カイコの繭なし突然変異形質を利用した *Paecilomyces tenuipes* の省力的生産

崔 智英・金 三銀・呂 奏洪・南 聖姫・金 鍾吉・林 秀浩

大韓民国農村振興庁農業科学技術院蚕糸昆虫部

Method for Production of *Paecilomyces tenuipes* Utilizing the Naked-Pupa Mutant Silkworm. Ji Young Choi, Sam Eun Kim, Joo Hong Yeo, Sung Hee Nam, Jong Gill Kim and Soo Ho Lim (Department of Sericulture and Entomology, National Institute of Agricultural Science and Technology, R.D.A., Suwon 441-100, Korea). *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 45: 111-116 (2001)

Abstract: To shorten the labor cost for the production of the fungus, *Paecilomyces tenuipes*, the use of uncocooning mutant silkworm as a host was examined. The strain *Nd* was selected as the best for the production of *P. tenuipes* among five strains (*Nd*, *Nd^{II}*, *p³Nd*, *Nd-s* and *Nd-t*). *Nd* yielded the highest pupation rate of 95%, naked pupation rate of 99% and pupal weight of 1.4 g/individual. The optimum time for the infection of *P. tenuipes* was 12 h at 28.5°C and 95% R.H., when 10^8 conidia/ml of *P. tenuipes* were sprayed on the surface of the silkworms. The yield of *P. tenuipes* was reduced when *Nd* was used as a host because *Nd* was smaller than the hybrid Baegokjam that has been used as a typical host. To increase the host weight, *Nd* was crossed with Jam123 or Jam124, and resulted in not only greater weights ($>1.2\times$) but also higher yield ($>1.5\times$) of *P. tenuipes*.

Key words: Silkworm, naked-pupa, *Paecilomyces tenuipes*, synnemata production

緒 言

Cordyceps sinensis は古くから、結核や黄疸の治療剤、または阿片中毒の解毒剤として利用されている (Gee, 1918; Kobayasi, 1977)。最近、抗癌効果を持つことも知られている (Yamaguchi et al., 1990)。しかしながら自然界ではその個体数が少なく、自然の冬虫夏草を採集して医療用や研究用の物量を確保することはむずかしい。一方、大量飼育の容易なカイコを寄主にして、*Paecilomyces tenuipes* を人工的に栽培する方法が開発され、特許が得られている (Cho et al., 1996)。この *P. tenuipes* に感染したカイコの蛹 (菌糸で満ちた蛹体とこれから生えた分生子柄束の集合体) からは *C. sinensis* に類似した薬効が報告された (Cho et al., 1999)。Cho et al. (1996) の方法では、菌を接種したカイコを飼育し、繭を作らせた後、菌の感染の有無を確認すると同時にその分生子柄束の成長にさしつかえないように、繭を切開する作業過程が含まれている。カイコを簇に移し、作り終った繭を簇から収穫することは、生糸を生産するための従来の養蚕業では必要なことであるが、*P. tenuipes* の生産をめざしてカイコを飼う立場からみれば不必要な作業である。カイコが繭を作成することは、移動できない蛹の時期に外敵から自分を守る生態的意味を持つと同時に、絹糸腺内にあまった蛋白質を絹として排泄するという生理的意味をも持っ

ている (Nunome et al., 1957; 高見, 1969)。それゆえ、カイコの吐糸を人為的に止めさせることは容易ではなく、吐糸孔をむりに閉ざした場合は、ほとんどのカイコは正常な変態ができなくなる (赤尾, 1942)。

Nd 系統というカイコは遺伝的に後部絹糸腺が退化していて、正常な繭を作らない“繭なし”という特性を持つ (Iijima, 1972)。この点に着目して一般品種の代りに、*Nd* 系統および *Nd* と一般品種の交雑種のカイコを寄主として用いる方法とそれらにおける *P. tenuipes* (菌糸で満ちた蛹体とこれから生えた分生子柄束の集合体) の生産性を検討し、良好な結果が得られたので報告する。

材料および方法

1. 供試菌

供試菌は、韓国農業科学技術院病害虫研究室で継代している *P. tenuipes* である。この菌を PDA 培地 (PD 24 g, 寒天 15 g, 蒸溜水 1 l) で 25°C, 14 日間培養した。これを 0.5 cm×0.5 cm の大きさに切り出し、50 ml の PD 培地 (PD 24 g, 蒸溜水 1 l) に移し、Shaking Incubator (25°C, 150 rpm) で 7 日間培養した。この液体種菌 1 ml を 80 g の玄米培地 (pH 5.5 の蒸溜水で 48 時間処理したもの) に入れ、25°C で 40 日間培養した。培養した分生子は 1 ppm の界面活性剤 (Tween20, Yakuri Pure Chem. Co. Ltd.) を添加した蒸溜水

で、水懸濁液にした。

2. 供試カイコ

カイコは繭を作らない特性を持つ *Nd*, *Nd^H*, *p³Nd*, *Nd-s*, *Nd-t* の 5 つの *Nd* 系統、韓国の指定品種である白玉蚕（蚕 123×蚕 124）および *Nd* の 1 代交雑種（*Nd*×蚕 123, 蚕 123×*Nd*, *Nd*×蚕 124, 蚕 124×*Nd*）を供試した。

3. *P. tenuipes* の接種および分生子柄束の形成

10^7 , 5×10^7 , 10^8 (conidia/ml) に希釈した *P. tenuipes* 分生子の水懸濁液を 5 齢 1 日目のカイコ 100 頭当たり、30 ml ずつ散布して接種した。散布後 28.5°C, 95% R.H. の高温多湿の環境に 12 時間または 24 時間放置してから、23°C, 75% R.H. の環境で熟蚕になるまで桑葉で飼育した。*P. tenuipes* の感染の有無は上簇後 8~10 日目に調べた。虫体内に菌糸が充満して硬くなった個体は感染、やわらかいままの個体は非感染と判定した。感染と判定された個体は、21°C または 25°C, 95% R.H. の環境下で 20~40 日間保ち、分生子柄束を形成させた。

4. その他

飼育温湿度、給餌回数などは森（1970）の方法に従った。絹蛋白質であるセリシンとフィブロインの組成は練減率法（Zhu et al., 1995）で分析した。

結果および考察

1. *P. tenuipes* の生産に適した繭なしカイコの選抜

P. tenuipes の生産に適した繭なしカイコを選抜するため、*Nd*, *Nd^H*, *p³Nd*, *Nd-s*, *Nd-t* の 5 つの繭なし系統について、繭なし比率、蛹重、孵化率を比較した（Table 1）。本報での蛹化率とは 5 齢 1 日目に供試した幼虫頭数に対する蛹化頭数の比率で、カイコの強健度を表す指標とみなせるが、供試の繭なし系統のうち *Nd* が 95.1% で最も高く、従来 *P. tenuipes* の寄主に用いられている白玉蚕よりも高い値を示した。繭なし比率においても *Nd* 系統が 99.3% を示し、他の繭なし系統の 3.8~50.4% を上まわっていた。白玉蚕はす

べて結繭し、繭なし比率は 0.0% であった。一方、蛹重は *Nd* 系統が繭なし系統の中で最も重かったが白玉蚕のそれには及ばなかった。*Nd* 系統は孵化率も 91.2% で、他の系統より高い値を示した。これらの特性から *P. tenuipes* の生産には *Nd* 系統が最も有利であると判定された。

供試した各系統の作った繭の性質を Table 2 にまとめた。白玉蚕の作った繭はすべて正常で、その繭層重は 526 mg であったが、繭なし系統の作った繭の繭層重は 28~35 mg で、白玉蚕の 1/15~1/20 にすぎなかった。これを繭層比率で表すと白玉蚕が 24.2% であり、繭なし系統は 2.6~3.1% である。この薄い繭は手で容易に裂くことができるものであった。繭なし系統の繭の繭層は正常なカイコに比べ量的に少ないだけでなく、蛋白質の組成においても明らかな特徴を示した。白玉蚕の場合セリシンが 25%、フィブロインが 75% でフィブロインが主成分であるのに対して、繭なし系統ではセリシンが 95~97% でフィブロインはわずか 3~5% であり、セリシンが主成分をなしている。フィブロインは鎖状ペプチドでできている繊維蛋白質で、繭系の中核部をなし、生糸の強力、伸度、弾性など繊維としての特徴はすべてフィブロインの性質に基づく。一方、セリシンは俗称、糸糊とも言われ、フィブロインのまわりに位置しながら繭系同士を接着し、繭の形を作り上げる役割を担うだけである。そのような性質からみて、95% 以上のセリシンで構成されている繭なし系統の繭が手で容易に裂かれるのは当然といえる。このため、たとえ *Nd* 系統から繭を作った個体が出現したとしても、正常な系統よりその繭を除去しやすく、*P. tenuipes* の人工的生産に有利である。

2. *Nd* 系統に適した *P. tenuipes* の接種条件

白玉蚕の代りに *Nd* 系統を供試菌の寄主に用いるため、*Nd* 系統の *P. tenuipes* に対する感染率および分生子柄束の形成率（分生子柄束形成個体数/接種個体数）を確認する必要があった。そこで *Nd* と白玉蚕に対する *P. tenuipes* の接種結果を調べたところ、*Nd* の感染率と分生子柄束形成率

Table 1. Naked pupation rate, pupal weight and hatchability of *Nd* (naked pupa) mutants of *Bombyx mori*

Strain ^a	Pupation rate (%)	Naked pupation rate (%) ^b	Pupal weight (g, mean ± SEM)		Hatchability (%)
			Naked	Cocooned	
<i>Nd</i>	95.1	99.3	1.4 ± 0.04	1.5 ^c	91.2
<i>Nd^H</i>	93.6	25.5	1.2 ± 0.06	1.2 ± 0.06	83.3
<i>p³Nd</i>	92.2	26.1	1.0 ± 0.04	1.0 ± 0.03	74.5
<i>Nd-s</i>	72.1	50.4	1.2 ± 0.03	1.1 ± 0.03	62.8
<i>Nd-t</i>	82.5	3.8	1.2 ± 0.14	1.3 ± 0.04	— ^d
Baegokjam	93.2	0.0	—	1.7 ± 0.05	92.7

^a Number tested: 150 individuals for each strain (3 replicates of 50 individuals).

^b Naked pupae/total pupae.

^c Only one individual tested.

^d Not tested.

Table 2. Cocooned silkworm rate, cocoon shell weight, and silk protein composition of *Nd* mutants of *Bombyx mori*

Strain ^a	Cocooned silkworm rate (%)		No. of tested for cocoon characters	Cocoon shell weight (mg, mean±SEM)	% of cocoon shell weight ^b	Silk protein composition (%)	
	Normal cocoon	Thin cocoon				Sericin	Fibroin
<i>Nd</i>	0	1	0 ^c	—	—	—	—
<i>Nd^H</i>	0	74	111	33±3.0	3.1	95	5
<i>p³Nd</i>	0	74	111	28±1.0	2.6	97	3
<i>Nd-s</i>	0	50	75	34±3.0	3.0	95	5
<i>Nd-t</i>	0	96	144	35±1.0	2.7	—	—
Baegokjam	100	0	150	526±8.0	24.2	25	75

^a Number tested for cocooned silkworm rate: 150 individuals for each strain (3 replicates of 50 individuals).^b Cocoon shell weight/whole cocoon weight.^c Only one individual was cocooned, and not tested.Table 3. Infection and synnemata formation of *Nd* mutants of *Bombyx mori* by *Paecilomyces tenuipes*

Strain ^a	Infection rate (%) ^b	Synnemata forming rate (%) ^c
<i>Nd</i>	58	47
<i>Nd^H</i>	40	32
<i>p³Nd</i>	25	12
<i>Nd-s</i>	23	20
Baegokjam	89	87

^a Number tested for infection: 300 individuals for each strain.^b Conditions of inoculation: after being sprayed with 10⁸ conidia/ml diluent, the worms were kept at 28.5°C, 95% R.H. for 24 h.^c Environmental conditions for synnemata formation were 25°C and 95% R.H.

は各々 58% と 47% であり、白玉蚕の 89% と 87% に比べい
ちじるしく低く (Table 3), *Nd* 系統を白玉蚕の代りに用い
ることは適切ではないと思われた。

しかし、この結果は白玉蚕に適した接種条件 (分生子濃
度: 10⁸ conidia/ml, 高温多湿保持時間: 24 時間) をそのま
ま、菌なし系統に適用したためと思われる。そこで *Nd* 系
統に適する接種条件を検討した。各種濃度の *P. tenuipes* の
水懸濁液を接種後、高温多湿 (28.5°C, 95% R.H.) での保
持時間を変えて感染率と分生子柄束形成率を調べて Fig. 1
と Fig. 2 の結果を得た。白玉蚕に対する適正接種条件は
10⁸ conidia/ml, 24 時間高温多湿の処理で、感染率 95%, 分
生子柄束形成率 81% であるのに対し, *Nd* に対する適正接
種条件は 10⁸ conidia/ml, 12 時間高温多湿処理であること
が明らかになった。この際の感染率および分生子柄束形成
率は各々 90% と 87% で, *Nd* を寄主にした方が白玉蚕の場
合より高かった。

3. *Nd* の交雑種を利用した *P. tenuipes* の生産性

白玉蚕の両親である蚕 123 および蚕 124 と *Nd* との交雑
種では Table 4 と Table 5 の結果が得られた。この交雑種の

Fig. 1. Infection rate of silkworms with *Paecilomyces tenuipes* under various inoculative conditions. A hundred silkworms were used for each experiment. Fig. 2. Synnemata forming rate of *Paecilomyces tenuipes* under the various inoculative conditions. A hundred silkworms were used for each experiment.

菌なし比率は 72~89% であり, 残り 11~28% は結菌はし
たものの, 原種の *Nd* と同じくすべて薄い菌を作り, 手で
容易に裂くことができるものであった。蛹重は交雑により

Table 4. Naked pupation rate, pupal weight and hatchability of F_1 hybrids of *Nd* of *Bombyx mori*

Strain ^a	Pupation rate (%)	Naked pupation rate (%) ^b	Pupal weight (g, mean $\pm$ SEM)		Hatchability (%)
			Naked	Cocooned	
<i>Nd</i> ×Jam123	97.9	73.2	2.1 $\pm$ 0.06	1.9 $\pm$ 0.09	91.7
Jam123× <i>Nd</i>	97.8	88.7	2.1 $\pm$ 0.07	2.0 $\pm$ 0.08	93.3
<i>Nd</i> ×Jam124	97.9	71.6	2.0 $\pm$ 0.04	2.0 $\pm$ 0.08	96.5
Jam124× <i>Nd</i>	97.2	77.3	2.1 $\pm$ 0.06	2.1 $\pm$ 0.09	89.8
<i>Nd</i>	95.3	100.0	1.2 $\pm$ 0.04	—	91.2
Baegokjam	99.3	0.0	—	1.7 $\pm$ 0.06	92.7

^{a,b} For details, see Table 1.Table 5. Cocooned silkworm rate, cocoon shell weight, and silk protein composition of F_1 hybrids of *Nd* of *Bombyx mori*

Strain ^a	Cocooned silkworm rate (%)		No. of tested for cocoon characters	Cocoon shell weight (mg, mean $\pm$ SEM)	% of cocoon shell weight ^b	Silk protein composition (%)	
	Normal cocoon	Thin cocoon				Sericin	Fibroin
<i>Nd</i> ×Jam123	0	27	41	76 $\pm$ 3.0	3.9	92	8
Jam123× <i>Nd</i>	0	11	17	58 $\pm$ 4.0	2.9	93	7
<i>Nd</i> ×Jam124	0	28	42	57 $\pm$ 7.0	2.7	92	8
Jam124× <i>Nd</i>	0	23	35	74 $\pm$ 3.0	3.4	92	8
<i>Nd</i> ^c	0	0	0	—	—	—	—
Baegokjam	100	0	150	470 $\pm$ 11.0	21.1	25	75

^{a,b} For details, see Table 2.^c A cocooned individual was not found.

2.0~2.1 g となり, *Nd* 原種の 1.4 g はもちろん, 白玉蚕の 1.7 g よりも重くなった. *Nd* の交雑種の繭が両親のどちらよりも重くなったばかりでなく, 白玉蚕よりも重くなったのは, 雑種強勢効果のほかに繭糸の生成に使われるべき蛋白質が繭層の代りに蛹の体を構成する栄養源に転用されたためと思われる. また *Nd* の交雑種が作った繭の蛋白質組成もセリシンが 92~93% で原種の *Nd* と類似した結果を示した.

以上のように *Nd* 系統は, 蚕 123 または蚕 124 と交雑させることにより, 繭なし比率が 70~90% を保ちながらその蛹重が大きく改善されることが確認されたので, *Nd* の F_1 を *P. tenuipes* の寄主に用いたときの生産性を調べた. この交雑種に好適な接種条件を調べたところ, 10^8 conidia/ml の濃度の *P. tenuipes* の水懸濁液をスプレーした後, 28.5°C, 95% R.H. の環境で 12 時間保持することが適当であることが分かった (Fig. 3, Fig. 4). すなわち, *Nd* の交雑種の場合は上の条件で 96~99% の感染率と 95~97% の分生子柄束形成率が得られ, 白玉蚕に対する感染率 95% と分生子柄束形成率 81% よりもすぐれた成績を示した.

一方, 100 頭のカイコに接種した *P. tenuipes* の生産量 (分生子柄束と繭糸の充満した状態の蛹の重さの合計) は, 白玉蚕を寄主にした場合 135 g であるのに対し *Nd* 交雑種

では 187~239 g で, 1.40 倍~1.77 倍増加した (Table 6).

繭なしカイコを利用することにより *P. tenuipes* を省力的に人工栽培することができるようになった. また, 繭なしカイコの 1 交代雑種を *P. tenuipes* の寄主に用いることで分生子柄束の生産量も増加した.

摘 要

カイコを寄主にして *P. tenuipes* を人工栽培する際, 繭を作らない“繭なし”突然変異形質を利用することにより, 上簇と繭切りの作業が省ける省力的生産のためのカイコ系統を確立するとともに分生子柄束形成を評価した.

供試した 5 種の繭なし系統のうち, 蛹化率 95%, 繭なし比率 99%, 蛹重 1.4 g の成績を示した *Nd* が *P. tenuipes* の生産に最適の系統として選抜された. この *Nd* の *P. tenuipes* に対する感染率および分生子柄束形成率は, 従来 *P. tenuipes* の寄主に用いられていた交雑種の白玉蚕とは異なり, 10^8 conidia/ml に希釈した *P. tenuipes* の水懸濁液をカイコの表皮にスプレーした後, 28.5°C, 95% R.H. の環境で 12 時間放置した場合に, 最高値を示した. 一方, 蚕 123 または蚕 124 と交雑した *Nd* の 1 交代雑種は 72~89% の繭なし形質を保ちながら, 蛹重 1.9~2.1 g, 分生子柄束形成率 90~96%, *P. tenuipes* の生産量 189~239 g で, すべての形質

Fig. 3. Infection rates of various F_1 hybrids of *Nd* with *Paecilomyces tenuipes*. A hundred silkworms were used for each experiment. A concentration of 10^8 conidia/ml was inoculated.

Fig. 4. Synnemata forming rates of *Paecilomyces tenuipes* on various F_1 hybrids of *Nd*. See Fig. 3 for detail.

Table 6. Yield of *Paecilomyces tenuipes* utilizing F_1 hybrids of *Nd* of *Bombyx mori*

Strain ^a	Inoculation time in h ^b	No. of infected	No. of synnemata formed	Weight of <i>P. tenuipes</i> per individual (g in fresh weight, mean $\pm$ SEM) ^c	Yield of <i>P. tenuipes</i> / 100 individuals (g in fresh weight) ^c
<i>Nd</i> × <i>Jam123</i>	12	92	90	2.1 $\pm$ 0.08	189
<i>Jam123</i> × <i>Nd</i>	12	96	96	2.2 $\pm$ 0.16	211
<i>Nd</i> × <i>Jam124</i>	12	92	92	2.1 $\pm$ 0.07	193
<i>Jam124</i> × <i>Nd</i>	12	95	92	2.6 $\pm$ 0.16	239
<i>Nd</i>	12	83	81	1.5 $\pm$ 0.06	121
Baegokjam	24	89	75	1.8 $\pm$ 0.07	135

^a Number inoculated: 100 individuals for each strain.

^b Conditions of inoculation: after being sprayed with 10^8 conidia/ml diluent, the worms were kept at 28.5°C, 95% R.H.

^c Total weight of synnemata and pupa containing mycelia.

において白玉蚕と同等以上の成績を示した。

引用文献

- 赤尾 晃 (1942) 家蚕の吐糸に関する研究. 蚕試報 11: 295–309.
 [Akao, A. (1942) Study on spinning of silkworm, *Bombyx mori*.
Bull. Imp. Seri. Exp. Sta. 11: 295–309].
- Cho, S. Y., S. D. Ji and S. H. Im (1996) A method of artificial cultivation of *Paecilomyces tenuipes* using silkworm. Korean Patent Num-

ber: 187897 (in Korean).

Cho, S. Y., K. H. Shin, S. K. Song and J. M. Sung (1999) Mass Production and useful material development of the entomopathogenic fungi (*Cordyceps*) growing on the silkworm, *Bombyx mori* L. Rural Development Administration Report. 234 pp. (in Korean with English abstract).

Gee, N. G. (1918) Notes on *Cordyceps sinensis*. *Mycol. Notes* 54: 767–768.

- Iijima, T. (1972) Ultrastructure of the posterior silk gland of the 'naked pupa' silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 18: 2055–2063.
- Kobayasi, Y. (1977) Miscellaneous notes on the genus *Cordyceps* and its allies. *J. Jpn. Bot.* 52: 269–272.
- 森 精 (1970) カイコによる新生物実験 . 三省堂 , 東京 . 476 pp. [Mori, S. (1970) *The Silkworm*. Sanseido, Tokyo. 476 pp.]
- Nunome, J., Y. Yawata and Y. Akagi (1957) Studies on mechanism in the process of becoming non-cocooning silkworms (*Bombyx mori* L.). *Bull. Fac. Text. Fib., Kyoto Univ. Indust. Arts Text. Fib.* 2: 8–23.
- 高見丈夫 (1969) 蚕種総論 . 全国蚕種協会 , 東京 . 371 pp.
- [Takami, T. (1969) *General Principles of Silkworm Variety*. National Silkworm Association. 371 pp.]
- Tanada, Y. and H. K. Kaya (1993) *Insect Pathology*. Academic Press, New York. 666 pp.
- Yamaguchi, N., J. Yoshida, L. J. Ren, H. Chen, Y. Miyazawa, Y. Fujii, Y. X. Huang, S. Takamura, S. Suzuki, S. Koshimura and F. D. Zeng (1990) Augmentation of various immune reactivities of tumor-bearing hosts with an extract of *Cordyceps sinensis*. *Biotherapy* 2: 199–205.
- Zhu, L. J., M. Arai and K. Hirabayashi (1995) Gelation of silk sericin and physical properties of the gel. *J. Seric. Sci. Jpn.* 64: 415–419.
-