

東北蚕糸・昆虫利用研究報告

第 46 号

令和 3 年 12 月

日本蚕糸学会東北支部

No.46 目 次

依田 直哉 北島 博 鈴木 剛 藤本 章晃 安河内 祐二 佐原 健	コウモリガにおける BAC ライブラリー構築 1
竹内 悠真 佐原 健	ミトコンドリア配列が異なるキタキチョウの簡易判別法 6
小原 聡大 竹村 洋子 酒井 弘貴 佐原 健	カイコ <i>Sxl</i> 変異系統の維持について 12
佐藤 拓海 浅野 眞一郎 佐藤 昌直	組織透明化を利用した BmNPV 感染観察の高感度化 17
西出 雅成	蚕を利用した教育活動 23
大森 裕介 金児 雄	人工飼料と桑葉による p50 と錦秋×鍾和の発育比較 28

コウモリガにおける BAC ライブラリー構築

依田 直哉¹・北島 博²・鈴木 剛³・藤本 章晃¹・安河内 祐二⁴・佐原 健^{1,*}

¹岩手大学農学部・²森林研究・整備機構・³大阪教育大教育協働学科・

⁴農業・食品産業技術総合研究機構

(2021 年 12 月 1 日受理)

鱗翅目昆虫は昆虫綱のなかで 2 番目に種数が多く、これまでに約 16 万種が記載されている (KRISTENSEN *et al.* 2007; van NIEUKERKEN 2011)。モデル鱗翅目昆虫のカイコ (*Bombyx mori*) は益虫であるのに対し、多くの農林害虫を含む。また、愛玩昆虫としての蝶類なども、我々の生活に密接に関係している。

鱗翅目昆虫における染色体研究は、20 世紀初頭の染色体カウントから始まった (ROBINSON, 1971)。鱗翅目昆虫における初の全染色体同定は、カイコにおいて成し遂げられた (YOSHIDO *et al.* 2005)。その後、ゲノム情報が豊富なカイコを利用した、BAC-FISH (bacterial artificial chromosome- fluorescence *in situ* hybridization) 法、分子連関解析や次世代シーケンス技術によるゲノム比較などにより鱗翅目昆虫の染色体比較研究が行われた (PRINGLE *et al.* 2007; BELDADE *et al.* 2009; YASUKOCHI *et al.* 2009; BAXTER *et al.* 2011; YOSHIDO *et al.* 2011; THE HELICONIUS GENOME CONSORTIUM 2012; SAHARA *et al.* 2013; VAN'T HOF *et al.* 2013; YOU *et al.* 2013; AHOLA *et al.* 2014; YASUKOCHI *et al.* 2016; WAN *et al.* 2019)。これら染色体比較が行われた 10 種では、カイコ染色体との対応関係が存在し、オ

ルソログ遺伝子の配置も高く保存されていた。故に、進化的な鱗翅目昆虫においてはコリニアリティーが存在すると示唆された。例外として、シロチョウ科 *Pieris* 属のモンシロチョウ (*P. rapae*) とエゾスジグロシロチョウ (*P. napi*) はカイコと染色体構成が大きく異なる (NALLU *et al.* 2018; HILL *et al.* 2019)。

コウモリガ科 (*Hepialidae*) に属するコウモリガ (*Endoclita excrescens*) の幼虫は広食性であり、トウモロコシやジャガイモなど作物の幹や枝に穿孔し、芯の部分を食べる。また、ブドウやモモなどの多くの果樹では、樹勢の低下や枯死を引き起こす害虫として知られている (高橋, 1963; 石井・保坂, 1964)。コウモリガの所属する原始的なグループでは、染色体進化に関するマッピング情報は乏しい。このため、OKUMURA *et al.* (2019) によりコウモリ BAC ライブラリーが作製され、カイコとコウモリガの染色体比較解析が始められた (小林, 未発表)。しかし、カイコ単一オルソログを含むコウモリガ BAC クローンの選抜が十分に行えず、マッピングは一部の染色体にとどまった。

FRAÏSSE *et al.* (2017) が研究対象としたコウモリガ科 *Thitarodes sylvina* のゲノムサイズは、

*責任著者

〒020-8550 盛岡市上田 3-18-8

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

約 1.8 Gb と推定された。また、シネンシストウチュウカソウ (*Ophiocordyceps sinensis*) の宿主である中国産 *Thitarodes* sp. のドラフトゲノムサイズは、3.2 Gb と報告されている (CHENG *et al.* 2016)。カイコのゲノムサイズは、約 460 Mb (KAWAMOTO *et al.* 2019)、コナガ (*Plutella xylostella*) のゲノムサイズが約 370 Mb (JOURAKU *et al.* 2013) であることを考慮すると、コウモリガ科の種は鱗翅目昆虫としては非常に大きなゲノムを持っている可能性が考えられる。OKUMURA *et al.* (2019) が構築したコウモリガ BAC ライブラリーの総インサートサイズは約 2 Gb と推定される。ゲノムリダンダンシーを考慮すると、小林 (未発表) の選抜した、カイコ単一遺伝子オルソログを含むコウモリガ BAC クローンが 69 に留まったのは、ライブラリーのゲノムカバー率の低さが影響した可能性も否めない。染色体の対応関係を網羅的に比較するためには、1 染色体あたり 4 以上のマーカーを必要とする。小林 (未発表) では、カイコ単一オルソログ含む BAC を複数獲得できていない染色体が存在し、研究完遂にはさらなる BAC 選抜が必要と考えられた。そこで、本研究では新規のカイコオルソログ含有コウモリガ BAC を効率的に選抜するために新規コウモリガ BAC ライブラリーの構築を行った。

材料と方法

1. BAC ライブラリー作製

作製に用いたコウモリガ高分子 (HMW) DNA は、OKUMURA *et al.* (2019) にて単離、作製されプラグを分譲いただいた。プラグ作製までの手順は、OKUMURA *et al.* (2019) に記載された通りである。プラグ中の HMW DNA を

*Hind*III (TaKaRa) にて部分消化し、低融点アガロースゲルを用いて CHEF Mapper® XA システム (Bio-Rad) によるパルスフィールド電気泳動を行った。約 100~190 Kb に相当する HMW DNA 分画よりゲルの切り出しを行った。以上の作業を 2 度行い、1 度目の作業で分画 1 (切り出し位置 120~140 Kb) 分画 2 (140~165 Kb) 分画 3 (165~190 Kb)、2 度目の作業で分画 4 (100~120 Kb) 分画 5 (120~140 Kb) を切り出した。それぞれの分画から *Hind*III 処理済み DNA をゲル抽出した。抽出した HMW DNA は、*Hind*III 消化済み pBeloBAC11 にライゲーションした。ライゲーション済みプラスミドをエレクトロポレーション (GENE PULSER II, BIO-RAD, 1.25 kV もしくは 1.5 kV, 25 μ F, 100 Ω) にてコンピテントセル HST08 Premium Electro-Cells (TaKaRa) に導入した。形質転換体は、X-gal と IPTG を塗布したクロラムフェニコール (12.5 μ g/ml) 入りの寒天培地で培養した。青白判別により、白コロニーをインサートありと判定・選抜した。クロラムフェニコール (10 μ g/ml) と 8%グリセロール入り LB 溶液を分注した 384 well プレートに、白コロニーのみを各 well につき 4 もしくは 8 コロニー植菌し、37 $^{\circ}$ C で over night 培養し-80 $^{\circ}$ C にストックした。また、384 well プレートの列 (1-24) (x プール) と行 (A-P) (y プール) から菌体が培養された LB 溶液を集菌し、それぞれの列と行に相当する混合クローン (x プール: 64 もしくは 128 クローン、y プール 48 もしくは 96 クローン) が含まれている溶液を作製し、LB 溶液でスケールアップした。この溶液から BAC-DNA を抽出することで x ならびに y の DNA プールとした。さらに、16 行の y-DNA プールを混合して各プレートの BAC-DNA プールとした。

2. BAC ライブラリーのインサートサイズ推定

ストック前のシングルコロニーを無作為選抜し、BAC-DNA をアルカリ SDS 法にて抽出した。抽出した BAC-DNA は *NotI* (New England BioLabs) を用いて 37 °C で 5 時間処理した。制限酵素処理済み BAC-DNA は、1% Pulsed Field Certified Agarose (Bio-Rad) ゲルを用い、CHEF Mapper® XA システムでパルスフィールド電気泳動を行った。 λ -*HindIII* (TaKaRa) と λ -ladder (New England BioLabs) マーカーを基準とし、片対数グラフを用いて切断されたインサート DNA のサイズを推定した。

結果と考察

1. BAC ライブラリーの評価

BAC ライブラリー作製に用いたそれぞれの分画の平均インサートサイズは、分画 1 が 42.5 Kb、分画 2 が 45.5 Kb、分画 3 が 36.0 Kb、分画 4 が 41.1 Kb、分画 5 が 56.1 Kb と推定された。それぞれの分画からストックしたクローン数は、10,752、29,276、12,820、12,496 ならびに 5,312 で、本研究で作製したコウモリガ BAC ライブラリーは総クローン数 70,656、推定総塩基配列長は、約 3.06 Gb と算出された。既存のコウモリガ BAC ライブラリー (OKUMURA *et al.* 2019) との合計塩基長は、約 5 Gb と推定された。本研究で用いたコウモリガ (*Endoclita excrescens*) は、FRAÏSSE *et al.* (2017) や CHENG *et al.* (2016) によりゲノムサイズが推定された *Thitarodes* 属とは別属ではあるが、類似したゲノムサイズを持つと仮定すると、2つのコウモリガ BAC ライブラリーの総塩基長は、約 1.7 もしくは 2.8 ゲノム分に相当する。よって、2

つのコウモリガ BAC ライブラリーを併せて、ゲノム全体をほぼ網羅するライブラリーが構築されたと推定される。

これまでの BAC ライブラリー構築の際、我々は 384 well プレーートの各 well に 1 コロニーの BAC クローンが植菌していた。一方、本研究では、コウモリガの大きなゲノムサイズを考慮して各 well に 4 もしくは 8 の形質転換体のコロニーを植菌した。その結果、より少ないプレート枚数で多くの BAC クローンをストックするライブラリーが構築できた。一方、平均インサートサイズは、OKUMURA *et al.* (2019) のライブラリーと比べ約 23 Kb も小さかった。その要因は定かではないが、長期保存によるプラグ内の HMW DNA の劣化もしくは PFGE 装置など機器の問題、実験実施者の技術的問題などが考えられる。

-80 °C ストックスペース有効活用に well あたりの複数コロニー植菌は寄与するものの、本ストック法ではプレート、x および yDNA プールを用いた BAC クローンの PCR による well 特定の後、複数クローンからの再選抜を余儀な

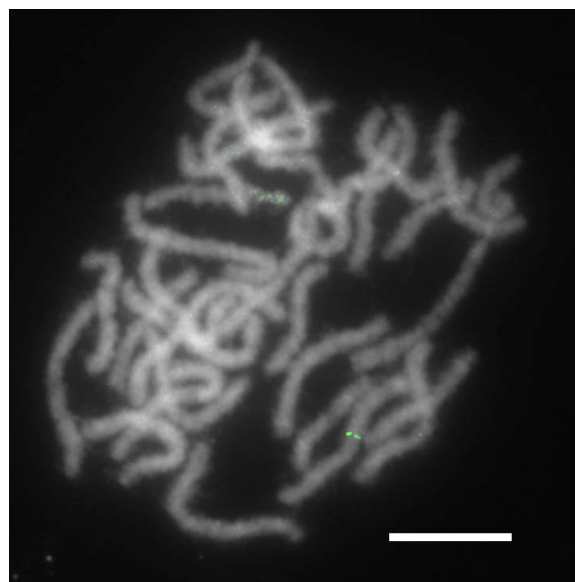


図 1. 新規コウモリガ BAC ライブラリーから選抜した BAC クローンを用いた BAC-FISH スケールバー、10 μ m

くされる。これは筆者らの体感であるが、各 well に 8 コロニーを植菌したプレートは、4 コロニー植菌プレートに比べ目的の BAC クローンを抽出できない確率が高かった。従って、各 well に植菌するクローンは 4 つ以内を推奨する。

2. BAC-FISH マッピングに向けて

小林(未発表)の研究では、コウモリガ cDNA ライブラリーを構築し、サンガーシークエンスされた配列情報をカイコゲノム情報に blast サーチしてカイコオルソログを特定していた。次世代シークエンス技術の向上と低価格化は、我々エンドユーザーの利用機会を飛躍的に高めた。また、カイコオルソログを検出できるツールである BmTOP (Ohno *et al.* 2020) も開発されている。

コウモリガ RNA-seq と BmTOP による解析の結果、我々はこれまでに、カイコ単一遺伝子オルソログを含む可能性のある 1,452 個コウモリガ配列を検出している。この配列情報の真贋についてはさらに検討を必要とするものの、一部プライマー作製をおこない、前述した PCR 特定と BAC クローン選抜の感触を掴んだ。

小林(未発表)では 115 contigs から 69 のオルソログを含むコンティグを検出し、40 BAC クローンを選抜している。今後、必要に応じた PCR 選抜を行い、コウモリガ BAC-FISH マッピングを実施したい。なお、本研究で構築したコウモリガ BAC ライブラリーから選抜した BAC クローンを用いた BAC-FISH においても、OKUMURA *et al.* (2019) と同様の特異的プロンプシグナルが検出できている (図 1)。

文 献

- AHOLA V. *et al.* (2014): *Nature Comm*, **5**: 4737
BAXTER S.W. *et al.* (2011): *PLoS ONE*, **6**: e1931
BELDADE P. *et al.* (2009): *PLoS Genetics*, **5**: e1000366
CHENG L-R. *et al.* (2016): *Insect Sci*, **23**: 326–329
FRAÏSSE C. *et al.* (2017): *Nature Comm*, **8**: 1486
HILL J.A. *et al.* (2019): *Sci. Adv*, **5**, eaau3648
石井賢二・保坂徳五郎 (1964): *植物防疫*, **18**, 49–52
JOURAKU A. *et al.* (2013): *BMC Genomics*, **14**: 464
KAWAMOTO M. *et al.* (2019): *Insect Bioch. Mol. Biol*, **107**: 53–62
KRISTENSEN N.P. *et al.* (2007): *Zootaxa*, **1668**: 699–747
NALLU S. *et al.* (2018): *Nat. Ecol. Evol*, **2**, 1418
van NIEUKERKEN E.J. *et al.* (2011): *Zootaxa*, **3148**: 212–221
OHNO M. *et al.* (2020): *J. Insect Biotech. Seric*, **89**, 1–7
OKUMURA A. *et al.* (2019): *Entomol. Sci*, **22**: 167–172
PRINGLE E.G. *et al.* (2007): *Genetics*, **177**: 417–426
ROBINSON R. (1971): *Pergamon Press, Oxford*, 687pp
SAHARA K. *et al.* (2013): *Insect Biochem. Mol. Biol*, **43**: 644–653
高橋保雄 (1963): *植物防疫*, **17**: 107–112
THE HELICONIUS GENOME CONSORTIUM (2012): *Nature*, **487**: 94–98
VAN'T HOF A.E. *et al.* (2013): *Heredity*, **110**: 283–295
WAN F. *et al.* (2019): *Nature Comm*, **10**: 1–14
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

YOU M. *et al.* (2013): *Nature Genet*, **45**: 220–225

ミトコンドリア配列が異なるキタキチョウの簡易判別法

竹内 悠真・佐原 健*

岩手大学農学部

(2021年12月2日受理)

ボルバキアは α -プロテオバクテリア綱に属する共生細菌である (O'NEIL *et al.* 1992)。節足動物やフィラリア線虫の体内に共生し、特に節足動物においては約 40%が感染していると言われている (ZUG and HAMMERSTEIN 2012)。共生細菌であるボルバキアは、宿主の生殖に対して様々な影響を及ぼす。その影響は大まかに、細胞質不和合、雌化、雄殺し、単為生殖の 4 種類に分けられる。これらは、ボルバキアが効率良く母系伝播し、繁栄するための戦略であると考えられる (WERREN *et al.* 2008)。細胞質不和合は最も事例の多い生殖操作で、ボルバキア感染雄と非感染雌の交配では卵が正常に孵化しない現象である。これにより非感染雌の繁殖が不利となり、感染雌の適応度が増加する (WERREN, 1997)。よって、感染が広まるに連れ、ミトコンドリア遺伝子が感染型へと均質化する (RAYCHOUDHURY *et al.* 2010)。

キタキチョウ (*Eurema mandarina*) は、鱗翅目昆虫シロチョウ科に属する。キタキチョウは成虫前翅縁毛の色、日長と温度による季節型発現、成虫の卵巣成熟までの期間、幼虫期の食草の違いから (KATO, 2000)、かつて同種であったミナミキチョウ (*Eurema hecabe*) とは別種に分類された (加藤・矢田, 2005)。キタキチョウは北海道及び東北北部を除く日本全土から琉球

列島にかけて分布しており、ミナミキチョウは奄美大島以南に分布している。

キタキチョウには異なる 2 系統のボルバキアが感染している。細胞質不和合を起こす wCI と雌化を起こす wFem である (HIROKI *et al.* 2002; 2004)。wCI は、東北北部と対馬の個体を除いて感染が認められるのに対して、wFem は種子島と沖縄本島の一部で発見にとどまる (HIROKI *et al.* 2005; NARITA *et al.* 2006; 2007a)。wCI 系統のゲノム配列は、ミナミキチョウに感染し細胞質不和合を引き起こすボルバキア系統の配列と一致性がある。ミナミキチョウは、全個体がボルバキアに感染している。キタキチョウには非感染個体が発見されている。これらのことから、過去にミナミキチョウからキタキチョウへ水平伝搬が起こったことが wCI の由来と推測される (NARITA *et al.* 2006)。また、核遺伝子の系統関係を調べると、キタキチョウとミナミキチョウに分岐するが、ミトコンドリア配列の ND5、16S rRNA、COI および COIII を用いて系統解析を行うと、種に関わらず感染個体と非感染個体に分岐する (NARITA *et al.* 2006; MIYATA *et al.* 2017; 2020)。これらのことから、ミナミキチョウのボルバキアがキタキチョウへと水平伝搬したと結論づけられる (NARITA *et al.* 2006; MIYATA *et al.* 2020)。

*責任著者

〒020-8550 盛岡市上田 3-18-8

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

先行研究によると、対馬を除く、本邦南部から盛岡市までの全ての個体群が wCI に感染していた (NARITA *et al.* 2007b)。ところが最近、盛岡市で非感染個体が確認された (佐々木, 未発表)。その由来について、非感染系統個体なのか、感染していたボルバキアが脱落した個体なのかは不明であった。我々は研究対象地域を東北地方太平洋沿いに広げ、キタキチョウのボルバキア非感染個体の由来を調査することを計画している。

非感染キタキチョウの由来の特定は、ミトコンドリア配列を確認すればよい (NARITA *et al.* 2006; MIYATA *et al.* 2017; 2020)。しかし、大量の個体を配列特定するにはコストがかかる。そこで本研究では、ミトコンドリア遺伝子配列がキタキチョウ型かミナミキチョウ型かを簡便に識別できる PCR 法の確立に取り組んだ。先行研究 (NARITA *et al.* 2006) で公表されているキタキチョウおよびミナミキチョウの ND5 配列を参考にプライマーを設計し、キタキチョウ型とミナミキチョウ型の簡易識別に成功した。

材料と方法

1. 供試昆虫

供試昆虫は 2021 年 5 月 6 日に岩手県盛岡市 (39°44'30"N 141°16'10"E) で採集した非感染キタキチョウと 2021 年 4 月 24 日に福島県福島市 (37°48'31"N 140°30'27"E) で採集した感染キタキチョウを供試した。

2. DNA 抽出

キタキチョウの脚 2 本と Φ 1.5 mm のビーズ

6 個を 100 μ l STE buffer 中に入れビーズクラッシャー (BEADS CRUSHER, TAITEC) を用いて破碎した。破碎後、20 mg/ml の Proteinase K (Promega) を 2 μ l 加え、50 °C 30 分、92 °C 5 分の熱処理を施した。15,000 rpm、5 分で組織を沈殿させ、上清を DNA 抽出液として PCR テンプレートに用いた。

3. ボルバキア検出

PCR によりボルバキア感染の判定を行った。プライマーは、wsp81F と wsp691R を用いた (ZHOU *et al.* 1998)。PCR 条件は 94°C 2 分処理の後、94 °C 30 秒、53 °C 30 秒、72 °C 30 秒を 35 回繰り返す、72 °C 5 分で伸長完了させた。PCR 後、2%アガロースゲル電気泳動により PCR 産物増幅の有無とサイズ確認を行った。

4. ND5 シーケンスとプライマー設計および PCR 条件

ND5 配列増幅には、プライマー V1 と A1 を用いた PCR を行い (YAGI *et al.* 1999)、PCR 産物を pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega) を用いてクローニングした。大腸菌からのプラスミド DNA 抽出は、QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を使用し、抽出したプラスミド DNA の配列決定を北海道システムサイエンス株式会社に依頼した。

今回シーケンスにより決定された ND5 配列と先行研究 (NARITA *et al.* 2006) により決定された ND5 配列は、ClustalW を用いてマルチプルアラインメントを行い、キタキチョウ型とミナミキチョウ型で異なっている多型サイトが共通であることを確認した (図 1)。多型サイトをターゲットに目的バンド長が 133 bp となる

由来	採集地	配列		accession No*
		565	585	684
キタキチヨウ (非感染)	仙台	...TTAATAAGATTAATTTTCGGG...	...ATTGGATTATTAAT...	AB194755
キタキチヨウ (非感染)	盛岡	...TTAATAAGATTAATTTTCGGG...	...ATTGGATTATTAAT...	(本研究)
ミナミキチヨウ	波照間	...TTAATAAGATTAATTTTCGGG...	...GTTGGTTATTAAT...	AB194764
キタキチヨウ (感染)	新潟他	...TTAATAAGATTAATTTTCGGG...	...GTTGGTTATTAAT...	AB194760
キタキチヨウ (感染)	福島	...TTAATAAGATTAATTTTCGGG...	...GTTGGTTATTAAT...	(本研究)

← 共通フォワードプライマー
← リバースプライマー

図 1. ND5 の一部配列アラインメント

赤字はキタキチヨウ型とミナミキチヨウ型での多型サイト（リバースプライマーサイト）と共通フォワードプライマーサイト。 *NARITA *et al.* (2006) 参照もしくは本研究データ

プライマーを設計した。本プライマーは、ミナミキチヨウ型とキタキチヨウ型それぞれリバース配列を 15 塩基と短く設計されている（図 1）。キタキチヨウ型の 3'末端と 3'末端から 7 番目がそれぞれ T に対し、ミナミキチヨウ型ではそれぞれ C である。設計したプライマーは、共通するフォワードが EmND5_F1 (5'-TTAATAAGATTAATTTTCGGG-3')、リバースは、ミナミキチヨウ型 EmND5P_R1 (5'-ATTAATAA**C**CCAA**A**C-3') とキタキチヨウ型が EmND5N_R2 (5'-ATTAATAA**T**CCAA**A**T-3') である（図 1 参照）。プラスミド DNA を 0.1 ng、キタキチヨウの脚から直接抽出した DNA は 0.5 ng をテンプレートとしてアニール温度をグラディエントとした PCR を行った。PCR 反応液は、25 mM dNTP mixture 2 μ l、10 \times standard buffer (NEB) 2 μ l、10 mM プライマー各 0.5 μ l、Taq polymerase (NEB) 1U を滅菌水にて 20 μ l にボリュームアップして用いた。プラスミド DNA をテンプレートにミナミキチヨウ型プライマーを用いる PCR の場合には、94 $^{\circ}$ C 2 分処理の後、94 $^{\circ}$ C 30 秒、45 $^{\circ}$ C~57 $^{\circ}$ C 1 分、72 $^{\circ}$ C 30 秒を 40 回繰り返して、72 $^{\circ}$ C 5 分で伸長完了させた。キタキチヨウの脚から抽出した DNA をテンプレートに用いる PCR の場合には、アニール温度を 45 $^{\circ}$ C~51 $^{\circ}$ C に変更した。キタキチヨウ型リバースプライマーを使用する場合、アニール

温度は 40 $^{\circ}$ C~51 $^{\circ}$ C とした。PCR 産物 10 μ l を 2% アガロースゲルで電気泳動した。

結果と考察

1. ミナミキチヨウ型プライマーによる PCR

プラスミド DNA を用いた場合、感染キタキチヨウ由来（ミナミキチヨウタイプ）では、アニール温度 45 $^{\circ}$ C~51.84 $^{\circ}$ C（図 2Aa-g）まではっきりとした増幅産物が、53.16 $^{\circ}$ C（図 2Ah）ではごく薄い増幅産物が認められた。これに対

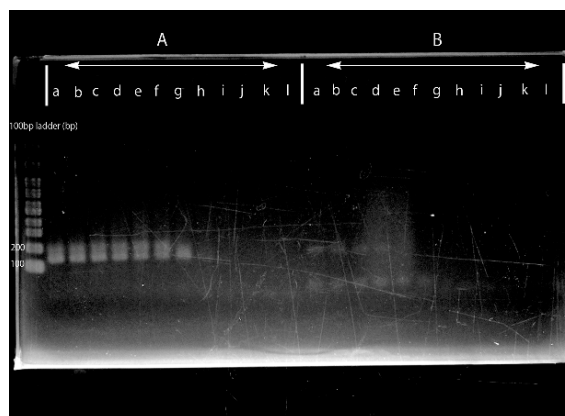


図 2. プラスミド DNA をテンプレートにしたミナミキチヨウ型プライマーによる PCR 増幅確認
A: 感染キタキチヨウ ND5 が導入されたプラスミド DNA の実験区; B: 非感染キタキチヨウ ND5 が導入されたプラスミド DNA の実験区; アニール温度は a: 45 $^{\circ}$ C; b: 45.36 $^{\circ}$ C; c: 46.08 $^{\circ}$ C; d: 47.28 $^{\circ}$ C; e: 48.96 $^{\circ}$ C; f: 50.28 $^{\circ}$ C; g: 51.84 $^{\circ}$ C; h: 53.16 $^{\circ}$ C; i: 54.96 $^{\circ}$ C; j: 56.16 $^{\circ}$ C; k: 56.88 $^{\circ}$ C; l: 57 $^{\circ}$ C。マーカーは 100 bp DNA ladder。B 区にプライマーダイマーが検出される場合がある。

し、非感染キタキチョウ由来（キタキチョウタイプ）では、45 °C~47.28 °C（図 2Ba-d）でごく薄い増幅産物が認められた。この結果より、48.96 °C~51.84 °Cの間には、PCR 増幅産物の有無による相違が認められ、ミナミキチョウ型（感染）とキタキチョウ型（非感染）を識別できた。

脚から直接 DNA 抽出を行ったテンプレートで PCR を行った結果、感染キタキチョウでは、アニーリング温度 45 °C~46.98 °Cにおいて明瞭な増幅産物が認められた（図 3Aa-c）。アニーリング温度 47.67 °C~48.82 °C（図 3d-e）では薄い

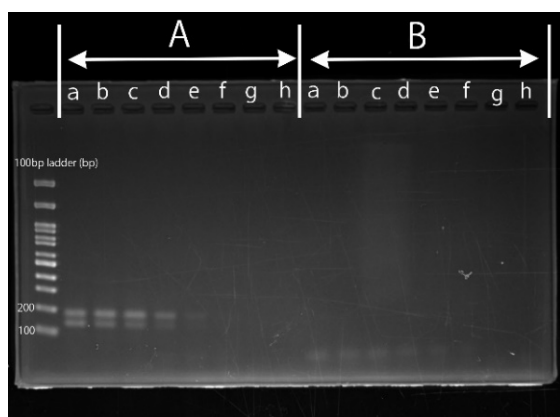


図 3. 脚からの DNA 抽出液をテンプレートにしたミナミキチョウ型プライマーによる PCR 増幅確認
A: 感染キタキチョウをテンプレートにした実験区;
B: 非感染キタキチョウをテンプレートにした実験区;
アニーリング温度は a: 45 °C; b: 46.14 °C; c: 46.98 °C; d: 47.64 °C; e: 48.82 °C; f: 49.08 °C; g: 49.98 °C; h: 51 °C。マーカーは 100 bp DNA ladder。B 区にプライマーダイマーが検出される場合がある。

増幅産物が認められた。一方、非感染キタキチョウでの増幅は、最低アニーリング温度の 45 °Cからすべての温度で認められなかった（図 2Ba-h）。プラスミド DNA の場合と比べ、識別できる温度は低くなるがキタキチョウ型（非感染）とミナミキチョウ型（感染）を識別することが可能であった。なお、予定長よりも長い（約 190 bp）PCR 産物が認められた（図 2A）。ヘテロダイマー形成などが考えられるが、現状での簡易判別に影響をおよぼすものではない。

2. キタキチョウ型プライマーによる PCR

プラスミド DNA を用いた場合、非感染キタキチョウ由来（キタキチョウタイプ）では、40 °C~43.63 °C（図 4①Ba-e）まではっきりとした増幅産物が得られ、44.84 °C（図 4①Bf）ではごく薄い増幅産物が認められた。これに対し、感染キタキチョウ由来（ミナミキチョウタイプ）では 40 °C~40.33 °C（図 4①Aa-b）でごく薄い増幅産物が認められた。

キタキチョウの脚から直接 DNA 抽出を行ったテンプレートで PCR を行った結果、非感染キタキチョウではアニーリング温度 40 °C~40.99 °C（図 4②Ba-c）で、ミナミキチョウタイプでは 40 °C~40.33 °C（図 4②Aa-b）でごく薄い増幅産物が認められた。プラスミド DNA では、42.09 °C~44.84 °Cまでミナミキチョウ型（感染）とキタキチョウ型（非感染）を識別できる可能性はあった。しかし、キタキチョウの脚から直接抽出した DNA では、増幅産物が薄く、アニーリング温度 40.33 °Cと 40.99 °Cといった低アニーリング温度による増幅差しか認められない。また、追加実験では、増幅産物は全く認められない場合もあった。アニーリング温度が低く安定性にかけることから、このプライマーセットによる識別は極めて難しいと判断した。

これらのことから、増幅の有無により配列差の検出には、15 塩基の短い配列の中で GC 比率に差を付けることと、3'末端に対応する多型サイトが GC であることが重要であると考えられる。

3. ミナミキチョウ型とキタキチョウ型ミトコンドリアの簡易判別

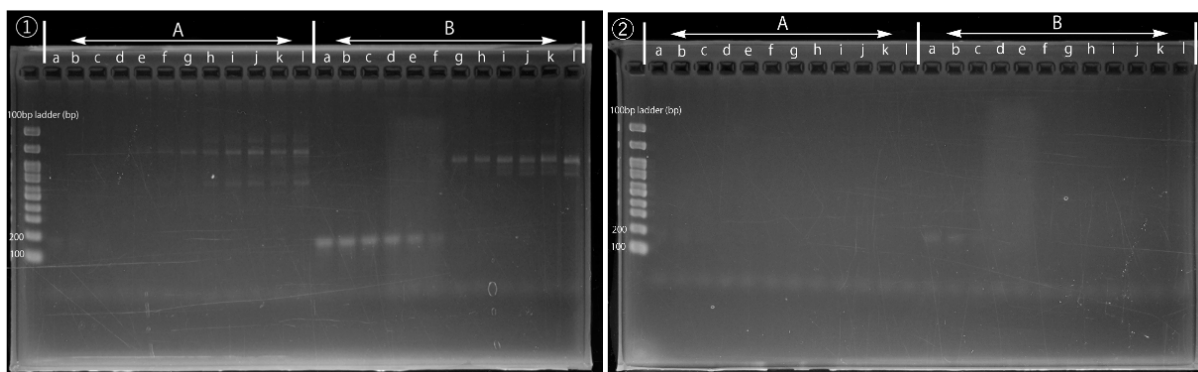


図 4. キタキチョウ型プライマーによる PCR 増幅確認

① プラスミド DNA がテンプレートの実験区; ② 脚からの DNA 抽出液がテンプレートの実験区; ①A: 感染キタキチョウ ND5 が導入されたプラスミド DNA の実験区; ① B: 非感染キタキチョウ ND5 が導入されたプラスミド DNA の実験区; ②A 感染キタキチョウの脚から抽出した DNA テンプレートの実験区; ②B: 非感染キタキチョウの脚から抽出したテンプレート DNA の実験区; アニール温度は a: 40 °C; b: 40.33 °C; c: 40.99 °C; d: 42.09 °C; e: 43.63 °C; f: 44.84 °C; g: 46.27 °C; h: 47.48 °C; i: 49.13 °C; j: 50.23 °C; k: 50.89 °C; l: 51 °C。マーカーは 100bp DNA ladder。プライマーダイマーが検出される場合がある。

本研究の結果からミナミキチョウ型とキタキチョウ型ミトコンドリア識別には、EmND5_F1 と EmND5P_R1 のプライマーペアを用いた PCR を 94 °C 2 分処理の後、94 °C 30 秒、47 °C 1 分、72 °C 30 秒を 40 回繰り返し、72 °C 5 分で伸長完了させることが適当であると考えられる。プラスミド DNA と脚から抽出した DNA で PCR 増幅のアニール温度に差が出たことについては、テンプレートの精製度の違いから引き起こされる可能性がある。つまり、プラスミド DNA はキットを用いて抽出したのに対し、脚から直接 DNA を抽出する方法では精製を行っていないことが一因と考えられる。

すべての個体をシーケンスする必要なく、簡便にミトコンドリアタイプを判別できれば、より多くのサンプル処理が可能になる。そこで、ミナミキチョウタイプのみならず、キタキチョウタイプにおいて増幅ポジティブなプライマーセットを設定できれば、ミトコンドリアタイプ確定の蓋然性も高まる。そのため、現在 COIII 配列差を用いた、同様の簡便検出システムの構築に取り組んでいる。15 塩基以内の近い位置に 3 カ所の多型サイトが存在するため、簡易判

別の可能性は十分高いと考えている。

文 献

- HIROKI M. *et al.* (2002): *Naturwissenschaften*, **89**: 167–170
- HIROKI M. *et al.* (2004): *Proc. R. Soc. Lond. B*, **271**: 1751–1755
- HIROKI M. *et al.* (2005): *Evol. Ecol. Res*, **7**: 931–942
- KATO Y. (2000): *Zool. Sci*, **17**: 539–547
- 加藤義臣・矢田 修 (2005): *蝶と蛾*, **56**: 171–183
- MIYATA M. *et al.* (2017): *Biol. Letters*, **13**: 20170153
- MIYATA M. *et al.* (2020): *Ecol. Evol*, **10**: 8323–8330
- NARITA S. *et al.* (2006): *Mol. Ecol*, **15**: 1095–1108
- NARITA S. *et al.* (2007a): *Appl. Environ. Microbiol*, **73**: 4332–4341
- NARITA S. *et al.* (2007b): *Genome*, **50**: 365–372
- O'NEIL S.L. *et al.* (1992): *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **89**: 2699–2702
- RAYCHOUDHURY R. *et al.* (2010): *Heredity*, **104**: 318–326
- WERREN J.H. (1997): *Annu. Rev. Entomol*, **42**: 587–

607

WERREN J.H. *et al.* (2008): Nature Rev. Microbiol,

6: 741–751

YAGI T. *et al.* (1999): J. Mol. Evol, **48**: 42–48

ZHOU W. *et al.* (1998): Proc. Royal Soc. Lond. B:

265: 509–515

ZUG R. and HAMMERSTEIN P. (2012): PLoS ONE,

7: 7–9

カイコ *Sxl* 変異系統の維持について

小原 聡大¹・竹村 洋子²・酒井 弘貴³・佐原 健^{1,*}

¹岩手大学農学部・²蚕糸科学技術研究所・³農業・食品産業技術総合研究機構

(2021年12月7日受理)

進化的なチョウ目昆虫に有核精子と無核精子が存在することは、古くから知られている (MEVES, 1903)。精子変態初期、無核精子は中央部に球形の核を持つものの、peristaltic squeezing により終期に脱核する (KAWAMURA *et al.* 2000; SAHARA and KAWAMURA, 2004)。無核精子が受精に必要な不可欠であることは、カイコで初めて実験的に証明された (SAHARA and KAWAMURA, 2002)。しかし、受精しない無核精子の存在意義には科学的興味が向けられ、いくつかの説が提唱されている (FRIEDLÄNDER *et al.* 2005)。エゾスジグロシロチョウ (*Pieris napi*) では、同種の精子間競争を避けるために Cheap filler として無核精子を使用する (COOK and WEDELL, 1999)。カイコ交尾囊における有核精子の乖離には、C エンドペプチダーゼによる無核精子の激しいかき混ぜ運動の活性化を必要とする (OSANAI *et al.* 1989)。この酵素活性はトリプシンで代用でき、カイコ人工授精の鍵となった (TAKEMURA *et al.* 1999)。現在カイコ系統保存にも応用されている、凍結人工授精法については竹村・持田 (2008) に詳しく紹介されている。

カイコの有核精子変態が終齢幼虫期にほぼ終了するのに対して、無核精子変態はワンダリング期以降に認められる (KAWAMURA *et al.* 2002)。キイロシヨウジョウバエ *Sxl* のカイコ

ホモログ (*Bm-Sxl*) には、スプライス多型が存在し、*Bm-Sxl-L* は有核精子と *Bm-Sxl-S* は無核精子の出現時期とそれぞれ平行であった (NIIMI *et al.* 2006)。最近、TALEN (transcription activator-like effector nuclease) を利用した *Bm-Sxl* 突然変異の作出がなされ、*Bm-Sxl-L* 特異的変異では認められない無核精子形成異常と雄不妊化が、*Bm-Sxl-S* との共通配列変異個体 (*Sxl^{ln3}-homo* ならびに *Sxl^{Δ6}-homo*) に認められた (SAKAI *et al.* 2019)。*Sxl^{ln3}-homo* を用いた観察の結果、精包とともに交尾囊へ射精された精子は受精囊へ移動していなかった。これらのことから *Bm-Sxl* は、正常な無核精子形成に必須であることと、無核精子は、有核精子の移動に密接に関係することが明らかとなった。

Sxl^{ln3}-homo の有核精子に異常がないことは、3倍体雄との重複交尾により確認された。そのため、この方法による系統維持は可能である。しかし、系統維持の度毎に3倍体を誘起することはスペースや労力的に負担が大きかった。そこで、黒縞遺伝子座 (*p^S*) をホモにもつ *re9* 系統をヘルパーとして利用する方法が開発された (SAKAI *et al.* 2020)。この研究では、卵色を用いた *re9* の交尾時間の最適化と *Sxl^{ln3}-homo* 雌への確認実験を行った。最適な重複交尾の結果、*Sxl^{ln3}-homo* 個体と考えられる次世代の形蚕ホモ (*+^l/^l*) 個体割合は0~31.5%、最大受精

*責任著者

〒020-8550 盛岡市上田 3-18-8

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

卵数は 112 個であった。この研究での実験区数は 6 と小さく、形蚕個体の受精については確認されていなかった。

そこで本研究では、これら次世代の単交尾における受精率がゼロである Sxl^{ln3} -homo だと証明するとともに、その次世代へも系統維持できることを示す目的で実験を行った。

材料と方法

1. カイコ系統

本研究では、基礎生物学研究所新美輝幸博士より分譲を受けた大造系形蚕 ($+^p/+^p$) $Bm-Sxl$ 変異系統の Sxl^{ln3} -homo (SAKAI *et al.* 2019)、蚕糸科学技術研究所より分譲をうけた黒縞 (p^s/p^s) の $re9$ 系統ならびに北海道大学応用分子昆虫学研究室より分譲を受けた赤卵 (re/re) の Cre 系統を用いた。飼育は 25°C、12L12D の恒温室にて桑葉もしくは人工飼料 (シルクメイト原種 1-3 齢用 S, 日本農産工業) により行った。

2. $re9$ 雄をヘルパーとして用いた Sxl^{ln3} -homo 系統維持方法

Sxl^{ln3} -homo の雌は正常な妊性を持つのに対し、雄は無核精子の形態ならびに行動異常性を示し完全不妊である (SAKAI *et al.* 2019)。本研究では、3 倍体雄をヘルパーとして用いた二重交尾由来の継代 3 区の次世代から本方法による継代を始めた。SAKAI *et al.* (2020) に従い、 $re9$ 雄と Sxl^{ln3} -homo 雄を Sxl^{ln3} -homo 雌に二重交尾させることで次世代 Sxl^{ln3} -homo を得た。二重交尾の手順は、未交尾雌に対し、 $re9$ を 30 分間交尾させた直後、 Sxl^{ln3} -homo 雄を 3 時間以上再交尾させた。受精卵の一部を孵化させ、形蚕と黒縞個体数をカウントした。越年卵の一部を翌春掃き立て、形蚕個体 (Sxl^{ln3} -homo) 雄を

Cre 雌と交配させ、すべての個体が完全不妊であることを確かめた (表 1 参照) 後、同様の二重交尾により受精卵を得た。この受精卵区より孵化した個体の形質調査を行った。

3. Sxl^{ln3} -homo の確認

上記の通り、雄個体の完全不妊性を確認するとともに、SAHARA and KAWAMURA (2004) に従い、化蛹 1 日の精巣内の精子を間接蛍光抗体法にて精子束の蛍光顕微鏡観察を行った。

取り出した精巣を MAS コート付きスライドガラス (S9215, MATSUNAMI) 上でピンセットを使って切り裂き、内容物を 22×24 mm カバークラス (MATSUNAMI) を押し付けるように移動させ、展開塗布した。湿ったままの状態、50 mL コプリンジャーで氷冷 4%パラホルムアルデヒドを用いて固定した。間接蛍光抗体染色方法は、SAHARA and KAWAMURA (2004) を参照した。鞭毛のチューブリン染色には、1 次抗体として Anti α -Tubulin, Monoclonal Antibody (011-25034, FUJIFILM)、2 次抗体には Fluorescein Conjugate Affinity purified Anti-MOUSE IgG [H&L] [Rabbit]、ブロッキングには GOAT SERUM (G9023, SIGMA) を用いた。核は DAPI 染色にて検出した。

染色されたプレパラートは、B&W CCD カメラ (DFC350FX) 付き DM6000B 蛍光顕微鏡 (Leica) にて観察、デジタル画像取得した。取得データは Photoshopv22.42 (Adobe) にてプロセスした。

結果と考察

1. 第一世代の分離比

3 蛾の親世代から各 11 蛾、9 蛾および 8 蛾区の卵の約半数を即時浸酸して、3 齢起蚕での黒

表 1. 第 1 世代における形蚕 (+*p*/*p*) と黒縞 (*p*^S/*p*) の分離と雄の不妊性確認

蛾区	<i>Sxl</i> ^{ln3} -homo 雌への重複交尾			Cre 雌との単交尾	
	黒縞	形蚕	形蚕率 (%)	産卵数	受精率 (%)
1-1	88	14	13.73	218	0
1-2	52	3	5.45	424	0
1-3	128	0	0	288	0
1-4	90	44	32.84	427	0
1-5	69	59	46.09	489	0
1-6	75	19	20.21	297	0
1-7	83	10	10.75	405	0
1-8	81	19	19	398	0
1-9	84	0	0	495	0
1-10	2	94	97.92	582	0
1-11	46	23	33.33	410	0
2-1	64	4	5.88	258	0
2-2	109	30	21.58	409	0
2-3	47	15	24.19	94	0
2-4	84	9	9.68	175	0
2-5	53	16	23.19	157	0
2-6	117	13	10	405	0
2-7	27	8	22.86	289	0
2-8	127	0	0	263	0
2-9	28	2	6.67	222	0
3-1	70	0	0	451	0
3-2	96	1	1.03	540	0
3-3	126	5	3.82	522	0
3-4	90	44	32.84	605	0
3-5	98	9	8.41	322	0
3-6	103	1	0.96	602	0
3-7	87	3	3.33	145	0
3-8	74	0	0	504	0

縞 (+*p*/*p*^S) と形蚕 (+*p*/*p*) の分離比を調査した (表 1)。*Sxl*^{ln3}-homo 雄由来の子供が全く認められない区と 1-10 区を除く各グループの平均形蚕率は、蛾区 1 で 24.65 %、2 で 15.50 % ならびに 3 で 9.50 % であった。形蚕率が極めて低いもしくはゼロとなるケースは、すべての受精卵が re9 雄由来と考えられ、SAKAI *et al.* (2020) との間に齟齬はない。1-10 区において極めて高い形蚕率となった原因は、re9 雄の無核精子を非常に効率良くヘルパーとして利用したとの推定も成り立つが、re9 雄との交尾時間の計測ミスなどによる可能性もある。こうしたケースでは、系統維持個体から削除しておくのが無難であろう。

2. 第二世代の分離比

第二世代では 1-1、1-7、1-9、2-4、2-5 および 3-5 区を掃き立て、それぞれ形蚕 (*Sxl*^{ln3}-homo)

を選抜飼育した。孵化はいずれも良好であった。成虫雄を Cre 雌と交配した結果 (単交尾)、完全不妊であった。よって、re9 雄をヘルパーとして (材料と方法 2. 参照) 次世代受精卵を得て、38 区を掃き立てた。それらの個体を 3 齢起蚕で選抜した *Sxl*^{ln3}-homo (形蚕) の分離比を調査した。その結果、形蚕の非出現区は 1 つにとどまり、出現率 10 % 以上の区は親世代の 42.86 % (表 1) から 65.79 % へと向上した (表 2)。また、形蚕率が異常に高い外れ値も認められず、4-9 区で 299 頭、58.51 % の最高値を示した。

形蚕雄個体が *Sxl*^{ln3}-homo であることを確認するために無核精子の異常性を蛍光顕微鏡観察した。有核精子束には形態異常は認められなかったものの、無核精子束は、核が変形し前方へ移動するなど、SAKAI *et al.* (2019) と同一の特徴を有していた (図 1)。これらのことから、本研究で、*Sxl*^{ln3}-homo の系統維持が完全に確立したと考えられる。

表 2. 第 2 世代における形蚕 (+*p*/*p*) と黒縞 (*p*^S/*p*) の分離

蛾区	<i>Sxl</i> ^{ln3} -homo 雌への重複交尾			<i>Sxl</i> ^{ln3} -homo 雌への重複交尾			
	黒縞	形蚕	形蚕率 (%)	蛾区	黒縞	形蚕	形蚕率 (%)
4-1	382	2	0.52	4-20	212	137	39.26
4-2	336	19	5.35	4-21	345	77	18.25
4-3	347	6	1.70	4-22	238	32	11.85
4-4	255	33	11.46	4-23	283	110	27.99
4-5	414	25	5.69	4-24	402	119	22.84
4-6	416	0	0	4-25	294	11	3.61
4-7	258	66	20.37	4-26	309	58	15.80
4-8	338	3	0.88	4-27	318	114	26.39
4-9	212	299	58.51	4-28	209	86	29.15
4-10	211	187	46.98	4-29	256	127	33.16
4-11	456	15	3.18	4-30	250	116	31.69
4-12	265	61	18.71	4-31	415	15	3.49
4-13	202	173	46.13	4-32	357	41	10.30
4-14	276	122	30.65	4-33	284	3	1.05
4-15	124	42	25.30	4-34	383	4	1.03
4-16	182	197	51.98	4-35	246	40	13.99
4-17	370	68	15.53	4-36	242	33	12.00
4-18	367	45	10.92	4-37	451	38	7.77
4-19	158	152	49.03	4-38	375	9	2.34

3. 黒縞系統雄個体をヘルパーとした *Sxl*^{ln3}-homo の系統手順と要点

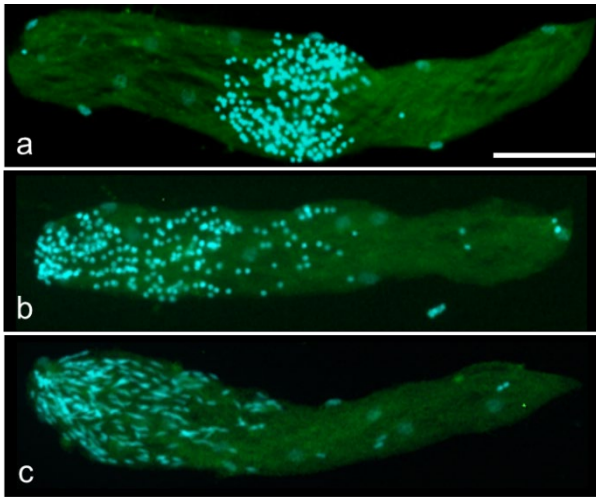


図 1. 鞭毛を免疫染色（緑）した無核精子束
a: 黒縞個体の正常無核精子束; 核（シアン）は球形で中央部に集中する。b, c: 形蚕個体 (Sxl^{ln3} -homo) の異常無核精子束; 球形の核の多くが頭部方向へ移動 (b) し、さらに流線形に伸長する核も認められる (c)。スケールバーは 5 μ m。

SAKAI *et al.* (2020) のデータを考慮すると重複交尾順は、re9 雄の後、 Sxl 変異体雄とすべきである。また、第 2 世代では、re9 雄を割愛後、すぐに Sxl^{ln3} -homo 雄と交尾させるよう心がけた。このことが Sxl^{ln3} -homo (形蚕) の出現率を向上させた要因かもしれない。本系統維持手順において、いずれの個体も羽化当日に交配する必要はないものの、できれば長期の冷蔵保護は避けたい。雌の長期冷蔵は、特に 2 回目雄 (Sxl^{ln3} -homo) 個体の交尾意欲を削ぐこととなるため注意が必要である。

十分な受精卵が得られた場合でも孵化が不斉な場合があった。本実験では、初発は 5°C に冷蔵保護し、2 日目の孵化個体と同時に掃き立てることで省スペースを可能とした。なお、点青期以降に全暗催青に移行させ、孵化の斉一化をはかる方法も有効であると考えられる。

形蚕の選抜は、早いほど省力化につながる。本研究では、識別が確実となる 3 齢起蚕で選抜した (図 2a)。しかしながら、2 齢初期での候補選抜も可能だと考えられる。形蚕個体は、黒縞個体に比べ、総じて初齢入眠に半日程度の遅れを生ずる。また、2 齢起蚕から半日程度は、

その斑紋や光沢から形蚕が区別可能である (図 2b 赤矢印)。系統維持における省力化は、他の飼育との兼ね合いもあるので、判別時期については適切に判断するとよい。

第一世代では受精卵 28 区をそれぞれ約半数掃き立て、平均 15.89 個体 (全受精卵では 31.79 個体と推定)、第二世代ではすべての受精卵 38 区から平均 70.66 個体の Sxl^{ln3} -homo (形蚕) がそれぞれ得られた。これらの結果から、今後の系統維持には、15 ペア程度が適切であると考えられる。

文 献

- COOK P.A. and WEDELL N. (1999): *Nature*, **397**: 486
- FRIEDLÄNDER M. *et al.* (2005): *Adv. Insect Physiol*, **32**: 206-308
- KAWAMURA N. *et al.* (2000): *J. Morphol*, **246**: 53–58
- KAWAMURA N. *et al.* (2002): *Dev. Growth Differ*, **49**: 25–30
- MEVES F. (1903): *Arch. Mikrosk. Anat. Einwicklungsmech*, **61**: 1–84
- NIIMI T. *et al.* (2006): *Genome*, **49**: 263–268
- OSANAI M. *et al.* (1989): *Inver. Preprod. Dev*, **15**: 97–103
- SAHARA K. and KAWAMURA N. (2002): *Zygote*, **10**: 23–29
- SAHARA K. and KAWAMURA N. (2004): *J. Morphol*, **259**: 1–6
- SAKAI H. *et al.* (2019): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**: 10412–10417
- SAKAI H. *et al.* (2020): *J. Insect Biotech. Seric*, **89**: 39–43
- TAKEMURA Y. *et al.* (1999): *J. Insect Physiol*, **45**: 471–477
- 竹村洋子・持田裕司 (2008): 蚕糸・昆虫バイオテック, **77**: 9–16

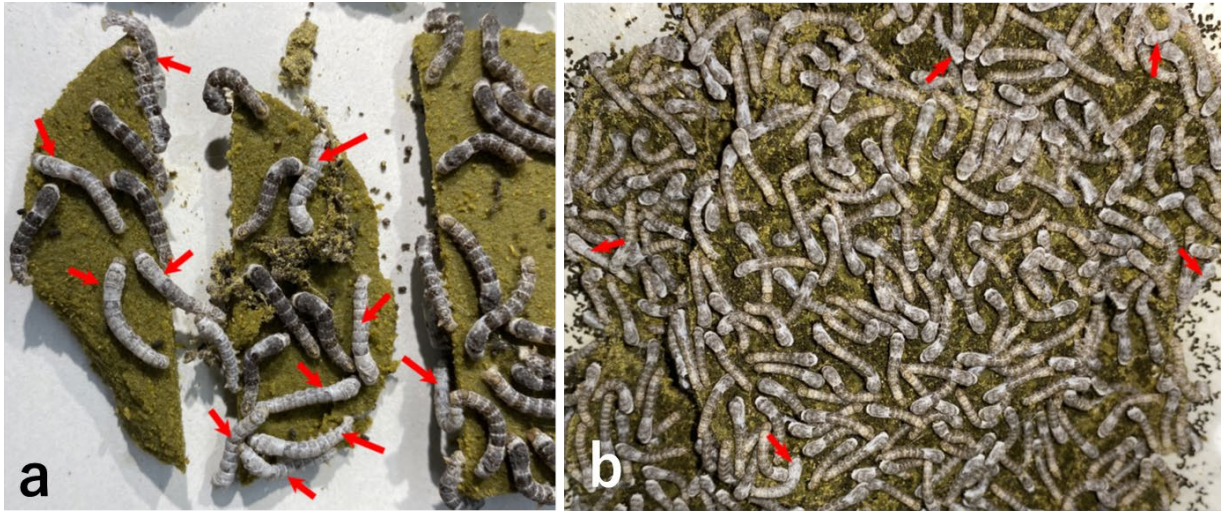


図2. 第2世代における形蚕 ($+p/+p$) と黒縞 ($p^S/+p$) の識別
a: 3齢起蚕時には完全に識別可能; b: 2齢1日目では形蚕候補の識別可能 (詳細は本文参照)

組織透明化を利用した BmNPV 感染観察の高感度化

佐藤 拓海・浅野 眞一郎・佐藤 昌直*

北海道大学大学院農学院

(2021 年 12 月 7 日受理)

昆虫に感染するウイルスはその多くが主に中腸で増殖する一方で、バキュロウイルスは中腸から気管を介して全身の様々な器官で感染を広げ、増殖する組織指向性を持つ (MILLER, 1997)。昆虫を含む動物は多様な器官・細胞種から個体を作り出し、人間では 200 種以上の細胞種が存在する。昆虫の細胞種数はまだ精査されていないが、多数の細胞種が各器官を構成していることが想像される。多くのウイルスはコンパクトなゲノムに限られた遺伝情報をコードしているため、感染可能な細胞種を増やすための遺伝子コード数増加とゲノムサイズにはトレードオフがある。多くの器官、つまり遺伝子発現・生理学的状態が異なる多様な細胞でも感染を成立させられることがバキュロウイルスのウイルスとしてのユニークな特徴である。しかし、その感染戦略が宿主昆虫の有する細胞多様性のどこまでに対応しているのだろうか？バキュロウイルスが感染できる細胞種、感染できない細胞種を定義して、その感染能力の限界を解明し、また感受性・非感受性の細胞間の分子生物学的差異を明らかにすることは、ウイルス学だけではなく、細胞生物学、発生生物学、進化学にも波及効果がある。

バキュロウイルスに感受性・非感受性の細胞を鋭敏に分析するためには、高感度なウイルス

感染細胞の特定手法が必要になる。バキュロウイルス感染細胞特定は、古典的にはウイルス感染個体を解剖し、感染組織の一部を摘出して電子顕微鏡を用いてなされてきた (GRANADOS and LAWLER, 1981)。後にバキュロウイルスの遺伝子組換え技術が構築され、蛍光レポータータンパク質を発現する組換えウイルスを使った感染細胞の観察が可能となった。これにより極めて高倍率での観察が必要なウイルス粒子の観察ではなく、レポーター遺伝子発現を指標にした感染細胞・組織の同定が可能となった (BARRETT *et al.* 1998)。しかし、一般に組織中の蛍光タンパク質を励起し観察しうる深度は 2 mm 程度であり、感染組織の表層のみしか観察することができない。バキュロウイルスが個体のどこまで感染を広げ、組織の中でどのように感染細胞が分布しているのかを明らかにするためには、深部まで感染細胞を検出できなければならない。

蛍光タンパク質レポーターを利用した観察方法は蛍光によって感染細胞を簡便に判別できる優位性があり、本研究では蛍光タンパク質レポーターを使った観察方法の改良を目指した。蛍光タンパク質レポーターによる観察の高感度化における最大の課題は、上述した観察可能な深度の問題であり、これは不透明な組織に

*責任著者

〒060-8589 札幌市北区北 9 西 9

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

より生じる励起光・蛍光の散乱が原因である。近年、この問題を解決するために、様々な組織透明化の方法が哺乳類サンプルを中心に開発されてきた (HAMA *et al.* 2011; ERTÜRK *et al.* 2012)。この中で、マウスの組織を透明化する CUBIC は蛍光タンパク質の観察と併用可能であり (SUSAKI *et al.* 2014)、また、マウスだけでなくショウジョウバエ等の昆虫でも適用されている (MARKO *et al.* 2018)。そこで、本研究では CUBIC を利用し、組織固定時間と透明化試薬の濃度を調節することでカイコにおける蛍光タンパク質レポーターを発現する *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) 感染観察の高感度化を目指した。

材料と方法

1. 供試カイコおよびウイルス

本研究では、錦秋×鐘和の4齢および5齢起蚕を供試した。飼料はシルクメイト L4M を用い、25°C で飼育した。蛍光タンパク質発現ユニットを導入した BmNPV として本研究室で保存されている、多角体遺伝子プロモーター下流に EGFP が導入された BmNPV である BmGFP (ONO *et al.* 2012) を使用した。

1. リン酸緩衝液 (PBS) の調製 (500 ml)

塩化ナトリウム (富士フィルム和光純薬株式会社、以下和光純薬、和光一級) 40 g、リン酸水素二ナトリウム (和光純薬、試薬特級) 14.5 g、塩化カリウム (和光純薬、試薬特級) 1.0 g、リン酸二水素カリウム (和光純薬、試薬特級) 1.0 g を超純水に溶かし、500 ml になるよう脱イオン水でメスアップして 10×PBS とした。1×PBS

として用いる場合は 10×PBS と超純水を 1:9 の割合で混合した。

2. 組織固定試薬の調製 (500 ml)

本研究では、組織固定試薬としてパラホルムアルデヒド (PFA) を 4 % 含む 1×PBS である 4 % PFA を用いた。超純水 400 ml に 10×PBS 50 ml を混合し、ホットスターラーを用いて 50°C 以上 60°C 以下になるように攪拌しながらパラホルムアルデヒド (和光純薬、組織固定用) を 40 g 加えた。パラホルムアルデヒドが溶解するまで 3 M 水酸化ナトリウム (和光純薬、試薬特級) を滴下し、室温に戻したのち 6 M 塩酸 (和光純薬、試薬特級) で pH 7.4 に調整し、超純水で 500 ml になるようメスアップした。これを濾過して 4 % PFA とした。

3. 組織透明化試薬の調製 (500 ml)

本研究では、組織透明化試薬として CUBIC プロトコール (SUSAKI *et al.* 2015) で用いられている reagent-1 および reagent-2 を半分の濃度にした 1/2×reagent-1 を用いた。尿素 (和光純薬、試薬特級) 125 g と Quadrol (N,N,N',N'-tetrakis) (東京化成工業株式会社) 125 g を超純水 175 g に加えてホットスターラーで加熱しながら攪拌し、完全に溶かしたのち室温になるまで静置した。TritonX-100 (ナカライテスク株式会社) 75 g を加えて攪拌しながら 0.1 MPa 以下になるように、脱気時間は 30 分以内に抑え脱気した。これを超純水と 1:1 で混合し、組織透明化試薬とした。

4. 5. 4 齢起蚕の組織透明化

4 齢起蚕を 4 % PFA に浸漬して 4°C で 30 rpm で 120 時間振盪して組織固定した。PBS に 2 時間以上、2 回浸漬することで洗浄したのち、組織透明化試薬 (1×reagent-1) に浸漬して透明化した。透明化して 10 日後に実体顕微鏡 (Leica MZFLIIT-HLW) で観察した。

6. ウイルスに感染したカイコの組織透明化と撮影

ウイルス上清を 3.0×10^4 PFU になるように希釈し、カイコ個体に注射した。72 時間後カイコを解剖し、中腸を取り除いたのち 4 % PFA に浸漬して 4°C で 30 rpm で 168 時間振盪して組織固定した。PBS に 2 時間以上、2 回浸漬することで洗浄したのち、組織透明化試薬に浸漬して透明化した。双眼実体顕微鏡 (Carl ZEISS SteREO Lumor V.12) を用いて組織固定開始から 24 時間ごとに観察し、カメラは Zyla5.5 (Andor) を用いて、明視野画像は露光時間 150 ms、暗視野画像 1000 ms で撮影した。

7. カイコの染色と組織透明化

5 齢起蚕を解剖し、中腸と絹糸腺を取り除いて 4 % PFA に浸漬し、4°C で 30 rpm で 168 時間振盪した。PBS で 2 時間以上、2 回浸漬することで洗浄した。TritonX-100 を 0.2 % 含む PBS に浸漬して 30 rpm で 15 分振盪し、超純水で 3 回洗浄したのち、0.0005 % の DAPI 溶液 2 ml に浸漬して 30 rpm で一晩振盪し、PBS で 3 回洗浄した。染色したカイコは双眼実体顕微鏡 (Carl ZEISS SteREO Lumor V.12) と共焦点レーザー顕微鏡 (Leica TCS SP5) を用いて観察したのち、組織透明化試薬に浸漬して透明化した。透明化して 24 時間後のサンプルは PBS で 3 回

洗浄し、TritonX-100 を 0.2 % 含む PBS に浸漬して 30 rpm で 15 分振盪し、超純水で 3 回洗浄したのち、0.0005 % の DAPI 溶液 2 ml に浸漬して 30 rpm で一晩振盪し、PBS で 3 回洗浄した。染色したカイコをもう一度双眼実体顕微鏡 (Carl ZEISS SteREO Lumor V.12) と共焦点レーザー顕微鏡 (Leica TCS SP5) を用いて観察した。

結果と考察

蛍光タンパク質を発現する BmNPV はカイコ個体全体でのウイルス増殖を観察できる点で有用である。しかし、不透明な組織による励起光と蛍光シグナルの散乱は、詳細なウイルス感染・増殖の観察を妨げてきた。この問題を解決する手段として、先行研究でマウスやショウジョウバエで実施されてきた組織透明化がカイコでも利用可能か検証する実験を行った。

マウス組織を透明化する手法 (SUSAKI *et al.* 2015) に従って、カイコを透明化することができた (図 1A)。しかし、CUBIC 処理時間が長くなるにつれて GFP 蛍光が観察されなくなり、処理条件の調節が必要であることがわかった (未発表データ)。まず、GFP 蛍光の消失からサンプル固定の時間の調節を行なった。マウス脳透明化プロトコールでは組織固定は 24 時間で十分であるが、カイコ個体の体積はマウスの脳より大きく、また外骨格に覆われているため、24 時間では組織固定が不十分だと考え、固定時間を延長した。条件検討の結果、固定時間を 168 時間に延長した。また、CUBIC 処理したカイコ個体を PBS から透明化試薬に浸漬した際に、変形が観察されたこともあった。変形による組織の損傷を疑い、変形を生じる原因の候補であった浸透圧の影響を小さくするために透

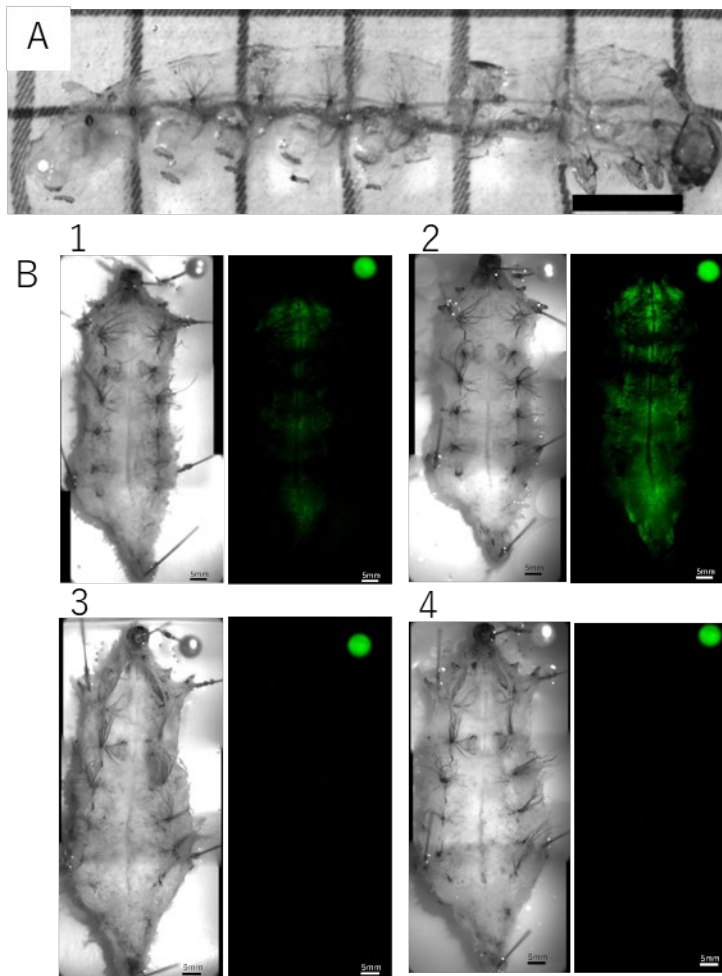


図1. BmGFP感染カイコ個体の透明化前後に検出された蛍光の変化

A: CUBICでカイコ幼虫を透明化した例。4齢起蚕を組織透明化し、10日後に撮影した; B: 透明化による蛍光検出感度の向上。BmGFP注射3日後のカイコ (B-1, B-2) と注射していないカイコ (B-3, B-4) を解剖し、組織透明化してGFP蛍光を観察した。明視野は露光時間 150 ms、暗視野は露光時間 1000 ms で撮影した。B-1, B-3: 168 時間組織固定をした後 1/2×reagent-1 に浸漬する直前; B-2, B-4: 1/2×reagent-1 に浸漬して 24 時間後; スケールバー: 5mm。

明化試薬の濃度をマウス用プロトコールで使われる濃度の半分にした。さらに、マウスの全身透明化プロトコールと同様に試薬と各器官の接触を増すために、切開したのち組織固定と透明化を行なった。このプロトコールにより、固定・透明化の効率化および短時間化が可能となり、従来の方で見られた蛍光減衰や個体変形の問題が解決された(未発表データ)。透明化処理前のBmGFP感染カイコでは蛍光が検出されなかった箇所においても透明化処理後では新たに蛍光シグナルが検出された(図1B)。GFP発現組換えウイルスを接種していない個体では、このような観察蛍光の増加は観察されず、これらが自家蛍光ではなく、ウイルス感染によって発現しているレポーター蛍光であると結論した。これら蛍光は脂肪体の奥で確認されたことから、透明化前には脂肪体によって励

起光の侵入・蛍光検出が妨げられていた、表皮および筋肉のウイルス感染細胞からの蛍光だと推測された。

一方、脂質を除去する性質を持つCUBIC処理によって脂肪体に隠されていたGFP蛍光が検出されたことから、脂肪体の脱脂質による透明化ではなく、脂肪体の破壊・解離が原因である可能性も否定できなかった。この可能性を検証するために透明化前と透明化後にそれぞれ脂肪体細胞の核をDAPIで染色し、脂肪体の存在を顕微鏡観察で比較した。CUBICに24時間処理し(図2A)、透明化した脂肪体と透明化処理していない脂肪体を染色して観察したところ、DAPI染色された脂肪体細胞の核が透明化前と透明化後で同様に観察された(図2B)。つまり、CUBIC処理によって新たに観察されたGFP蛍光は、真に組織透明化によって検出可能

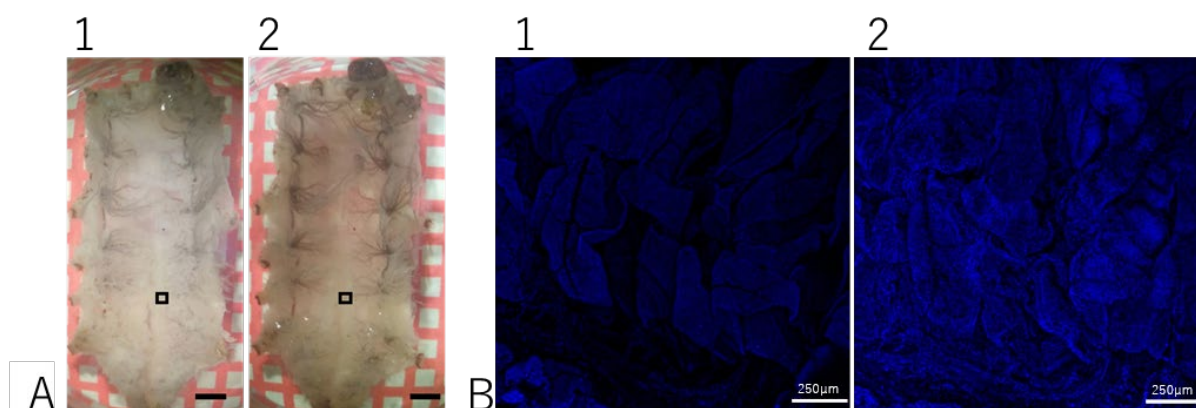


図2. 核染色による脂肪体保持の検証

5 齢起蚕を解剖して 4 % PFA で固定し、透明化前後に DAPI で染色し脂肪体を観察した。

A: 透明化前後のカイコ幼虫; スケールバーは 5mm。B: 四角で囲った部位の脂肪体を透明化前後で撮影した; スケールバーは 250µm。A-1: 固定ののち、1/2×reagent-1 に浸漬する直前。A-2: 1/2×reagent-1 に浸漬して 24 時間後; B-1: 固定ののち、1/2×reagent-1 に浸漬する直前; B-2: 1/2×reagent-1 に浸漬して 24 時間後。

になった蛍光だと結論した。

これらの結果から CUBIC を用いた組織透明化は蛍光タンパク質レポーターによるウイルス感染観察を極めて高感度化する手段として有効であることが示された。透明化以前では観察できなかった弱い蛍光が検出されるようになったことは、カイコ個体内での BmNPV 感染動態を深部まで観察可能になったことを示している。透明化を利用する以前ではこのような深部の蛍光を検出できなかったため、さらに小さな組織片を調製して観察する必要があった。原理的には 2 mm 程度の組織片を網羅的に調製することにより、個体レベルでくまなくウイルス感染細胞を探索することは可能であるが、実現するには技術的なハードルは高い。さらに個体を観察可能なサイズに分割することは、個体における空間情報、特に破壊面である断面における情報を失いやすく、得られる生物学的情報が少なくなってしまう。一方で、本手法による個体スケールでの深部観察、GFP 蛍光の高感度検出は実験手技の簡便さだけでなく、得られる生物学的情報の面からもアドバンテージが

ある。透明化を使用しない観察では、感染後 72 時間では一部の組織のみからしか蛍光を得られなかったが、透明化サンプルの観察結果から、感染後 72 時間後の時点ですでに BmNPV が全身に感染を広げていることが明らかになった。

本研究では BmNPV 感染のマーカーとしての GFP 蛍光を対象にカイコ透明化技術を評価したが、本研究が優位性を発揮する研究対象はさらに広い。カイコの遺伝子発現制御配列を探索するためのエンハンサートラップシステム (UCHINO *et al.* 2008) で使われていたように、カイコの遺伝子発現を蛍光タンパク質でモニターする場合に本手法による深部観察は簡便且つより詳細なイメージングを可能とする。また、模様のある鱗翅目昆虫の幼虫でも本研究のように切開し、内部から観察することで透明化できないメラニン蓄積組織の影響を避けて深部イメージングを行える。現時点では、そのような非モデル昆虫にレポーター遺伝子を導入する手段が確立されていないが、ヒトにおけるアデノ随伴ウイルスのような遺伝子導入ウイルスベクターが開発されれば、本手法とあわせ

て非モデル昆虫における遺伝子発現制御研究のツールになることが期待できる。ゲノム解読が容易になった現代において、推定遺伝子の空間的発現情報の取得、シスエレメントなどの配列情報の機能を解析することが重要な課題である。本研究の成果は組織・細胞のレベルから機能ゲノミクスまでをカバーする次世代昆虫科学の基盤技術となると期待される。

文 献

- BARRETT J.W. *et al.* (1998): *J. Virol*, **72**: 3377-3382
- ERTÜRK A. *et al.* (2012): *Nature Protocols*, **7**: 1983-1995
- GRANADOS R.R. and LAWLER K.A.(1981): *Virology*, **108**: 297-308
- HAMA H. *et al.* (2011): *Nature Neuroscience*, **14**: 1481-1488
- MARKO P. *et al.* (2018): *Nature Commun*, **9**: 4731
- MILLER L.K. (1997): *In* “The Baculoviruses, Baculovirus pathogenesis” (Federici B.A. ed), pp33-59, Plenum Press, New York.
- ONO C. *et al.* (2012): *Virus Res*, **165**: 197-206
- SUSAKI E.A. *et al.* (2014): *Cell*, **157**: 726-739
- SUSAKI E.A. *et al.* (2015): *Nature Protocols*, **10**: 1709-1727
- UCHINO K. *et al.* (2008): *Insect Biochem. Mol. Biol*, **38**: 1165-1173

蚕を利用した教育活動

西出 雅成*

北海道科学大学高等学校

(2021年12月14日受理)

はじめに

35年間の教育活動の中で、お蚕様を使った実験例でとくに好評であったものをいくつか紹介する。また、継続して取り組んできた部活動での蚕を使った研究についても合わせて報告する。

1. 高等学校における理科実験での活用例：絹糸の構造観察より

(糸巻き)

市販の毛糸など巻く糸巻き器(図1)を利用してお湯で煮た繭から糸を巻くことができる。



図1. 煮繭にはカセットコンロとビーカーを用い、市販の糸巻き器を利用した自作の繰糸器

鍋に半分程度水を入れて、加熱沸騰したら繭を数個入れ、割り箸で繭が完全に湯の中につかるようにして沈める。繭から空気を放出させな

がら、さらに2分間程煮て加熱をやめ、最後に水を加える。割り箸の先で繭玉をなでるようにすると、箸に糸がからみつく(図2)ので、数個の繭から糸を束ねて、先端を糸巻き器につけ、



図2. 割り箸を使い作貯生繭から索緒する様子

巻き取る。はじめはゆっくりと巻き、その後しだいに巻き取り速度を上げて糸は切れることなく1,000m程度は巻き取ることができる(図1)。最後は、薄い層に包まれたさなぎが見えてくるので生徒は、驚きの表情を見せる。(高校生のみならず小学生から大人まで楽しむことができる実験である。)

(まわたづくり)

従来の真綿づくりとは少し異なるが、教室等で簡易的にできる方法を紹介する。せっけん水を入れたビーカーに中のさなぎを抜き出した

*責任著者

〒002-8073 札幌市北区あいの里 3-8-2-16

e-mail: t202003@hst.hus.ac.jp

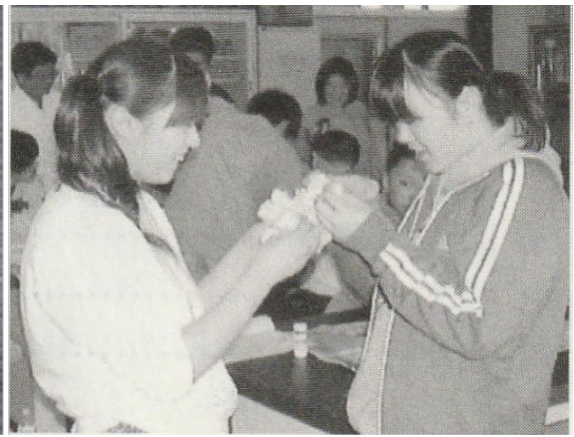


図3. 手でほぐした真綿と真綿の感触に感動する生徒

繭を数個入れ、40~50℃を保ちながら、柔らかくなるまで煮る。その後、0.5 mol/L ほどの水酸化ナトリウム水溶液(NaOHaq)を数滴加えて、さらに煮ると、繭玉がほぐれはじめてくる。少しすると一気に綿状になって広がる。加熱をやめ綿状になったら繭を十分に水洗いし、乾燥器(またはドライヤー等)で乾かす。乾燥した綿状の繭を手にとり、ほぐしていくと手ざわりのよい、ふかふかした柔らかいまわたができる(図3)。

(カイコの絹糸線からテグスづくり)

カイコの形態観察を行った後、ジエチルエーテルで麻酔し、幼虫体の背面を上にして解剖皿に静置して、頭部と胸部の間を虫ピンでしっかりととめる。さらに、幼虫体をひっぱりようにして伸ばして尾部を虫ピンで止める。次に解剖はさみ(眼科用がよい)を用いて、こう門の部分から背脈管にそって頭部に達するまで、消化管を損傷させないように注意して皮膚を切開する。切開した皮膚を虫ピンで左右にとめる。

消化管、絹糸腺、後部マルピーギ管が観察され、消化管への気管の分布の様子も観察できる。

絹糸線を丁寧に取り出し、約0.1%酢酸に浸け、7~10分後、両端を指でしっかり保持して(図4上)、一定の速さでゆっくりとひっぱり、

ある程度の長さでそのまま数分保持すると、伸びた絹糸線が硬直して硬いテグスができる(図4)。

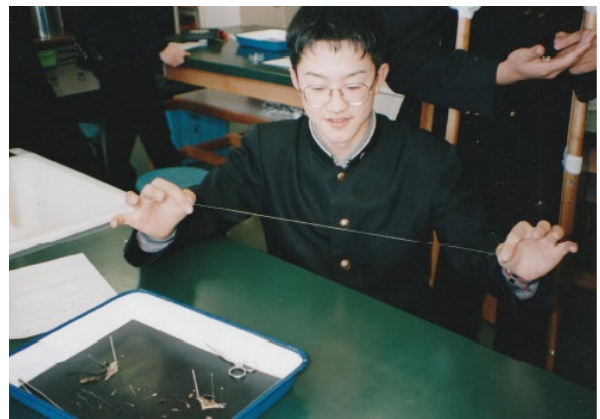


図4. テグス作製風景

この観察実験は、はじめて解剖を行う生徒でも容易にでき、内部構造の観察とともに、釣り糸のテグス製作からタンパク質の変性を理解する有意義な実験である。

2. 理科・科学部の活動（探究活動として）

1) キチン・キトサン添加による低温飼育

部活動における探究活動では、カイコの人工飼料の研究を継続的に行い、その中で同じキチン質を持つカイコにキチン及び当時健康食品として話題であったキチン誘導体のキトサンを添加した人工飼料を食べさせてはどうか、という発想が生まれた。さらに、北海道という寒冷的な地域でも飼育が可能になるのではという期待も持ってこの実験を行った。

なお、北海道の養蚕業の歴史については、吉野滝男氏（元旭川陵雲高校教諭）が克明にまとめられた資料が現存する。それによると北海道でも養蚕が可能な地域として渡島、後志、石狩、天塩、北見、十勝、胆振および日高（一部は除外）として、かなり全道の広範囲で挑戦していた歴史が記されている。

この実験では、4齢脱皮までは室温で人工飼料にて成長させた。低温（15℃）でのカイコの飼育（4齢脱皮後）は、市販人工飼料（粉体）90gに3gの割合でキチンおよびキトサンを添加し、他にクエン酸、寒天などを合わせて調製し湿体の人工飼料を作り、4齢脱皮後、低温庫内（15℃）で給餌した。

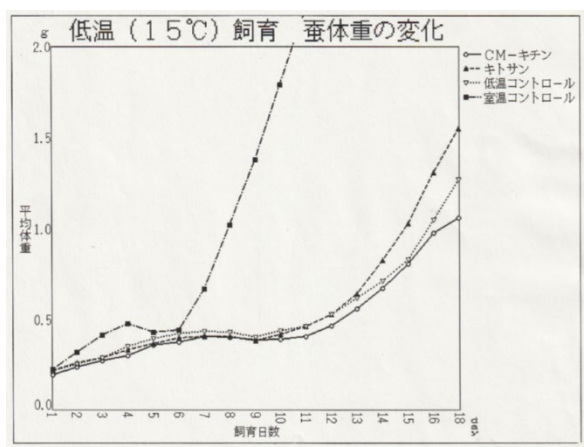


図 5.4 齢脱皮後のカイコ平均体重の変化

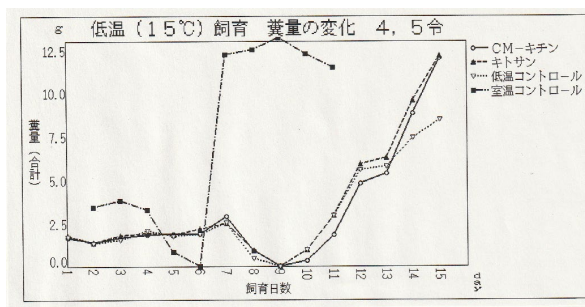


図 6. 低温飼育における4齢～5齢初期の糞量変化



図 7.4 齢脱皮後の26日目のカイコの様子

キトサン添加区(上)はほぼすべての餌が消費されているのに対し、コントロール区(中央)とキチン添加区(下)では、餌が残る。

低温飼育では、4 齢起蚕後 14 日目ごろからキトサン添加区がキチン添加区ならびに低温コントロール区に対して優位性が見られた (図 5)。低温コントロール区における糞量は、4 齢脱皮後 15 日目に差が顕著となった (図 6)。4 齢脱皮後 26 日目に於ける幼虫は、低温コントロール及びキチン添加区では給餌した人工飼料を残し、衰弱していく様子が伺えた (図 7)。

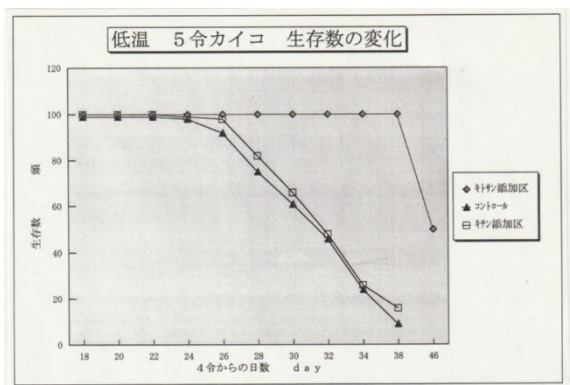


図 8. 低温飼育における生存数の推移

低温 (15 °C) 飼育では、4 齢脱皮後 26 日目を境にして生存数の差が顕著となり (図 8)、キトサン添加区のみが、営繭した。キトサン添加区では、室温 (20°C) 飼育区よりは多少劣るが、繭層率 18%前後の結果が得られた (図 9)。低温飼育では、飼育日数がかかるが、キトサン添加人工飼料の調製によって繭までの生産が可能であった。

2. 環境ホルモン (ビスフェノール A) 添加によるカイコの精巣への影響

1998 年頃、当時環境ホルモンとしてポリカ

ーボネート容器から溶出される外因性内分泌かく乱物質 (通称: 環境ホルモン) が話題となっていた。部活動ではこれを人工飼料に混入させ、カイコの精巣にどのような影響があるか調べる研究に取組んだ。

カイコ品種は、日 603・4×中 604・5 の 4 元交雑種 (はばたき) を用い、25 °C、湿度 65% で飼育した。本飼育条件において、コントロール区は孵化後 26 日で上簇した。市販人工飼料 (粉体) 100 g に 1 ppm~100 ppm のビスフェノール A 溶液を混ぜてカイコに与えた。

熟蚕雄から精巣を摘出し、精巣摘出を等張液 (0.85% KClaq) 浸漬→精巣の内容物 (精子など) を静かにスライドガラス上へ塗布→乾燥→カルノア液 (固定) →4%ギムザ染色→顕微鏡観察と実験を進めた。その結果、ビスフェノール A 添加区では、正常区よりも太く短い有核精子が多く認められた (図 10)。有核精子変態の遅延もしくは停滞の可能性が考えられた。

倒立顕微鏡による精子観察も行った (図 11)。撮影像を比較すると精子数の減少が見られ、環境ホルモン (ビスフェノール A) 添加による精子束への影響の可能性が示唆された。

3) その他の研究テーマ

2011 年には蚕の繭からつくるシルクせっけんをテーマに、また、2017 年ならびに 2019 年には UV カットシルク保湿液の調製に関する研究を行ってきた。

区画	データ数	(まゆ全体)		(絹糸)		繭層率 %	%
		全繭重 g (平均)	繭層 g (平均)	全繭重 g (平均)	繭層 g (平均)		
キトサン添加区	♂12♀ 8	♂0.70 ♀0.80	♂0.13 ♀0.15	♂0.67 ♀0.83	♂0.14 ♀0.17	♂17.8 ♀18.6	
コントロール室温 (20 °C)	♂38♀ 58	♂0.67 ♀0.83	♂0.14 ♀0.17	♂0.67 ♀0.83	♂0.14 ♀0.17	♂20.3 ♀19.9	

(5 令 の べ給餌量 450 g)

図 9. 低温 (15 °C) と室温 (20 °C) 飼育で上簇した個体の繭質

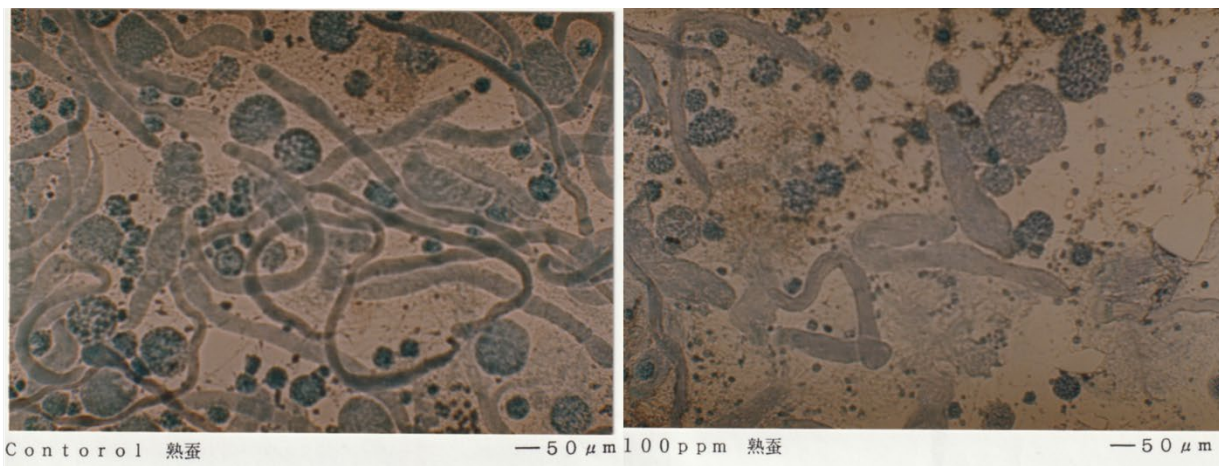


図 10. 熟蚕における無処理（左）とビスフェノール 100 ppm 処理区（右）の精子

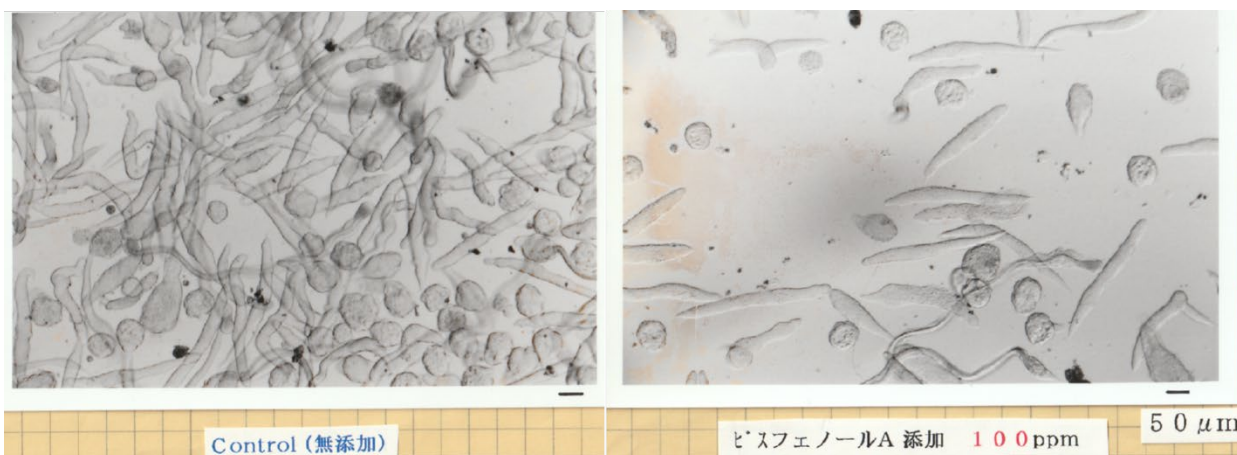


図 11. 倒立顕微鏡観察による無処理区（左）とビスフェノール 100 ppm 処理区（右）の精子

4) 現在研究中のテーマ

上簇する簇の大きさと吐糸するタイミングを合わせて、玉繭ができる条件を研究中である（図 12）。

おわりに

これまで多くの大学関係者の方、人工飼料生産者の方などに大変お世話になり、継続してカイコを利用した教育活動ができましたこと、心より感謝申し上げます。



図 12. 段ボールの簡易簇を自作して玉繭のサイズを調整

人工飼料と桑葉による p50 と錦秋×鍾和の発育比較

大森 裕介・金児 雄*

弘前大学大学院農学生命科学研究科

(2021年12月16日受理)

昆虫の脱皮や変態は、ホルモンによって制御されている。チョウ目において、蛹変態は幼若ホルモン (JH) が血中から消失することによって引き起こされる (HIRUMA and KANEKO, 2013)。JH の消失は、終齢幼虫が一定の体重を超えることで起こる (NIJHOUT and WILLIAMS, 1974)。また終齢幼虫への脱皮も、一定の大きさに達することで起こる (NIJHOUT 1975; DAIMON *et al.* 2021)。タバコスズメガ (*Manduca sexta*) の場合、頭幅が 5.1 mm 以上で、終齢へと脱皮を行い、終齢幼虫期間に体重が 5 g を超えることで、血中 JH が消失し蛹変態が始まる。このように幼虫の体の大きさと変態は強く相関することから、昆虫の内分泌や生理の研究は、一定の栄養状態で安定した発育下で実験を行うことが望ましい。そのためこれらの研究においては、年間を通して一定の栄養状態が期待できる人工飼料を用いることが多い。

人工飼料の開発研究は、カイコの安定供給を目的として行われ、1960年には福田らが、桑粉末を含む人工飼料でのカイコの全齢飼育に初めて成功した (福田ら, 1960)。その後、桑粉末を含まない人工飼料を用いた全齢飼育も報告された (伊藤, 1962; 林屋ら, 1963)。人工飼料の改良に伴い、人工飼料に適する系統とそうでな

い系統の調査も行われた (高宮, 1968)。中国種では、日本種に比べて1齢期の発育が遅れる傾向があり、一方で、日本種では4、5齢の発育が遅れる傾向が認められた。また1代雑種 (F₁) においても、品種間で人工飼料への適合性が異なることが報告されている (寿, 1980)。一般的に桑葉飼育に比べて人工飼料飼育では、幼虫から蛹までにかかる日数は長く、個体の体重が軽くなる (松原ら, 1967; 高宮, 1968; 高宮・中村, 1973)。

現在では、人工飼料は市販されており、誰でも気軽に使用することができる。本研究でも、錦秋×鍾和を、日本農産工業製の交雑種用粉末人工飼料のシルクメイト 2M で飼育し、実験に供している。近年、錦秋×鍾和の次世代に認められた変異体解析のために、p50 系統へのもどし交配を始めた。p50 系統は、ゲノムプロジェクトに用いられた p50T と同様の配列を有することが期待される系統である。しかし p50 と交配した錦秋×鍾和由来の変異体は、シルクメイト 2M ではうまく飼育できなかった。そこで本研究では、発育不良要因を知り、よりよい飼育条件を設定するため、p50 と錦秋×鍾和それぞれの発育について、日本農産工業製の人工飼料 2 種類と桑葉を用いて比較した。

*責任著者

〒036-8561 弘前市文京町 3

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

材料と方法

1. 供試カイコ系統

本研究では、錦秋×鍾和(上田蚕種株式会社)および p50 を用いた。p50 は NBRP を通じて、九州大学大学院農学研究院附属遺伝子資源開発研究センターから購入した。

2. 飼育方法

桑葉は、九州大学大学院農学研究院附属遺伝子資源開発研究センターから購入した。日本農産工業製人工飼料は、形成済みの原種用シルクメイト PS と、粉末で供給される交雑種用シルクメイト 2M を使用した。

シルクメイト 2M の調整に際して、1~2 齢用と 3~5 齢用で水分量を変えた。1~2 齢用には、粉末に対して 2.85 倍量の蒸留水を加え、3~5 齢用には 2.6 倍量の蒸留水を加えた。粉末に蒸留水を加え 70 分間蒸し、十分に冷却した後、一週間を目処として使用まで 4°C で保存した。

幼虫期を通じて、桑葉、シルクメイト PS またはシルクメイト 2M のいずれか 1 種類を用いて飼育した。飼育温度は 25 °C、明暗周期は 12L:12D とした。p50 の飼育の際には、YURI and

SAHARA (2017) を参考に、裸蛹にならないように湿度管理に十分留意した。各齢期における日数は、脱皮初日を 0 日として数えた。

3. 発育日数算出および体重測定

12 時間毎に飼育個体の脱皮状況を確認し、吐糸管着色 (Kiguchi *et al.* 1983) は実体顕微鏡を用いて観察した。脱皮状況に応じて、4 齢 0 日、5 齢 0 日、蛹 0 日に達した個体の体重を測定した。幼虫脱皮時の体重測定は、雌雄鑑別後、給餌前に行った。

4. 頭幅測定

p50 の桑葉飼育区およびシルクメイト PS 飼育区においては、雌雄別に 5 齢 4 日幼虫の最大頭幅をノギスにて測定した。

5. 統計処理

各飼料区での発育を比較するため InStat 3 (<https://www.graphpad.com/scientific-software/instat/>) を用いて、1 齢から蛹までの各発育日数および発育期間全日数に対して one way ANOVA を行ったのち、Tukey の多重比較を行った。体重測定の結果に対しては、各系統内の同一発育時期の値を (<https://www.r-project.org/>) の MSM3 パ

表 1. p50 における飼料の違いによる孵化から羽化までの各発育期間にかかる日数の比較

飼料	N	1 齢 (日)	2 齢 (日)	3 齢 (日)	4 齢 (日)	5 齢 (日)	吐糸期 (日)	蛹 (日)	期間全体 (日)
2M	50	5.00±0	4.75±0.44, a	4.00±0	5.81±0.54, a	7.05±0.29, a	3.63±0.49, a	8.19±0.54, a	38.42±1.30, a
PS	50	4.00±0	3.00±0, b	4.00±0	5.00±0, b	5.42±0.50, b	3.46±0.50, a	7.40±0.49, b	32.28±0.45, b
桑葉	78	4.00±0	3.00±0, b	4.00±0	4.00±0, c	3.90±0.20, c	2.10±0.31, b	7.95±0.22, c	28.95±0.51, c

値は平均値±SD で示した。飼料の 2M は、シルクメイト 2M、PS はシルクメイト PS。5 齢 (日) は、5 齢脱皮から吐糸管着色までの期間とし、吐糸期は、吐糸管着色から蛹脱皮までの期間とした。1 齢と 3 齢を除く、数値横の異なるアルファベットは、各齢期において飼料間で有意差 (Tukey の多重検定で $p < 0.01$) があることを表す。

パッケージ (Version 1.16) を用いて、Steel-Dwass による多重比較を行った。頭幅値に対しては、InStat 3 を用いた Mann-Whitney U-test を行った。

結果と考察

1. 飼料の違いが p50 の発育に及ぼす影響

p50 をシルクメイト PS (PS)、シルクメイト 2M (2M) または桑葉のいずれかを用いて飼育した。いずれの飼料で飼育した場合も、全ての個体が蛹へと脱皮した。桑葉飼育区は全ての個体が正常な繭を紡ぎ、成虫になった。しかし PS 飼育区で 53 頭中 3 頭が、裸蛹となり死亡した。2M 飼育区では 54 頭中 4 頭が、正常な繭を紡いだ後の蛹期間中に死亡した。そこで正常に繭を紡ぎ、かつ成虫になった個体に対して、成虫まで 1 齢から 4 齢の各齢期の日数、5 齢脱皮から吐糸管着色にかかる日数、吐糸管着色から蛹脱皮までの日数、蛹脱皮から羽化するまでの日数を飼料区ごとに示し、比較した (表 1)。5 齢幼虫は、吐糸管着色後に摂食を終えて繭を紡ぎ始めることから、吐糸管着色から蛹脱皮までの日数を吐糸期とした。2M 飼育区は、他の 2 区に比べて 2 齢と 4 齢期の発育日数にばらつきが認められた。PS 飼育区では、5 齢期の発育日数がばらつき、2 つの人工飼料育双方の蛹期間のばらつきがやや大きくなった (表 1)。発育日数を 1 齢から羽化までの期間全体で比較すると、桑葉飼育区に対して 2M 飼育区では平均 10.53 日余計にかかった。PS 飼育区は、両者の中間程度の値を示した。これらの結果は、人工飼料育は桑葉育よりも発育が遅れるとの報告 (高宮, 1968) と一致する。

桑葉飼育区に比べ 2M 飼育区は、3 齢を除いた全ての齢期にかかる日数が長かった。特に 4

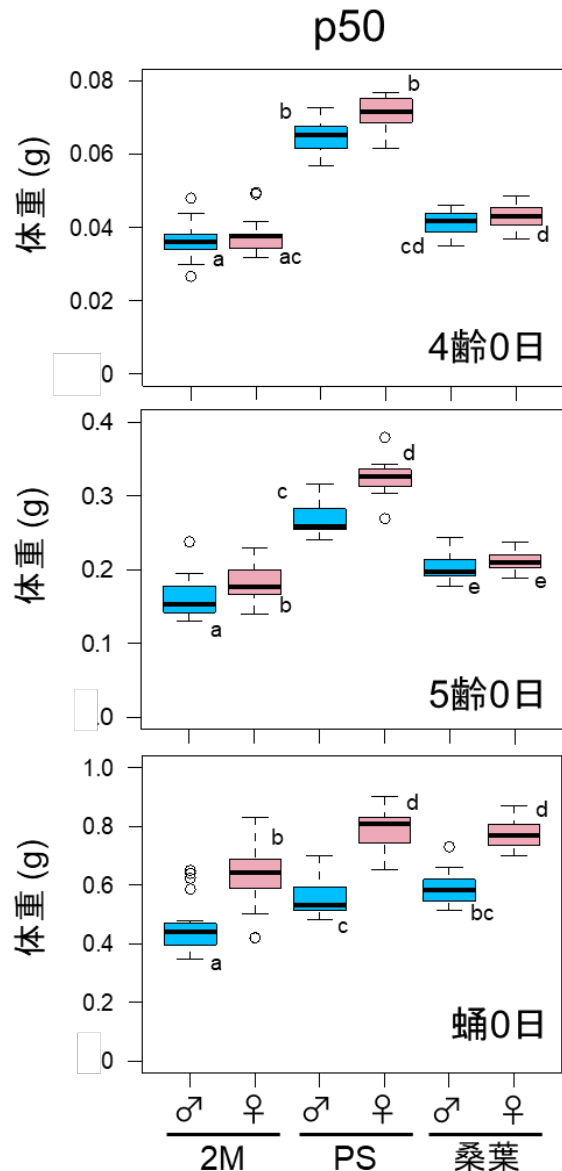


図 1. 飼料の違いによる p50 の体重への影響

p50 を、シルクメイト 2M (2M)、シルクメイト PS (PS)、桑葉のそれぞれで飼育し、4 齢 0 日 (上段)、5 齢 0 日 (中段)、蛹 0 日 (下段) に体重を測定した。体重は、雌雄それぞれ測定し、箱ひげ図で示した。青色が雄、ピンク色が雌の体重を示す。また箱の上端が第 3 四分位数、下端が第 1 四分位数を示し、箱の中の線は中央値を表す。ヒゲの両端は、第 3 四分位数+1.5×(箱の長さ)の範囲内での最大値、第 1 四分位数-1.5×(箱の長さ)範囲内での最小値を表す。ヒゲの範囲から外れた値は、丸で示した。各グラフ内の異なるアルファベットは、有意差があることを示す (n=15-30, Steel-Dwass による多重検定で、 $p < 0.05$)。

齢と 5 齢において、それぞれ 2.81 日と、3.15 日遅延した。また摂食を行わない吐糸期でも 2M

飼育区は、桑葉飼育区に比べて 2.53 日長かった。発育のばらつきが顕著であることおよび各齢期が長いことから 2M は、p50 飼育に適さないと結論付けられた。

PS 飼育区は、1~3 齢日数は桑葉飼育区と同一と見なせたが、4 齢から吐糸期にかけて、各齢期で 1~1.5 日程度の遅延が認められた。p50 は中国種であり (伴野, 2008)、中国種を人工飼料で飼育すると桑葉飼育と比べ 1 齢での発育に遅延が認められると報告されている (高宮, 1968)。しかしながら、本研究の PS 飼育区と桑葉飼育区の間では、そのような相違は認められなかった (表 1)。報告当時の人工飼料に比べ PS は、改良されたためであると考えられる。蛹においては桑葉飼育区よりも、PS 飼育区が 0.55 日早く羽化した。

飼料の違いが p50 の体重に与える影響を調査した (図 1)。それぞれ脱皮直後である 4 齢 0 日と 5 齢 0 日においては、雌雄ともに PS 飼育区が最も重く、ついで桑葉飼育区、2M 飼育区の順に軽くなった。一方、蛹 0 日の体重は、PS

飼育区と桑葉飼育区に差が無かったのに対して、2M 飼育区では、有意に軽量であった (図 1)。また 2M 飼育区では、蛹個体間のばらつきが大きかった。通常、終齢への脱皮後に幼虫が一定の体重を超えると、血中 JH 濃度が急激に低下し始め、この低下によって頭部から前胸腺刺激ホルモン (PTTH) の分泌が促され、蛹変態が始まる (NIJHOUT, 1994)。よって、一定の体重を超えてから PTTH が分泌されるまでの期間でどれだけ成長したかによって、個体の蛹の大きさに違いが生じる (NIJHOUT, 2015)。2M 飼育区では、5 齢期間が長いにも関わらず蛹サイズが小型であったことから、この期間における発育速度が遅いと考えられる。

幼虫が蛹脱皮するかどうか、言い換えるならばその幼虫が終齢か否かは、脱皮時の頭幅サイズによって決まる (NIJHOUT, 1975; DAIMON *et al.* 2021)。PS 飼育区の 5 齢 0 日の体重は、桑葉飼育に比べて、雄で 1.32 倍、雌で 1.52 倍も重いことから (図 1)、両飼育区間には、頭幅に差があると推測された。そこで 5 齢の頭幅を、PS 飼育区と桑葉飼育区で比較した (図 2)。頭部のクチクラは硬く脱皮後も変化せず、その齢期間の頭幅は大きく変化しない (NIJHOUT, 1994) ことから、5 齢 4 日の個体の頭幅を測定した。その結果、雌雄いずれにおいても頭幅に有意差は認められなかった (図 2)。つまり PS で飼育された個体は、桑葉飼育区に比べて体重は重い、頭幅の成長は差が無いと言える。つまり、飼料によって頭幅と体重の比は異なる。飼料間で、体重に差が生じた要因として、体内水分率の違いが考えられる。カイコの体内水分率は、孵化後急激に上昇し、4 齢期間まで同程度で保持される (上田・鈴木, 1967)。また人工飼料に含まれる水分率が高いと、体内水分率が高くなることが報告されている (高宮, 1970)。

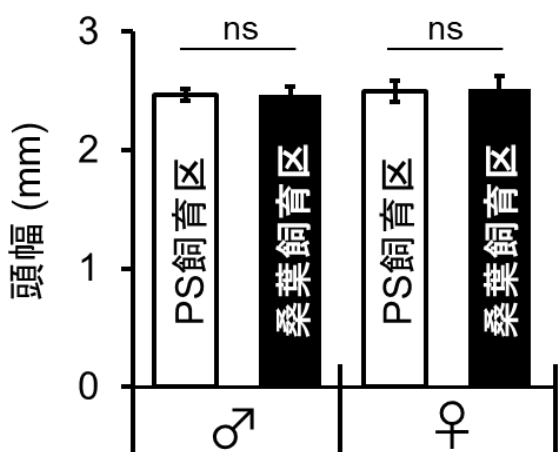


図 2. p50 の PS 飼育区と桑葉飼育区の頭幅の比較

5 齢 4 日において、p50 のシルクメイト PS 飼育区 (PS 飼育区) と桑葉飼育区の頭幅を、雌雄それぞれ計測した。値は n=6-18 の平均値で、エラーバーは標準偏差を示す。グラフ上部の ns は、Mann-Whitney U-test の結果、有意差がないことを示す。

これらのことから、PS 飼育区では飼料に含まれる水分により、桑葉飼育に比べて体重が重くなった可能性がある。

2. 飼料の違いが錦秋×鍾和の発育に及ぼす影響

いずれの飼育区においても、蛹期間の日数にばらつきが見られた(表2)。PS 飼育区、2M 飼育区ならびに桑葉飼育区全ての個体が正常に繭を紡ぎ、成虫になった。p50 とは異なり、期間全体(孵化から羽化まで)の発育日数は、PS 飼育区が、2M 飼育区と桑葉飼育区に比べて有意に短くなった。一方で、2M 飼育区と桑葉飼育区には有意な差は認められなかった。また、1 齢期間は、2M 飼育区で他の飼育区よりも1日延長した。蛹期間は、桑葉飼育が2M 飼育区よりも1日延長し有意差が認められた。3 齢発育日数は、2M 飼育区が有意に短く、5 齢発育日数は桑葉飼育区、2M 飼育区、PS 飼育区の順に有意な短縮が認められた。PS 飼育区は、4 齢以降の飼育期間が短くなる傾向が見られ、特に5 齢飼育期間は桑葉飼育区より2.05 日も短縮した(表2)。人工飼料育での5 齢期間短縮は、日124号×支124号でも報告されて(高宮,1970)おり、実用品種という点で錦秋×鍾和との共通性がある。4、5 齢期は、1~3 齢期とは栄養要求性が異なることが指摘されている(平山,

2020)ものの、なぜPSで飼育した際に、錦秋×鍾和の発育が大きく短縮されるのかは不明である。

錦秋×鍾和の全発育期間の差は、p50 ほど顕著ではなかった(表1-2)。この結果は、実用系統が一般的に人工飼料への適合性が高いという報告(高宮,1968)と一致したが、その要因の詳細は不明である。

錦秋×鍾和の雌体重は、4 齢0日の桑葉飼育区とPS 飼育区を除いたいずれの飼育区間でも有意差が認められなかった(図3)。一方雄は、飼料の違いによる体重差が観察されたものの、飼料ごとに一様ではなかった。例えば、4 齢0日ではPS 飼育区が他の2区に比べて有意に軽く、蛹0日では桑葉飼育に比べて、2M 飼育区で有意に軽かった。また、2M 飼育区とPS 飼育区では、ある時期での個体間のばらつきが大きくなった。p50 に比べて、錦秋×鍾和の幼虫体重に大きな差が生じなかった理由のひとつに、錦秋×鍾和が水分調整力に優れている可能性が考えられる。日124号、支124号および日124号×支124号の3品種で、人工飼料に含まれる水分率が体重に与える影響を比較したところ、日124号×支124号は、餌の水分率による体重のばらつきが最少となった(高宮,1970)。交雑品種の錦秋×鍾和も同様に水分の調整力が優れ、p50のような水太りが起こらなかった結果、幼虫期における大きな体重差を生じな

表2. 錦秋×鍾和における飼料の違いによる孵化から羽化までの各発育期間にかかる日数の比較

飼料	N	1 齢 (日)	2 齢 (日)	3 齢 (日)	4 齢 (日)	5 齢 (日)	吐糸期 (日)	蛹 (日)	期間全体 (日)
2M	24	5.00±0	4.00±0	3.83±0.24, a	4.83±0.24, a	6.58±0.58, a	4.00±0, a	10.75±1.24, a	39.00±1.76, a
PS	51	4.00±0	4.00±0	4.00±0, b	4.63±0.49, b	5.10±0.67, b	3.47±0.50, b	11.18±1.28, ab	36.37±2.28, b
桑葉	27	4.00±0	4.00±0	4.00±0, b	5.00±0, a	7.15±0.36, c	4.00±0, a	11.70±1.10, b	39.85±1.06, a

値は平均値±SDで示した。飼料の2Mは、シルクメイト2M、PSはシルクメイトPS。5 齢(日)は、5 齢脱皮から吐糸管着色までの期間とし、吐糸期は、吐糸管着色から蛹脱皮までの期間とした。1 齢と3 齢を除く、数値横の異なるアルファベットは、各齢期において飼料間で有意差(Tukeyの多重検定で $p < 0.01$)があることを表す。

った可能性が考えられる。

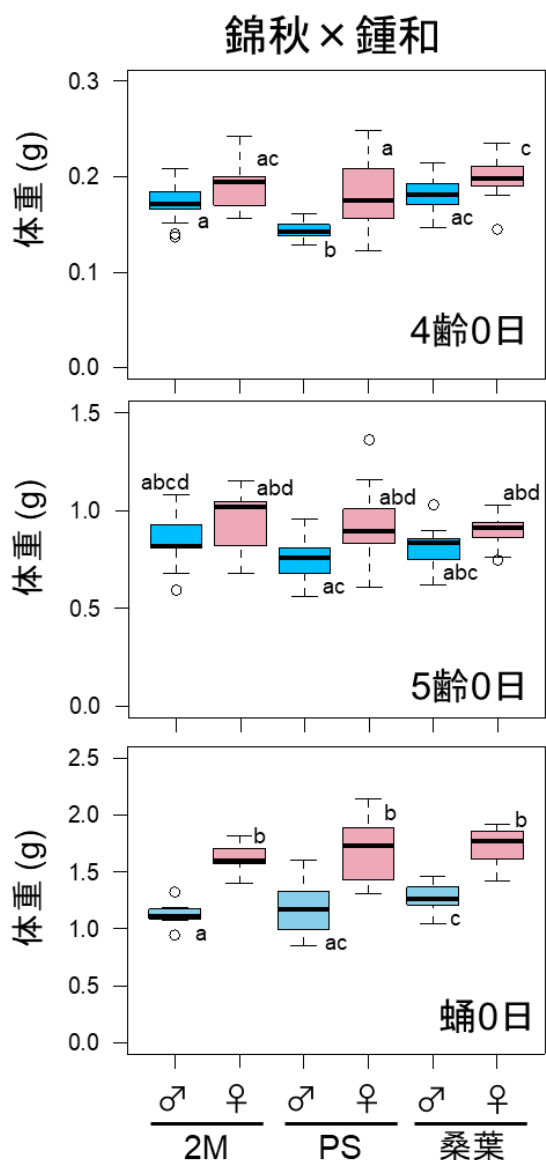


図3. 飼料の違いによる錦秋×鍾和の体重への影響

錦秋×鍾和を、シルクメイト 2M (2M)、シルクメイト PS (PS)、桑葉のそれぞれで飼育し、4 齢 0 日 (上段)、5 齢 0 日 (中段)、蛹 0 日 (下段) において体重を測定した。体重は、雌雄それぞれ測定し、箱ひげ図で示した。図の表示方法は、図 1 と同様。各グラフ内の異なるアルファベットは、有意差があることを示す (n=12-26, Steel-Dwass による多重検定で、 $p<0.05$)。

3. p50 系統へもどし交配した変異体の飼育に向けて

錦秋×鍾和の発育は、2M と桑葉で大差なかつ

たことから、錦秋×鍾和を用いた研究には 2M を使用して問題ないと考えられる。一方で、PS 飼育区では、発育期間の短縮が観察されたことから、2M や桑葉の飼育で得られた結果と比較する際には注意を要する。これまでカイコの内分泌の研究の多くは、人工飼料育した錦秋×鍾和を対象としている。今後の議論には、使用した人工飼料にも着目する必要がある。

p50 はゲノムプロジェクトに使用された元の系統であり、次世代シーケンスで得られたデータのマッピングが容易に行える。近年、次世代シーケンサーを利用した結果がリーズナブルに入手できるようになり、内分泌や生理の実験においても、今後、p50 系統を使用することが増えると考えられる。今回の結果から、2M での p50 の飼育は、発育の大幅な遅延があることから、研究に支障をきたす可能性があり、現状では、もどし交配した変異個体の飼育には、桑葉が適していると考えられる。一方、水分量を変化させた PS での p50 飼育においては、桑葉育と同等の飼育の可能もある。日本農産工業は、組成が PS と同様と考えられる粉体の原種 1-3 齢用人工飼料のシルクメイト PM を販売している。今後、この人工飼料を用いて、水分量に関する飼育の改善について検証したい。

文 献

- 伴野 豊 (2008): 蚕糸・昆虫バイオテック, **77**: 3-8
- DAIMON T. *et al* (2021): *Curr. Biol*, **31**: 884-891
- 福田紀文ら (1960): 日蚕雑, **29**: 1-3
- 林屋慶三ら (1963): 農化, **37**: 735-737
- 平山 力 (2020): 蚕糸・昆虫バイオテック, **89**: 91-96
- HIRUMA K. and KANEKO Y. (2013): *Curr. Top. Dev.*

- Biol, **103**: 73-100
- 伊藤智夫 (1962): 日蚕雑, **31**: 1-6
- Kiguchi K *et al.* (1983): Jpn. Agr. Res. Quat, **17**: 41-46
- 寿 正夫 (1980): 岩手県蚕業試験場要報, **37**: 735-737
- 松原藤好ら (1967): 日蚕雑, **36**: 39-45.
- NIJHOUT H.F. (1975): J. Exp. Biol, **62**: 221-230
- NIJHOUT H.F. (1994): Insect Hormones, Princeton University Press. pp. 61-81
- NIJHOUT H.F. (2015): BMC Biology, **13**: 57
- NIJHOUT H.F. and WILLAMS C.M. (1974): J. Exp. Biol, **61**: 481-491
- 高宮邦夫 (1968): 蚕糸研究, **69**: 27-34
- 高宮邦夫 (1970): 蚕試彙報, **93**: 23-38
- 高宮邦夫・中村正雄 (1973): 蚕試彙報, **96**: 129-141
- 上田 悟・鈴木 清 (1967): 蚕糸報, **22**: 33-74
- YURI K. and SAHARA K. (2017): J. Insect Biotech. Seric, **86**: 43-47

日本蚕糸学会東北支部 役員

(任期 2021 年 1 月 1 日～2022 年 12 月 31 日)

支部長

佐原 健 (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)

浅野 真一郎 (一般社団法人日本蚕糸学会東北選挙区選出代議員)

委員 (編集担当)

金児 雄 (一般社団法人日本蚕糸学会東北選挙区選出代議員)

東北蚕糸・昆虫利用研究報告投稿要領

1. 東北蚕糸・昆虫利用研究報告(以下本報告)への投稿者は日本蚕糸学会員にかぎる。共著のときは非会員を含むことができる。会員の推薦のもと支部長が許可した場合にも投稿可能とする。
2. 本報告への投稿原稿はデジタルデータとし、A4版サイズに、次の順序で記述する。1)表題 2)著者名 3)所属機関の名称 4)本文(目的、材料と方法、結果と考察、要約など) 5)文献
なお、1行21文字、1ページ40行とする。刷上がり1ページ分は1,600字を目安とする。
以下、URL参照：http://jsss.or.jp/modules/pico2/index.php?content_id=18
3. 本報告への投稿原稿は横書きとし、当用漢字および現代かなづかいを用いる。動植物および外来語はカタカナとするが、蚕や桑などは漢字を用いてもよい。薬品名、化学物質名等は和名を用い、学術用語は日本蚕糸学会編「蚕糸学用語辞典」による。また、学名(イタリック)および外国人の名、地名は原語とする。
4. 数字はアラビア数字とし、また単位および略記号の表し方は km、m、cm、mm、 μm 、nm、ha、a、(アール)、 m^2 、ml、 μl 、kg、g、mg、 μg 、sec、min、hr、rpm、%、ppm、M(モル濃度)、N(規定度)、 $^{\circ}\text{C}$ 、kcal、pH、RH(相対湿度)、 ^{32}P (放射性リン ^{32}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) (浅野眞一郎)に送信する。紛失等の事故を考慮してデータの控えをとっておく。掲載した原稿データは返却しない。

付 記

送付の様式

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

日本蚕糸学会東北支部規約

(総則)

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

(機関)

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

(役員)

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

を委員とする

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

(会計)

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

(名誉会員及び賛助会員)

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

(規約の改廃等)

- 第11条 この規約の改廃は総会出席会員の過半数の賛同を必要とする

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

印刷	令和3年12月28日
発行	令和3年12月28日
編集者	佐原 健
発行者	日本蚕糸学会東北支部 〒020-8550 盛岡市上田 3-18-8 岩手大学農学部応用昆虫学研究室 Tel 019-621-6147

