

# 東北蚕糸・昆虫利用研究報告

第 41 号

平成 28 年 12 月

日本蚕糸学会東北支部



# No.41 目 次

大野 瑞紀 鈴木 剛 安河内 祐二 佐原 健	モンキチョウ BAC ライブラリーの作製 . . . . . 1
山田 恭裕 浅野 眞一郎 伴戸 久徳 佐原 健	天蚕繭色の遺伝について . . . . . 4
佐藤 文美 佐藤 昌直 伴戸 久徳 浅野 眞一郎	Cry1Ia トキシンのコナガに対する殺虫活性機構について . . . . . 7
中尾 悠太 中神 あゆみ 佐藤 昌直 伴戸 久徳 浅野 眞一郎	Cry44Aa トキシンの殺虫活性機構の解明 . . . . . 9
池田 優里恵 佐藤 昌直 伴戸 久徳 浅野 眞一郎	Cry8Da トキシンの殺虫活性機構について . . . . . 12
服部 和澄 佐藤 昌直 浅野 眞一郎 伴戸 久徳	バキュロウイルス耐性カイコ細胞の作出に向けて . . . . . 14
荏間澤 真弓	東北地域のシルク産業と食べるシルクの現在・過去・未来 . . . . . 17

## モンキチョウ BAC ライブラリーの作製

大野 瑞紀<sup>1</sup>・鈴木 剛<sup>2</sup>・安河内 祐二<sup>3</sup>・佐原 健<sup>1\*</sup>  
岩手大学農学部<sup>1</sup>・大阪教育大学自然研究専攻<sup>2</sup>・  
農業・食品産業技術総合研究機構<sup>3</sup>

鱗翅目昆虫の染色体研究は、これまでモデル鱗翅目昆虫であるカイコのゲノム情報を基盤として行われてきた。分子連関解析、fluorescence *in situ* hybridization (FISH)、および次世代シーケンサーによるドラフトゲノム解析を用いて、これまで10種 (n=14~31)においてカイコとの染色体比較研究が報告されている。その結果、報告された全ての種でカイコとの間に染色体コリアリティーが存在することが明らかになった(AHOLA *et al.* 2014; BAXTER *et al.* 2011; PRINGLE *et al.* 2007; SAHARA *et al.* 2013; VANT HOF *et al.* 2008; 2013; YASUKOCHI *et al.* 2009; 2016; YOSHIDO *et al.* 2011)。しかし、シロチョウ科に属するオオモンシロチョウとモンシロチョウでは、2種の染色体間にはコリアリティーが存在するものの、カイコ染色体との間には多数のリアレンジメントが生じていることが bacterial artificial chromosome (BAC)-FISH マッピングにより明らかとなってきた(未発表)。

シロチョウ科は4亜科に分類され、このうち1属5種のみが属するマルバネシロチョウ亜科(KIM *et al.* 2011)はほとんど研究が進んでいない。上記2種の属するシロチョウ亜科は、親子でも染色体数が異なることが、最近明らかとなったコバネシロチョウ亜科(ŠICHOVÁ *et al.* 2015; 2016)とともに、属する種の染色体数が多様である。こうした状況証拠は、オオモンシロチョウやモンシロチョウと同様に、これら2亜科の染色体が、保存性

の高い他の鱗翅目昆虫とは異なり、多数のリアレンジメントを起こしている可能性を示唆する。これに対してモンキチョウ亜科では、報告のある種の染色体数が1種を除きn=31前後であることが報告されている(ROBINSON, 1971)。n=31は、進化的な鱗翅目昆虫の典型染色体数である(YASUKOCHI *et al.* 2016)。よって、モンキチョウ亜科の種では、カイコをはじめとする典型的な鱗翅目昆虫との間に染色体コリアリティーが存在すると予測されるものの、確証は得られていない。そこで私たちは、モンキチョウ亜科の種を用いたBAC-FISHマッピングによるカイコとシロチョウ亜科との染色体比較を計画している。

本研究では、モンキチョウ亜科に属する種の中でも生息域の広いモンキチョウ(n=31)を用いてBACライブラリーの作製を行った。さらに、作製したBACがFISHマッピングに利用可能であることの確認も行った。

### 材料と方法

#### 供試昆虫

本研究では、岩手県盛岡市の川原果樹園にてモンキチョウ雌複数個体を採集した。これらの次世代から雄蛹3個体をBACライブラリーの作製に用いた。染色体標本作製には、上記個体に加えて2015~2016年に岩手大学構内で採集したモンキチ

\*責任著者

〒020-8550 盛岡市上田 3-18-8

e-mail [sahara@iwate-u.ac.jp](mailto:sahara@iwate-u.ac.jp)

ヨウ雌個体の次世代を用いた。孵化した幼虫はアカツメクサとシロツメクサにより飼育した。

### BAC の作製

Hight molecular weight (HMW)-DNA を含むアガロースプラグ作製は、SUZUKI *et al.* (1997)を一部改変して行った。部分消化したゲノム断片は、 $\lambda$ -ladder marker を参考にして、分画 1 (約 100~125Kbp) と分画 2 (約 125~150Kbp) の 2 つの領域に分けて、SUZUKI *et al.* (2012) に従いゲル抽出および pBeloBAC11 ベクターへの ligation を行った。コンピテントセル HST08 Premium Electro-Cells (TaKaRa) 18 $\mu$ l と ligation mix 1 $\mu$ l を混合し、1.25 or 1.50KV、25 $\mu$ F、100 $\Omega$  の条件で、Gene Pulser Xcell (Bio-Rad)によりエレクトロポレーションを行った。これを X-gal と IPTG を塗布したクロラムフェニコール 12.5 $\mu$ g/ml 入り LB アガロースプレートに植菌し、37 $^{\circ}$ C で 20-24h 静置培養した。

### BAC ライブラリーの作製

プレートから白コロニーを選択し、クロラムフェニコール 10 $\mu$ g/ml 入り LB グリセロール 8% 溶液を 50 $\mu$ l ずつ分注した 384 ウェル y プール作製用プレートに植菌した。37 $^{\circ}$ C で 1 晩培養し、恒久保存プレートと x プール作製用プレート (LB 分注済) に爪楊枝でコピーした後、y およびプレート DNA プールの作製に用いた。x プール作製用プレートは 1 晩培養した後、x-DNA プール作製に用いた。恒久保存プレートは 1 晩培養した後、-80 $^{\circ}$ C で保存した。

### 平均インサート長の測定

インサート長の測定は CHEF mapper (Bio-Rad) を用いたパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) により行った。QIAGEN Plasmid Midi Kit を用いて精製した BAC を *NotI* (TaKaRa) で 1 晩、制限酵素処理を行い、Auto Algorithm 5-400Kb 設定で泳動した。

### 染色体標本

モンキチョウ雄幼虫では 5 齢初期、雌幼虫では前蛹の体腔内からそれぞれ摘出した生殖巣より、TRAUT (1976) の方法を改変して減数分裂期の染色体をスライドグラス上に作製した。

### FISH (Fluorescence *in situ* hybridization)

BAC-FISH ならびに画像解析は、YOSHIDO *et al.* (2005) に従って行った。FISH には Nick translation Kit (Abbott) により蛍光色素ラベルされた BAC-DNA プローブを用いた。BAC-FISH され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デジタル保存し、Adobe photoshop CS6 にて画像解析を行った。

## 結果と考察

最終的にエレクトロポレーションは 66 回行い、合計 19, 123 個の BAC クロニーを得た。青白コロニー数の比較より、ligation 効率は約 70% と推定された。

分画 1 と 2 それぞれから、384 ウェルプレートで 23 プレート (8,832 クロニー)、17 プレート (6,528 クロニー) の 2 種類の BAC ライブラリーを作製した。パルスフィールドゲル電気泳動により、2 種類のモンキチョウ BAC ライブラリーの平均インサート長を推定した結果、分画 1 が 75.4Kb (n=16)、分画 2 が 90.3Kb (n=16) となった。モンキチョウのゲノムサイズをカイコ (約 400Mb (THE INTERNATIONAL SILKWORM GENOME CONSORTIUM 2008)) もしくはコベニモンドクチョウ (270Mb (DAVEY *et al.* 2016)) と仮定すると、それぞれ約 3.1x と 4.6x ゲノムをカバーする。どちらにしても、ライブラリーとして十分なゲノム情報を含むと言える。

さらに、作製したモンキチョウ BAC-DNA (01C01) を Orange-dUTP を用いてラベルし、染色体標本に FISH を行った。その結果、1 つの 2 課染色体ついにシングルシグナルが得られた (図 1)。こ

のことから、作製した BAC ライブラリーを用いた FISH マッピングが可能であると考えられる。

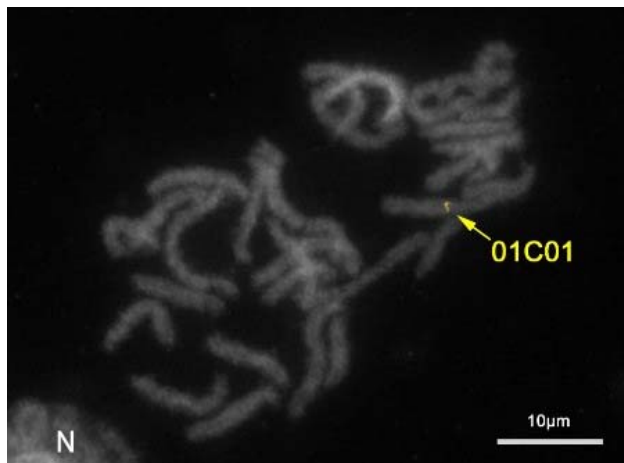


図 1. モンキチョウ BAC 01C01 を用いた FISH Orange-dUTP でラベルしたモンキチョウ BAC 01C01 を、パキテン期のモンキチョウ染色体標本に FISH した図。矢印はシグナルを示す。N は核を示す。

本研究では、モンキチョウ亜科で初となる BAC ライブラリーの作製に成功した。今後は、最近ゲノム情報が公開されたモンキチョウ亜科のワタリオオキチョウ (CONG *et al.* 2016)、カイコ、オオモンシロチョウの配列データを元にプライマーを設計し、ライブラリーのスクリーニングを行う予定である。本研究で得られたモンキチョウ BAC を用いた FISH マッピングにより、シロチョウ亜科およびカイコと染色体比較を行うことができる。本研究の結果が、シロチョウ科における染色体進化の謎の解明に繋がることに期待している。

## 文 献

- AHOLA V. *et al.* (2014): *Nature Comm.* **5**: 4737.  
BAXTER S. W. *et al.* (2011): *PLoS ONE*, **6**: e19315  
CONG Q. *et al.* (2016): *Genome Biol. Evol.* **8**: 915-31  
DAVEY J. W. *et al.* (2016): *G3*, **6**(3): 695–708  
THE INTERNATIONAL SILKWORM GENOME CONSORTIUM (2008): *Insect Biochem. Mol. Biol.* **38**: 1036-1045  
KIM T. *et al.* (2011): *Systematic Entomology*, **36**: 139-163  
PRINGLE E. G. *et al.* (2007): *Genetics*, **177**: 417-426  
ROBINSON R. (1971): Pergamon, Oxford, pp 557-598  
SAHARA K. *et al.* (2013): *Insect Biochem. Mol. Biol.* **43**: 644–653  
ŠIČHOVÁ J. *et al.* (2015): *BMC Evol. Biol.* **15**:89  
ŠIČHOVÁ J. *et al.* (2016): *Biol. J. Linn. Soc. London*, **118**: 457–471  
SUZUKI G. *et al.* (1997): *Gene*, **199**:133-137  
SUZUKI G. *et al.* (2012): *Plant Cell Rep.* **31**:621-628  
TRAUT W. (1976): *Chromosoma*, **58**: 275-284  
VAN'T HOF A. E. *et al.* (2008): *PLoS ONE*, **3**: e388  
VAN'T HOF A.E. *et al.* (2013): *Heredity*, **110**: 283–295  
YASUKOCHI Y. *et al.* (2009) *PLoS ONE*, **4**: e7465  
YASUKOCHI Y. *et al.* (2016): *Heredity*, **116**: 75-83  
YOSHIDO A. *et al.* (2005): *Genetics*, **170**: 675-685  
YOSHIDO A. *et al.* (2011): *Insect Biochem. Mol. Biol.* **41**:370-377

## 天蚕繭色の遺伝について

山田 恭裕<sup>1</sup>・浅野 眞一郎<sup>2</sup>・伴戸 久徳<sup>2</sup>・佐原 健<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup>北海道大学北方生物圏フィールド科学センター・

<sup>2</sup>北海道大学大学院農学研究院・<sup>3</sup>岩手大学農学部

カイコにおけるメンデル遺伝の再発見(Toyama 1906a)は、動物における遺伝学の黎明であり、カイコ一代雑種への利用(Toyama 1906b)は、ヘテロシス育種のさきがけである。後者は、家畜や家畜昆虫のカイコならびに他家受粉の植物でこそ容易に実験、応用が可能であったものの、野生動物や自家受粉植物では大変困難である。繭を利用できる野生絹糸昆虫においても同じことが言えるが、実験はある程度の施設が揃っている環境では不可能ではない。我々は、北海道大学農学部旧附属農場養蚕室(現北方生物圏フィールド科学センター生物生産研究農場)(以下北大農場)において、通称、天蚕と呼ばれるヤママユガ(*Antheraea yamamai*)に関する遺伝的な実験を試みた。本研究の大部分は、1990~2002年に行われた。既報告データに新たな知見をまとめて報告する。

### エメラルドグリーン繭の発見

北大農場では1980年代に天蚕飼育を始め、北方で利用可能な飼料樹による飼育成績や繭質についての報告を行ってきた(菊池ら1991;1993)。こうした研究用飼育の中から、黄色みの少ない繭を見だし、エメラルドグリーン(EG: 図1a)として、その数の変動に着目してきた。約10,000の繭の大量飼育では、1991年に約1%であった通常色(NG: 図1b)に混入する割合が翌年には2.7%、翌々年には4.4%

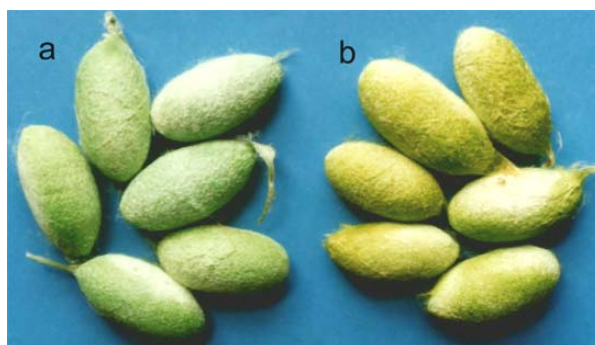


図1 北大農場で発見されたエメラルドグリーン繭(a)と、もとのノーマルグリーン繭(b)

と増加した(Nakada *et al.* 1994)。また、色差計による測定では明るさと赤-緑色度合いを示す  $L^*$  と  $a^*$  の値は同等であったのに対して、黄色-青色度合いを示す  $b^*$  の値は、異なっていた(Nakada *et al.* 1994)。また、それぞれの繭の吸光度を計測すると420nm付近をピークとする吸光度は、350nmから480nmにおいてEGで明らかに低い値を示した(斉藤ら1995)。これらのことから、EGの色はNGに比べて黄色みが少ない繭であると言える。

$b^*$ の値に基づいたクラスター解析において、NGは異なるクラスターを形成した(Nakada *et al.* 1994)。この結果と大量飼育のEG繭が増加した結果は、繭色が遺伝することを示唆するものであった。

### 天蚕の繭色に関する交配実験

遺伝性が確認できれば、同一形質や別形質をも

\*責任著者

〒020-8550 盛岡市上田 3-18-8

e-mail: [sahara@iwate-u.ac.jp](mailto:sahara@iwate-u.ac.jp)

つ個体を何世代か一蛾育したうえで、交配して遺伝子座の数や遺伝性を調査する。カイコであれば容易であるこうした実験も天蚕では事情が異なっている。そこで、まず EG と NG をそれぞれ 1 ペア交配してその一部を飼育することで、その後代の繭色を確認した。その結果、EG 系統では 99.4%、NG では 95.6% が親と同じ繭色を示した (NAKADA *et al.* 1994)。しかし、本格的な交配実験による繭色分離比調査には、できるだけ多くの 1 ペア由来幼虫を飼育 (一蛾育) したい。

これを実現するべく、コナラ 3 本をパイプで囲い、網掛けをする天蚕 1 蛾育用のパイプハウスを作製した (山田ら 2001)。このハウスでの飼育成績は、ハウスあたり 146 が最大収繭数であった。1 ペア交配には寒冷紗を用いた袋を軒先や樹木間に角材を渡しぶら下げて交配させた。袋内に円形に加工した針金をあわせて入れることで、空間を維持した。受精率は、平均 63.5% であった (山田ら 2001)。この他、1 ペア交配法として翅切除 (談ら 1988) や封筒の利用も考案されている (石井・二瓶 1994)。

この天蚕遺伝解析用飼育システムを用いて EG ならびに NG の一蛾育を継続するとともに 1994 年に EG と NG の一蛾育実験を行った。その結果、EG および NG の親から生まれた子の繭色一致率は 99.1% と 99.5% となった。1995 年にこれらの相互交配と同系交配を行ったところ、同系交配では親子の繭色が 100% 一致した。また、NG 雌と EG 雄の交配区では 96.8% が、その逆交雑では 90.1% が NG 繭となった。これらのことから、エメラルドグリーン繭は、劣性の単一座に支配される可能性が高いと考えられる。しかしながら、繭色に影響を与える別遺伝子座の影響もあると考えられる。

カイコの黄繭は、基本的にそれぞれ *carotenoid-binding protein (CBP)* と *Cameo2* と特定 (SAKUDOH *et al.* 2007; 2010) された、優性の黄血遺伝子座 (Y) と外層黄繭遺伝子座 (C) が必須である。また、未クロニングで劣性の非黄血抑制遺伝子座 (+) をバック

グラウンドとして外層の黄色い繭となる。カイコ黄繭を黄色味は、ルテンや B カロテンであり、桑に由来する。天蚕繭でも黄色味が飼料樹由来のカロチノイドであるとすれば、CBP と *Cameo2* の変異個体が EG 繭となるとの想定も可能である。さらには、天蚕にも黄血抑制遺伝子座 *I* や *C* 座の複対立遺伝子が存在すれば繭色決定はさらに複雑である。EG 繭に関する遺伝子座の特定は、カイコのように容易ではないが、もう少し繭色に関する交配実験は必要であろう。その上で、カイコオルソログを想定した分子遺伝学的手法により関連する遺伝子の実態が見えてくるかも知れない。

### 天蚕の雑種強勢に関する実験

カイコにおける雑種強勢の利用は我々の常識であるが、野蚕に应用できるかどうかについては不明である。EG と NG の交配実験と同時に我々は双方の繭重について選抜を行った。その後に EG 雌と NG 雄ならびにその逆交雑において繭重の増加が認められるかどうかを調査した。その結果、それぞれの一蛾育は、兄妹交配した EG ならびに NG の繭重よりも有意に大型であった。また、大量飼育区より選抜した各 100 個体の繭重も雑種第一代では、統計的に大型化することを認めた。この結果は、天蚕においてもカイコ同様のヘテロシスが認められることを示唆する。

### 天蚕の系統維持

天蚕の交配には旧来より竹籠が利用されており、現在でも天蚕飼育農家においては、同様の採卵が実施されている (北沢 1827)。EG と NG の交配実験には、寒冷紗による 1 ペア交配を行っているが、大量飼育区における個体数を賄うには、集中的な労働が大きな負担となっていた。そこで、北大農場では、天蚕の簡便な大量採取法の開発にも取り組んだ (斎藤ら 2001)。



縦 0.9m、横 2.6m、高さ 1.8m の寒冷紗による簡単なパイプハウスを設置し、その中に 9 月上旬に雌雄無選抜の 200~250 繭をプラスチック籠に入れ、収穫コンテナを裏返した上に放置する。斎藤ら(2001)の報告では、9 月下旬までに 95%が羽化し、産卵数は 20,000 以上であった。交尾率は 50%と推測され、受精卵率は 70~80%、孵化率は 70%程度と記述される。

### 終わりに

ここに報告した雑種強勢実験は、同一飼育個体群からの選抜であり、もともと遠縁間の交雑ではない。よって、今後、別地域の飼育個体群間の交雑を行うことでより良い一代雑種の利用が想定される。我々は、繭色をマーカーとして選抜を行ったが、繭色に関わらず飼育地が異なり遠縁と考えられる個体間の交配を試す価値は大いにある。

紹介した採卵方式については、北大農場で現在も利用されているが、寒冷紗の代わりに防風ネットを使用することも可能である。この採卵方式では過去に、孵化の非常に悪化する年があった。原因は、卵寄生蜂によるもので寒冷紗を二重にすることにより被害は検出レベル未満となった。北大農場は、札幌市街地に位置するため、キタキツネ

の出没が稀に認められる程度で、野生生物の被害はこれまでになかった。しかし、日本全国各地の天蚕飼育農家においては、地域や環境によって野生動物による被害も想定した採卵を考慮いただきたい。

### 文 献

- 談恩智ら(1988): 日蚕雑. **57**: 351-352  
北沢始芳(1828): 山繭養蚕秘傳抄, 金花堂. 48pp  
菊池邦夫ら(1991): 北大農場研究報. **24**: 1-6  
菊池邦夫ら(1993): 北大農場研究報. **28**: 9-18  
石井正市・二瓶由美子 (1994): 東北蚕糸研報. **19**: 21  
NAKADA T. *et al.* (1994): *Int. J. Silkmoth Silk*, **1**:167-169  
斎藤寛ら(1995): 北大農場研究報. **29**: 1-6  
斎藤寛ら(2001): 北大農場研究報. **32**: 71-74  
SAKUDOH T. *et al.* (2007): *PNAS*, **104**: 8941-8946  
SAKUDOH T. *et al.* (2010): *J. Biol. Chem.* **285**: 7739-7751  
TOYAMA K. (1906a): *Bull. Coll. Agric. Tokyo Imp. Univ.* **7**: 259-393  
TOYAMA K. (1906b): *Biol. Zbl.* **26**: 321-334  
山田恭裕ら(2001): 北大農場研究報. **32**: 75-79

## CryIIa トキシンのコナガに対する殺虫活性機構について

佐藤 文美・佐藤 昌直・伴戸 久徳・浅野 眞一郎\*  
北海道大学大学院農学院

*Bacillus thuringiensis kurstaki* HD-1 は、アブラナ科作物の害虫であるコナガ (*Plutella xylostella*) に対し、強い殺虫活性を示すため、防除資材として広く利用されてきたが、HD-1 抵抗性を獲得したコナガが世界中で報告されている。CryIIa が HD-1 抵抗性獲得コナガ幼虫に対して強い殺虫活性を有することが確認された (Cu *et al.* 2009) ことから、HD-1 抵抗性獲得コナガ幼虫に対し、防除資材として利用できる可能性がある。しかし、CryIIa の殺虫活性機構はまだ明らかになっていない。

Cry トキシンの殺虫活性機構解明のためには昆虫中腸内に存在する Cry トキシンと結合する受容体の同定が重要である。同じチョウ目昆虫に対し、Cry1Ab や Cry1Ac といった他の Cry1 トキシンが中腸上皮細胞膜上のカドヘリン様タンパク質 (以下 Cad) を受容体としているという報告から、CryIIa トキシンも Cad を受容体としている可能性が高いと考えた。コナガの Cad はアミノ酸反復配列から成るカドヘリンリピート構造 (以下 CR) を持ち、CR1~12 までのリピートを持つ。Cry トキシンや昆虫種によって結合する CR 領域が異なるという多数の報告があり、コナガと同じチョウ目昆虫タバコスズメガでは Cry1Ab が CR7,11,12 領域に結合 (GANG *et al.*, 2004)、ワタバギガでは Cry1Ac が CR10,11 領域に結合したという結果が報告がされている (FABRICK and TABASHNIK, 2007)。これらのことから CryIIa トキシンは CR の後半部に結合す

る可能性が高いと考えた。

### 材料と方法

コナガは北海道大学農学部附属農場にて採取し、研究室にて継代飼育したものを本研究に供試した。cryIIa 遺伝子のクローニングは本研究室に保存されている kurstaki HD1 株から PCR によって増幅したものをを用いた。クローニングを行い、発現プラスミド pGEX-4T-3 に組み込み GST 融合タンパク質として *E.coli* BL21 株で GST 融合タンパク質として発現させた。

コナガ幼虫に対する CryIIa の半数致死濃度 (LC50) を求めるために、殺虫活性試験を行った。キャベツの葉に CryIIa を異なる濃度で塗り分けコナガ終齢幼虫に与え、2 日後に死亡数を測定しプロビット法を用いて LC50 を算出した。

コナガ幼虫の中腸を摘出し調整したコナガ幼虫 Brush Border Membrane Vesicles (以下 BBMV) と CryIIa の結合調査を行うために、コナガ幼虫 BBMV と CryIIa を混合し SDS-PAGE に供試した。抗 GST 抗体を用いてコナガ幼虫 BBMV と CryIIa の結合を Western Blot によって確認した。

コナガ4 齢幼虫から total RNA の抽出及び逆転写反応を行い、コナガ中腸 cDNA ライブラリーを得た。コナガ Cad の塩基配列を元に全長を増幅するプライマーを設計し、クローニングを行った。

\*責任著者

〒060-8589 札幌市北区北9西9

e-mail: [sangaku@abs.agr.hokudai.ac.jp](mailto:sangaku@abs.agr.hokudai.ac.jp)

続いて、コナガ幼虫 BBMV と CryIIa、CR を用いた BBMV 結合競合実験を行うために、CryIIa と結合する可能性が高いと考えたコナガ Cad の CR6-8 領域、CR9-11 領域を発現プラスミド pET-21-d プラスミドに組み込み、His 融合タンパク質として *E.coli* BL21 株で発現させた。

## 結果と考察

GST 融合タンパク質として発現した CryIIa の濃度は CryIIa を SDS-PAGE に供試した際に、ImageJ を用いて分子量マーカーの各バンドの平均との比色によって測定した。得られた濃度を元にコナガ幼虫に CryIIa を与え、CryIIa の LC50 を算出した結果、LC50 は 19.00ng/cm<sup>2</sup> となった。CryIAc の LC50 は 10.47ng/cm<sup>2</sup> であったことと比較すると、CryIIa はコナガ幼虫に対して CryIAc と同様の高い殺虫活性を示すことが明らかとなった (表 1)。この結果から、CryIIa は CryIAc 抵抗性獲得コナガ幼虫だけでなく、抵抗性を獲得していないコナガ幼虫に対しても新たな防除資材として利用できると考えた。

表 1 CryIAc と CryIIa のコナガ幼虫に対する殺虫活性試験

	LC50[ng/cm <sup>2</sup> ]
<b>CryIAc</b>	10.47 (7.139-17.19) *
<b>CryIIa</b>	19.00 (10.00-32.00)

\*括弧内の数字は 95%信頼限界値を示す

コナガ幼虫 BBMV と CryIIa の結合調査を行うために、抗 GST 抗体を用いて BBMV と結合した CryIIa を Western Blot で検出した。その結果、CryIIa の大きさである 81 kDa と GST タンパク質の大きさである 26 kDa を合わせた 107 kDa 付近にシグナルを検出した。この結果から、CryIIa の受容体は中腸刷子縁膜上に存在することが明らかとなった。

今後は、コナガ BBMV と CryIIa、CR6-8 領域、CR9-11 領域を用いた BBMV 結合競合実験を行い、CryIIa トキシンが Cad のどの領域と結合するのかを明らかにするとともに、昆虫培養細胞で Cad 全長を発現させ、CryIIa トキシン受容体としての機能を調査したいと考えている。

## 文 献

- CU *et al.* (2009): Acta Hort Sin. **36**: 1161-1168  
 GANG *et al.* (2004) : J. Bio Chem. **27**: 28051-28056  
 FABRICK JA. and TABASHNIK BE. (2007): Insect Biochem Mol Biol. **37**: 97-106

## Cry44Aa トキシンの殺虫活性機構の解明

中尾 悠太・中神 あゆみ・佐藤 昌直・伴戸 久徳・浅野 眞一郎\*  
北海道大学大学院農学院

ネッタイシマカなどの熱帯性感染症の媒介昆虫の防除には *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) 剤が使用されている。*entomocidus* INA288 株 (LAY *et al.* 1994) が産生する Cry44Aa トキシンは、Bti 剤に含まれる Cry11Aa トキシンや Cry4Aa トキシンよりもネッタイシマカに対して強い殺虫活性を示すことから、Bti 剤に代わる、もしくは併用できる Bt 剤としての利用が期待できる。Cry44Aa トキシンを効率的にカ類の防除資材として利用するためには Cry44Aa トキシンの詳細な作用機構の解明が必要とされる。

Cry トキシンの作用機構としては、鱗翅目に殺虫活性をもつ Cry1A トキシンにおいて以下のようなモデルが提唱されている。菌内で生産される Cry タンパク質は昆虫中腸内のアルカリ性条件下で可溶化し、消化酵素によって分子内切断が起こり活性型トキシンとなる。その後、中腸上のレセプター分子と結合することで、オリゴマー化し、細胞膜に細孔を形成することで細胞を崩壊させる (ARONSON *et al.* 1999; BRAVO *et al.* 2004)。Cry タンパク質に抵抗性を持つ鱗翅目でのレセプター分子の発現量の低下がみられる (JURAT *et al.* 2011) ことなどから Cry トキシンの作用機構において、レセプター分子との結合は重要であり、レセプター分子の同定は作用機構の解明に必須な要素であると考えられる。

ネッタイシマカカドヘリン様タンパク質 (以下 AeCad) はカドヘリンリピート (以下 CR) と呼ばれるドメインを 11 持つ中腸上に発現す

るタンパク質である。AeCad は Cry11Aa トキシンと Cry4Aa トキシンのレセプター分子で、オリゴマー化に関与する (LEE *et al.* 2015)。また、トキシンとの結合部位は CR8~11 に存在する (CHEN J *et al.* 2009)。そこで本研究では AeCad をレセプター候補分子とし、ネッタイシマカ幼虫よりクローニングを行い、CR8~11 を GST 融合タンパク質として発現させ結合試験を行った。

### 材料と方法

本研究室保存のプラスミド DNA、pHY44A-44Aorf2 (ITO *et al.* 2002) を、結晶非産生 *kurstaki* HD-1 mutant (*BT51*) (YAMAMOTO *et al.* 1988) に形質転換して *cry* 遺伝子の発現を行った。

ネッタイシマカ 4 齢幼虫の中腸から RNA を抽出し、逆転写反応によりネッタイシマカ中腸 cDNA の合成を行った。得られた cDNA を鋳型とし、目的クローニング部位に特異的なプライマーを用いて PCR を行い目的の DNA 断片を得た。得られた AeCad の DNA 断片を GST 融合タンパク質発現プラスミドにライゲーションし、大腸菌を形質転換させた。

組換え大腸菌より発現させた GST 融合ネッタイシマカカドヘリン様タンパク質 (以下 GST-AeCad) をオーバーレイアッセイに供試した。GST-AeCad を 5  $\mu$ mol 含むようサンプルを調整し、SDS-PAGE 後、PVDF 膜に転写した。

\*責任著者

〒060-8589 札幌市北区北 9 西 9

e-mail: [sangaku@abs.agr.hokudai.ac.jp](mailto:sangaku@abs.agr.hokudai.ac.jp)

TBST 1 ml あたりビオチン化した Cry44Aa トキシン (以下 bio-Cry44Aa) が 1 µg 含まれるように調整した溶液に PVDF 膜を浸した。その後、Streptavidin horseradish peroxidase conjugate を用いてトキシンのビオチンシグナルを検出した。また、すでに Cry44Aa トキシンとの結合が確認されている GST 融合ネッタイシマカアルカリフォスファターゼ (以下 GST-AeALP) でも同様の実験を行った。

GST-AeCad をプルダウンアッセイに供試した。GST-AeCad の終濃度が 1 µM に、bio-Cry44Aa の終濃度が 0.5 µM になるように Micro Bio-Spin Column に加えた後、GST 担体である Glutathione Sepharose 4B を 40 µl 加え 1 時間 4°C でインキュベートした。その後、100 mM Glutathione を含む 50 mM Tris-HCl pH8.0 で溶出を行い、Streptavidin horseradish peroxidase conjugate を用いたウエスタンブロット解析に供試した。また、同様の結合試験を GST-AeALP と bio-Cry44Aa でも行った。

ネッタイシマカ BBMV と GST-AeCad を用いて結合競合試験を行った。bio-Cry44Aa を 10 倍量の GST-AeCad と 1 時間インキュベートし、さらにそこに 10 µg のネッタイシマカ BBMV を加え 1 時間インキュベートした。遠心分離により、BBMV に結合しなかった Cry トキシンを除き、ペレットを Streptavidin horseradish peroxidase conjugate を用いたウエスタンブロット解析に供試した。同様の結合試験を GST-AeCad とビオチン化した Cry11Aa トキシン (以下 bio-Cry11Aa) でも行った。

## 結果と考察

オーバーレイアッセイの結果、GST-AeALP だと推測されるバンドの位置に結合した bio-Cry44Aa のシグナルが検出されたのに対し、GST-AeCad のバンドの位置にはシグナルが検出されなかった。

プルダウンアッセイで、bio-Cry44Aa と GST-AeALP をインキュベートした結果、

GST-AeALP と結合した bio-Cry44Aa のシグナルが検出できた。一方、bio-Cry44Aa と GST-AeCad をインキュベートした場合、bio-Cry44Aa のシグナルは検出されなかった。

ネッタイシマカ BBMV を用いた結合競合試験を行った結果、bio-Cry11Aa のネッタイシマカ BBMV への結合は GST-AeCad をインキュベートすることで阻害された。一方で GST-AeCad による bio-Cry44Aa と BBMV の結合阻害はされなかった。GST-AeCad の結合阻害は GST-AeCad と bio-Cry11Aa が結合することにより、BBMV への結合阻害が生じているためだと考えられた。

以上のオーバーレイアッセイおよび、プルダウンアッセイ、結合競合試験の結果より、Cry44Aa トキシンは Cry11Aa トキシンと異なり AeCad の CR8~11 とは結合しないことが示唆され、Cry44Aa トキシンの作用機構において AeCad をレセプターとしない、および、Cry11Aa トキシンとは異なる CR8~11 以外の部位と結合することで作用する可能性が考えられる。今後は、これらの可能性を検証するために AeCad の全長を利用した結合試験や、もしくは、AeCad を発現させた昆虫細胞を用いた細胞毒性試験を行いレセプター分子としての機能を明らかにするつもりである。

## 文 献

- ARONSON A. *et al.* (1999): Appl. Environ. Microbiol. **65**: 2503-2507
- BRAVO A. *et al.* (2004): Biochem Biophys Acta. 1667, 38-46.
- CHEN J. *et al.* (2009): Biochemical Journal, **424**: 191-200
- JURAT F. *et al.* (2011): PLoSOne, 6(3): e17606.
- ITO T. *et al.* (2002): Appl. Environ. Microbiol. **72**: 5673-5676
- LAY B. *et al.* (1994): Abstract of the Pacific Rim BT Conference, 30p.
- LEE S. *et al.* (2015): Invertebrate Neuropeptides XV, Volume **68**: 140-147

YAMAMOTO T. *et al.* (1988): *Curr. Microbiol.* **17**:  
5-12

## Cry8Da トキシンの殺虫活性機構について

池田 優里恵・佐藤 昌直・伴戸 久徳・浅野 眞一郎\*  
北海道大学大学院農学院

マメコガネ (*Popillia japonica*) 成虫は、多くの農作物の葉や花、実を食害し、重大な被害を与える害虫であることから、防除が必要である。*Bacillus thuringiensis galleriae* SDS-502 株 (ASANO *et al.* 2003) が有する Cry8Da は、マメコガネに対して、幼虫だけでなく成虫にも殺虫活性を持ち、マメコガネ成虫の効果的な防除に役立つと考えられるが、殺虫活性機構は未だ解明されていない。Cry トキシンの作用機構として、以下のようなモデルが提唱されている (PARDO-LÓPEZ *et al.* 2012)。食化された Cry タンパク質は、昆虫腸管のアルカリ条件下で可溶化され、消化液中のプロテアーゼにより活性化され、Cry トキシンとなる。その後、中腸上皮細胞膜上の受容体と結合してオリゴマー化が起き、細胞膜へ細孔を形成し、腸管を損傷させることで昆虫を死に至らしめる。作用機構において、Cry トキシンと受容体の結合は重要であり、Cry8Da トキシンのマメコガネ成虫における受容体探索がなされた。マメコガネ成虫中腸から調製された BBMV (brush border membrane vesicles) における Cry8Da トキシン結合タンパク質を調査したところ、 $\beta$  グルコシダーゼであると同定された (YAMAGUCHI *et al.* 2013)。

本研究では、マメコガネ成虫由来  $\beta$  グルコシダーゼ (以下 APjbGlu) に着目し、受容体候補として、機能調査を行った。大腸菌で発現させた APjbGlut と、同じく大腸菌で発現させた Cry8Da を用いて、トキシンオーバーレイアッセイ、BBMV 結合競合試験により結合を調査した。また、受容体としての機能を解析するために、 $\beta$  グルコシダーゼ遺伝

子を RNAi によりノックダウンさせたマメコガネ成虫を作出した。

### 材料と方法

APjpGlut-His、GST-8Da-His の発現は、本研究室保存のプラスミド、pET-APjbGlut ならびに pGEX-8Da-His を用いた。それぞれで形質転換した大腸菌 BL21 株を LB-amp. に植菌し、37°C で振盪培養した。その後、IPTG を終濃度 0.5 mM になるように加え、23°C で 16 時間振盪培養することで発現を誘導した。発現の確認は Penta-His Antibody BSA-free Mouse monoclonal IgG と Anti-GST, Rabbit-Poly, HRP をそれぞれ用いて行った。

トキシンオーバーレイアッセイは以下のように行った。APjbGlut-His と GST (コントロール) を SDS-PAGE に供試し、分離したタンパク質をニトロセルロース膜へ電気的に転写した。TBST 1 ml あたりにトリプシン処理した Cry8Da トキシンが 1  $\mu$ g 含まれるように調製した溶液にニトロセルロース膜を浸した後、一次抗体として、本研究室に保存してある抗 8Da 血清を、二次抗体として Goat anti-Mouse IgG-HRP を用いて Cry8Da トキシンを検出した。

マメコガネ成虫 BBMV と APjbGlut-His、GST-8Da-His を用いて BBMV 結合競合試験を行った。北海道大学構内にて採取し飼育したマメコガネ成虫の中腸を摘出し、MET buffer 中でホモジェナイザーにより組織を破砕した後、等量の 24 mM

\*責任著者

〒060-8589 札幌市北区北 9 西 9

e-mail: [sangaku@abs.agr.hokudai.ac.jp](mailto:sangaku@abs.agr.hokudai.ac.jp)

MgCl<sub>2</sub> を加えて遠心分離をすることでマメコガネ成虫 BBMV を得た。0.5 μg の GST-8Da-His を 0.5 μg または 15 μg の APjbGlut-His と 4°C で 1 時間インキュベートした後に遠心分離し、上清をマメコガネ成虫 BBMV (20 μg タンパク質) に加えてさらに 4°C で 1 時間インキュベートした。遠心分離により BBMV に結合しなかった Cry トキシンを取り除いた。得られたペレットを SDS-PAGE に供試した後、ニトロセルロース膜に転写し、Anti-GST, Rabbit-Poly, HRP を用いて GST-8Da-His のシグナルを検出した。

マメコガネ成虫 β グルコシダーゼのノックダウンは以下のように行った。マメコガネ成虫 β グルコシダーゼの部分配列 (C<sup>357</sup>~A<sup>823</sup>) を pGEM-T Easy へサブクローニングした後、T7、SP6 ポリメラーゼを用いて ssRNA を合成し、アニーリングさせ dsRNA を作製した。作製した dsRNA を 80 ng/匹でインジェクションし、一週間後 qPCR を用いて β グルコシダーゼ遺伝子の転写量を調査した。リファレンスの遺伝子として APN を用いた。

## 結果と考察

トキシンオーバーレイアッセイにより、APjbGlut-His と Cry8Da トキシンの結合を調査した。その結果、APjbGlut-His のレーンで、結合したと考えられるシグナルが検出された。シグナルのサイズから、APjbGlut-His に結合した Cry8Da トキシンが抗体によって検出されたと考えられた。

マメコガネ成虫 BBMV を用いて結合競合試験を行うことで、APjbGlut-His と Cry8Da トキシンの結

合が、マメコガネ成虫 BBMV と Cry8Da トキシンの結合に与える影響を調査した。APjbGlut-His と GST-8Da-His をインキュベートした後に BBMV を加えると、GST-8Da-His と BBMV のみでインキュベートした場合に比べ、検出されたシグナルが弱かった。これは GST-8Da-His が APjbGlut-His と結合したことにより、マメコガネ成虫 BBMV との結合が阻害されたためであると考えられた。

β グルコシダーゼ部分配列から作製した dsRNA をインジェクションした個体での β グルコシダーゼ転写量は、していない個体に比べ、約 200 分の 1 に減少していた。

これらの結果から、Cry8Da トキシンと APjbGlut-His は結合をし、それにより Cry8Da トキシンとマメコガネ成虫 BBMV の結合が阻害されていると考えられ、β グルコシダーゼはマメコガネ成虫において Cry8Da トキシンの受容体である可能性が高まった。今後は、β グルコシダーゼが Cry8Da トキシンの受容体として機能していることをより明らかにするために、β グルコシダーゼノックダウン個体を用いて Cry8Da トキシンに対する殺虫活性試験を行い、殺虫活性機構の解明をしたいと考えている。

## 文 献

- ASANO *et al.* (2003): *Biological Control*, **28**: 191-196  
PARDO-LÓPEZ *et al.* (2012): *FEMS Microbiol Rev.* **37**: 3-22  
YAMAGUCHI *et al.* (2013): *J. Invertebr. Pathol.* **113**: 123-128



## バキュロウイルス耐性カイコ細胞の作出に向けて

服部 和澄・佐藤 昌直・浅野 眞一郎・伴戸 久徳\*  
北海道大学大学院農学院

バキュロウイルス科に属する *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) はカイコ核多角体病を引き起こす環状二本鎖 DNA ウイルスである。カイコ核多角体病は養蚕業において最も深刻な経済的被害を与える伝染病であり、現在のところ有効な防除法は消毒作業しか存在しない。消毒作業にはコストがかかるため BmNPV 耐性カイコの育種が求められるが、実用に耐える BmNPV 抵抗性カイコは作出されていないのが現状である。

これまで、トランスジェニック技術と RNA 干渉 (RNA interference: RNAi) を利用した BmNPV 耐性カイコの作出研究が国内外で行われ、一定レベルの BmNPV 耐性付与に成功している (ISOBE *et al.* 2004; KANGINAKUDRU *et al.* 2007; ZHANG *et al.* 2014)。近年、本研究室において BmNPV 耐性付与技術の改善を目的とした研究の過程で、BmNPV の増殖を顕著に抑制する組換えカイコ細胞 (BmN-B10) が作出された (大塚, 2012)。BmN-B10 細胞は、BmNPV の必須極初期遺伝子である *ie-1* の mRNA を標的とした dsRNA をカイコ U6 プロモーターと BmNPV のエンハンサーである *hr* 配列の制御下で発現する組換え細胞である。BmN-B10 細胞に BmNPV を低濃度で感染させた場合、ウイルス DNA の蓄積は非組換え細胞 (BmN 細胞) と比べて 1%以下にまで抑制され、多角体の形成も見られないが、G2/M 期での細胞周期の停止を伴う細胞

増殖停止が観察される (武内, 2015)。

これまでに、細胞周期の停止に働くバキュロウイルス遺伝子として、*ie-2* および *odv-ec27* が報告されている (BELYAVSKIY *et al.* 1998; PRIKHOD'KO and MILLER, 1998)。

本研究では、これらの遺伝子が感染 BmN-B10 細胞において発現し、細胞周期を停止させることで細胞増殖停止が生じている可能性について検討を行った。

### 材料と方法

#### 供試細胞

供試細胞として、当研究室で保存されているカイコ卵巣由来の BmN 細胞および、BmN 細胞をもとに作製された BmNPV 耐性組換え細胞である BmN-B10 細胞を用いた。これらの細胞は、10% FBS (Biosera) を含む TC-100 培地 (Applichem) を用いて、26°Cにて培養した。

#### 供試ウイルス

供試ウイルスとして、当研究室で保存されている BmNPV T3 株を用いた。

#### 各ウイルス遺伝子の転写量の比較

BmN 細胞および BmN-B10 細胞に多重感染度 0.1

\*責任著者

〒060-8589 札幌市北区北 9 西 9

e-mail: [hban@abs.agr.hokudai.ac.jp](mailto:hban@abs.agr.hokudai.ac.jp)

でウイルスを接種し、感染後 4 時間、8 時間、12 時間および 16 時間において細胞 RNA を抽出した。これらのサンプルから PrimeScript RT reagent Kit (TaKaRa) を用いて cDNA を作製した。この cDNA と SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa) および各遺伝子に特異的なプライマーを用いた定量 PCR にて、*ie-1*、*ie-2*、*odv-ec27* の転写量を経時的に解析した。なお、それぞれのプライマーは以下の通り。*ie-1F*:

CAGTAAAGTGAACCGAAGAGAGAGC *ie-1R*:  
TCGGACAACGGAACCAGACC  
*ie-2F*: TAACCGGGATTCCATCAA ACAGC  
*ie-2R*: CGGACCGTTCTCTTTCCAATCG  
*odv-ec27F*: GCGCAGCGATGATTACGAGTC  
*odv-ec27R*: GTTCGACGATCAGCAACAGAGTTAG

## 結果と考察

BmN-B10 細胞は *ie-1* に対する dsRNA を発現する組換え細胞である。*ie-1* は広範な BmNPV 遺伝子の発現調節に関わる転写活性化因子をコードしている。そこで、*ie-1* のノックダウンによって *ie-2* や *odv-ec27* の転写が抑制されているかどうかを定量 PCR にて調査した。その結果、ウイルス感染後 16 時間において BmN-B10 細胞における *ie-1* 転写産物量は、コントロールである BmN 細胞の 10% 程度に抑制されていた。また、*ie-1* と同じく極初期遺伝子の一つである *ie-2* も 10% 程度に抑制されていた。

一方、*odv-ec27* は後期遺伝子に属し、感染後 16 時間頃からその転写産物が顕著に増加することが知られているが (BRAUNAGEL *et al.* 1996)、感染後 16 時間での BmN-B10 細胞における *odv-ec27* の転写産物量は、BmN の 10% 程度に抑制されていた。また、感染後 24 時間においてもこれらの遺伝子からの転写産物量は、では、BmN-B10 細胞においては BmN 細胞の 20% 程度に抑制されていた。しかし、これらの結果は、BmNPV 感染時に BmN-B10

細胞ではウイルス増殖は効果的に抑えられるものの、*ie-2* および *odv-ec27* が発現していることを示している。これらのことから、BmN-B10 細胞の増殖が停止するのは、*ie-2* および *odv-ec27* の発現抑制が不十分であることが一因であると推測された。

*odv-ec27* にコードされる ODV-EC27 は ODV および BV に含まれる構造タンパク質であり、

宿主の Cyclin B と相同性を示し、Cdk-1 と結合することで、Cdk-1 とその本来のリガンドである Cyclin B との結合が阻害され、細胞周期を G2/M 期で停止させる。*ie-2* の遺伝子産物 (IE-2) による細胞周期停止の分子機構については RING フィンガードメインが必須であると報告されているが詳細は不明である (BELYAVSKIY *et al.* 1998; PRIKHOD'KO and MILLER, 1998)。バキュロウイルスは、宿主細胞周期を制御することでウイルスの増殖に有利な細胞内環境を作り出していると考えられており (BRAUNAGEL *et al.* 1998)、これらの遺伝子はウイルス増殖抑制のための重要な標的遺伝子と考えられる。今後、*ie-1* に加えて *ie-2* や *odv-ec27* を同時にノックダウンすることで、ウイルス感染による細胞増殖阻害が回復し、BmN-B10 細胞の BmNPV 耐性改善に繋がることが期待される。

## 文 献

- BELYAVSKIY M. *et al.* (1998): Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **95**: 11205–11210  
BRAUNAGEL SC. *et al.* (1996): Virology, **222**: 110-114  
BRAUNAGEL SC. *et al.* (1998): Virology, **244**, 195-211  
ISOBE R. *et al.* (2004): Arch. Virol. **149**: 1931-1940  
KANGINAKUDRU S. *et al.* (2007): Insect Mol. Biol. **16**: 635-644  
大塚大輔(2012): 北海道大学大学院農学研究科, 博士論文  
PRIKHOD'KO EA. and MILLER LK. (1998): J. Virol. **72**:

684-692

士論文

武内潤一(2015): 北海道大学大学院農学研究科, 修

ZHANG J. *et al.* (2014): *Antiviral Res.* **104**: 143-15

## 東北地域のシルク産業と食べるシルクの現在・過去・未来

荻間澤 真弓

(株) バイオコクーン研究所

### はじめに

養蚕は弥生時代中頃に北九州に伝来し、1～2世紀に本格的に始まった（佐原 2012）。図1は、奈良県桜井市の纏向遺跡から出土した天蚕糸によって作られた平織りの絹布の巾着であり、3世紀後半から4世紀初めのものと考えられている。このようにすでに、天蚕糸による応用開発が始まっていたことを物語る。



図1. 纏向遺跡 巾着状絹製品

（写真提供：奈良県桜井市教育委員会蔵資料）

養蚕業は奈良時代に近畿から関東、東北までのび、平安朝時代にはほとんど全国におよび、古代の養蚕・製糸の技術はわが国に適する技術として調和され安定化された。1930年（昭和5年）には産繭額が最高になり40万トンに達した。しかし、農業恐慌を転機として縮小に転じ、第二次世界大戦によって打撃を受け、終戦後の1947年（昭和22年）に産繭額は、大正以来最低の5万トン余となった（大日本蚕糸会 2010）。

その後現在に至るまで、繊維としてのシルク生産が衰退の一途をたどっているのは明らかである。本稿では東北の繭生産を概観しながら、シルク研究の解決すべき問題点と今後の1つの方向性を提案したい。



図2. 山形県鶴岡市松ヶ丘開墾場

（写真提供：山形県商工労働観光部産業政策課）

### 東北の繭生産の歴史

東北の繭生産の歴史として、まずは、山形県商工労働観光部産業政策課作成資料（山形県近代化産業遺産群HPから引用）を紹介する。1871年（明治5年）、明治維新直後の廃藩置県の折、庄内藩（山形県鶴岡市）は、旧庄内藩士3,000人により、庄内の再建を果たすために松ヶ丘に開墾を行った。松ヶ丘開墾場では、明治7年に311ヘクタールに及ぶ桑園を造成し、明治8～10年には大蚕室10棟が建設された（図2）。第蚕室は、大きな柱、大きな梁をもつ和風構造形式の建築で、桁行21間（37.8m）、梁間5間（9m）におよぶ。2階の腰窓には、和風建築独特の無双窓を、通風換気のために越屋根をとりつけ、通風のバランスを考えた構造である。屋根には、明治8年にとりこわされた鶴岡城の瓦が使われている。その後、鶴岡市に製糸工場と絹織物工場が創設され繭生産は盛んとなった。平成元年（1989年）に本陣、蚕室等の建造物を含む、23,950㎡が国の史跡に指定されている。

岩手大学の前身である盛岡高等農林学校では、

明治36年5月1日に入学式を挙し、同年10月に校友会発足式を開催した。会報には得業生（卒業生）の消息・寄稿・名簿・移動のほか、学術報告も掲載されている。学術研究には、明治43年にエリ蚕についての報告や、明治44年にはカイコ幼虫についての実験報告などが掲載されている（図3）。



図3. 盛岡高等農林学校校友会報第1号  
(岩手大学図書館所蔵)

盛岡高等農林学校の卒業生であり「雨ニモマケズ(1931年)」など、傑出した才能を発揮した宮澤賢治の最初の作品は、小学4年に書かれたものであろう。岩手県知事賞を受賞した「よーさん」は、岩手県第1回児童学芸学業成績調に収められている（図4）。当時、岩手県でも養蚕が盛んであり、日常生活に浸透していたことが伺え、わが

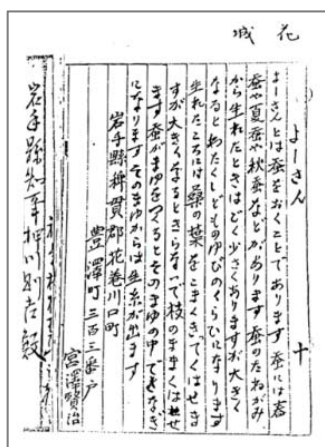


図4. 宮澤賢治の現存する最初の作品  
(郷原, 2007)

国における養蚕業の最盛期 1930年代には農家の40%で養蚕が行われており、生糸類がわが国の輸出総額の約50%を占めていた。

## 東北のシルク研究の最前線

今世紀における東北のシルク研究の最先端として、2001年4月、山形県鶴岡市にタウンキャンパスを設置した慶應義塾大学先端生命科学研究科から生まれた Spiber 株式会社が例として挙げられる。クモの糸の高機能構造タンパク質を人工的に合成し、タンク培養に成功した（図5）。鋼鉄の340



図5. タンク培養によりパウダー化し繊維化されたもの（鈴木幸一氏提供）

倍の強度とナイロンを上回る伸縮性をもつ次世代のバイオ素材としての研究開発が行われている。内容としてはバイオインフォマティクスを駆使した、アグリバイオテクノロジーや医療素材などの、アプリケーション開発まで多岐にわたっている。

## 食べるシルクの発見

今世紀に入ってもわが国における養蚕業は衰退の一途をたどっており、図6に示したように消滅の危機が迫っていることが伺える。大日本蚕糸会によると、平成19年には養蚕農家が1,169件で繭生産量が433tであったが、平成27年には、わずか368件の養蚕農家で135tの繭生産量に留まっている（（財）大日本蚕糸会蚕業技術研究所 2010）。総務省統計局によると、天蚕の繭生産状況は、平成20年度では、全国で521.4kgまで落ち込んでおり、野蚕産業としての生業は成り立たない状況である。

国内シルクの生産と需要の減少に歯止めをかけるために、1991年、中国江蘇省蘇州で開催された

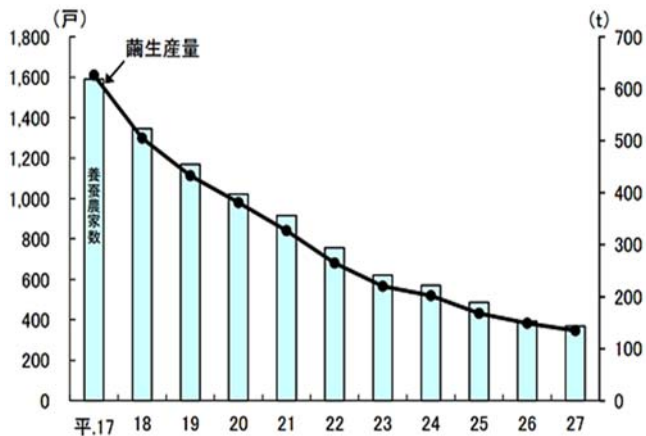


図 6. 養蚕農家数及び繭生産量の推移 (全国)  
(一般財団法人 大日本蚕糸会調査)

第 1 回国際絹学会で、故平林 潔博士が世界で初めてシルクのパウダー化に成功した「食べるシルク」を発表した。平林博士は絹糸腺内液状絹の研究を進めていたが、絹糸を中性塩に溶かし、透析後のフィブリン溶液を放置していたところゲル化した。そこで、絹を食べたら絹が大量に消費できるのではないかと発想し、試食してみたが無色、無味、無臭であった。これに味付けをした結果、市販の類似品に比べ遜色のないゼリーと判断して絹の食品化に取り掛かった (平林 1992)。

絹が消化・吸収されるかどうか動物実験での消化率の調査から、フィブリン溶液は 50%ほどが消化されることが明らかとなった。サモアーゼ分解酵素をフィブリンに添加した場合には、80%以上が消化された。血液中におけるアミノ酸量を測定した結果、ほぼ絹フィブリンのアミノ酸組成と一致していることから、フィブリンはラットにより消化・吸収されることを確認した (平林 1989)。一方、フィブリンをラットに投与し、アルコール代謝実験を行なったところ、エタノール大量投与に対し血中アルコール濃度の減少に有効に作用することや、血中コレステロールの濃度がかなり抑制された (平林ら 1991)。

これらの研究成果が、国内の蚕糸科学・食品分野に影響を与えた。しかし、主要研究論文が邦文であったことから、わが国発の食べるシルク研究

のオリジナリティが、海外において正しく評価されていないのは残念なことである。

### 国内の食べるシルク研究

我々は、D-ガラクトース注射で誘導した老化促進マウスに、1%と 2%のカイコフィブリンペプチド混合液水を 7 週間自由摂取させ、アンチエイジング評価法の 1 つとして毛の摩擦係数を測定した。その結果、摩擦係数は老化促進マウスでは高かったが、フィブリンペプチド混合液を摂取した老化促進マウスではコントロールレベルまで低下し、マウス体毛のアンチエイジング機能を明らかにした (Yamamoto *et al.* 2011)。また、Okazaki *et al.* (2010) は高脂肪食を与えたラットの脂質および炭水化物代謝に対するセリシン摂取の効果を調べた。ラットには 20%牛脂飼料の対照群、20%牛脂飼料に 4%のセリシン (w/w) 添加の 2 つのグループに 5 週間投与した。その結果、トリグリセリド、コレステロール、リン脂質および遊離脂肪酸の血清濃度が有意に減少し、血清中の VLDL (超低密度リポタンパク質)、トリグリセリド、VLDL-コレステロール、LDL (低密度リポタンパク質) - コレステロール、LDL-リン脂質も有意に低下した。また、腹腔内グルコース注射後の血漿グルコースおよびインスリンの濃度上昇を抑制したことから、高脂肪食へのセリシン添加は、ラットの脂質および炭水化物代謝を改善する可能性を示唆している。さらに、わが国における稀なケースとして、田中ら (2012) のグループのヒト試験では、シルクカプセルを経口摂取することによって薄毛に対する影響を検討した。その結果、16 週間にわたり 1 日 1,800 mg を摂取させたところ、単位面積当たりの頭髮量は、摂取 16 週間後に上昇する傾向が認められ、毛穴に対する毛髪の本数が上昇した。このヒト試験は、マウスへのシルク経口摂取の結果 (Yamamoto *et al.* 2011) と同じように、シルクによる毛のアンチエイジング効果を示している。

## 海外の食べるシルク研究

インドでは、D-ガラクトースで記憶障害を誘発したアルツハイマー病 (AD) ラットに、カイコセリシンを 60 日間 (0.2 g/kg) 経口投与する研究が行われた。その結果、アセチルコリンエステラーゼレベルが抑制され、また脳の組織化学的知見では、セリシンが大脳皮質および海馬領域のニューロンにおける AD 誘発損傷を改善した (Yellamma 2014)。

中国のグループは、ストレプトゾトシンの連続腹腔内注射により II 型糖尿病誘導のラットに、カイコセリシン (2.4 g/kg) を 35 日間、胃内灌流させると、血糖値は有意に低下し、セリシンが坐骨神経および関連神経細胞の細胞傷害に対し保護すると報告している (Song *et al.*, 2013)。

韓国のグループ (Um *et al.* 2011) は、高脂肪食マウスにサクサンフィブロインを摂取させ、脂質代謝および抗酸化に及ぼす影響を調べた。マウスに、正常対照食 (NC 群)、高脂肪食 (HF 群)、またはサクサンフィブロイン 1% (w/w) 粉末を添加した高脂肪食 (HFS 群) を 7 週間与えた。実験後、HF 群では、体重、血漿、肝臓総コレステロール値および肝臓トリグリセリドが有意に増加し、NC 群と比較し、肝臓の抗酸化酵素活性は低下した。一方 HFS 群は、体重、血漿、コレステロール、中性脂肪の著しい減少を示し、過酸化脂質に対する保護効果を示した。これらの結果により、サクサンフィブロインが脂質代謝および抗酸化防御システムを改善することが明らかとなった。したがって、サクサンフィブロインは、高脂血症およびその関連疾患に対する治療薬開発のため機能性材料として期待できる。なおこの論文以外に、野蚕の食べるシルクの研究はほとんどなされておらず今後の研究が期待される。

## 食べるシルクの将来展望

厚生労働省によると、2015 年度の医療費 (概算) の総額は前年度比約 1.5 兆円増 (3.8%増) の 41.5 兆円まで膨れ上がった。総額が 40 兆円を突破したのは 2014 年からで、高齢化の進展や高額薬剤の使用頻度が増えたことを受け、現在の調査方法となった 2001 年度以降 13 年連続で過去最高を更新した。このままでは、国民医療費は毎年増加の一途をたどることが懸念される。

前述の食べるシルクについては、*in vivo* 試験でカイコセリシンとフィブロインの機能性研究が国内外で行なわれており、ヒト試験に移行しつつある。このように非繊維型の養蚕は韓国ではすでに行われているが、2008 年前後から韓国以外でも非繊維型養蚕の流れがスタートしており、蚕糸科学の根源的な目的である繊維型養蚕とは別に、非繊維型養蚕の学術と産業の流れが世界的なレベルで起きている (鈴木 2016)。

我々は、食べるシルクとしての非繊維型シルクの利用から① 医療費の削減、② 機能性表示食品・医薬品候補物質の開発による経済効果、③ 蚕糸科学技術の継承および TPP 対応農業に向けての新養蚕農家のネットワーク構築を目指したい。とりわけ、わが国における養蚕を文化として終わらせるのではなく、喫緊の課題である高齢化社会における医療分野で甦らせる養蚕イノベーションに取り組んでいる。

なお、本稿を丁寧に校閲いただいた (株) バイオコクーン研究所の鈴木 幸一所長に御礼申し上げます。

## 文 献

- 郷原宏(2007) 宝島社. 東京. pp.14-22
- 平林潔(1989) バイオインダストリー, **6**: 749-754
- 平林潔(1992) 化学, **47**: 25-28
- 平林潔ら(1991) 技術材料, **9**: 221-225
- Okazaki Y. *et al.* (2010) Biosci. Biotechnol.

Biochem. **74**: 1534-1538

佐原健(2012) 海游舎, 東京. (齋藤 裕・佐原 健共編) pp. 166-180

Song C. et al. (2013) Neural. Regen. Res. **8**: 506-513

鈴木幸一(2016) 蚕糸・昆虫バイオテック, **85**: 59-61

田中光頭ら(2012) 新薬と臨床. **61**: 159-166

Um IC. *et al.* (2011) Int. J. Indust. Entomol. **22**: 95-100

Yamamoto K. *et al.* (2011) Int. J. Indust. Entomol. **23**: 201-206

Yellamma K. (2014) J. Alzheimers Dis. Parkinsonism, **4**: 1-13

(財) 大日本蚕糸会蚕業技術研究所(2010) 養蚕. **3**: 9-14



## 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、 $\mu$ m、nm、ha、a、(アール)、m<sup>2</sup>、ml、 $\mu$ l、kg、g、mg、 $\mu$ g、sec、min、hr、rpm、%、ppm、M(モル濃度)、N(規定度)、 $^{\circ}$ C、kcal、pH、RH(相対湿度)、<sup>32</sup>P(放射性リン <sup>32</sup>P)などとし、単位は原則として c.g.s 単位系を用いる。
5. 図・表中の文字、記号とともにそのまま印刷となるよう明確に描く。刷り上がりサイズは横 8cm 以内もしくは 17.5 以内 cm、縦 24cm 以内となることを考慮して図中の文字、数字、記号などの大きさに注意する。
10. 図や表の挿入箇所を指定する場合は原稿の本文の右横などに朱書きする。
11. 文献の引用は本文中では著者名(年号)あるいは(著者名、年号)とする。共著者については2人まで両名を並記し、3人以上のときは最初の著者に「ら」を付記してほかを省略する。文献は次のようにまとめて論文の末尾に著者名のアルファベット順に配列する。

### [学術雑誌より引用する場合]

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

例: 四方正義・村田武(1969): 日蚕雑. **38**: 1-10.

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

### [単行本を引用する場合]

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

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

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

[共著の単行本の一部を引用する場合]

著者名、発行年、本の名前、編者名、引用ページ、発行所、同所在地。

例: 上田光雄(1952): 家蚕遺伝学(田中義麿編), pp 373-417, 裳華房, 東京.

BENZ G (1963): *In* "Insect Pathology, An Adv. Treat" (Steinhaus EA ed), vol 1, pp 229-338, Academic Press, New York.

なお、学術雑誌の略名は、最近の本誌、蚕糸学文献目録、Biological Abstracts および Chemical Abstracts による。

12. 編集様式を整えるため、編集幹事は著者に原稿中の内容、字句等について訂正を求めることがある。

13. 校正は原則として初校のみ著者校正とし、誤植の訂正にとどめ変更は認めない。

14. 本報告への投稿原稿は付記の送状を添付し、編集担当宛([sangaku@abs.agr.hokudai.ac.jp](mailto: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 29 年 1 月 1 日～平成 30 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)

印刷 平成 28 年 12 月 10 日

発行 平成 28 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

