

令和 3 年 6 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03942

研究課題名(和文) 寄主特異性を決定する共生ウイルスおよびウイルス様粒子の類似性および相違性の解明

研究課題名(英文) Analysis of similarity and difference of symbiotic virus and virus like particle related with species specificity

研究代表者

田中 利治 (Tanaka, Toshiharu)

名古屋大学・農学国際教育研究センター・客員教授

研究者番号：30227152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：重要害虫のアワヨトウ幼虫に寄生し、個体群制御に重要な役目を果たす寄生バチ2種が持つ共生ウイルスの類似性と相違性を明らかにし寄主特異性に関与する遺伝子の候補を特定した。寄主血球に感染し、発現したPDV遺伝子に着目、若齢のみ(Cr)と終令まで寄生できる(Ck)2種間で、未感染血球と比べてdown-regulateまたはup-regulateされた遺伝子数に違いが見られた。さらにシグナル伝達系を阻害する脱リン酸化酵素やクロマチン機能の制御や転写制御に関するBEN-domainが多く発現していることをqRT-PCRを使って確かめた。2種間で相同性が低い遺伝子は、それぞれのハチの特異性を示していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大発生によりイネ科作物に大きな被害を及ぼす重要害虫であるアワヨトウは、通常は寄生バチ等で個体群数が制御されている。最近の気候変動の影響により寄主であるアワヨトウは大発生を引き起こす危険性も持つ。寄生バチと寄主間相互作用の解析から寄主特異性の仕組みを分子生物学的視点からの解明により、生態系におけるバランス維持の仕組みの解明につながり、安全で持続的な農業を確保するために重要な意味を持つ。また寄生バチの卵が、寄主体内で生育するために必要なポリドナウイルスによる寄主免疫系の制御機構に関与する遺伝子の分析で、寄主特異性に関与する遺伝子を特定し、人に害を持つウイルスの制御方法の研究にも大きく貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Common armyworm *Mythimna separata* which is one of very important insect pest to rice and Zea mays, is parasitized successfully by two kinds of endoparasitoids, *Cotesia ruficornis* (Cr) which parasitizes within young stages and *C. kariyai* (Ck) which can parasitize until final larval stage. Endoparasitoids with the polydnavirus (PDV) in ovary, inject the host hemocoel with the eggs, and PDV infects in the host tissues. Similarity and difference of PDV between Ck and Cr were clarified by comparing respective RNAseq. The up-regulated or down regulated genes were different between two kind of PDVs when compared with those of the gene expressed in uninfected hemocytes. Many genes related with regulation of signal transduction or chromatin showed high homology, but genes with low homology between two PDVs seemed to be applicable to the respective characteristics of parasitoid like species specificity when comparing respective RNA sequence from two kinds of PDV.

研究分野：昆虫生理生化学

キーワード：寄主特異性 ポリドナウイルス 寄主免疫

1. 研究開始当初の背景

寄生蜂は小さく目立たないが、生態系のバランスを保つためには重要な働きを持ち、省エネで安全・安心かつ持続可能な農業の確立には欠かせない存在である。中でもそれぞれ寄生蜂が持つ寄主特異性は、寄生蜂の有効利用にとって、重要な課題である。しかし、地球上に寄生蜂は 20 万種以上存在し、内部寄生蜂は寄主とかなり特異的な相互関係を作り上げているが、農業生態系における害虫制御にとっては、外部寄生蜂より重要な働きを担っていることが分かっている。そこで本研究では、寄生蜂の寄主特異性を決定する因子の類似点と相違点を、寄主免疫との関連性に着目し明らかにすることで、多様性を遂げてきた寄生蜂の相互関係を、生理・生化学的な現象まで含めた解析を行うことで、特異性の多様化の解明および害虫の特に免疫系に関連した制御剤の開発に貢献できることが期待できる。特に寄主との密接な関係を持つ内部寄生蜂の寄主特異性は、共生ウイルス(ポリドナウイルス:PDV)やウイルス様粒子(VLP)の遺伝子の違いによることがわかってきているが、寄主特異性の解析には、それぞれの蜂が持つ PDV/VLP の機能的な類似点や相違点を生理・生化学的な解析まで含めた検討には至っていない。多様に進化した寄生バチ・寄主間相互作用で、同じ重要害虫に寄生して害虫の個体群制御に貢献している寄生バチ 2 種に着目し、遺伝子レベルで相同性および相違性を解析することで、寄生バチと寄主との相互作用の多様化を明らかにできる。

2. 研究の目的

チョウ目幼虫に寄生する内部幼虫寄生蜂は、世界的に数万種以上分布しているが、終令まで寄生可能な種類は、若齢に寄生できる寄生蜂の種類に比べてかなり少ない。高度に発達した寄主の終令における細胞性防御反応を制御できる遺伝子を持つことが予測されたがわかっていなかった。2 種の寄生バチが持つ PDV ゲノムは、以前行った実験結果からかなりの共通遺伝子を持っていることが予測されていたが、実際の遺伝子配列の比較には至らず、具体的な違いを明らかにできていなかった。本研究では、寄主特異性の原因である PDV の類似点と相違点を、若齢にしか寄生できない寄生バチ (*Cotesia ruficrus*, Cr) と終令まで寄生可能な特性を持つ寄生バチ (*Cotesia kariyai*, Ck) の 2 種間における寄生バチの PDV 遺伝子の類似性と相違性を明らかにする。寄生成功に必要な寄主の生理状態を制御する PDV 遺伝子の違いも明らかにすることで寄生バチの多様化を解明する。

3. 研究の方法

1) PDV 遺伝子の解析: *Cotesia* 属 2 種(Ck, Cr)のそれぞれの PDV+V を寄主アワヨトウに注入し、寄主血球に発現してくる遺伝子の比較を RNAseq 解析で明らかにし、Ck が終齢寄主に寄生できる原因遺伝子を特定する。

2) 寄主アワヨトウ終齢に発達する特異的な寄主血球(Hyper Spread Cell; HSC)の解析: HSC をできるだけ多く含む分画を得たうえで、HSC で発現している遺伝子の特定を行う。HSC は異物に付着すると大きく広がり、細胞の周りにメラニン化を伴った糖タンパク質の沈着物をつくる。しかし、PDV+V の作用を受けると血球は伸展せずアポト-シスに向かう。アクチンの形成阻害による伸展抑制が示唆されていることから、PDV 遺伝子中の阻害因子の特定を行う。また HSC の周りのメラニンを伴った沈着物は、異物へのマークづけの役目をもつことが推測され、その物質のタンパク解析、N 末の決定、遺伝子配列の決定を行うことで役目をあきらかにする

4. 研究成果

(1) まずは、Ck と Cr の PDV のゲノムのシーケンスを行ったところ、PDV が分節化していることから、解析結果が複雑になり解析を断念した。そこでそれぞれの PDV が感染した寄主の血球と未感染の血球で発現したそれぞれの mRNA の比較解析に切り替えた。寄主血球で発現した寄主免疫の制御に関わっている遺伝子で、特に未感染の血球と比べて mRNA 比率が 4 以上であるものに着目して、寄主の生体防御を制御する遺伝子を特定した。機能的類似性を持つ遺伝子群をまとめて、2 種が寄主に寄生する為の共通の遺伝子群と CkPDV が終齢寄生を可能にしている候補遺伝子を明らかにした。この過程では、寄主アワヨトウ内で PDV の発現とは関係なく発現しているアワヨトウの遺伝子が明らかにならないと、PDV による発現を特定できない。そのためにアワヨトウのゲノムも解析した。NGS による short reads と Long reads を通して決定したが、全ゲノム解析には至らなかった。しかし、寄主血球中で発現した mRNA のうち PDV の影響を受けていないアワヨトウ自身の発現遺伝子を特定するためには大きく貢献し、寄主の異物に反応する生体防御反応に関連する遺伝子の down-regulation を明らかにした。

(2) BEN-domain, PTP (脱リン酸化酵素), p94, viral-H4 遺伝子は 2 種の PDV で相同性が高くアワヨトウという寄主に寄生するための基本的な寄主制御遺伝子、つまり signal transduction や transcription を阻害する遺伝子と思われる。一方で viral ankyrin, CrV1, EP-11 like 遺伝子は 60-70%の低い相同性を示したことから、2 種間での遺伝子の多様性を示していると思われる。

(3) 終令寄主において発達してくる体内に侵入した異物に対して特別な機能を示す HSC(Hyperspread cell)は、終齢まで寄生できる CkPDV が特異的に、この細胞の機能を消失させている可能性がわかってきた。まずは寄生されていない個体で、HSC の動態を明らかにするために、HSC を生産する器官を明らかにすることが必要であることから様々な実験を行い、多くの可能性を潰しながら時間を要した。最終的には、造血器官から供給されている可能性が示された。だとすれば PDV 感染で造血器官からの血球細胞の放出が抑制される結果と一致し、今回の CkPDV の遺伝子の中から、造血器官に作用し

HSC の増殖を抑制する遺伝子が見つけれられる。

(4) 寄主の異物に対する生体防御反応に関連する遺伝子として、アワヨトウの c-type lectin, PTP, フェノール酸化酵素前駆体(PP02)、Integrin beta-1 が CkPDV 感染では発現が低く抑えられた。アワヨトウの lectin は両種とも抑制していたことから初期過程における異物認識機構は、この遺伝子によって乱されていることが示唆された。CkPDV 感染では CrPDV 感染と比べて、PTP と PP02, Integrin-beta_1 の発現抑制が見られ、最終で発達してくる HSP の消失にはこれらの遺伝子に関連している可能性が示唆された。

(5) 今回の研究で、2 種間の寄生バチが持つ PDV の発現遺伝子の比較によって、多くの基礎的な data も取れ寄主制御の実態があきらかになった。今後はこれらの遺伝子の働きが重要と思われる遺伝子の knock-down を行うことでそれぞれの遺伝子の働きを明確な物にする。また今回、見送った感染した脂肪体からの PDV 遺伝子の発現は、寄主の免疫に参与する遺伝子が多く含まれていることが予測されるが、予算の関係で RNAseq 解析には至らなかった。そのために、今回の実験での 2 種寄生蜂のそれぞれの PDV+V 注入で寄主血球で発現している RNAseq からつくった primer を使い、脂肪体での発現を調べ PDV の遺伝子発現を明らかにすることを現在行っている。これにより 2 種間の寄主特異性の多様性進化の解明をめざす。

残念ながら当初の予定で材料の候補に挙げてあった、Ck と Cr と同じ科のギンケコマユバチ (*Meteorus pulchricornis*) は、飼育維持で失敗し、研究がほとんどできず、次回までに体制を作ることとした。当初予定の免疫系の実験の教科書は、現在皇學館大学の実習で検討していたが、分かりやすい材料を検討する必要が出て現在検討中である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Yoshikawa Kai, Matsukawa Mizuki, Tanaka Toshiharu	4. 巻 43
2. 論文標題 Viral infection induces different detoxification enzyme activities in insecticide-resistant and -susceptible brown planthopper <i>Nilaparvata lugens</i> strains	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Pesticide Science	6. 最初と最後の頁 10~17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1584/jpestics.D17-052	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 -
1. 著者名 Matsukawa Mizuki, Ito Kasumi, Kawakita Kazuhito, Tanaka Toshiharu	4. 巻 42
2. 論文標題 カンボジアにおけるトビイロウンカの殺虫剤感受性の現状	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Current Topics in Biochemical Research	6. 最初と最後の頁 45~51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1584/jpestics.D16-101	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 -
1. 著者名 Hiroyoshi Satoshi, Harvey Jeffrey A, Nakamatsu Yutaka, Nemoto Hisashi, Mitsunaga Jun, Mitsunaga Takayuki, Tanaka Toshiharu	4. 巻 9
2. 論文標題 Potential Host Range of the Larval Endoparasitoid <i>Cotesia vestalis</i> (=plutellae) (Hymenoptera: Braconidae)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Insect Science	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1179543317715623	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 該当する
1. 著者名 Tomomi Sawa, Toshiharu Tanaka, Yoshiaki Kato, Yutaka Nakamatsu	4. 巻 107
2. 論文標題 Cky811 protein expressed by polydnavirus and venom gland of <i>Cotesia kariyai</i> regulates the host <i>Mythimna separata</i> larvae immune response function of C type lectin responsible for foreign substance recognition which suppresses its melanization and encapsulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Insect Biochemistry and Physiology	6. 最初と最後の頁 1-18, e21789
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/arch.21786	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松谷広志・奥村雄暉・加藤良晃・田中利治・中松豊
2. 発表標題 異物のメラニン化に関わるhyper-spread cellの産生について
3. 学会等名 応用動物昆虫学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

RNAseqの解析結果を論文投稿中でreviewerからのコメントで論文が複雑すぎるようで、内容を更に分割して再投稿する。

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	中松 豊 (Nakamatsu Yutaka) (00456617)	皇學館大学・教育学部・教授 (34101)	
研究分担者	千葉 壮太郎 (Chiba Sotaro) (70754521)	名古屋大学・アジアサテライトキャンパス学院(農)・特任准教授 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------