

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H05052

研究課題名(和文)パキキュロウイルスに対するチャノコカクモンハマキの抵抗性獲得機構の解明

研究課題名(英文)Mechanisms associated with resistance of Adoxophyes honmai against baculoviruses

研究代表者

仲井 まどか(Nakai, Madoka)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60302907

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：パキキュロウイルスに対する害虫の抵抗性発達メカニズムを解明するため、チャの害虫であるチャノコカクモンハマキ(ハマキガ科)個体群に対して核多角体病ウイルス Adoxophyes honmai NPV (AdhoNPV)を用いて選抜を繰り返し、AdhoNPVに抵抗性の系統(R系統)を作出した。R系統と選抜していないAdhoNPV感受性のS系統の比較研究により、R系統の抵抗性メカニズムには、中腸上皮細胞へのウイルス粒子結合能の低下をはじめ複数の機構が関与していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

害虫の薬剤抵抗性発達、害虫防除の研究における最も重要な課題のひとつであるため、本研究の成果は、社会的意義がある。害虫の微生物防除資材は、これまで害虫に抵抗性が発達しにくい資材であると考えられてきた。しかし、2005年に欧州でパキキュロウイルスに対して抵抗性をもつ野外害虫個体群が世界ではじめて出現した。抵抗性メカニズムの解明は、パキキュロウイルスの抵抗性マネジメントに利用できる。また、パキキュロウイルスの感染は、宿主昆虫の中腸におけるウイルス粒子の結合により開始される。本研究により確立した抵抗性昆虫個体群は、パキキュロウイルス感染機構を解明するモデル昆虫としての学術的価値がある。

研究成果の概要(英文)：To elucidate resistance mechanism of insect against baculoviruses, the resistant strain (R-strain) of Adoxophyes honmai (Tortricidae) were selected by continuous exposure to a nucleopolyhedrovirus (Adoxophyes honmai NPV: AdhoNPV). Comparative studies for R-strain and non-selected susceptible strain (S-strain) revealed that plural resistant mechanisms were exists including decreased binding of occlusion derived viruses to midgut epithelial cells.

研究分野：応用昆虫学

キーワード：パキキュロウイルス 抵抗性 選抜 核多角体病ウイルス 顆粒病ウイルス 中腸上皮細胞 交差抵抗性

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

昆虫の農薬抵抗性発達は、応用昆虫学の最も重要な解決すべき課題といえる。天敵微生物などの生物的防除資材は、宿主昆虫との共進化を経ているため、化学合成農薬に比べてそもそも抵抗性が発達しにくいという考え方があった (Shelton and Roush, 2007)。しかし、バキュロウイルスの一種である顆粒病ウイルス (Cydia pomonella granulovirus: CpGV) が欧州でリンゴ害虫のコドリングの防除に使用されているが、2000年頃からCpGVに抵抗性のコドリング個体群の出現が報告されており、バキュロウイルスに対しても昆虫が抵抗性を発達させることが明らかになった (Asser Kaiser et al., 2007など)。そのため、昆虫のバキュロウイルス抵抗性のメカニズムを解明することが急務となっている。

Shelton and Roush, 2007, Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology (Lacey and Kaya eds), 793. Asser Kaiser et al., 2007 Science, 317, 1916.

## 2. 研究の目的

野外で採集したチャの害虫であるチャノコカクモンハマキ個体群に対してチャノコカクモンハマキ核多角体病ウイルス (Adoxophyes honmai nucleopolyhedrovirus: AdhoNPV) を用いて選抜を繰り返し、NPVに抵抗性の系統 (R系統) を作出した。本研究は、S系統とR系統の比較により、抵抗性のメカニズムを解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 1) 抵抗性系統および感受性系統の樹立

野外採集したチャノコカクモンハマキ個体群に対して、60～70%致死濃度のチャノコカクモンハマキ核多角体病ウイルス (Adoxophyes honmai nucleopolyhedrovirus: AdhoNPV) を食餌混入法により経口接種した。生き残った個体を交配させて次世代に経口接種を行い、これを繰り返すことで選抜を行い AdhoNPV抵抗性系統 (R系統) を樹立した。また、R系統は選抜を行わずに継代飼育した AdhoNPV感受性のS系統として、この系統を維持し、以下の実験に用いた。

### 2) 一次感染における抵抗性

AdhoNPVのウイルス粒子がR系統幼虫の中腸上皮細胞に結合し融合するかどうかを蛍光標識したウイルス粒子を用いた fluorescence-quenching assayにより調査した。すなわち、ウイルス包埋体を超遠心分離機により精製し、包埋体を可溶化して包埋体由来ウイルス (ODV) を精製した。このODVにローダミン (Octadecyl Rhodamine B Chloride: R18) を標識した。次に、ODVをチャノコカクモンハマキ5齢幼虫に経口接種し、解剖して中腸を取り出し、中腸に結合したウイルス量を測定した。さらに、中腸を界面活性剤処理することによりODVの中腸上皮細胞への融合量を測定した。

### 3) 二次感染における抵抗性

AdhoNPV感染虫体液から出芽型ウイルスを調整して段階希釈し、S系統およびR系統5齢幼虫の血腔に微量注射器により注射した。S系統およびR系統の感受性を比較することにより、二次感染機構におけるウイルス抵抗性を調査した。

### 4) 顆粒病ウイルスに対する交差抵抗性

同じバキュロウイルスであるが、AdhoNPVとは系統的に異なるリンゴコカクモンハマキ顆粒病ウイルス (Adoxophyes orana granulovirus: AdorGV) に対する交差抵抗性を確認した。すなわち、AdorGV包埋体懸濁液をS系統およびR系統の幼虫に経口接種し、個別飼育して致死まで観察した。感染致死率をProbit変換して半数致死濃度 (LC<sub>50</sub>) を算出した。また、S系統およびR系統を正逆交雑して生物検定

によりF<sub>1</sub>世代の感染致死率を算出した。また、感染虫の雌雄から絹糸腺を摘出し乳酸酢酸オルセイン染色により識別した。

#### 5) ウイルス選抜過程の感染抵抗性機構

R系統をAdhoNPVにより選抜する過程で、選抜開始後21世代で選抜を中止した系統(RN21系統)を用いて、抵抗性機構を調査した。方法は、2)および3)に準じる方法で調査した。

### 4. 研究成果

#### 1) 抵抗性系統および感受性系統の樹立

R系統は、選抜していない感受性のS系統に対して1齢接種では40万倍以上、5齢接種では6万7千倍以上の抵抗性を示した。比較して400,000倍以上の抵抗性を獲得した。また、R系統における選抜を停止しても感受性の回復はみられなかった。このことから、AdhoNPVによる選抜を停止しても抵抗性の形質は、個体群内に安定的に維持されると考えられた。

#### 2) 一次感染における抵抗性

AdhoNPVのウイルス粒子がR系統幼虫の中腸上皮細胞に結合し融合するかどうかを調査した結果、R系統におけるAdhoNPVのウイルス粒子の結合量および融合量はS系統に比べて有意に低かった。このことから、R系統における抵抗性機構に中腸上皮細胞への侵入機構の低下が関与していることが示された。

#### 3) 二次感染における抵抗性

出芽型ウイルスの注射接種におけるS系統およびR系統5齢幼虫のウイルス抵抗性を調査した結果、S系統に比べてR系統は有意にAdhoNPV感受性が低いことが示された。このことから、R系統は、一次感染のみならず二次感染においても抵抗性を示すことから複数の抵抗性機構を持つことが明らかになった。

#### 4) 顆粒病ウイルスに対する交差抵抗性

AdorGV包埋体懸濁液を経口接種し、LC<sub>50</sub>値を算出した結果、それぞれ $2.2 \times 10^7$ 、 $3.2 \times 10^9$  個/mlであり、R系統のS系統に対する抵抗性比は148倍であった。つまり、R系統はAdhoNPVほどではないが、AdorGVに対しても交差抵抗性をもつことが示された。S系統およびR系統を正逆交雑して生物検定によりF<sub>1</sub>世代の感染致死率を算出し、感染虫の雌雄を識別した。その結果、R系統の雄とS系統の雌を交配したRS系統の生存区でのみ実験に供試した母集団のものと異なる性比が得られた。チャノコカクモンハマキは、WZ型の雌ヘテロ型(雄:ZZ、雌:ZW)の染色体構成をもつ。そのため、抵抗性因子がW染色体上の存在する可能性が示唆された。

#### 5) ウイルス選抜過程の感染抵抗性機構

R系統をAdhoNPVにより選抜する過程で、選抜開始後21世代で選抜を中止した系統(RN21系統)の抵抗性機構を調査した。その結果、RN21系統とR系統は、異なる抵抗性のメカニズムを示したことから、R系統は、人為的な選抜の過程で異なる抵抗性機構を段階的に獲得した可能性が示された。

#### 6) コスジオビハマキ核多角体病ウイルス全ゲノム配列決定

コスジオビハマキ核多角体病ウイルス(Choristoneura diversana nucleopolyhedrovirus: ChdiNPV)は、

チャノコカクモンハマキに感染力のあるバキュロウイルスである。R系統は、これまで *Autographa californica* multiple NPVやAdorGVに対しても交差抵抗性であることが知られている。R系統のAdhoNPV以外のウイルスに対する交差抵抗性の機構解明はR系統の抵抗性メカニズムを解明するために有用な情報を得ることができる。本研究では、ChdiNPVの全ゲノム配列を決定し、交差抵抗性解明の基盤を整備した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Keiko Tsuruta, Joerg T. Wenmann, Yasuhisa Kunimi, Maki N. Inoue, Madoka Nakai	4. 巻 154
2. 論文標題 Morphological properties of the occlusion body of Adoxophyes orana granulovirus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Invertebrate Pathology	6. 最初と最後の頁 58-64
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jip.2018.03.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakai, M., Takahashi, K., Iwata, K., Tanaka, K., Koyanagi, J., Ookuma, A., Takatsuka, J, Okuno, S., Kunimi, Y.	4. 巻 145,
2. 論文標題 Acquired resistance to a nucleopolyhedrovirus in the smaller tea tortrix Adoxophyes honmai (Lepidoptera: Tortricidae) after selection by serial viral administration.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Invertebrate Pathology,	6. 最初と最後の頁 23-30.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jip.2017.03.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Iwata, K., Haas-Stapleton,, E., Inoue, M.N., Kunimi. Y., Nakai, M. (2017)	4. 巻 98,
2. 論文標題 Midgut-based resistance to oral infection by a nucleopolyhedrovirus in the laboratory-selected strain of the smaller tea tortrix, Adoxophyes honmai (Lepidoptera: Tortricidae).	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of General Virology	6. 最初と最後の頁 296-304.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/jgv.0.000684	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Jun Takatsuka	4. 巻 9
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of an Alphabaculovirus from Choristoneura diversana	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00051-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1128/MRA.00051-20">https://doi.org/10.1128/MRA.00051-20</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 立澤杜泰・井上真紀・仲井まどか
2. 発表標題 バキュロウイルス抵抗性チャノコカクモンハマキ系統の抵抗性発達過程の調査
3. 学会等名 第13回昆虫病理研究会シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 嶋倉直也・井上真紀・仲井まどか
2. 発表標題 核多角体病ウイルスにより選抜したチャノコカクモンハマキ個体群の 顆粒病ウイルスへの交差抵抗性とその遺伝様式
3. 学会等名 第13回昆虫病理研究会シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 仲井まどか・立澤杜泰・四宮啓登・高橋和宏・高務淳・井上真紀・国見裕久
2. 発表標題 核多角体病ウイルスにより選抜したチャノコカクモンハマキの段階的抵抗性発達と交雑実験による抵抗性遺伝様式の推定
3. 学会等名 第62回日本応用動物昆虫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 立澤 杜泰・井上 真紀・仲井 まどか
2. 発表標題 チャノコカクモンハマキ核多角体ウイルス抵抗性系統の抵抗性機構の発達様式調査
3. 学会等名 第62回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ecology of insect viruses: how viruses adapt to their insect hostpopulation
2. 発表標題 Madoka Nakai
3. 学会等名 50th of Annual Meeting and Golden Jubilee Celebration of the Society for Invertebrate Pathology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keiko Tsuruta, Joerg T. Wennmann, Maki N. Inoue, YasuhisaKunimi, Johannes A. Jehle, Madoka Nakai
2. 発表標題 Deciphering the genetic factor for morphologygranulovirus occlusionbody
3. 学会等名 50th of Annual Meeting and Golden Jubilee Celebration of the Society for Invertebrate Pathology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩田 賢人・鶴田 景子・国見 裕久・井上 真紀・仲井 まどか
2. 発表標題 核多角体病ウイルス選抜チャノコカクモンハマキ系統の顆粒病ウイルスに対する交差抵抗性の抵抗性機構と遺伝様式
3. 学会等名 第61回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 立澤 杜泰・岩田 賢人・高務 淳・井上 真紀・国見 裕久・仲井 まどか
2. 発表標題 チャノコカクモンハマキ核多角体ウイルス抵抗性チャノコカクモンハマキ系統のAutographa californica核多角体病ウイルスに対する交差抵抗性
3. 学会等名 第61回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岩田賢人, 石井一夫, 古崎利紀, 水谷哲也, 大松勉, 長井誠, 齋藤康将, 井上真紀, 仲井まどか
2. 発表標題 昆虫のバキュロウイルスに対する 抵抗性メカニズムの解明
3. 学会等名 第68回日本生物工学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Kento Iwata, Yasuhisa Kunimi, Maki N. Inoue, Madoka Nakai (2016)
2. 発表標題 Resistance to baculoviruses in the midgut of <i>Adoxophyes honmai</i> ,
3. 学会等名 49th of Annual meeting of the Society for Invertebrate Pathology, (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Annette Sauer, Petr Nguyen, Eva Fritsch, Karin Undorf-Spahn1, Kento Iwata, Madoka Nakai, David Heckel, Frantisek Marec, Johannes Jehle
2. 発表標題 Identification of a novel mode of resistance against <i>Cydia pomonella</i> granulovirus in codling moth indicates a highly dynamic adaptation in the host population,
3. 学会等名 49th of Annual meeting of the Society for Invertebrate Pathology, (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Madoka Nakai
2. 発表標題 Development of resistance to baculoviruses in a lepidopteran insect
3. 学会等名 2017 Spring Conference of the Korean Society for Applied Entomology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 岩田賢人, 石井一夫, 古崎利紀, 水谷哲也, 大松勉, 長井誠, 井上真紀, 国見裕久, 仲井まどか
2. 発表標題 核多角体病ウイルス抵抗性チャノコカクモンハマキ系統におけるRNA-Seqを用いた遺伝子発現解析
3. 学会等名 第12回 昆虫病理研究会シンポジウム
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 岩田賢人, Eric Haas-Stapleton, 井上真紀, 国見裕久, 仲井まどか
2. 発表標題 核多角体病ウイルスで選抜した抵抗性チャノコカクモンハマキ系統は顆粒病ウイルスに対して異なる抵抗性メカニズムを持つ
3. 学会等名 第12回 昆虫病理研究会シンポジウム
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Ann E. Hajek, Jorgen Eilenberg	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Cambridge University Press	5. 総ページ数 439
3. 書名 Natural Enemies second edition (Box11.1)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京農工大学応用遺伝生態学研究室  
<http://www.tuat.ac.jp/~insect>

## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐藤 令一  (Sato Ryoichi)  (30235428)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授    (12605)	
研究分担者	高務 淳  (Takatsuka Jun)  (80399378)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等    (82105)	
研究分担者	石井 一夫  (Ishii Kazuo)  (60449238)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・特任教授    (12605)	