

農業生物資源ジーンバンク (昆虫分野) の紹介

農業生物資源研究所 小瀬川 英一・今西 重雄

はじめに

農業生物資源研究所のジーンバンクは、農業分野に関わる生物遺伝資源を探索・収集すると共に、それらの特性評価・保存・配布・情報公開を行っている。ジーンバンクは4部門(植物・微生物・動物・DNA)に分かれており、動物部門の中に昆虫類が含まれている。遺伝資源の登録数は植物部門で約24万系統、動物部門で約1千系統、微生物部門で約2万5千系統の遺伝資源(2008年度実績)を保有する。昆虫遺伝資源として754系統が登録されており、この中には有用昆虫や培養細胞などが含まれている(表-1)。登録遺伝資源のうち、アクティブコレクションはホームページ(http://www.nias.affrc.go.jp/index_e.html)から配布を申請することができる。非アクティブ遺伝資源は特性調査が終了した後にアクティブ化される。本稿では特に、カイコと昆虫培養細胞の遺伝資源について紹介する。

I カイコ遺伝資源について

昆虫遺伝資源はカイコの登録数が多い。カイコは遺伝・生理・生化学などの研究の蓄積が多く、今後もモデル昆虫としての利用が期待される。そこで昆虫学の研究材料に利用するという視点からカイコ遺伝資源を紹介する。

(1) カイコ遺伝資源の分類

カイコ遺伝資源は品種の原産地域から6種類(日本種、中国種、欧州種、東南アジア種、眠性種、突然変異種)に分類されている(表-2)。地域種で分類する理由は、地域種間の交配で雑種を得ると、最大限の雑種強勢が得られるからである。それゆえ、むやみに地域間雑種から系統育成をすることは避けられてきた。眠性品種は幼虫脱皮回数の遺伝的多様性をもつ品種である。脱皮回数3回の三眠蚕の普及例としては、朝鮮半島において近世まですべてのカイコが三眠蚕であったことが知られている。突然変異種は、突然変異遺伝子の保存に主眼がおかれる系統群であり、地域性との関連は薄く、基礎研究

目的で利用されるものが多い。ところで地域種はさらに3種類(在来種、改良種、育種素材)に分類される。在来品種は歴史的に古く、又昔、大如来は約200年前前に利用が始まった品種である。在来品種は大正時代までに、改良品種に主役の座を譲った。カイコにおいて改良品種とは、雑種強勢を利用する一代交雑品種(1代雑種)の親系統(原種)を意味する。1代雑種は現代の養蚕用品種の大部分を占めるようになった。一方、育種素材は、限りなく実用品種に近いところまで育成された原種予備群であり、短期間で実用品種として完成させることができる潜在力をもっている。特に、実験利用などに便利な

表-1 昆虫遺伝資源の登録数^{a)}

区分	登録数
ミツバチ	2
ハリナシミツバチ	1
カイコ	667
昆虫培養細胞	70
天敵昆虫	5
天敵餌用昆虫	2
検定用昆虫	7
合計	754

^{a)} 2007年度の実績を参考にした。

表-2 カイコ遺伝資源の分類と登録品種数^{a)}

分類	登録品種数
日本種	
在来品種	49
改良品種	58
育種素材	86
中国種	
在来品種	51
改良品種	71
育種素材	101
欧州種	
在来品種	27
改良品種	19
育種素材	3
東南アジア種	6
眠性種	21
突然変異種	
原型	125
複合型	50
合計	667

^{a)} 2007年度の実績に基づく。

Introduction of Insect Genetic Resources Stocked in Genebank of National Institute of Agrobiological Sciences. By Eiichi KOSEGAWA and Shigeo IMANISHI

(キーワード: ジーンバンク, 昆虫培養細胞系, 遺伝子発現, カイコ, 遺伝資源)

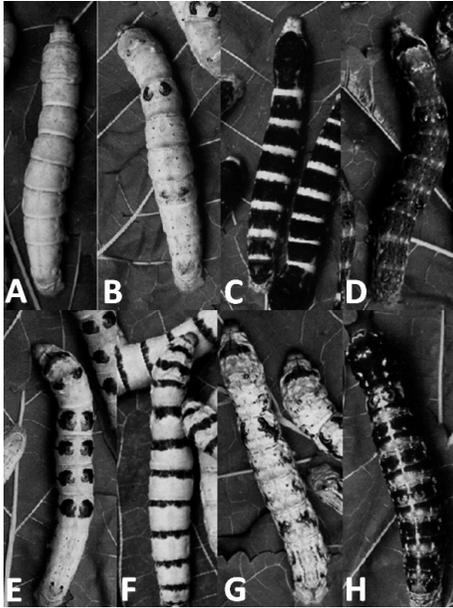


図-1 カイコ幼虫斑紋の多様性

A: 姫蚕 (p)^{a)}. B: 形蚕 (p^s). C: 黒縞 (p^s). D: 暗色 (p^M). E: 褐円 (L). F: 虎蚕 (Ze). G: 緋 (q). H: 杲 (U).^{a)} 括弧内は遺伝子記号。

人工飼料育に適合した系統が多い。

(2) 形態・発生に関連した遺伝資源

在来品種の幼虫体色は多様であり、遺伝子で支配されている(図-1)。蛹体色は正常色と黒色(bp)*が存在する。成虫体色では黒いガの黒蛾(Bm)や、クワコツマグロ遺伝子(Ws)が保存されている。後者は近縁のクワコ(*Bombyx mandarina*)から導入された翅の色素分布に関連する遺伝子である。

外部形態の変異系統としては、幼虫背面に生じる瘤(K)や過剰な気門を生じる変異(es)、成虫の前後翅を欠如する無翅(fl)などが存在する。主として体節形成に異常を示すホメオティック突然変異は10系統が保存されている。

内部形態の変異として、血球細胞の一つである小球細胞が欠如する変異(Sph)が保存されている。また腎臓形卵遺伝子(ki)は卵の変形を伴う胚致死遺伝子であり、中胚葉が分化しないという特徴がある。前述のホメオティック突然変異系統や相互の雑種は神経系の形態(辻田, 1955)や卵巣小管の数が異常になることが知られている。

* 括弧内のイタリック文字列は遺伝子記号を示す。

(3) 性決定に関連する遺伝資源

カイコの性決定に関する研究例は多い。その理由は養蚕用品種がほとんどすべて1代雑種であり、原種間の厳密な交配が不可欠であることに関係する。膨大な量の交配を正確に行うため、交尾器を見なくても雌雄鑑別が確実に実施できる方法の開発が望まれていた。開発にはカイコの性決定様式が雌ヘテロのZW型であることが大きく寄与した。具体的な改良点は、W染色体に幼虫斑紋・卵色・繭色の遺伝子を転座させることであった。改良された転座W染色体をもつ系統は、標識形質が限性遺伝するので雌雄鑑別が容易になり、現在多くの品種に利用されている。そしてそれらとともに改良の途中段階のW染色体をもつ系統も複数保存されている。一方、伴性遺伝するZ染色体上の遺伝標識を利用して雌雄鑑別が可能である。例えば孵化幼虫が赤褐色を呈する伴性赤蟻(sch)や、油蚕の一種のd油(od)などの突然変異遺伝子を利用する。これらの方法は、卵や若齢幼虫など、雌雄鑑別が難しいステージで実験を行うときに有利である。

(4) 眠性

カイコ品種の幼虫脱皮回数は、環境条件が一定であればおおむね遺伝的に固定している。幼虫脱皮回数は普通4回(四眠蚕)であるのに対し、2回、3回(三眠蚕)、5回、6回の品種が存在する。四眠蚕は虫体が大きく生糸や有用物質の大量生産に適合している。一方、三眠蚕は小さく生糸の大量生産には適していない。5回、6回の品種の虫体は四眠蚕の実用品種より小さい。眠性を支配する遺伝子としては、優性の三眠蚕遺伝子(M^3)や劣性三眠遺伝子(rt)が存在し、基礎研究に利用されている。

(5) 突然変異性試験用系統

特定座位法を利用して、化学物質などの遺伝毒性を調査することができる(田島ら, 1973)。正常のカイコに被検物質を添食、塗布、注射などの方法で処理し、その個体が羽化したとき、桃色(pe)・赤色(re)の2種類の劣性卵色突然変異をもつ系統と交配する。この交配で産下された卵の中に、桃色あるいは赤色の卵が生じれば、被検物質が突然変異源である可能性が示唆される。

(6) 化性

化性は1年間に昆虫が自然発生する回数概念である。現存するカイコにおける化性の種類は1化性、2化性、多化性である。1化性品種は確定型休眠であり、2化性品種は随意型休眠である。2化性カイコは親世代の卵期の温度・光周期条件を変えることによって、次世代に休眠卵、非休眠卵を容易に産み分けさせることができる。日本種・中国種には1化性と2化性が存在し、欧州

種は1化性、東南アジア種は主として多化性である。遺伝子組換え実験など、カイコを休眠させずに次世代を得る場合は、化性が不安定な多化性より突然変異を利用する方法が確実である。例えば着色非休眠卵 (*pnd*) は劣性突然変異であり、ホモになると卵は休眠卵特有の着色をするにもかかわらず卵は休眠せずに発生を続けてふ化するので、年内に多数回飼育する実験などに利用される。

(7) 行動

繭形の決定は吐糸行動に関連し、品種ごとに固定している。一般に日本種は縊れた俵形の繭であり、中国種は楕円形、欧州種は長楕円、東南アジア種は紡錘形である。また野蚕の繭に見られるように、繭の前後端に穴が開く有孔繭系統や、繭の縊れ部分が非常に薄くなり、蛹が透けて見える胴切れ繭系統が保存されている。カイコの多くの品種は単独で1個の繭を作るが、一部の品種は複数個体が、融合した1個の繭(同孔繭)を形成する。同孔繭品種の例としては沖縄由来の琉球多蚕繭や、在来の大如来が顕著である。綿蚕や東南アジア種は、繭層の中の糸間隔が広く、繭殻が綿状となり柔らかい。

交尾行動に関する異常を示す系統の例を挙げる。白薄墨蚕 (*bd*) は雌は不妊であり、雄は雌が近くにいても雌を探索し交尾しようとする行動が弱い。*bd* 雄に正常な雌のフェロモン刺激を与えた場合でも興奮が弱いので自力で交尾できない。しかし *bd* 雄の交尾器が雌をつかむ反射行動は非常に旺盛なので、ハンドペアリングは比較的容易である。*bd* とは異なるが、前後翅を欠如する *fl* や、翅に遺伝的奇形がある「ざりがに (*cf*)」も交尾行動に難がある。交尾行動は旺盛であるが、雄が尾端を雌の尾端に近づけても雌を捕まえることができない場合が多い。そのような雄は交尾することができないままアプローチを繰り返す。

飼い慣らしに関する行動特性系統を2例紹介する。幼虫行動の例としては、カイコは野外昆虫に比較して索餌行動などの幼虫の移動性は弱い。しかし、クワコとカイコの交雑固定系統の N56 は幼虫の行動性に富み、餌がなくなると逃亡する。対照的に同じ交雑固定系統の N52 は逃亡しないので、カイコ並である。成虫の例を挙げると、成虫のカイコは基本的に飛翔しないが、赤熟など小型の在来種はまれに脚を浮かせて羽ばたきながら地面を滑走することがある。

(8) 生理・生化学

1) エクダイソン合成異常

カイコ突然変異の中に、1~2齢の幼虫の一部が、脱皮に入ることができず致死する系統が数種類存在し、これらを不眠蚕と呼んでいる。光沢不眠蚕 (*nm-g*) は、

エクダイソン合成能が低下していると考えられている(永田ら, 1992)。

尿酸合成異常: カイコ幼虫の真皮が白色を呈するのは尿酸が蓄積するためである。この尿酸が蓄積できない油蚕の皮膚は体内が観察できるほど透明になる。油蚕表現型を示す突然変異は対立遺伝子、独立した遺伝子を含め多種類存在する。

2) 繭色の多様性

カイコの繭は品種ごとに紅色から黄、緑、白色まで多様である。その色素は2種類(カロチノイドとフラボノイド)に大別される。カロチノイド色素は紅~黄色を呈し、フラボノイドは黄~緑色を呈する。カロチノイド色素の蓄積に関係する遺伝子は *Y*, *I*, *C*, *F* などが知られている。フラボノイド色素の繭層への蓄積に関連する遺伝子は、*Ga*, *Gb*, *Gc* などの遺伝子の関与が知られているが、まだ解明途上である。近年は、繭層フラボノイドを利用した製品開発のニーズがあるため、高繭層フラボノイド品種のピュアマイソールや大如来の利用が期待される。

3) 広食性カイコ

広食性とは、雑食ほどではないが複数種類の餌を接食可能である性質を意味する。カイコはそもそも単食性の典型であったが、桑以外の材料を含む人工飼料が開発されると同時に、それを摂食して育つ品種が育成された。初期の研究に用いられた品種、沢 J は劣性突然変異により味覚が鈍化して広食性を獲得したことが明らかになっている (Izuka et al., 2007)。

4) 幼虫期間

一定の飼育環境下において、ふ化を起点に変態直前に繭糸を吐糸するまでの日数(幼虫期間)も品種ごとに固定している。幼虫脱皮4回の品種の最短例として中国種の碧蓮は幼虫期間がおおむね18日間であるのに対し、最長例は鳥目卵系統で27日間である。普通、発育期間が長い品種の虫体は大きい傾向にあるが、長すぎる系統はむしろ小さい場合が多い。実験材料としては幼虫期間が短い品種が必要とされる場合が多い。

II 昆虫培養細胞について

農業生物資源研究所のジーンバンクには約70株の様々な昆虫種由来の培養細胞株が保存・配布されている。昆虫培養細胞系は他の動植物の遺伝資源収集と異なり、組織などから連続培養できる細胞集団系統を作出するため、系統の確立までに長期間が必要である。また、植物細胞やカルスのように個体の形成に直結しないという特殊性があるが、ゲノム解析による生体機能情報の解明には重要な遺伝資源になっている。昆虫の培養細胞株

は胚子、卵巣、精巣、脂肪体の組織を構成する細胞や血球細胞が由来のため、単一組織由来の固有遺伝情報が得られる特長がある。例えば、培養細胞に微生物を感染させることにより、昆虫特有の免疫応答遺伝子の探索がマイクロアレイ技術で可能になる。ここでは昆虫の樹立培養細胞株を用いた様々な分子生物学研究の一端を紹介する。

(1) 濃核病ウイルス関連培養細胞

蚕の病気の一つの濃核病ウイルス (BmDENV) は1型と2型があり、感染・抵抗を支配する遺伝子 (*Nid-1*, *nsd-1* 等) が特定化されている。この遺伝子が発現する構造タンパク質に特異的に反応するタンパク質が中腸細胞表面や細胞内に存在する。蚕の培養細胞株 SES-BoMo-J125K2 系では構造タンパク質と相互作用するタンパク質が確認されており、BmDENV 感受性蚕と非感受性蚕間の関係に如何なる相関があるのか研究された。

(2) 抗ガン活性ペプチド

モンシロチョウの蛹から抗ガン活性ペプチドのピエリシンが分離同定された。ピエリシンはヒト胃ガン細胞をはじめ、ガン細胞に対する細胞殺傷活性を示す。国立がん研究センターではモンシロチョウ蛹卵巣の樹立培養細胞株 NIAS-PRC-819c 系を用いてピエリシンはガン細胞には殺傷活性をもつものになぜモンシロチョウ自体の細胞を殺傷しないのか研究を進め、ガン細胞の増殖抑制研究を進めている。

(3) 天蚕蛹卵巣由来の培養細胞

YANG et al. (2004) はチョウ目の天蚕から分離同定された休眠維持ペプチドはラット肝ガン細胞の増殖抑制能を示す。この機能解明が天蚕蛹卵巣由来の培養細胞株 NIAS-AnPe-0611 系を用いて調べられている。

(4) カイコ培養細胞株から植物性 RNA ウイルス

KATSUMA et al. (2005) は多くの蚕培養細胞株の細胞質内に植物性 RNA ウイルスの存在を発見した。ウイルスは Tymoviridae 目 Maculavirus 科に属し、Grapevine fleck virus はその近縁種である。蚕から新たに発見したので BmMLV と命名した。BmMLV は培養液を通して感染細胞から非感染細胞に伝搬するが、感染源の解明が進められている。

(5) 培養細胞を利用した Wolbachia の増殖

細菌性共生微生物のヒメトビウンカ体内に共生する Wolbachia (*Laodelphax striatellus* Wolbachia) およびマダニ体内に共生する CLO (*Ixodes scapularis* CLO) は樹立培養細胞株 NIAS-Bm-aff3 系により増殖維持が確認され、虫体による継代維持の労力が不要になった。さらに細胞への CLO 感染により Lebocin, lysozyme, gloverin の免疫応答遺伝子の発現が確認され、虫の微生物

抵抗性機構の解明が進んでいる。

(6) 免疫誘導遺伝子の誘導能

さらに蚕脂肪体由来細胞株 NIAS-Bm-aff3 系を用いて、ペプチドグリカン (PGN) による免疫誘導遺伝子の誘導能を調べ、大腸菌由来の DAP 型 PGN では誘導されるのに対し、ブドウ状球菌由来のリジン型 PGN では誘導されず、PGN のタイプにより誘導能が異なることが示された。

(7) 小胞体分子シャペロンと免疫応答

前述の NIAS-Bm-aff3 系にリポポリサッカライド (LPS) の処理により、時間経過に伴って小胞体分子シャペロンに属するカルレティキュリン (CRT) 転写量、発現量の増加が見られ、また LPS 濃度に応じて CRT の転写量の影響されることが判明した。このようにカイコ CRT の遺伝子発現調節機構と免疫応答との関連性が明らかにされている。

(8) 昆虫培養細胞利用の意義

昆虫の培養細胞系は 1960 年代に初めて作出された。当初は病理学基礎研究に利用されたが、分子遺伝学研究的の進歩によりゲノム (遺伝子) 解析が進み、個々の遺伝子の機能解析には、細胞は最も単純化した生物体として実験上重要な地位を占めつつある。また、遺伝子組換えウイルスによる害虫防除技術が開発される時、培養細胞は遺伝子組換えやウイルス増殖に重要な役割を果たす。以上の昆虫培養細胞に関する研究成果は、農業生物資源研究所のジーンバンクの昆虫培養細胞系を用いて研究発表された。

おわりに

農業生物資源研究所では、遺伝子発現による生命現象の解明や遺伝子操作技術開発に向けて新たな培養細胞株の作出やジーンバンクの充実を図り、国内はもとより世界的な昆虫細胞銀行への発展を進めている。またカイコは国内の動物遺伝資源としては最多の種類数である。蚕糸業法などの廃止により、国内における法的なカイコ品種の利用制限はなくなった。しかし配布希望者はまだ限定的である。これを機会にモデル昆虫として、気軽に研究に利用して頂けるならば幸いである。

参考文献

- 1) 辻田光雄 (1955): 遺伝学雑誌 30: 227 ~ 235.
- 2) 田島彌太郎ら (1973): 化学物質の突然変異性検出法, 講談社, 東京, 188 pp.
- 3) 永田昌男ら (1992): 日蚕雑 61: 400 ~ 406.
- 4) IZUKA, T. et al. (2007): J. Insect Biotech. Sericol. 76: 107 ~ 109.
- 5) YANG, P. et al. (2004): ibid. 73: 7 ~ 13.
- 6) KATSUMA, S. et al. (2005): J. Virol. 79: 5577 ~ 5584.