

東北蚕糸・昆虫利用研究報告

第 43 号

平成 30 年 12 月

日本蚕糸学会東北支部

No.43 目 次

山田 恭裕 浅野 眞一郎	Bt 菌を利用したクワうどんこ病の防除 1
石川 聡子 佐藤 昌直 浅野 眞一郎 伴戸 久徳	BmNPV 必須遺伝子のリファクタリングとその評価 3
大森 裕介 金児 雄	蛹変態に対する 1 齢期の栄養状態の影響 7
大野 瑞紀 川本 宗孝 佐原 健	RNA-seq データからカイコ遺伝子オルソログを検出する方法 11

Bt 菌を利用したクワうどんこ病の防除

山田 恭裕¹・浅野 眞一郎^{2,*}

¹北海道大学北方圏フィールド科学センター・²北海道大学大学院農学研究院

北海道大学北方圏フィールド科学センター研究農場におけるクワによるカイコの飼育は、年3回飼育を行うために寒冷地に適したクワの栽培管理を行っている。春先（6月初旬）の春蚕の飼育のクワを確保するために、早生種である五郎治早生やかんまさり、剣持を飼育用途・時期にあわせて利用している。そのために、夏の終盤期になると桑葉にうどんこ病が発生し（本間、1930）、3世代目の秋蚕飼育開始時にはクワが硬くなり、うどんこ病変がでてカイコの飼育に支障をきたすことがある。しかしながら、広い桑園を管理するにあたり、うどんこ病の防除に化学薬剤を用いるのはコストからも現実的でない。そこで、近年作物の糸状菌病防除資材として注目されてきた *Bacillus thuringiensis* 菌（以下 Bt 菌）を用いてうどんこ病防除が可能であるか調査した。

材料と方法

うどんこ病防除資材として、トマトの糸状菌病に防除効果が認められた *japonensis* N141 株と CR371 株を供試した(Qi *et al.* 2016)。

うどんこ病防除試験を、研究農場でカイコ飼育のため栽培管理している、かんまさりと剣持を用いて行った。

Bt 培養液は、細菌培養に利用される LB 培地 (Luria-Bertani) に、2 株の Bt 株を植菌し、50 ml、16 時間、250 rpm で培養した上清を、遠心分離 (15

分間、12,000 rpm) により回収し、試験区のクワ葉裏に水彩画用のハケで1週間おきに、1葉あたり 5 ml 程を5回塗布した。

6週間後にBt培養液を塗布したクワ葉を摘桑し、うどんこ病の病斑を観察した。

結果と考察

北海道大学研究農場の桑園では例年、うどんこ病の病変が認められるのは8月中旬であるため、Bt 菌の培養上清の初回の塗布は7月下旬とした。平成 29 年夏は、札幌市は例年並みの気温で推移したため7月下旬では、うどんこ病の病変は観察されなかった。そこで、かんまさり区と剣持区を設定し、供試した Bt 菌 2 株の処理液を調整して、5 週間にわたり塗布を行ない摘桑してうどんこ病変の数 (200 cm²あたりの病変数) を計測した (表 1)。調査を行なった桑園のかんまさりと剣持では、例年9月中旬にはうどんこ病の発生がピークを迎えることから、この時期に実験が終わるように計画を立てた。試験を行なった時は、剣持区の方がかんまさり区 (図 1) よりも若干うどんこ病の発病が少ないものの、無処理の桑葉ではどちらの区においてもうどんこ病が出ていた。今回の実験では処理葉の数が少なく防除価を統計的に比較することはできないが、両区とも CR371 株よりも N141 株によるうどんこ病に対して防除効果が高いことが明らかになった。

*責任著者

〒060-8589 札幌市北区北9西9

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

表1. 各処理における桑葉のうどんこ病出現数

かんまさり区	病変数	平均値
無処理 1	23	24
無処理 2	28	
無処理 3	21	
N141 処理 1	5	11.3
N141 処理 2	12	
N141 処理 3	17	
CR371 処理 1	16	16.3
CR371 処理 2	19	
CR371 処理 3	14	

剣持区	病変数	平均値
無処理 1	19	18.3
無処理 2	16	
無処理 3	20	
N141 処理 1	4	4.3
N141 処理 2	4	
N141 処理 3	5	
CR371 処理 1	9	9.6
CR371 処理 2	12	
CR371 処理 3	8	

このことは、トマトの糸状菌病防除効果について調査した結果と同じであった。クワの糸状菌病は他にもあることからそれぞれの糸状菌病に対する効果については今後調査をしたいと考えている。

また、本実験に供試した2株の Bt 株はカイコに対して殺虫活性を有しない株であり、Cry タンパク質を作らない栄養型細胞増殖期に菌体を遠心分



図1. かんまさり区のうどんこ病変比較
左) N141 処理葉; 右) 無処理
赤い丸囲みはうどんこ病変

離で取り除いてあるので、処理したクワをカイコに与えても毒性はなかったが、カイコの品種によっては感受性があることも考えられることから、プラスミドキュアリング等の手法を用いて Cry タンパク質を欠損させた株を作成して、その培養上清を使うことでさらに安全かつ効率的なうどんこ病防除資材を開発できると考えている。さらに、本実験では Bt 培養液を桑葉に塗布する方法で防除効果を確認したが、この方法は広い桑園で行うには現実的ではない。農薬散布に使われるスプレーヤー等で効率よく葉面を処理する方法を考える必要がある。

文 献

- 本間ヤス(1930): 札幌博物学会報, **11**, 174
 Qi J. *et al.* (2016): *Int. J. Environ. Agri. Res.*, **2(6)**, 55-63

BmNPV 必須遺伝子のリファクタリングとその評価

石川 聡子・佐藤 昌直・浅野 眞一郎・伴戸 久徳*

北海道大学大学院農学院

ゲノムは、その名の由来 (gene + -ome) の通り、その生物が持つ遺伝子情報のすべてがコードされている。タンパク質をコードするオープンリーディングフレーム (ORF)、発現制御領域であるプロモーター、エンハンサー、ターミネーターのひとまとまりが、ある遺伝子がどのような構造のタンパク質をいつ・どこで産生するかを規定する DNA 配列 (機能単位) であり、これら機能単位が進化の過程の中で配置された DNA 配列がゲノムである。様々な生物でゲノム DNA の両鎖の塩基のほとんどについて転写が確認されることから、ORF を含む転写領域と制御配列は、排他的ではなく重複していること (KAPRANOV *et al.* 2007)、ひいては機能単位間で配列を共有している可能性がある。

逆遺伝学では、ある塩基配列に改変を加えて表現型を解析し、その配列を含む機能単位の生物学的な役割を同定する。しかし、改変配列が複数の機能単位に共有されており、その事実が明らかにされていない場合、標的機能単位と表現型の関係について正しく評価できない。よって、標的機能単位とそれが果たす役割の関係を遺伝学的に明らかにするには、標的機能単位を他の機能単位と独立させて解析する必要がある。機能単位を独立させて解析する試みは T7 ファージで初めに行われ、ゲノムの約 1/3 の領域について機能単位間の重複を解消して、それぞれを独立させたウイルスゲノムを作製した (CHAN *et al.* 2005)。CHAN *et al.* (2005) は、この遺伝子機能単位の独立化をコンピュータ

ープログラムにおける個別機能の独立化作業のアナロジーから「T7 ファージのリファクタリング」と名付けた。

我々は、カイコ核多角体病ウイルス *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) T3 系統の効率的な逆遺伝学的解析を可能とするべく、バクミドを構築し (ONO *et al.* 2007)、大腸菌内での相同組換えによって 141 遺伝子の ORF をノックアウトした遺伝子ノックアウトウイルスライブラリーを作製した (ONO *et al.* 2012)。しかし、BmNPV T3 のゲノム上には、遺伝子が密に存在していること (GOMI *et al.* 1999)、BmNPV のエンハンサー等、制御領域についての解析が進んでおらず、機能単位となる領域を厳密に定義できていないことから、標的 ORF ノックアウトが隣接機能単位にも影響している可能性を否定できない。そのため、ノックアウトウイルスを標的機能単位のみでレスキューし、その表現型が復帰するかを検討する必要がある。

そこで我々は、BmNPV ゲノムのリファクタリング手法を新たに考案し、その結果を評価した：前述の ONO *et al.* (2012) による遺伝子ノックアウトウイルスライブラリーの各バクミドでは、標的 ORF が欠損している。そこで、本研究では、標的 ORF を含む機能単位として制御領域を含めた DNA 配列をノックアウトバクミドの「別遺伝子座」に挿入し、表現型の復帰を評価した。

なお、ONO *et al.* (2012) では、ウイルス感染過程の最終段階に発現するポリヘドリン遺伝子プロモ

*責任著者

〒060-8589 札幌市北区北 9 西 9

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

ーターにEGFPを挿入したウイルスを用いており、そのGFP蛍光発現のパターンから遺伝子を分類した。type Dに分類された遺伝子のORFノックアウトウイルスでは、GFP蛍光が全く観察されないため、この表現型が復帰するかを指標とし、リファクタリングの可否を評価した。

材料と方法

1. 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 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% 加えた血清培地を用いて 26 °C で培養した。

2. リファクタリングバクミドの構築

リファクタリングに用いる機能単位配列として、標的 ORF の上流・下流 500 塩基を含む配列を、表 1 に示すプライマーを用いて PCR で増幅し、pCR8 にクローニングした。機能単位配列は、次に pFastBac1 に載せ替え、バクミドへのトランスポジションを行った。必須遺伝子ノックアウトバクミドは、ONO *et al.* (2012) で報告した *ie-1*、*lef-4*、*lef-8*、*lef-9*、*p47* ノックアウトバクミドを用いた。

表 1. リファクタリングバクミド作製用 PCR プライマー

p47_up	5'-ATGTTGTAGCTTGTCTGAAAAA-3'
p47_down	5'-ACAATAACATGGACAAACATCG-3'
lef-8_up	5'-AAAAAATTGACCAAAGCTTTTCTG-3'
lef-8_down	5'-GTTTAATTTTAATGCTAACGCGTAC-3'
lef-9_up	5'-CGGCCACAAATATTTTACGG-3'
lef-9_down	5'-AACAAATCTTTACAATCAATACGAA-3'
lef-4_up	5'-TCTAGAATGCTTCTGTAGTTGC-3'
lef-4_down	5'-GCAATAATACAAGTTTTGTTTGAT-3'
DH_up	5'-TTTTGGTTGTCCAAGTCCAC-3'
DH_down	5'-ATATTGCCGAAAAACCGCTAT-3'
ie-1_up	5'-ATCCTGGCGTAGAATTTGTC-3'
ie-1_down	5'-CATGTGCCAAGGATTTAACTATGA-3'

3. BmN 細胞へのトランスフェクション

X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (Roche) 3.2 μ l に、リファクタリングバクミドまたは BmGFP を 0.8 μ g 混合し、室温で 30 分静置した。コントロール溶液には DNA 溶液ではなく、超純水を使用した。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 4.0×10^5 個の BmN 細胞に 400 μ l のトランスフェクション溶液を滴下した。26°C で 6 時間静置後、培地を 10% FBS を含む TC-100 培地 1 ml に交換した。

4. BmN 細胞への感染

BmN 細胞にトランスフェクションした 8 日後に回収した培養上清 100 μ l を無血清 TC100 培地 1 ml に加え、 4.0×10^5 個の BmN 細胞に滴下して 26 °C で 1 時間静置した。その後、培地を 10% FBS を含む TC-100 培地 1 ml に交換した。なお、交換時点を感染 0 時間とした。

5. GFP 蛍光の観察

各タイムポイントにおける GFP 蛍光は、Leica MZ FLIII (Leica) で観察し、Leica Application Suit (Leica v 4.4) で画像を得た。

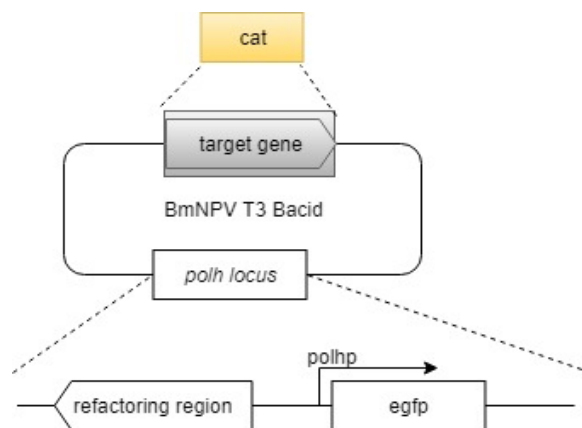


図 1. リファクタリングバクミド構造の概要

標的 ORF がクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼに置換されたノックアウトバクミドのポリヘドリン遺伝子座にリファクタリングのために 機能単位として標的 ORF、上流・下流 500 bp を含む領域を挿入した。

結 果

p47、lef-8、lef-9、lef-4、DNA helicase (p143)、ie-1 のそれぞれについて、ORF ノックアウトバクミドのポリヘドリン遺伝子座に機能単位候補を導入したバクミドを作製した (図 1, 2)。

これらのバクミドに由来する子孫ウイルスを含む培養上清を用い、感染実験を行ったところ、一次感染細胞では、すべてのウイルスで GFP 蛍光が観察され、lef4 リファクタリングウイルス以外では二次感染細胞でもコントロールウイルスと同等の蛍光が確認された (図 3)。

考 察

本研究での type D の 6 遺伝子のリファクタリング実験から BmNPV でのリファクタリングの試みは概ね成功し、これらノックアウトウイルスが

type D であった原因は、機能単位に含まれる遺伝子がその原因であると結論できる。ORF ノックアウトウイルスでは、GFP 蛍光が観察されなかった 6 ノックアウトウイルスの全てで一次感染細胞レベルでは GFP 蛍光が観察され、lef-4 リファクタリングウイルスを除いて全てのリファクタリングウイルスでは、二次感染細胞での GFP 蛍光が復帰した。本研究では、機能単位に含まれる制御領域として ORF の上流・下流それぞれ 500 塩基を使用し、この領域がこれらリファクタリングウイルスの表現型復帰を担う機能単位として機能した。また、それぞれの遺伝子がもともと存在する遺伝子座以外で機能復帰が見られ、これらは独立した機能単位として機能することも認められた。

一方、lef-4 リファクタリングウイルスの二次感染能はコントロールウイルスと比較して著しく低い。lef-4 についてリファクタリングが成功しなかった原因について現段階では用いた機能単位では

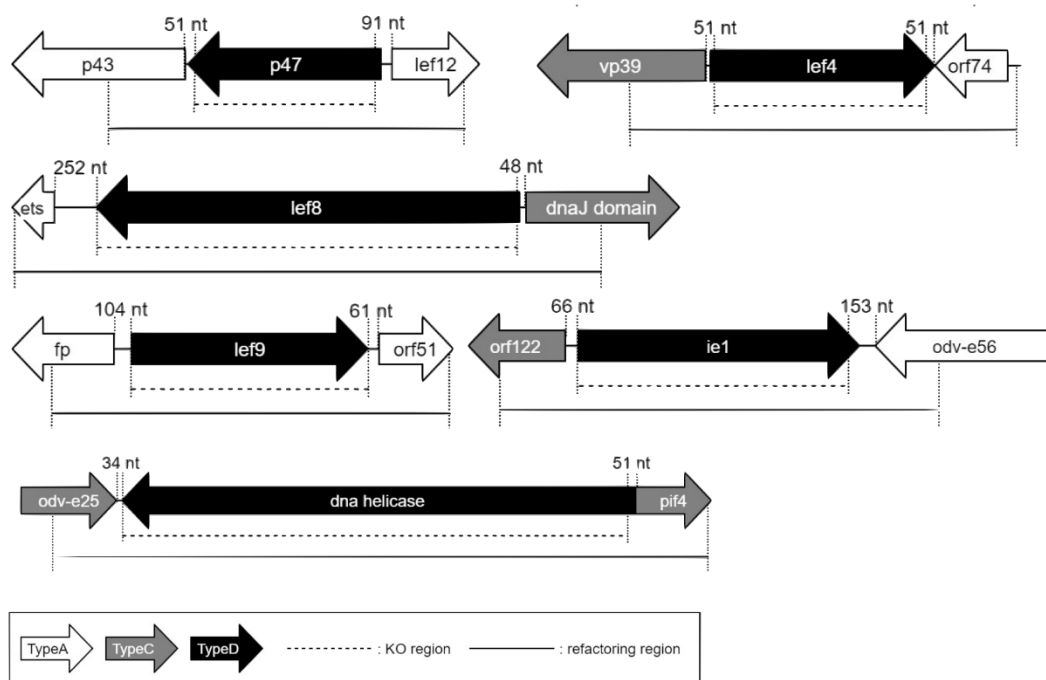


図 2. 本研究で選定した必須遺伝子のノックアウト領域とリファクタリング領域

矢印は ORF を示している。矢印の色はノックアウト時にポリヘドリンプロモーターに制御される GFP の発現が、コントロールウイルスとほぼ変わらない type A 遺伝子 (白)、二次感染細胞での GFP 蛍光が見られない type C 遺伝子 (灰色)、GFP 蛍光が全く見られない type D 遺伝子 (黒) を示している。

なく、ノックアウトバクミドにその原因があると考えている。lef-4 に隣接する vp39 は、ノックアウトすると二次感染能が失われる type C 遺伝子である (ONO *et al.* 2012)。lef-4 ノックアウト領域に vp39 プロモーターが含まれていた可能性がある : lef-4 ORF ノックアウトのために cat 遺伝子と置換した領域には、後期プロモーターモチーフの TAAG が存在していた。BmNPV 感染 BmN 細胞の全長 cDNA ライブラリー (KATSUMA *et al.* 2011) には、5 末端側が上述 TAAG と一致する転写産物が存在することからも、これが vp39 プロモーターであり、lef-4 ノックアウトによって vp39 の転写も抑制されたと推測される。今後、lef-4 ORF ノックアウトウイルスを vp39 機能単位も含めてリファクタリングし、この問題を明らかにしたい。

以上まとめると、本研究では ORF ノックアウトウイルスのポリヘドリン遺伝子座に機能単位を挿入し、機能単位が独立して機能することを検証することによって BmNPV ゲノムのリファクタリングを行った。リファクタリング可能な機能単位

の同定を進めることにより、1) 逆遺伝学解析で観察された表現型の原因遺伝子 (機能単位) を同定できるだけではなく、2) 現在、情報が少ないシスエレメント等の制御領域も含めた BmNPV ゲノム配列解析基盤を提供することができ、更に 3) BmNPV ゲノムを再設計する際の機能単位配列として利用可能となることが期待される。

BmNPV リファクタリングにより、BmNPV の遺伝学・ゲノム科学・合成生物学へ貢献していきたい。

文 献

- CHAN L. Y. *et al.* (2005): *Mol. Syst. Biol*, **1**: 0018.
 GOMI S. *et al.* (1999): *J. Gen. Virol*, **80**: 1323-1337
 KAPRANOV P. *et al.* (2007): *Nature Rev. Genet*, **8**: 413-423
 KATSUMA S. *et al.* (2011): *J. Gen. Virol*, **92**: 200-203
 ONO C. *et al.* (2007): *J. Insect Biotech. Sericol*, **76**: 161-167
 ONO C. *et al.* (2012): *Virus Res*, **165**: 197-206

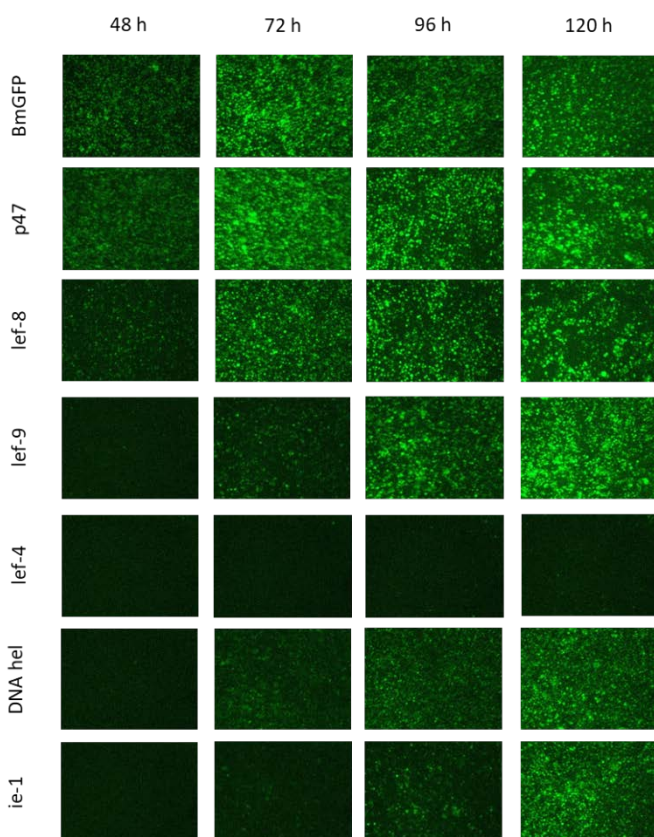


図 3. リファクタリングウイルス感染におけるポリヘドリンプロモーターからのレポーター発現の復帰
 トランスフェクションから 8 日後に回収した上清を BmN 細胞に播種し、48、72、96、120 時間後に EGFP 蛍光を観察した。パネルの各行ごとにリファクタリングした機能単位を含む遺伝子名、各列は観察したタイムポイント (h: 時間) を示している (感染実験時に血清を含む培地と交換した時間を 0 時間とした)。BmGFP, コントロールウイルス。

蛹変態に対する1齢期の栄養状態の影響

大森 裕介¹・金児 雄^{1,*}

¹弘前大学農学生命科学部

完全変態昆虫は複数の幼虫脱皮を行い、十分な大きさに達すると蛹へと変態する。幼虫脱皮時に、十分な大きさに達していると、脱皮後の齢期中に蛹への変態が行われる。この終齢脱皮時に必要とされる体の大きさについては、タバコスズメガ (*Manduca sexta*) において詳しく研究されている。終齢以前に、栄養価のほとんどない餌または絶食を行うと、通常では4回の幼虫脱皮を行い、終齢になるのに対して、過剰脱皮が引き起こされる (NIJHOUT, 1975)。カイコやタバコスズメガの幼虫の場合には、硬いクチクラで覆われる頭部や気門の大きさは、脱皮時にのみ成長し、その成長は Dyar's rule に従うことが知られている (NIJHOUT, 1994)。そこで摂食条件の操作により、発育の状態を変化させ頭幅を計測した結果から、頭幅が 5.1 mm より大きい場合には、脱皮後の齢期が終齢となり、それ以下の場合には、過剰脱皮が引き起こされ、5.1 mm の頭幅の大きさが Threshold になっていることがわかった。このことから、蛹への変態は、脱皮回数ではなく、一定の大きさに達することが重要であることがわかる。同様の現象は、他の昆虫種でも知られている。しかしながら、終齢への脱皮時にみられる Threshold 機構の分子機構については十分にわかっていない。

これまで我々はカイコを用いて、3 齢から絶食実験を行うことで、カイコにおいても同様の機構が存在するか、検証を行ってきた。しかし、3 齢時から絶食処理を行っても、過剰脱皮を誘導できな

かった (unpublished data)。このことから、カイコにおいては、Threshold 機構は存在しないと考えていた。しかしながら、本年、九州大学での各種カイコの系統において過剰脱皮が報告された。これは、本年の夏の気温が例年に比べて高かったことにより、桑の生育が十分でなく、栄養が十分に摂取できなかったことにより引き起こされた現象だと考えられる。そこで、九州大学において過剰脱皮が引き起こされた B80 系統を用いて、栄養価の低い人工飼料により、過剰脱皮を再現できるかを検証した。

材料と方法

1. 供試カイコ系統

本研究では、B80 系統を使用し、下記の人工飼料を利用し、25°C、12L:12D の明暗周期で飼育した。B80 系統は、終齢致死系統であるため、親蛾において終齢致死遺伝子に対する分子マーカーにて解析し、親蛾が、「標準型と終齢致死遺伝子のヘテロ型」と「標準型」の個体を掛け合わせることで、子の世代で致死遺伝子をホモで持たないことを確認して使用した。B80 系統は、NBRP を通じて、九州大学大学院研究院附属遺伝子資源開発研究センターから分譲して頂いた。

2. 人工飼料

人工飼料は、純系用シルクメイト PS および雑種

*責任著者

〒036-8561 弘前市文京町 3

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

用シルクメイト 2M（日本農産工業）を使用した。栄養状態の異なる人工飼料を用意するために、寒天粉末（ナカライテスク）を加え、シルクメイト 2M の比率を変えた餌を用意した。100%（シルクメイト 2M 28.6 g, 水 100 ml）、60%（シルクメイト 2M 20.2 g, 寒天 1.2 g, 水 100 ml）、30%（シルクメイト 2M 9.2 g, 寒天 2.1 g, 水 100 ml）、20%（シルクメイト 2M 5.9 g, 寒天 2.4 g, 水 100 ml）となるよう調整し、飼育に使用した。

結果と考察

低栄養下で過剰脱皮が誘導できるか検証するために、孵化直後から、100%、60%、30%の餌で飼育した。100%の餌を与えた 40 個体中 39 個体が、60%の餌を与えた 65 個体の場合は全ての個体が、5 齢へと脱皮した後に、蛹へ変態した。一方で、30%の餌を与えた場合では、34 個体中 5 個体が 4 齢で死亡し、残りの 29 個体全てが 5 齢期中に蛹へと変態することなく死亡した（図 1）。20%の餌を与えた場合、35 個体中 17 個体が 1 齢で、11 個体が 2 齢で、5 個体が 3 齢で、1 個体が 4 齢で死亡し、5 齢に脱皮できた個体はいなかった。また各齢期にかかる時間は、100%と 60%の餌では差異が認められず、また全ての条件において、6 齢へと過剰

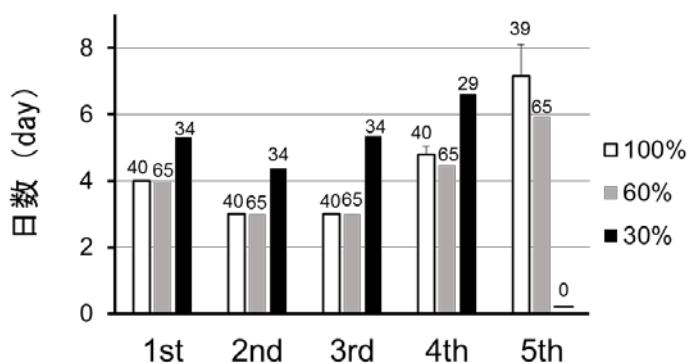


図 1. 各濃度のシルクメイト 2M での飼育にかかる日数 孵化直後から各濃度のシルクメイト 2M を与え、各齢期にかかった日数を計測した（平均値±SD）。バーの上の数字は、個体数を表している。

脱皮する個体は観察されなかった。これらのことから、B80 系統を人工飼料で飼育した場合は、タバコスズメガとは異なり、過剰脱皮はせずに死亡し、当初の想定と異なることが示唆された。100%、と 30%の餌で各齢の幼虫期間を比較すると、30%の餌を与えた場合には、1 齢から 4 齢のいずれの期間においても、100%に比べて、1 日から 2 日延長した（図 1）。

終齢に脱皮後に絶食を行うと、蛹変態に必要な critical weight を超えた後では、小さな蛹になり、終齢脱皮後 critical weight に達する前に絶食を行うと死亡することが一般的に知られている（EDGAR, 2006; KESHAN *et al.* 2015）。30%の餌を与えた場合には、終齢脱皮には十分な体重に達するが、終齢期において critical weight を超えるには十分でないと考えられる。また 20%の餌では、発育に十分な栄養が摂取できないことが考えられる。そこで今後、体重の推移および各齢への脱皮時における頭幅を計測することで、これら推定について検証を行いたい。その場合、20%と 30%の中間の餌を用いることで、過剰脱皮を誘導できるかもしれない。一方、九州大学では、過剰脱皮が観察されていることから、桑と今回用いたシルクメイト 2M の間で質的または量的に異なる成分が、過剰脱皮誘導に有効に働く可能性も考えられる。

30%の餌を与えた場合、変態せずに死亡したことから、1 齢または 1 齢と 2 齢において栄養価の高い餌を与えて、その後 30%の餌に移すことで蛹変態が誘導されるかを検証した。その結果、発育にかかる期間は、1 齢と 2 齢期間を純系用のシルクメイト PS を与えた個体の場合、1 齢のみシルクメイト PS を与えた個体に比べて、1 齢において 1 日延びた。一方、2 齢～5 齢期間は両方で差異がなかった（図 2）。1 齢のみシルクメイト PS に置き換えた場合は、50%（22 個体中 11 個体）が正常に蛹へと変態し、14%（22 個体中 3 個体）が幼虫と蛹の中間体になった。1 齢および 2 齢期間をシルクメイト PS に置き換え、その後 30%の餌に移し

たところ、26% (23 個体中 6 個体) が正常な蛹へと変態した。また 9% (23 個体中 2 個体) が幼虫と蛹の中間体になった。このことから、蛹への脱皮には、1 齢期間中に十分な餌を摂取することが重要であると考えられる。このことは、カイコの人工飼料を用い 1 齢のみを低栄養下にすると 6 齢へと脱皮することと矛盾しない (KATO and SUMIMOTO, 1968)。これまで、カイコを始め多数回脱皮する昆虫において最初の数齢期と後の齢期は

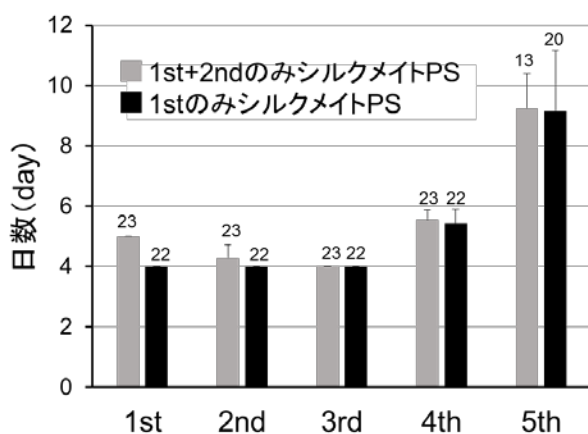


図 2. 各齢期にかかった日数.

孵化直後から 1 齢まであるいは 2 齢までシルクメイト PS を与え、その後、30%濃度のシルクメイト 2M に切り替えて、各齢期にかかった日数を計測した (平均値±SD)。バーの上の数字は、個体数を表している。

幼若ホルモンに対する応答性が異なるとされていた (FEYREISEN and JINDRA, 2012; SMYKAL *et al.* 2014)。しかし、本研究において、1 齢期と 2 齢期もまた、栄養に対する反応性が異なることが改めて示唆された。

本研究では、終齢への Threshold は確認できなかったが、B80 系統から終齢致死遺伝子座を正常ホモとした個体のみを用いることにより安定した結果が得られると考えられるので、本研究を足がかりに今後、栄養状態と変態の関係について、その機構の解明に繋げていきたい。

文 献

- EDGAR B. A. (2006): *Nature Rev Genet*, **7**: 907-916
- FEYREISEN R. and JINDRA M. (2012): *PLoS Genet*, **8**: e1002591
- KATO M. and SUMIMOTO K. (1968): *Anno. Zool. Japon*, **41**: 140-147
- KESHAN B. *et al.* (2015): *Eur. J. Entomol*, **112**: 632-641
- NIJHOUT H. F. (1975): *Biol. Bull*, **149**: 214-225
- NIJHOUT H. F. (1994): *Insect Hormones*, pp. 61-81. Princeton University Press.
- SMYKAL V. *et al.* (2014): *Dev. Biol*, **390**: 221-230

RNA-seq データからカイコ遺伝子オルソログを検出する方法

大野 瑞紀¹・川本 宗孝²・佐原 健^{3,*}

¹岩手大学連合農学研究科・²東京大学大学院生命農学研究科・³岩手大学農学部

チョウ目昆虫種間の染色体比較研究は、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により行われてきた。それらはモデルチョウ目昆虫であるカイコのゲノム情報を基盤とした、遺伝子オルソログの染色体上の座乗位置の比較によって進められてきた(PRINGLE *et al.* 2007; VAN'T HOF *et al.* 2008; 2013; YASUKOCHI *et al.* 2009; 2016; BAXTER *et al.* 2011; YOSHIDO *et al.* 2011; SAHARA *et al.* 2013; AHOLA *et al.* 2014)。その結果、チョウ目昆虫では染色体上の遺伝子配置が広く保存されていることが示された。このオルソログ配置保存性の必要性ならびに起源に迫るため、我々は、シロチョウ科の染色体進化に注目している。

シロチョウ科シロチョウ亜科に属する *Pieris napi* では、シーケンスデータより、ブロック単位の大規模な染色体変化が確認されている(HILL *et al.* 2018)。同じくシロチョウ亜科の *Pieris brassicae* と *Pieris rapae* では、2種の染色体間にはコリニ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いる(未発表)。これら *Pieris* 属数種の研究成果に加えて、シロチョウ亜科は、染色体数にばらつきがあることから(n=5, 12-32; ROBINSON 1971)、染色体に保存性のある他のチョウ目昆虫とは異なり、多数のリアレンジメントを起こしていることが示唆される。シロチョウ

ウ亜科と姉妹系統であるモンキチョウ亜科では、所属種の染色体数が1種を除き n=31 前後である(ROBINSON 1971)。n=31 は進化的なチョウ目昆虫の典型染色体数であることから (YASUKOCHI *et al.* 2016)、モンキチョウ亜科の種は、チョウ目昆虫に典型的な遺伝子配置の保存性をもつと予測される。シロチョウ科において、染色体コリニアリティーの存在しない近縁種同士を比較することは、遺伝子配置の保存性の意義を明らかにする糸口となるかもしれない。しかし、モンキチョウ亜科の細胞遺伝学的研究はほとんど存在しない。そこで我々は、カイコおよびシロチョウ亜科との染色体比較を目標とした、モンキチョウ亜科のモンキチョウ (*Colias erate*, n=31)染色体のマッピングを計画している。

BAC-FISH マッピングは、染色体上の遺伝子配置を視覚的に観察できることから、染色体比較を網羅的に行いたい場合に有効な方法である。染色体比較に用いる BAC のスクリーニングには、カイコ単一遺伝子オルソログ情報が必要である。近年の次世代シーケンス技術の発達により、大量の遺伝子情報の取得は、以前に比べ格段に容易になった。一方で、遺伝子オルソログを特定するビッグデータの効率的な情報処理が必要となった。

本研究では、モンキチョウの BAC セレクションに用いるカイコ単一遺伝子オルソログ情報を得るために、RNA-seq によりモンキチョウのトランスクリプトームデータを取得した。さらにオルソロ

*責任著者

〒020-8550 盛岡市上田 3-18-8

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

グを抽出するプログラムを開発し、網羅的な BAC-FISH マッピングに十分量のカイコ単一遺伝子オルソログを特定した。得られた遺伝子オルソログ群の染色体上の分布に偏りがあるかどうかを確認するために、セクションした遺伝子の染色体上の配置の可視化プログラム開発も同時に行った。

材料と方法

1. 供試昆虫

岩手大学構内でモンキチョウ雌複数個体を採集し、研究室内で採卵した。孵化幼虫は、アカツメクサとシロツメクサで室内飼育した。蛹 4 日の個体を RNAlater に保存(-20°C)し、RNA 抽出に用いた。

2. トランスクリプトーム(RNAseq)データの取得

蛹 4 日の雄雌それぞれ 1 個体から、NucleoSpin® RNA (MACHEREY-NAGEL)を用いて RNA を抽出した。混合 RNA 溶液を 1 サンプルとして、北海道システムサイエンス株式会社に Stranded mRNA-seq と *de novo* assemble を委託した。シーケンスには HiSeq 2500 (illumina, 1 lane, PE-100 bp, 4 Gb)を用いた。Raw data のクリーニングには cutadapt と Trimmomatic を利用し、アセンブラは Trinity を用いた。

3. カイコ単一遺伝子オルソログの特定手順

相同性の検定には、blast+ v2.2.31 (NCBI)を用いた。Assembled sequence data をクエリーに、カイコ GeneModel library 2017 (Lib. name KWMTBOMO, <http://silkbases.ab.a.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/index.cgi>) に対して tblastx 解析を行い、Hit Table を作成した。オルソログ候補の選出のために、新規に下記プログラム群を開発した(*Bombyx mori* Tool for Orthlog Picker; BmTOP, <https://github.com/mzkohno/BmTOP/>)。Blast_HitTable_THlister.c により、Hit Table から各 BLAST 結果の Top Hit results を抽出、リスト化を行った。解析に用いる Hit Table の最適

化は Blast_HitTable_lister.c により行った。出力 Hit Table より、Blast_HitTable_orthfin.c を用いてオルソログ候補を選出した。オルソログ候補の選出法は、下記 3 ステップにより行った。1) BLAST の結果 Top Hit したカイコ Gene model の ID が、他の配列の BLAST 結果にも存在した場合、その項目をリストから除外する。2) e-value と bit score のしきい値を設定し、Top Hit result がそれに満たない項目をリストから除外する。3) Top Hit result の e-value を Second Hit result の e-value で除算した結果が、設定したしきい値以上になる場合、リストから除外する。Top Hit の e-value が 0.0 の場合、Second Hit が $1e-50$ 以上のものを除外する。これらの条件により、特に配列の相同性が高いカイコ単一遺伝子オルソログを検出した。

4. 他の解析ツールとの比較

BmTOP の解析結果との比較を目的として、SonicParanoid (COSENTINO and IWASAKI 2018, <http://iwasakilab.bs.s.u-tokyo.ac.jp/sonicparanoid/>) によるカイコ遺伝子オルソログ候補の選抜を行った (Run mode: fast)。SonicParanoid 解析用アミノ酸配列は、上記 RNA-seq data から EMBOSS getorf (<http://emboss.sourceforge.net/apps/cvs/emboss/apps/getorf.html>) を用いて予測した。解析結果の比較には、遺伝子リスト間を比較する自作プログラム (BmCorTable_compariser_withorthlist.py)を利用した。ベン図は R (<https://www.r-project.org/>)により作成した。

5. カイコ染色体の *in silico* mapping

セクションした単一遺伝子のカイコ染色体上での座乗位置を、自作プログラムにより可視化した (gene_plotter.R, https://github.com/nkimoto/gene_plotter/)。実行には、Blast_HitTable_orthfin.c により出力した遺伝子オルソログリストと、GeneModel (2017)によって作成されたカイコ染色体情報 (Length_Silkbases.Sheet1.tsv)を利用した。

結果と考察

モンキチョウ RNA-seq から得られた Raw data は、4,053 Mb、リード数は、約 4,000 万リードであった。*de novo assemble* の結果、N50 が 1,357 base のコンティグを 64,764 得た。

表 1. しきい値とオルソログ数の対応表

		Threshold 1			
		1e-20	1e-40	1e-60	1e-80
Threshold 2	1e-20	2972	2725	2373	2018
	1e-40	2933	2688	2345	2006
	1e-60	2907	2661	2318	1986
	1e-80	2892	2645	2303	1972

Threshold 1: Maximum e-value of Top Hit result

Threshold 2: Maximum value of (Top hit e-value / Second hit e-value)

*All of score thresholds are 100.

Assembled sequence data をクエリーに用いて、カイコ Gene model (2017)への tblastx 解析を試みた。BLAST Hit Table から、自作プログラム群によるカイコ単一遺伝子オルソログの特定とリスト化を行った。カイコ単一遺伝子オルソログ候補を、様々なしきい値を設定して解析した(表 1)。左上が最も Rough に、右下が最も Sensitive な条件で解析した結果である。これら様々なしきい値でセレクト

ンされた遺伝子群を、カイコ染色体にそれぞれ *in silico* にマップした(図 1)。その結果、最も Sensitive に解析を行った場合でも、全ての染色体で BAC のセクションに十分な数のカイコ単一遺伝子オルソログを獲得できた(図 2)。われわれの研究目的は、全てのオルソログを特定することではなく、カイコ同一染色体上にバランス良く配置する、配列保存性と特異性の高い単一遺伝子オルソログを網羅的に獲得することであるため、Sensitive な条件での解析結果を用いるのが有効だと考えられる。

自作プログラム群の解析結果より得られたオルソログ数は、染色体の配列長に必ずしも依存しなかった(図 2)。例えば、カイコ第 15 染色体と第 22 染色体は、ほぼ同程度の配列長(約 18.5 Mb)だが、本研究で取得したオルソログ数には約 1.8 倍もの差があった。このような染色体ごとのオルソログ数の違いは、チョウ目昆虫の姉妹系統であるトビケラ目昆虫 RNA-seq data の解析でも同様に確認された(data not shown)。単一遺伝子オルソログが多く特定される染色体に偏りがあるという点で、チョウ目昆虫とトビケラ目昆虫種の差は無かった。ただし、本プログラムや本研究の検出方法にも偏りはあることは否定できない。

オルソログ検出用解析ツールの SonicParanoid を用いた解析からは、11,212 カイコ遺伝子がモンキ

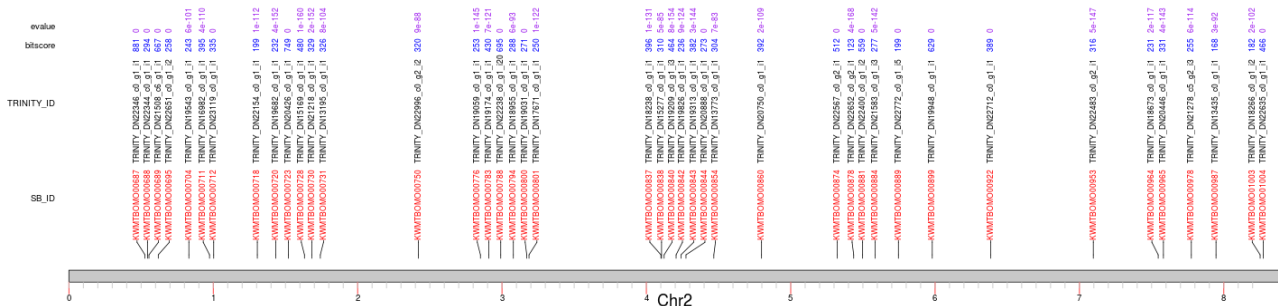


図 1. 解析データによるカイコ第 2 染色体の *in silico* mapping

しきい値を「Top Hit result の e-value 1e-80 以上または score 100 以下を除外」「Top Hit result の e-value を Second Hit result の e-value で除算した結果が 1e-50 以上のものを除外」としてセレクトした遺伝子を、カイコ染色体上に *in silico* mapping を行った。

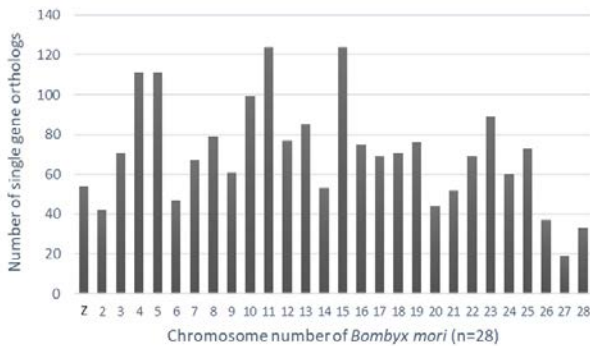


図2. カイコ染色体別のマーカー数

BmTOPにより、カイコ単一遺伝子オルソログとして最も Sensitive な条件でセレクションされた遺伝子が、カイコにおいてどの染色体上に座乗するかをカウントした。

チョウ遺伝子のオルソログとして検出された。本研究で最も Sensitive な解析結果 1,972 のうち 1,782 遺伝子が SonicParanoid により検出された遺伝子と重複した (図3)。つまり、BmTOP は、SonicParanoid よりも特異性の高い (単一遺伝子オルソログの可能性の高い) モンキチョウ遺伝子を特定できると考えられる。さらに、最も Sensitive な解析結果においても BmTOP 特異的な 190 遺伝子が特定できていることから、より高感度な可能性がある。

本研究で得られたカイコ単一遺伝子オルソログの分布は、少なくともカイコ染色体上においては全染色体上に広く分布することが確認できた (図1, 2)。モンキチョウと同じシロチョウ科モンキチョウ亜科に属するワタリオオキチョウのゲノムサイズは 345 Mb 前後であり、大きさはカイコの 7 割程度である (CONG *et al.* 2016)。これとモンキチョウのゲノムサイズが同程度だと仮定すると、本研究で得られた 1,972 オルソログはモンキチョウ全染色体 (n=31) も十分に網羅しうると考えられる。

本研究により、チョウ目昆虫種の RNA-seq データを利用した、BAC セレクションに用いる単一遺伝子オルソログの抽出に成功した。オルソログ解析のアプリケーションはこれまでにいくつか開発がされている (EBERSBERGER *et al.* 2009, EMMS and KELLY 2015, COSENTINO and IWASAKI 2018) が、目

的に応じて自作プログラムを構築することは、必要な情報が的確に抽出できることから、ビッグデータを分析する上で有効な手段である。カイコ単一遺伝子オルソログを任意のしきい値でリスト化、可視化できるプログラムの存在は、今後チョウ目昆虫のみならずトビケラ目昆虫におけるゲノム比較研究の一助となるだろう。本研究で得られたカイコ単一遺伝子オルソログ情報を利用した BAC のセレクションならびにモンキチョウ染色体の FISH マッピングによる他のチョウ目昆虫種との染色体比較研究を画策している。

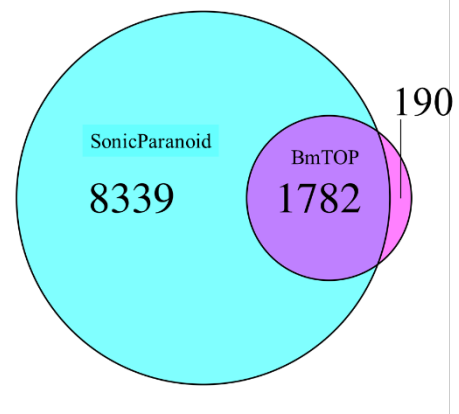


図3. SonicParanoid と BmTOP 解析結果の比較

BmTOP で最も Sensitive な解析により特定されたモンキチョウ 1,972 遺伝子のうち、190 が SonicParanoid では検出できなかった。図は R により作成した。

謝 辞

本研究の遂行に当たり、gene_plotter.R の開発にご助力いただきました 木本直樹氏にお礼申し上げます。

文 献

- AHOLA V. *et al.* (2014): Nature Communications, **5**: 4737
 BAXTER S.W. *et al.* (2011): PLoS ONE, **6**: e19315
 CONG Q. *et al.* (2016): Genome Biol. Evol, **8**(3):915-31

- COSENTINO S. and IWASAKI W. (2018): *Bioinformatics*, **35(1)**: 149-151
- EBERSBERGER I. *et al.* (2009): *BMC Evol. Biol.*, **9**: 157
- EMMS DM. and KELLY S. (2015): *Genome biology* **16(1)**: 157
- HILL J. *et al.* (2018): *bioRxiv*, 233700
- PRINGLE E. G. *et al.* (2007): *Genetics*, **177**: 417-426
- ROBINSON R. (1971): Pergamon, Oxford
- SAHARA K. *et al.* (2013): *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **43**: 644-653
- VAN'T HOF A. E. *et al.* (2008): *PLoS ONE*, **3(12)**: e388
- VAN'T HOF A. E. *et al.* (2013): *Heredity*, **110**: 283-295
- YASUKOCHI Y. *et al.* (2009) *PLoS ONE*, **4(10)**: e7465
- YASUKOCHI Y. *et al.* (2016): *Heredity*, **116(1)**: 75-83
- YOSHIDO A. *et al.* (2011): *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **41**:370-377

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

印 刷 平成 30 年 12 月 28 日

発 行 平成 30 年 12 月 28 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

