Biol., **33**, 1189-1199.
- UJVARY I. *et al.* (1988): *In* "Endocrinological Frontiers in Physiological Insect Ecology" (Sehnal F., Zabza A. and Denlinger DL. ed), **vol.1** pp. 593-400. Wroclaw Technical University Press, Wroclaw.
- UJVARY I. *et al.* (1989): Pestic. Biochem. Physiol. **35**, 259-274.
- UJVARY I. *et al.* (1995): *In* "Insects: Chemical, Physiological and Environmental Aspects (Konopinska D., Goldsworthy G., Nachman RJ., Nawlot J., Orchard I., Rosinski G. and Sobotka W. ed), pp. 293-298. Wydawnictwo Uniwersytetu Wroclawskiego, Wroclaw.

東北蚕糸・昆虫利用研究報告投稿要領

1. 東北蚕糸・昆虫利用研究報告(以下本報告)への投稿者は日本蚕糸学会員にかぎる。共著のときは非会員を含むことができる。会員の推薦のもと支部長が許可した場合にも投稿可能とする。
2. 本報告への投稿原稿はデジタルデータとし、A4版サイズに、次の順序で記述する。1)表題 2)著者名 3)所属機関の名称 4)本文(目的、材料と方法、結果と考察、要約など) 5)文献
なお、1行21文字、1ページ40行とする。刷上がり1ページ分は1,600字を目安とする。
以下、URL参照
<http://hashi.agr.hokudai.ac.jp/temp.doc>
3. 本報告への投稿原稿は横書きとし、当用漢字および現代かなづかいを用いる。動植物および外来語はカタカナとするが、蚕や桑などは漢字を用いてもよい。薬品名、化学物質名等は和名を用い、学術用語は日本蚕糸学会編「蚕糸学用語辞典」による。また、学名(イタリック)および外国人の名、地名は原語とする。
4. 数字はアラビア数字とし、また単位および略記号の表し方は km、m、cm、mm、 μ m、nm、ha、a、(アール)、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@abs.agr.hokudai.ac.jp) (浅野眞一郎)に送信する。紛失等の事故を考慮してデータの控えをとっておく。掲載した原稿データは返却しない。

付 記

送付の様式

発送年月日	平成	年	月	日
表 題				
著 者 名 (所属機関)	()			
連絡先 (電話番号)	(- -)			
送付枚数	原稿	枚、表	枚	
	図	枚、写真	葉	
備 考				

日本蚕糸学会東北支部規約

(総則)

- 第1条 この支部は日本蚕糸学会東北支部と呼び、事務局を岩手大学農学部におく
- 第2条 この支部は一般社団法人日本蚕糸学会支部設置規程のとおり北海道および東北六県に在住する日本蚕糸学会会員をもって組織され、この地方における蚕糸及び昆虫利用に関する学術の振興と普及をはかり、あわせて会員相互の研究上の連絡を緊密にすることを目的とする
- 第3条 前条の目的を達成するため次の事業をおこなう
- (1) 研究発表会、討論会、学術講演会等の開催
 - (2) そのほか支部の目的達成に必要な事業

(機関)

- 第4条 総会は最高の決定機関とし、支部会員の過半数（委任状も含む）の出席により成立する
- 2 総会は、委員会が必要と認めるとき支部長が召集する。総会の議長は支部長がこれにあたる
 - 3 総会は規約の改廃、その他重要な事項について審議決定する
- 第5条 この支部に委員を設ける
- 2 委員会は支部長が召集し、議長は支部長がこれにあたる
 - 3 委員会は支部の事業並びにこの規約に規定しない事項や細則などを審議決定するとともに支部運営の円滑な推進をはかる

(役員)

- 第6条 この支部に次の役員をおく
- (1) 支部長 1 名、副支部長 1 名、委員若干名
 - (2) 支部長及び副支部長は委員とする
 - (3) 支部長は一般社団法人日本蚕糸学会選挙規程にもとづき選出された東北選挙区選出理事、副支部長は第一位にて選出された東北選挙区選出代議員がこれにあたる。そのほかの東北選挙区選出の一般社団法人日本蚕糸学会理事、代議員

を委員とする

- 第7条 支部長は支部を代表し事務を総括する
- 2 副支部長は支部長を補佐し、支部長事故のあるときはこれを代理する
 - 3 委員は委員会を構成し合議により支部の運営にあたる
- 第8条 任期は一般社団法人日本蚕糸学会の任期規定に準ずる。ただし、再選を妨げない

(会計)

- 第9条 支部の会計は、一般社団法人日本蚕糸学会の会計に連結され、会計年度は毎年1月1日に始まり12月31日に終わる

(名誉会員及び賛助会員)

- 第10条 支部に対して特に功績のあった会員を総会の承認を経て名誉会員に推すことができる
- 2 支部の主旨に賛同し援助を与えられた個人・会社または団体を支部賛助会員に推すことができる

(規約の改廃等)

- 第11条 この規約の改廃は総会出席会員の過半数の賛同を必要とする

付則 この規定は平成4年10月31日より実施する
この規定は平成17年10月1日に改正した
この規定は平成25年1月1日に改正した

日本蚕糸学会東北支部 役員

(任期平成 27 年 1 月 1 日～平成 28 年 12 月 31 日)

支部長

伴戸久徳 (一般社団法人日本蚕糸学会東北選挙区選出理事)

副支部長 (会計担当)

佐原 健 (一般社団法人日本蚕糸学会東北選挙区選出代議員)

委員 (編集担当)

浅野眞一郎 (一般社団法人日本蚕糸学会東北選挙区選出代議員)

委員 (庶務担当)

比留間 潔 (一般社団法人日本蚕糸学会東北選挙区選出代議員)

印刷 平成 26 年 12 月 10 日

発行 平成 26 年 12 月 10 日

編集者 伴戸 久徳

発行者 日本蚕糸学会東北支部

〒020-8550

盛岡市上田 3-18-8

岩手大学農学部応用昆虫学研究室

Tel 019-621-6147

