

東北蚕糸・昆虫利用研究報告

第 42 号

平成 29 年 12 月

日本蚕糸学会東北支部

No.42 目 次

山口 真	
佐藤 昌直	マメコガネ幼虫における Cry8Da トキシンの殺虫活性機構について 1
伴戸 久徳	
浅野 眞一郎	
齋藤 諒	
武田 ひとみ	バキュロウイルスの複数の非必須
佐藤 昌直	遺伝子がウイルス増殖に与える影響について 4
浅野 眞一郎	
伴戸 久徳	
工藤 滉己	
佐藤 昌直	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus immediate-early
浅野 眞一郎	遺伝子 ORF 上流 500 塩基による発現制御についての解析 8
伴戸 久徳	
原田 直人	
佐藤 昌直	BmNPV ゲノムの <i>in vitro</i> アセンブリ 12
伴戸 久徳	
浅野 眞一郎	
江見 夏恵	未来を拓く新たな繭工芸への挑戦 17

マメコガネ幼虫における Cry8Da トキシンの殺虫活性機構について

山口 真・佐藤 昌直・伴戸 久徳・浅野 眞一郎*

北海道大学大学院農学院

鞘翅目昆虫であるマメコガネ (*Popillia japonica*) は、300 種以上の植物を食害する害虫とされており、当研究室にてマメコガネに殺虫活性を示す *B. thuringiensis* のスクリーニングが行われた (ASANO *et al.* 2003)。その結果、*B. thuringiensis galleriae* SDS502 株から分離された Cry8Da トキシンのマメコガネの幼虫と成虫に対して殺虫活性を示すことが確認された (YAMAGUCHI *et al.* 2008)。Cry トキシンは、標的昆虫の中腸上皮膜上に存在するレセプタータンパク質に結合し、上皮細胞を崩壊させ死を引き起こす。レセプターが非標的生物において存在しないことや、Cry トキシンは酸性条件である哺乳類の消化管内では分解されてしまうことから、人畜に無害である。Cry トキシンは、害虫防除資材として利用されているが、長期的な継続使用には問題点がある。過去に、ポプラハムシ (*Chrysomela tremulae*) の駆除に Cry3Aa トキシンを使用し続けた結果、Cry3Aa トキシンに抵抗性を持つ個体の出現が確認された (MUNSTER *et al.* 2011)。このことは、Cry8Da トキシンを使用し続けた場合でも、Cry8Da トキシンに抵抗性を持つマメコガネが出現する可能性を示唆している。そこで Cry8Da トキシンに抵抗性を持つ個体の出現の遅延や、さらに強い殺虫活性を示す殺虫剤の創出という点から、昆虫体内における Cry8Da トキシンの殺虫活性機構を明らかにする必要がある。

本研究では Cry8Da トキシンの殺虫活性機構を

調査するにあたり、マメコガネ幼虫由来 aminopeptidase N (APN) をレセプター候補と考えた。マメコガネ成虫から *Apn* 遺伝子をクローニングしたものを *Pjapn* 遺伝子とした。マメコガネ幼虫個体の APN をノックダウンするための dsRNA を作製し、マメコガネ幼虫に注射し、qPCR にて *Pjapn* 遺伝子がノックダウンされるかを調査した。

材料と方法

マメコガネ幼虫は、2017 年 7 月に札幌市モエレ沼公園にて成虫を採取し、研究室にて飼育、産卵、孵化させた幼虫を本研究に供試した。*Pjapn* 遺伝子のアミノ酸列に対し、APN に共通する構造の有無の確認は、以下のサイトを用いて行われた。シグナルペプチドは、PROSITE WWW service (<http://ipsort.hgc.jp/>)、GPI アンカーサイトは、big-PI predictor (http://mendel.imp.ac.at/gpi/gpi_server.html)、N 型糖鎖結合部位は、NetNGlyc 1.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)、O 型糖鎖結合部位は、NetOGlyc 3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc-3.1/>) を用いてそれぞれ予測された (図 1)。

ssRNA の作製は、以下のように行った。*Pjapn* 遺伝子から部分アミノ酸配列 E⁶²⁴~N⁷⁸³ をコードする領域を増幅し、ABI3130 sequence analyzer (Applied Biosystems) で配列を確認後、pGEM-T Easy ヘサブ

*責任著者

〒060-8589 札幌市北区北 9 西 9

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

クローニングした。その後、SP6 プロモータープライマーおよび T7 プロモータープライマーを用い DNA 断片を増幅した。得られた DNA 断片をテンプレートとし、T7 RNA polymerase、SP6 RNA polymerase (Takara) を用いて ssRNA を作製し、0.8% GTG ゲル電気泳動で確認した。各 ssRNA 30 µg を annealing buffer (4 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, pH 7.3) 中で反応させ、dsRNA を作製し、1% アガロースゲル電気泳動で確認した。Phosphate buffered saline (PBS) (140 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄) 10 µl に Lipofection Reagent (Invitrogen) 1.5 µl を混合した溶液と、同じく PBS 10µl に ssRNA または dsRNA 8 µg を混合した溶液をそれぞれ 25°C で 30 分間静置した。その後、2 つの溶液を各 10 µl ずつ混合し、25°C で 15 分間静置したものをそれぞれ ssRNA および dsRNA 注射溶液とした。注射はマイジェクター-29G (Terumo) を用い、2 齢幼虫に 2 µg の ssRNA または dsRNA を注射した。dsRNA を注射した幼虫を RNAi 処理個体、ssRNA を注射した幼虫をコントロール個体とし、注射してから 4 日後、生き残った RNAi 処理個体およびコントロール個体中腸から抽出した mRNA より cDNA を合成した。得られた cDNA をテンプレートとして qPCR を行い、ノックダウンの確認をした。希釈した cDNA 溶液を 4.2 µl、*Pjapn* 遺伝子の部分アミノ酸配列 V⁷⁰⁴~Y⁷⁴³ をコードする領域を標的としたプライマーを 0.8 µl、SYBR (Toyobo) を 5 µl 混合し、LightCycler® Nano (Roche) を用いて qPCR 反応を行った。

結果と考察

解析の結果からシグナルペプチド、GPI アンカーサイト、グルジンシンモチーフ、N 型糖鎖結合部位が存在し、O 型糖鎖結合部位は存在しなかった (図 1)。昆虫の APN はアミノ酸配列の違いから 9 つのグループに分けられており、O 型糖鎖結合

```

MILKCVFLIFTSFSGIAFGFPPSIPNPRIL EPRNDDLNYRLP D TVPISYD
VTIEPTFEFPDFTFAGQVVTILIRVVEATD VVTLHGNDIEIVPGTTSVISLT
AREELVEEPEL S TLHFIRIPLN TEVAVGTVLQISMQYTGVLNNEEN TG
FYKAQYEEEDGETKWFGTTQMEATYARQAFFCYDEPALKARFTIHLVR
TAEYNSISNMPLQSTQALENGKLMDDTTEETVEMSTYLVAFFVSEM TYI
EEGNQAVYAEPALIADRRGEYGLQKGIIEIVME FTDIKYSLEKLDQI
SIPDDWFTFGAMENWGLV TYRDRYLLFKDGLSMASEKQNVASIIA TEL
G QWFGNLVSPLWWTYIWLNEG FAYTFEYYATSVVEPTMRMMEQYV
VLSHQNAMEESDLSRSTRPMTTHYAQTPEEIIINLFDRIAYDKSGSVIRMM
EHFLTTEIFKRGLNIYLNKAYQAAEPNDLWEGQLAGINEINSNIPEP
LADIMETWSSQAGYPPVTVERNGEDITLTQSRFLLLETTHDLDTKWT
IPINYATASNPDFSSTLTTYWLKARDANTGITV ESDWIILNKQETGY
YRNVYDEDNWRLLIN ELN SDD FEKIHVLN RAQLIDD ALNLARSGRLSY
DIALN LLEYISRETDYIPLRSFPRGLTFLNKHLLNTDKYELFQRFVRDIL
QKAYESLGTQDTG DHTVKLN RINVL TWLCRYDHEACVAATH
TQLSAGVPANPDLQSIVYCSGLIEN TN IEAKWTSLYNRYNGNDVEY
LERNRIVAALGCVRSETQLNRLLDMVIDKAEGYTLEN AHKTAALSGIY
TSPKVGLETTLTYYID FSEMASVLNGGQIPAILSGISDRLLTTTEQKNQ
LEQFRSSLSEEQASYNAAFDAISNIESNIAWADEYVDDVTEWLDSSY
N GIVFAISAPLLIVAFITHLLV

```

図 1 *Pjapn* 遺伝子のアミノ酸配列

黄色はシグナルペプチド、青色は N 型糖鎖結合部位、紫色はグルジンシンモチーフ、緑色は亜鉛結合モチーフ、赤色は GPI アンカーサイト、水色は ssRNA の塩基配列、太字は qPCR にてターゲットとした塩基配列を示す。

部位がない APN は Group2 に属する (CRAVA *et al.* 2010)。そのため、本研究で用いた *Pjapn* 遺伝子および ssRNA は、Group2 の APN であると判断して実験を進めた。作製した ssRNA を 0.8% GTG ゲル電気泳動に供試したところ、1 本のバンドが予想されるサイズ (0.6kb) と一致する大きさの位置に確認できた (図 2)。

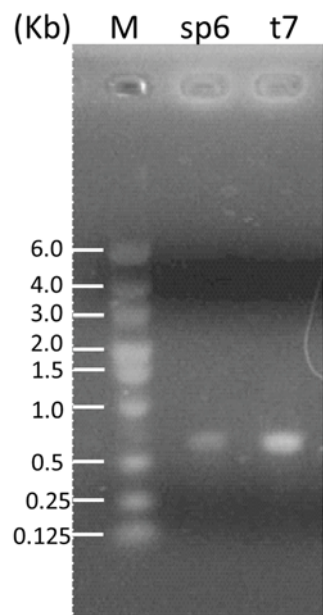


図 2 0.8%GTG ゲルによる ssRNA 合成の確認

M : RNA ladder (0.125-6.0 kb) (ニッポンジーン)

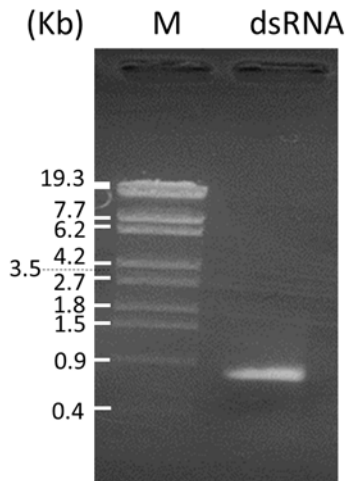


図3 1.0% Agarose ゲルによる dsRNA 合成の確認
M: λ -EcoT14I マーカー

作製した dsRNA を 1%アガロースゲル電気泳動に供試したところ、1 本のバンドが予想されるサイズ (0.6kbp) と一致する大きさの位置に確認できた (図 3)。dsRNA を注射し生き残った個体を用い *Pjapn* 遺伝子がノックダウンされたかを qPCR にて確認したが、RNAi 処理個体とコントロール個体で、*Pjapn* 遺伝子の発現量に明確な差は認められなかった。消化酵素である APN は、生存において必要不可欠な酵素である。dsRNA 注射個体にて *Pjapn* 遺伝子がノックダウンされることによって、

酵素活性の低下をまねき、死に至る可能性がある。本研究では生き残った個体のみでノックダウンの確認を行ったことにより、ノックダウンされずに生き残った個体の発現量比較となり、コントロール個体との差が見られなかった可能性が考えられる。このことから本実験で用いた RNAi 実験では、PjAPN がトキシンレセプターとして機能していることを調査する事は、困難であると考えられた。

今後は、バキュロウイルス発現系を用いて PjAPN を発現させた Sf9 細胞に Cry8Da トキシンがどのような損傷を与えるかを調査するなど、他の実験系を利用しながら、マメコガネ幼虫の APN がレセプターとしての機能を有するかをさらに詳細に解析する必要があると考えられた。

文 献

- ASANO, S. *et al.* (2003): *Biological Control*, **28**: 191-196.
 CRAVA, M. C. *et al.* (2010): *Insect Biolchem. Mol. Biol.*, **40**: 506-515.
 MUNSTER, M. *et al.* (2011): *J. Mol. Biol.*, **20**: 267-278.
 YAMAGUCHI, T. *et al.* (2008): *J. Invertebr. Pathol.*, **113**: 123-128.

バキュロウイルスの複数の非必須遺伝子が ウイルス増殖に与える影響について

齋藤 諒・武田 ひとみ・佐藤 昌直・浅野 眞一郎・伴戸 久徳*
北海道大学大学院農学院

ある生物の遺伝子レパートリーのうち、その生物が生活環を完結するのに必要な遺伝子は、必須遺伝子と呼ばれ、従来の分子生物学では、優先的に研究される傾向があった。必須遺伝子の同定は、解析対象遺伝子をノックアウトもしくは阻害した際の表現型をもとになされている。他方、ある遺伝子を機能阻害しても生活環を全うできる場合は、その遺伝子を非必須遺伝子と定義するが、酵母を用いた網羅的な 2 重変異体解析により、1 遺伝子破壊で表現型が現れない遺伝子群でも 2 重変異体を作製すると表現型が現れる場合が示された。このような場合、それらの遺伝子の間には「遺伝学的相互作用」があると定義される。1 遺伝子破壊株での解析では「一見」必要ではない遺伝子は、非必須遺伝子と定義されるが、生命機能のロバストネスに貢献している可能性がある。多重変異体を用いて遺伝学的相互作用を明らかにすることは、それら遺伝子の役割を明らかにするだけでなく、個々の遺伝子についての解析から脱却し、生命システムを理解するという大きな意義を持っている。

バキュロウイルス科に属する核多角体病ウイルス(nuclear polyhedrosis virus: NPV)は、約 80~130kbp の 2 本鎖環状 DNA、100 個以上の ORF を持つウイルスであり、ウイルスの中でも大きな遺伝子レパートリーを持つウイルスである。カイコに感染するカイコ核多角体病ウイルス *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV)は、141 遺伝子を持

ち、そのうち、86 遺伝子が BmN 細胞での増殖には非必須であることが明らかになっている(ONO *et al.* 2012)。最近、これら非必須遺伝子の生物学的意義を検討するために、非必須遺伝子が隣接して存在する遺伝子領域(非必須遺伝子クラスター)を標的に、複数の非必須遺伝子をノックアウトしたウイルスの解析が進み、BmNPV においても単遺伝子ノックアウトでは表現型に変化が見られない遺伝子群が、他遺伝子との相互作用によってウイルス増殖に貢献していることが明らかとなった(TAKA *et al.* 2013)。

本研究では、BmNPV の 7 つの非必須遺伝子からなる非必須遺伝子クラスター-bm32-38 に焦点をあて、これら 7 つの遺伝子間の遺伝学的相互作用について検討したので報告する。

材料と方法

1. 細胞及びウイルス

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 BmN 細胞を用いた。BmN 細胞は、TC-100 培地(PanReac appliChem)にウシ胎児血清(BIOSERA)を 10%加えた血清培地を利用して 26°C で培養した。

供試ウイルスは、BmGFP (ONO *et al.* 2007)と、 λ red recombination システムを用いて複数の遺伝子をノックアウトしたバクミド由来のウイルスを使

*責任著者

〒060-8589 札幌市北区北 9 西 9

e-mail: hban@abs.agr.hokudai.ac.jp

表1 ノックアウトバクミド作製のためのPCRに使用したプライマー配列

32-38_up	5'-ACACGTAGAATTCAACAGACGACTAGAGTACGTAGGCACAATCGCCACAAgtgtaggctggagctgcttc-3'
32-38_down	5'-ATATATATGTATGCAACAACCTTTTAAATATTCACATTAATAAGTGCCAGGcatatgaat at octocttag-3'
36_up	5'-CATGTTGCCCTACGAAATGGTGATTTCCGTGTGGTTTACTTGTCCCGGgtgtaggctggagctgcttc-3'
36_down	5'-GTTCGTATGTTGCTTATATTGATACAAAGTTTTCTTAATTGTAAACACACcatatgaat at octocttag-3'
37_up	5'-TTATTGTCGTAGTTGTAATATTTTTAAATATGTTTTGGTGCCTATTAATgtgtaggctggagctgcttc-3'
37_down	5'-CTTTTGTGTTAACAAATCAGTCTTTTGAATATTACATTCTCCCTAAATGTAcatatgaat at octocttag-3'
38_up	5'-ATATATATGTATGCAACAACCTTTTAAATATTACATTAATAAGTGCCAGGgtgtaggctggagctgcttc-3'
38_down	5'-AGACTGATATTGTTGTTGTTGTTACAAAATAGAAAATAAAAAATATAcatatgaat at octocttag-3'

用した。

2. 複数遺伝子ノックアウトバクミドの作製

本実験に用いたノックアウトバクミドは、bm32からbm38までの7遺伝子をノックアウトしたもの(bm32-38)と、bm36、bm37、bm38のうち1遺伝子ずつノックアウトしたもの、2遺伝子をノックアウトしたもの(bm36&37、bm37&38、bm36&38)、3遺伝子をノックアウトしたもの(bm36-38)である(図1)。ノックアウトはλ red recombination システムを用いた相同組換え(Ono et al. 2012)により、

標的遺伝子をクロラムフェニコール耐性遺伝子で置換することで行った。複数遺伝子ノックアウトウイルスの作製に使用したプライマーは、表1に示した。

3. バクミドのトランスフェクションと増殖特性の解析

トランスフェクションはリポフェクション法によって行った。まず、12-well-plate (Iwaki)に、1 wellあたり 4×10^5 個培養した BmN 細胞を無血清 TC-100 培地で 2 度洗浄した後、500 μ l の無血清培地

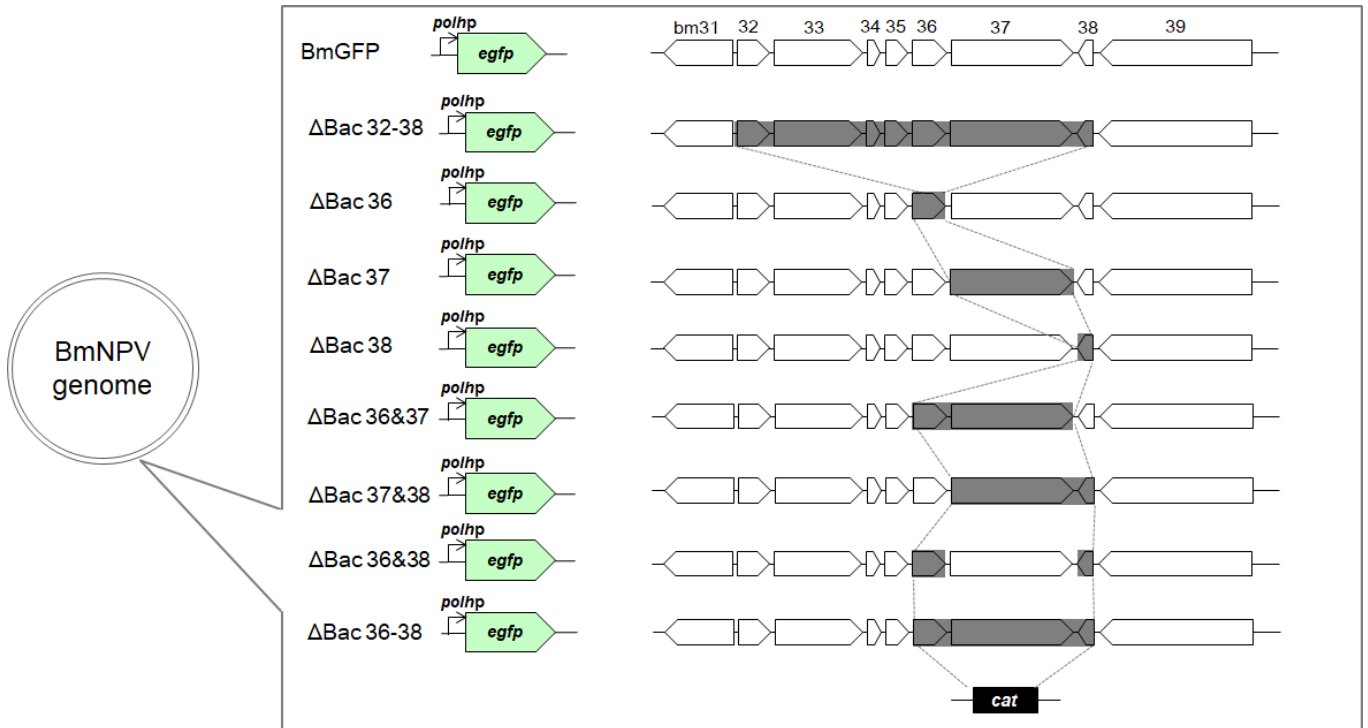


図1 本研究に用いた遺伝子ノックアウトバクミドの概略

を加えた。XtremeGENE9 (Roche) 6 μ l を蒸留水に加えた溶液 30 μ l を、バクミド DNA 0.8 μ g と混合して室温で 30 分間静置した。これを上記の 12-well-plate の培養細胞に加え、26°C で 6 時間培養後、1well あたり 500 μ l の 20% FBS を含む TC-100 培地を加えて培養を続けた。

増殖特性の解析には、多角体遺伝子プロモーターの下流に組み込んだ EGFP の蛍光タンパク質の発現をウイルス増殖の指標として解析を行った。解析には、Dino Capture 2.0 (AnMo Electronics Corporation)を使用した。

結 果

bm32 から bm38 までの 7 遺伝子は、非必須遺伝子である(ONO *et al.* 2007)。これらの遺伝子からなる非必須遺伝子クラスターをクロラムフェニコール耐性遺伝子と置換して、7 遺伝子ノックアウトバクミドを作製した。このバクミドをトランスフェクションした細胞からは、mock 処理をした細胞と同等な GFP 蛍光値しか得られず、ウイルスの増殖は検出できなかった(図 2)。この bm32-38 の領域を分割してノックアウトウイルスバクミドを作製・解析したところ(未発表データ)、bm36、37、38 の 3 欠損体(Δ bm36-38)で同様に GFP 蛍光が観察されなかった。そこで、これら 3 遺伝子についてすべての組合せで多重変異体を作製し、それらの増殖を調査した(図 3)。bm36、37、38 それぞれの単遺伝子ノックアウトバクミドをトランスフェクションした細胞では報告された通り(TAKA *et al.* 2013)、どのノックアウトバクミドをトランスフェクションした細胞においても GFP 蛍光とその経時的な拡大が見られた。 Δ bm37、 Δ bm38 をトランスフェクションした細胞では、BmGFP バクミドをトランスフェクションした細胞(ポジティブコントロール)と同等の GFP 蛍光が観察された。しかし、bm36 単独および bm36 を含む複数の遺伝子がノックアウトされたバクミドをトランスフェクション

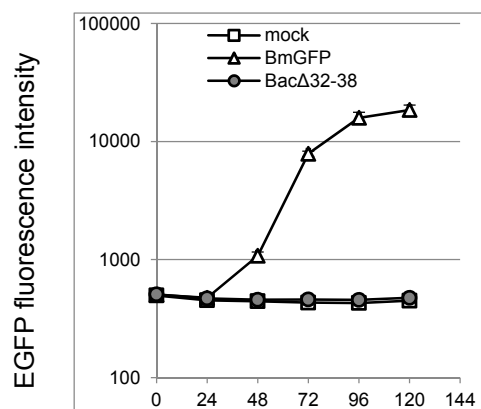


図 2 Δ bm32-38 の多重ノックアウトバクミドの蛍光量縦軸は EGFP 蛍光強度、横軸は時間(h)を表す。mock は、バクミド DNA ではなく蒸留水を混合した溶液で処理したものを用いた。

した細胞では、いずれも BmGFP バクミドをトランスフェクションした細胞(ポジティブコントロール)に比べて GFP 蛍光が減少するという結果となった(図 3)。また、 Δ bm36&37 は、 Δ bm36 よりも GFP 蛍光が強まっていた。

考 察

本研究での遺伝学的解析によって以下の 2 つの遺伝学的相互作用が同定された：

- 1) bm36、37、38 は単遺伝子のノックアウトではウイルス増殖能は維持されるが、これらを同時にノックアウトすることにより、ウイルス増殖が検出できない(蛍光が検出できない)レベルにまで低下し、これらの遺伝子間に遺伝学的相互作用が存在する可能性が示唆された。
- 2) Δ bm36&37 のトランスフェクション細胞では、 Δ bm36 による GFP 蛍光低下が明らかに回復傾向を見せた。この結果は、bm36-bm37 間に genetic suppression interaction (JOLANDA *et al.* 2016)が存在している可能性を示唆している。しかし、この点を明らかにするためには、今後、 Δ bm37 における GFP 発現促進効果の検証を含検討が必要である。

今後、これらの遺伝子間の相互作用について解析を進めることにより、単遺伝子破壊株では顕在化しなかったこれら非必須遺伝子の役割、機能の

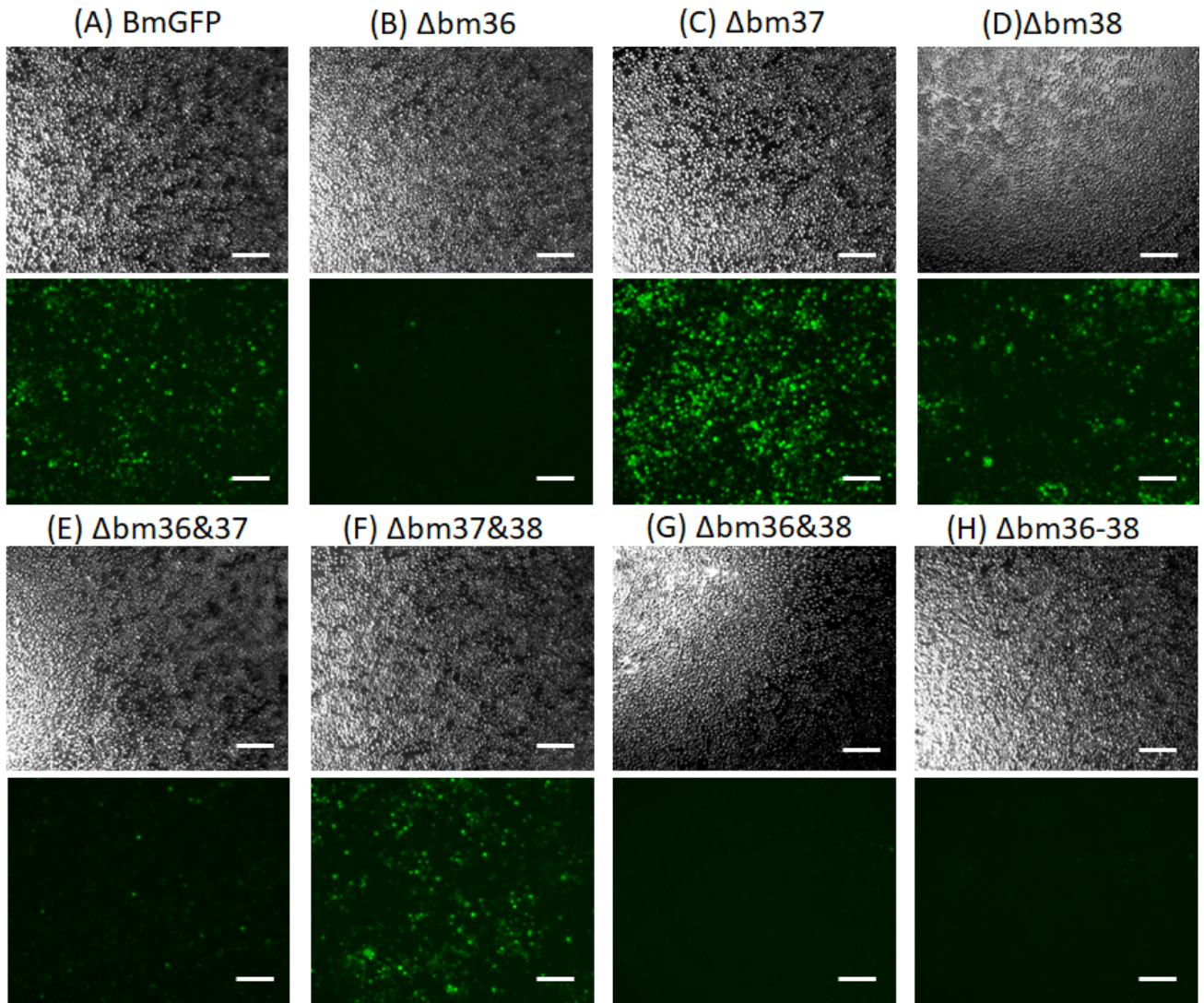


図3 bm36、37、38の多重ノックアウトバクミドトランスフェクションの結果
トランスフェクション後96hのEGFP蛍光を観察した。

(A) BmGFP(コントロール)、(B) Δbm36、(C) Δbm37、(D) Δbm38、(E) Δbm36&37、(F) Δbm37&38、(G) Δbm36&38、(H) Δbm36-38
それぞれ上部の白黒の写真が明視野、下部の写真が蛍光観察で、スケールバーはすべて0.5μmである。

一端が明らかになることが期待される。

文 献

ONO C. *et al.* (2007): J. Insect Biotech. Sericol, **76**: 161-

167

ONO C. *et al.* (2012): Virus Res, **165**: 197-206

TAKA H. *et al.* (2013): J. Insect Biotech. Sericol, **82**: 25-32

JOLANDA V. L. *et al.* (2016): Science, **354**: 599

Bombyx mori nucleopolyhedrovirus immediate-early 遺伝子 ORF 上流 500 塩基による発現制御についての解析

工藤 滉己・佐藤 昌直・浅野 眞一郎・伴戸 久徳*

北海道大学大学院農学院

ウイルスは、宿主が持つ分子メカニズムを利用し、自身の遺伝子情報の発現や増殖を達成する。一方で、ウイルスは、宿主因子に依存した遺伝子発現制御から、自身が主導権を握る遺伝子発現プログラムへと切り替えることにより、自身の増殖にとって有利な環境を作り出している。

DNA ウイルスであるバキュロウイルスは、100以上の遺伝子をゲノムにコードする。これらウイルス遺伝子は、発現時期によって immediate-early (前初期)、early (初期)、late (後期)、very-late (後後期)の4つに分類される。このうち、immediate-early 遺伝子 (*ie1, ie0, ie2, me53, pe38*) はその転写が宿主 RNA ポリメラーゼによって行われることが知られており、また、ウイルス遺伝子発現プログラムの発揮に重要な役割を果たすと考えられている。これら immediate-early 遺伝子は転写制御因子をコードしており、他のウイルス遺伝子の転写を制御し (PASSARELLI and MILLER, 1993; TODD *et al.* 1996)、さらに、immediate-early 遺伝子自身の発現制御を行うことも示されている (LEISY *et al.* 1997; ONO *et al.* 2016)。

本研究では、*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV)の遺伝子発現戦略の分子機構を明らかにするために、まず、各 immediate-early 遺伝子に着目し、その転写様式基盤として、それら遺伝子のプロモーター領域を同定することを目的とした。*ie1* プロモーター領域についての先行研究では、

ORF から 500 bp の領域で高発現することが報告されており (FUJITA *et al.* 2015)、本研究でも ORF 上流 500bp をターゲットとした。今回の報告までに組換えウイルスバクミドが構築できていなかった *ie2* 遺伝子以外について、各 immediate-early 遺伝子の ORF 上流 500 bp の下流に *luciferase* をレポーター遺伝子として組み込み、ウイルスゲノムをもつプラスミドに導入した。そしてレポーター発現バクミドの immediate-early 遺伝子とレポーター遺伝子の発現動態を比較した。

材料と方法

1) 供試細胞

昆虫培養細胞としてカイコ卵巣由来の BmN 細胞を用いた。10%のウシ胎児血清(Biosera)を含む TC100 培地 (Funakoshi) にて、BmN 細胞を 26°C で継代培養した。

2) 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 BmNPVT3 株を用いた 4 種類の組換えバクミド を構築した。

レポーター-luciferase のコード配列を組み込んだ pFastbac-MetLuc (石川, 2016) をインバース PCR により、ポリヘドリンプロモーターを排除した。ついで BmNPVT3 株から、各 immediate-early 遺伝

*責任著者

〒060-8589 札幌市北区北9西9

e-mail: hban@abs.agr.hokudai.ac.jp

子の ORF 上流 500 bp を PCR により増幅し、Gibson assembly により *luciferase* コード配列上流に各 immediate-early 遺伝子のプロモーター 4 種類を連結し、pFastBac-iep-MetLuc を得た (図 1)。それら

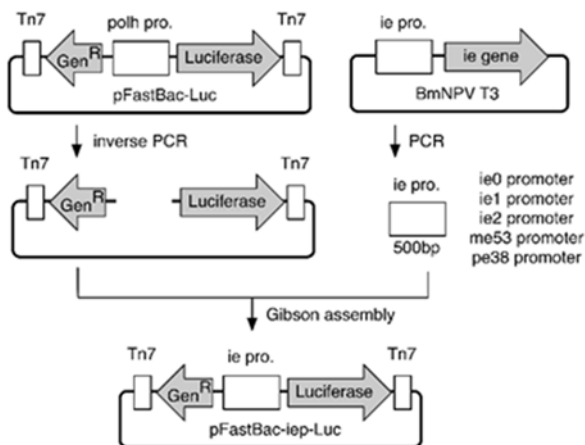


図 1 pFastBac-iep-MetLuc の構築図。ie pro. は各 immediate-early 遺伝子の ORF 上流 500 bp を指す。

の組換えプラスミドを用い、すでに報告された方法 (ONO *et al.* 2012) でレポーター発現バクミドを得た。各組換えプラスミド作製に用いたプライマー配列は、表 1 にまとめて示した。

表 1 pFastBac-iep-MetLuc 構築に用いたプライマー配列

Primer name	Sequence (5'·3')
ie0up	CGAGCATCGTTTGTTCGCCAGGCTTACA ATGCTGCTGCTGATGCTG
ie0down	atggtggcgaccggtggateCGTTGCGTTGCTCGTT ATCAATCAC
ie1up	CGAGCATCGTTTGTTCGCCAGGTGTCCG TGTGCGCTAGCATG
ie1down	atggtggcgaccggtggateCAGTCGTTTGGTTGTT CACGATCG
me53up	CGAGCATCGTTTGTTCGCCAGGTCAATT ATTGCAAACGCGGC
me53down	atggtggcgaccggtggateCTGTAAGTGGTTA GCACTCA
pe38up	CGAGCATCGTTTGTTCGCCAGGATTG GCGACTCATGGCTGG
pe38down	atggtggcgaccggtggateCITTGCTTATTGGCAG GCTCTCC
inv-fwd	Ggatccaccggtgcccaccat
inv-rev	CCTGGGCGAACAACGATGCTCG

3) 各 immediate-early 遺伝子とレポーター遺伝子の発現動態の比較

BmN 細胞にバクミドをトランスフェクション

し、トランスフェクション後 3 時間、6 時間、9 時間で細胞を回収した。その細胞から Trizol (Invitrogen) を用いて RNA を抽出した。その RNA を鋳型とし PrimeScript Reverse Transcriptase (Takara) を用いて cDNA を得た。それらを SYBR Premix Ex Taq (Takara) を用いて 反応条件[95 °C, 30 sec] x 1 cycle、[95 °C, 4 sec / 60 °C, 25 sec] x 40 cycles で、LightCycler 480 SystemII (Roche) を用いて qRT-PCR 反応を行った。各 immediate-early 遺伝子、*luciferase*、*tublin* について Ct 値を取得した。*Tublin* Ct 値で immediate-early 遺伝子 Ct 値、*luciferase* Ct 値を補正した Δ Ct 値を用いて両側 t 検定を行い、各 immediate-early 遺伝子とレポーター遺伝子の発現を比較した。qRT-PCR 反応に用いたプライマー配列は表 2 にまとめて示した。

表 2 qRT-PCR に用いたプライマー配列

Primer name	Sequence (5'·3')
ie0 qPCR up	CGACATTGCCAAACCCGAC
ie0 qPCR down	CCGTACGCGCCTTCAATTTTC
ie1 qPCR up	GCAGCATGCACATTGTGCGAA
ie1 qPCR down	AGCTATAGTCAACCGCTCTTCG
me53 qPCR up	TACAATGCTGCTGCTGATGC
me53 qPCR down	GTTCGTCAGCCGCCAAAATC
pe38 qPCR up	AGCGTCAGGTGAGGACATTG
pe38 qPCR down	CGAAAACGCTCGTTCAGCTC
Luc qPCR up	CAGCGGCTTCAAAGAAATGGC
Luc qPCR down	AGCCACTTCTTCAGCAGCTC

結果と考察

トランスフェクション後 3、6、9 時間における各 immediate-early 遺伝子とレポーター遺伝子の発現量を比較したところ、トランスフェクション 9 時間後の *ie0* 以外は両者の発現動態に有意な差は見られなかった (図 2)。これらの結果から、各 immediate-early 遺伝子の ORF 上流 500 bp は宿主 RNA ポリメラーゼを用いた転写が行われる感染初期において、プロモーターとして機能することが推測された。トランスフェクション 9 時間後での *ie0* 転写産物とレポーター遺伝子転写産物の間に量の差が生じた原因として、(1) ゲノム上で周辺

領域のコンテキストの違いによって同一の *ie0* プロモーターが影響を受けてしまっている可能性、(2) *ie0* ORF にも制御配列があり、レポーター遺伝子配列にはその制御が及ばない可能性、(3) qRT-PCR プライマー配列が高発現（高コピー数）時の *ie0* に対応しきれないものではなかった技術的可能性などが考えられる。今後、これら可能性を検討するために、以下の実験を行うことが必要である。

(1) に関しては、本来の位置にある *ie0* の ORF に相同組換えなどでレポーター遺伝子を連結したバクミドを作製し、このバクミドのレポーター遺伝子とワイルドタイプバクミドの *ie0* 発現量を比較する。

(2) に関しては、レポーター遺伝子 ORF に *ie0* の ORF 断片を部分的に付加したバクミドを作製し、このバクミドのレポーター遺伝子と *ie0* 発現量を比較する。

(3) に関しては、プライマーの定量的な正確性を確認する。

これらのプロモーター領域に制御される immediate-early 遺伝子発現量について生物学的な意味の検討も必要であろう。immediate-early 遺伝子をノックアウトしたウイルスに、これらプロモーターと遺伝子 ORF を含む発現カセットを導入し、遺伝子ノックアウトの影響を発現カセットからの遺伝子発現で相補できるかを解析することにより、今回対象とした ORF 上流 500 塩基が生物学的に十分な発現量や発現タイミングを制御できているかを確認する必要がある。これらのプロモーター配列の改変により、その発現制御を人為的に操作することで immediate-early 遺伝子発現制御の重要性に関してさらなる知見が得られると考えられる。

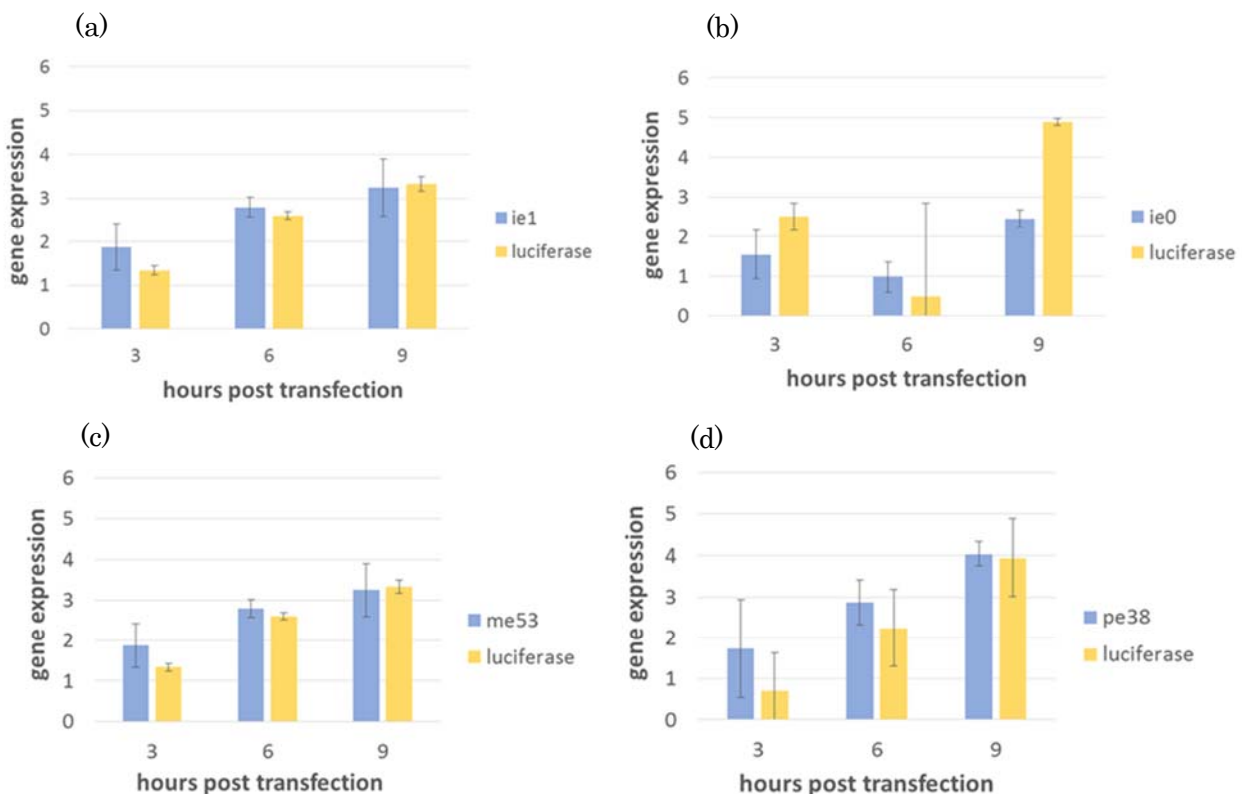


図 2. *ie1* (a), *ie0* (b), *me53* (c), *pe38* (d) の各組換えバクミドにおける遺伝子発現解析

文 献

FUJITA R. *et al.* (2015): *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **464**:1297–1301

石川 小百合 (2016) : 北海道大学大学院農学研究科修士論文

ONO C. *et al.* (2012): *Virus Res*, **165**: 197-206.

ONO C. *et al.* (2016): *PLOS ONE* **10**(3): e0119580

Passarelli A. L. and Miller L. K. (1993): *J. Virol*, **67**: 2149-2158

TODD J. W. *et al.* (1996): *J. Virol*, **70**: 2307-2317

LEISY D. J. *et al.* (1997): *J. Virol*, **71**: 5088-5094

BmNPV ゲノムの *in vitro* アセンブリ

原田 直人・佐藤 昌直・浅野 眞一郎・伴戸 久徳*

北海道大学大学院農学院

任意の DNA 配列を合成・連結する技術を駆使し、「ゲノムをデザインする」研究が新たな生物学の潮流として始まっている。独立して増殖し、且つゲノムが小さな細胞である *Mycoplasma mycoides* を材料にミニマムゲノムが再設計されている (HUTCHISON III *et al.* 2016)。この研究では、本来 1Mb ほどあるゲノムを約半分の 531kb にまで削減可能であることが示されたが、このミニマムゲノムには依然 149 個の機能未知遺伝子が含まれていた。細胞が必要とする遺伝子機能について、我々の知識が不十分であることが改めて提示され、どの遺伝子について知識が不足しているかも示された。酵母についても人工的に作成された DNA 配列を染色体として持つ酵母が作製されており、“SCRaMbLE”と呼ばれる手法を用いて人工的なゲノム再構成を可能とするなど (SHEN *et al.* 2015)、天然ゲノムを使った研究では不可能な新たな研究が提案されている。また、細胞を持つ生物より小さなゲノムを持つ DNA ウイルスでは、T7 ファージゲノム上で重複した領域を持つ ORF をそれぞれ単独の遺伝子単位として解析できるように「リファクタリング」されたゲノムが作製されている (CHAN *et al.* 2005)。

カイコを宿主とするバキュロウイルスであるカイコ核多角体病ウイルス (*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus: BmNPV) は、128 kb のゲノムをもち、140 の遺伝子をコードする環状 2 本鎖 DNA ウイルスである (GOMI *et al.* 1999)。このウイルス

は、感染後期にポリヘドリンと呼ばれるタンパク質を細胞内タンパク質の 50% に至るほども発現するため、組換えタンパク質発現ベクターとして活用されている。これまでは、T3 株などの野生型ウイルスゲノムを基にベクター構築がなされていたが、ウイルスベクターとしてさらに改良していくためには BmNPV の遺伝子発現・増殖に関わる機構を「設計可能」にする必要がある。そこで、本研究では、T3 株ゲノム (約 140kb) のゲノムデザインを可能にするために必要なゲノム再構築技術の確立を目的として、以下の実験を行った。

材料と方法

1) 供試細胞

当研究室で保存されているカイコ卵巣由来の BmN 細胞を用いた。細胞は、10% FBS (Biosera) を含む TC-100 培地 (Applichem) を用いて、26°C で培養した。

2) 各断片の調整

断片 6、10、14、18、24、32、38 は BmNPV 標準株 T3 バクミド BmGFP (ONO *et al.* 2012) をテンプレートにした PCR (酵素: Tks Gflex DNA polymerase (Takara) 反応条件: [95°C, 5sec.], [95°C, 15 sec./Tm°C, 15 sec./72°C, 1 min./kb] × 30 cycles, [72°C, 5 min./4°C ∞]) により得た。その他の断片は、pCR8/GW/TOPO にクローニングした。これらのプ

*責任著者

〒060-8589 札幌市北区北 9 西 9

e-mail: hban@abs.agr.hokudai.ac.jp

ラスミドを大腸菌 (DH5a) に導入し増幅させた後抽出し、制限酵素処理 (*NotI* または *AscI*) によって各断片を得た。

3) Gibson assembly による連結

中間断片連結 (図 1 の第 1 連結~第 3 連結) には CopyControl pCC1 ベクター (Epicentre) を、最終連結 (図 1 の第 4 連結) には EV (BmGFP の mini-F replicon、カナマイシン耐性遺伝子、トランスポゾンの挿入配列、*egfp* および *lacZα* を含む領域) をクローニング用配列として用いた。各クローニング用配列は、以下のようなプライマーを用いた PCR によって得た。DNA 断片の末端部に、連結する DNA 断片の末端と相同な 40~50 塩基配列と、アセンブリされた DNA 断片をベクターから分離するための制限酵素サイトをそれぞれに付加されるようにプライマーを設計した。これらベクターと DNA 断片群の連結は、GIBSON *et al.* (2009) に従って行った。その反応産物を大腸菌 (EPI300) に導入し増幅させた後抽出し、DNA 断片連結産物を得た。また、各 DNA 断片が連結されているかを確認するため、各連結部分を含む領域を増幅するプライマーを用いて PCR を行い、予想されるサイズと一致するかどうかをアガロース電気泳動により確認した。なお、今回の第四連結では、再構築 BmNPV と BmGFP を区別するために、大腸菌での複製起点等のベクターとして必要な配列と多角体プロモーターと融合した EGFP 配列を含む配列 (EV) を BmGFP で配置されている方向とは逆向きに連結されるよう試験的に設計した。GIBSON *et al.* は、天然の *M. genitalium* ゲノムと人工合成ゲノムを区別するために約 2.5kb の“watermark”配列を用いたが (GIBSON *et al.* 2008)、本研究ではウイルスとして増殖した際の脱落を考慮し、より大きな DNA 配列を逆位で用い、天然ゲノムと区別する戦略をとった。

4) BmN 細胞へのトランスフェクション

X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent 3.2 μ l に、再構築 BmNPV または BmGFP を 0.8 μ g 混合し、トランスフェクション溶液 (全体量 25 μ l になるように TC-100 でそれぞれ調製) とした。加えて、3.2 μ l の X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent および 21.8 μ l の超純水からなるコントロールトランスフェクション溶液を調製した。これら 3 種のトランスフェクション溶液を 30 分静置した。その後、あらかじめ無血清の TC-100 培地で 2 回洗浄し 12 ウェルプレート (Iwaki) に播種した 0.5×10^6 個の BmN 細胞にトランスフェクション溶液を滴下して 26°C で 6 時間静置しトランスフェクションを行った。その後、培地を、10% FBS を含む TC-100 培地 1 ml に交換した時点を 0 時間とし、培養を続けた。

6) GFP 蛍光の観察

各タイムポイントにおける GFP 発現は Leica MZ FLIII (Leica) で観察し、Leica Application Suite (Leica) で画像を得た。

結果と考察

1) DNA 連結・クローニング系と DNA 断片の設計、連結

任意の DNA 連結には酵素反応、大腸菌、枯草菌、酵母を用いた手法が発表されている。これらの中で枯草菌、酵母が高い DNA 連結活性を持つことが知られ、酵母による BmNPV の近縁種 AcMNPV (*Autographa californica nucleopolyhedrovirus*) のゲノム再構築が報告されている (SHANG *et al.* 2017)。

しかし、酵母では、バキュロウイルス pk2 がその増殖に影響を与え (DEVER *et al.* 1998)、枯草菌では、BmNPV バクミドを保持させた事例が無い。ウイルス遺伝子が異種宿主内で発現し、宿主増殖へ影響した場合にウイルスゲノム配列に変異が導入されることが懸念されるため、これら生物を介さない方法を計画した。大腸菌はこれまでに BmNPV

T3 ゲノムを維持してきた実績を持つが (ONO *et al.* 2012)、大腸菌内では長鎖 DNA の連結の報告がなかったため、*in vitro* での DNA 断片の連結を行った後に大腸菌でクローニングするよう実験を設計した。*in vitro* での DNA 断片の連結には、BmNPV ゲノムサイズ相当の大きな DNA の連結実績がある Gibson assembly (GIBSON *et al.* 2009) を採用した。BmNPV T3 ゲノムを約 4 kbp ごと 38 断片に、遺伝子間領域で分割した (図 1)。研究開始当初は、図 1 のように 38 断片を 5 断片ずつ、または 7 断片ずつ部分連結した後、連結産物同士を連結することで BmNPV ゲノムの再構築を行ったが、7 断片を一度に連結することは出来なかったため、3 断片と 4 断片の部分連結 (第 1 連結) を介することで 7 断片を連結した (第 2 連結)。この第 2 連結産物

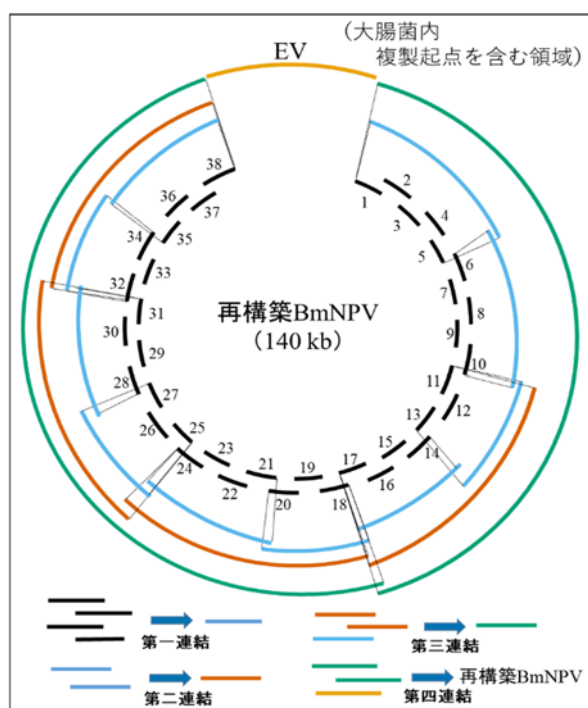


図 1. BmNPV ゲノムの再構築

1~38 (黒色) は BmNPV の各 DNA 断片を、各色の円弧は連結産物を示す。各 DNA 断片は連結に必要な 50 塩基のオーバーラップ領域を持つ。第四連結に用いたクローニング用配列 EV は BmGFP の mini-F replicon、カナマイシン耐性遺伝子、トランスポゾンの挿入配列、*egfp* および *lacZα* を含む

に対し連結確認を PCR によって行ったところ、各連結部で予想されるサイズと一致する大きさの DNA 断片が増幅された (図 2 A)。次に、これら 5、

7 断片連結産物を制限酵素処理し、ベクターから分離した後、一度に連結することで再構築 BmNPV ゲノムを得ようとしたが、形質転換した大腸菌を得ることは出来なかった。そこで、ここでも部分連結を導入し、断片 1~17、断片 18~38 の連結産物を得た (第 3 連結、図 2 B)。そして、これら第 3 連結産物からベクターを分離し、各ゲノム断片を連結することで再構築 BmNPV ゲノムを得た (第 4 連結、図 2 C)。

2) 連結ウイルスゲノムの細胞への導入と感染過程の確認

上記、連結 BmNPV ゲノムが細胞内でウイルスゲノムとして振る舞えるかを調べるために、BmN 細胞へトランスフェクションした。トランスフェクション後、72 時間に蛍光顕微鏡下において EGFP の蛍光が観察され、96 時間には、その周辺細胞でも蛍光が確認された (図 3)。*egfp* の転写は感染の最終段階で活性化されるポリヘドリンプロモーターによって制御されていることから、感染が最終段階まで進行していると考えられた。しかし、連結 BmNPV ゲノムトランスフェクション細胞の GFP 蛍光は、BmGFP に比べると低く、EV 領域の方向性が影響を及ぼしているか、BmGFP には無い変異等が連結ウイルスゲノムに存在するなどの可能性が考えられる。本実験では、DNA 連結によって得られた BmNPV ゲノムと BmGFP を区別するために、EV を逆向きで第 4 連結に用いた。これにより、EV の連結部位に PCR を行うことで再構築物を区別することができたが (図 2 C)、ウイルス複製や GFP 発現へ影響が生じている可能性は否定できない。連結産物と BmGFP の区別には、GIBSON *et al.* (2009) が行ったように、人工物と天然物を区別できる配列を導入するなど、別の方法による確認を今後検討する必要がある。また、再構築したウイルスゲノム DNA 配列を決定することで、連結過程で生じた変異がないかを確認する必要がある。

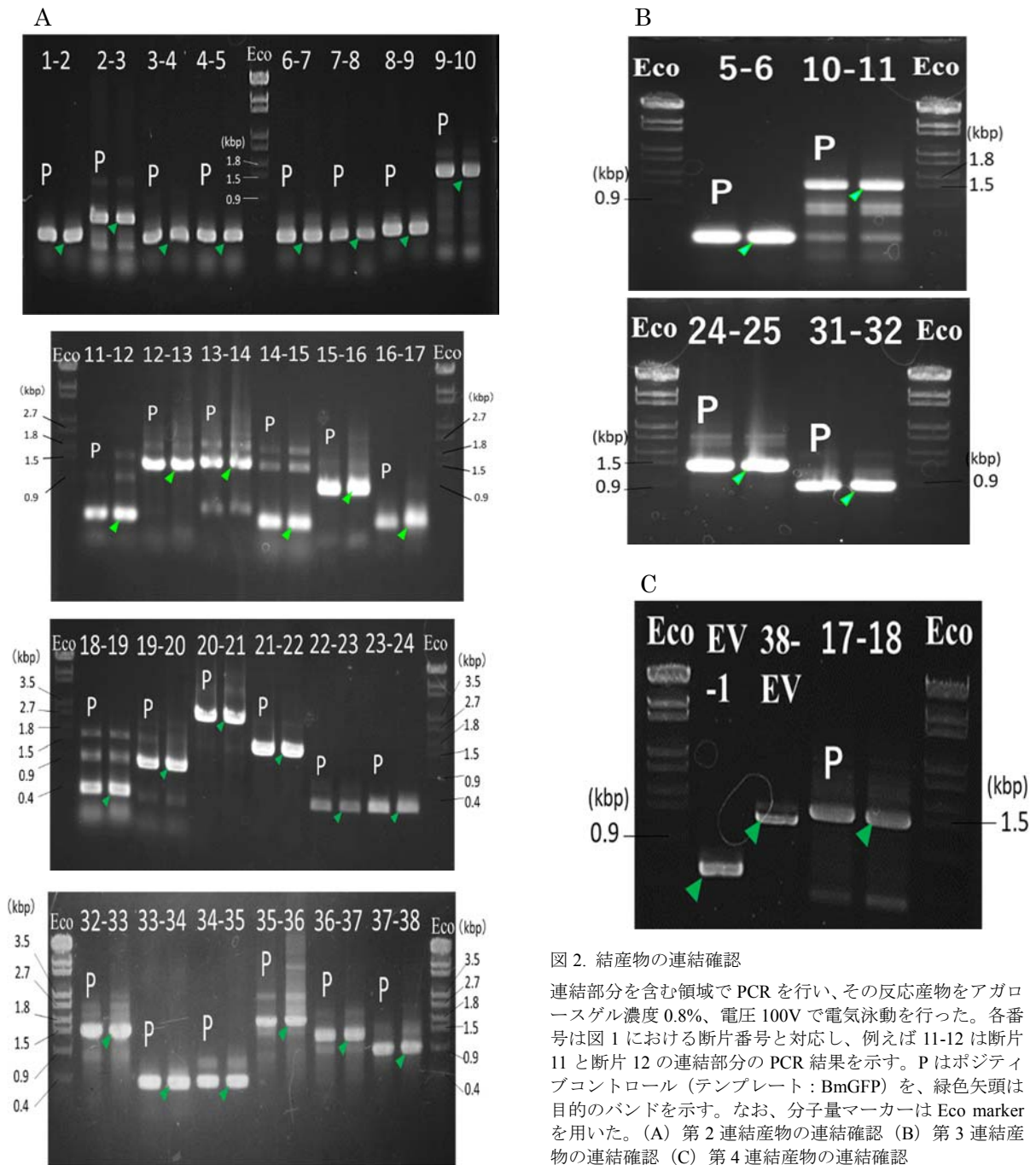


図 2. 結産物の連結確認

連結部分を含む領域で PCR を行い、その反応産物をアガロースゲル濃度 0.8%、電圧 100V で電気泳動を行った。各番号は図 1 における断片番号と対応し、例えば 11-12 は断片 11 と断片 12 の連結部分の PCR 結果を示す。P はポジティブコントロール (テンプレート: BmGFP) を、緑色矢頭は目的のバンドを示す。なお、分子量マーカーは Eco marker を用いた。(A) 第 2 連結産物の連結確認 (B) 第 3 連結産物の連結確認 (C) 第 4 連結産物の連結確認

上記のように課題はまだ残っているが、本研究では数 kb の DNA 断片から BmNPV ゲノムサイズの DNA を Gibson assembly と大腸菌を用いたクローニングで再構築できることを示した。冒頭で述べたように BmNPV ベクターを改良していくためには、リファクタリング等の遺伝子単位の再設計やミニマムゲノムの同定が今後、必要である。本研究は、その基盤技術となるゲノム再構築技術を

確立した。

文 献

- CHAN L. Y. *et al.* (2005): *Mol. Syst. Biol.*, **1**: 2005, 0018.
 DATSENKO K. A. and WANNER B. L. (2000): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**: 6640-6645
 DEVER T. E. *et al.* (1998): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,

95: 4164-4169

GIBSON D. G. *et al.* (2008): *Science*, **319**: 1215-1220

GIBSON D. G. *et al.* (2009): *Nat. Methods*, **6**: 343-345

HUTCHISON III C. A. *et al.* (2016): *Science*, **351**:
add6253

GOMI S. *et al.* (1999): *J. Virol*, **80**: 1323-1337

ONO C. *et al.* (2012): *Virus Res*, **165**: 197-206

SHANG Y. *et al.* (2017): *ACS Synth. Biol*, **6**: 1393-1402

SHEN Y. *et al.* (2015): *Genome Res*, **26**: 36-49

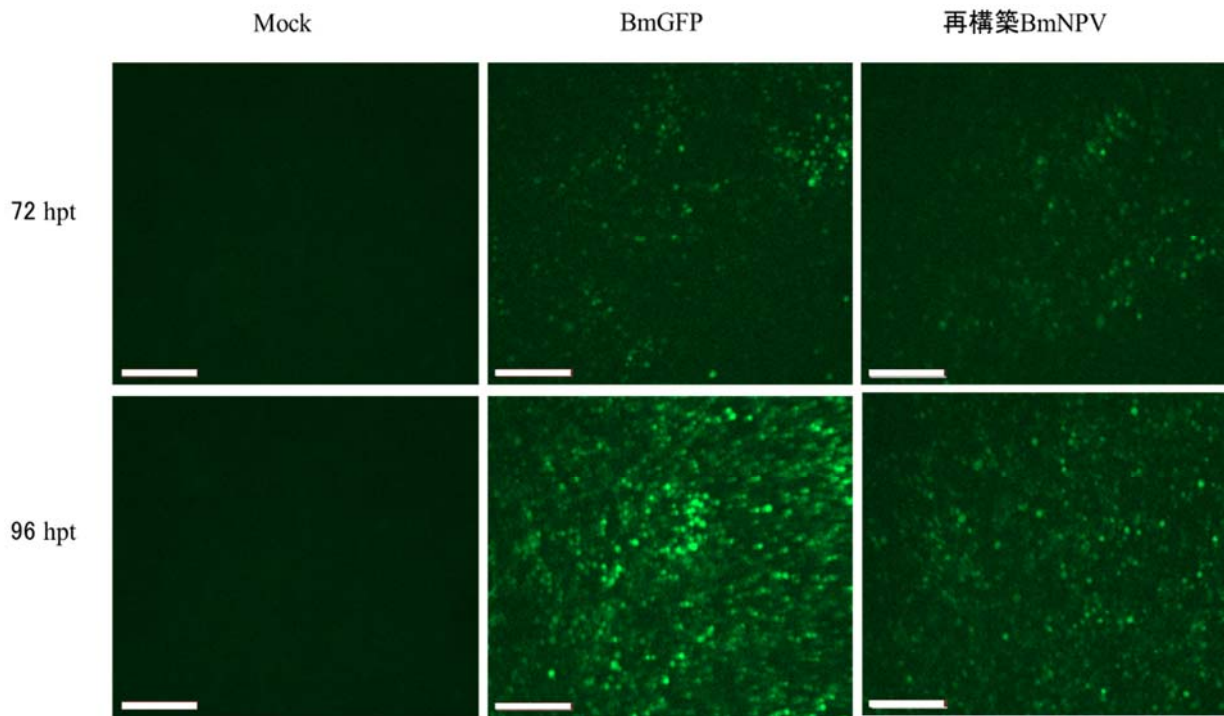


図3. トランスフェクションした BmN 細胞の蛍光顕微鏡観察結果

BmN 細胞へ BmGFP (ポジティブコントロール) または再構築 BmGFP をトランスフェクションした後、72 時間後と 96 時間後に GFP 発現の様子を観察した。スケールバー: 2 mm

未来を拓く新たな繭工芸への挑戦*

江見 夏恵**

工房夢繭・花

1. 千変万化する繭の特性に魅せられて工房立ち上げ

服飾・フラワーデザインの専門性をベースに、繭の特性を活かしつつ、新たな付加価値を創造する作品づくりを目指して、2002年工房夢繭・花(図1)を設立した。工房では、50種類を超える繭フラワーを考案した。



図1 工房ロゴ

独自染色方法で透明感のあるシルクの輝きを実現した。図2に示すブライダルブーケやフラワーアレンジメントを製作している。



図2 繭のブライダルブーケとフラワーアレンジメント

豊かな色彩と繭の品種や形状を活かした作品には、雛人形、五月飾り、干支や石割桜、チャグチャグ馬コなどがある(図3)。郷土の土産品として商品化している。



図3 繭クラフト作品

*本稿は、岩手県工業技術センター小林正信氏に執筆協力いただいた。

**emi@yumemayuka.com

2. 実用性と耐久性を求めて新技術開発

薄く剥がれるなど繭の特性は、クラフト素材としての魅力である。しかし、細かい細工をするほど耐久性に欠けてくる。より実用性の高い作品作りのために、繭に岩手県の地域素材でもある漆を塗装することを考えた。



図4 平成22年度盛岡市産学共同研究による開発作品

平泉コラボレーション事業（平成21～23年度、県南広域振興局）への参加をきっかけに、平成22～23年度には盛岡市産学共同研究を岩手県工業技術センターと共同で取り組み、漆と繭を組み合わせ商品開発を推進した。繭に塗装した漆は深く染み込むため、芯から固められて漆かぶれの危険

性も低減できる熱硬化法を試行錯誤し、独自の塗装方法を確立し特許を取得した（「繭への漆塗装方法」岩手県工業技術センターとの共同特許）。開発した方法により図4に示すような多数の作品を制作した。図5に示す繭と漆のジュエリーは平成23年度いわて特産品コンクール知事賞を受賞した。



図5 漆と繭のブローチ（平成23年度盛岡市産学共同研究）

3. 繭工芸の新たな可能性を求めた事業展開

地域で活躍するご当地キャラクターを繭で製作し、新規事業化を推進する。

地域の活性化や人の交流に繋がる新たな事業展開に挑戦し、第16回いわて希望ファンド（平成25年度）に採択され、ご当地キャラクター商品を開発し、商標「繭キャラ」（岩手県工業技術センターとの共同商標）を取得した（図6）。



図6 登録商標「繭キャラ」

2016年希望郷いわて国体では、盛岡に訪れる選手や監督の土産品として繭で作る「さんさ踊りとふっちストラップ」(図7)が採用された。市民参加の手作で9,000個を製作する事になった。



図7 さんさ踊りとふっちストラップ

強度のある組立方法の考案、初の量産体制で手づくり部品のキット化が課題となった。作り方説明書のデザイン、工具の考案を、工業技術センターにデザイン相談や加工依頼をした。

国体冬季大会では、野外展示装飾に繭フラワー



図8 冬季国体の屋外展示装飾

を使用した。繭は野外展示にも耐えうる素材で、加工しやすく多くの人の手で量産可能であることを実証できた(図8)。

4. 岩手から全国へ

繭を使ったブライダルブーケやフラワーアレンジメント制作に始まった「工房夢繭・花」の活動と作品づくりは、繭と漆の融合技術開発、希望郷岩手国体でのキャラクター登録、量産体制の確立、部品のキット化、冬期の野外使用の実現など、盛岡を中心に15年の実績を積み重ねてきた。その成果が認められ、工房作品が盛岡市ふるさと納税返礼品のひとつに採択された(図9)。こうした実績をもとに、今後、カイク繭からつむぎだされる工房作品の全国発信を目指したい。



図9 盛岡市ふるさと納税返礼品の一例

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 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 29 年 12 月 25 日

発 行 平成 29 年 12 月 25 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

