

平成 21 年 5 月 6 日現在

研究種目:基盤研究(B)

研究期間: 2006 ~2008

課題番号:18380038

研究課題名(和文) 核多角体病ウイルス分離株の比較による殺虫スピード決定機構の解明

研究課題名(英文) Factors determining killing-speed of nucleopolyhedroviruses

研究代表者 仲井 まどか(Nakai Madoka)

東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・准教授

研究者番号: 60302907

研究成果の概要:

本研究は、殺虫スピードの異なる核多角体病ウイルス(NPV)を比較し、殺虫スピードを決定する要因の解明を行った。その結果、殺虫スピードが遅いウイルスでは、ウイルスの増殖速度が遅く、さらに昆虫の呼吸を司る器官である気管の周囲の細胞での感染が遅れることが分かった。また、当初、ウイルスの形態から NPV であると考えて特性解明を行った宮崎県からの分離株が、実は、NPV ではなく顆粒病ウイルス(GV)であり、GV の形態異常変異株であることが明らかになった。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2007 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2008 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野:農学

科研費の分科・細目:農学・応用昆虫学

キーワード:核多角体病ウイルス、顆粒病ウイルス、殺虫スピード、組織感染特異性、増殖スピード、ウイルス包埋体、エクジステロイドUDP-グルコシドトランスフェラーゼ(EGT)

1. 研究開始当初の背景

バキュロウイルスは、鱗翅目昆虫に効果が高く、微生物防除資材として有望視されている。しかし、その殺虫機構の詳細や病原性に関与する要因についてはまだ解明されていない点が多い。1996年につくば市の茶畑で分離されたチャノコカクモンハマキ核多角

体病ウイルス (*Adoxophyes honmai* NPV, AdhoNPV) つくば株は、他の多くの核多角体病ウイルス (NPV) と較べて殺虫スピードが遅い slow-killing ウイルスである。たとえば、NPV のタイプ種である *Autographa californica*MNPV (AcMNPV) は、多くの宿主昆虫を接種後約 5 日で致死させるが、

AdhoNPV つくば株は、それにくらべて約 10 日以上遅く、約 17 日後に宿主幼虫は致死する。さらに 1999 年に宮崎県の茶畑より分離された AdhoNPV 宮崎株は、つくば株よりさらに約 7 日以上致死スピードが遅いことがわかっている。これまでにバキュロウイルスのゲノムにあるエクダイソン UDP-グルコシルトランスフェラーゼ (EGT) の遺伝子を欠損させることにより殺虫速度が速まるという知見が報告されているが、AdhoNPV つくば株は、*egt* 遺伝子の配列を持っている。バキュロウイルスの殺虫スピードを決定する要因については、未だまとまった知見がないため、殺虫スピードを決定する要因を解明することにより微生物防除資材としての新しい改良方法の発見が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、殺虫スピードの異なる *slow-killing* や *fast-killing* の NPV をチャノコカクモンハマキ幼虫に接種し、その病理学的性状を殺虫スピードに着目して明らかにする。ウイルスの殺虫スピードに関連した要因としては、ウイルス自体の増殖スピード、増殖する組織の特異性 (*tissue tropism*)、ウイルスのゲノムにコードされている殺虫スピード関連遺伝子の発現などが影響していると考えられる。本研究では、これらの要因に着目して、上記のウイルス株を比較することにより、これらのウイルスが共通の宿主昆虫において異なる殺虫スピードを発揮する要因を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) AdhoNPV と AcMNPV の病理学的性状の比較
殺虫スピードの遅い AdhoNPV と一般に殺虫スピードの速い AcMNPV を用いて病理学的性状の比較と殺虫スピード関連遺伝子の発現を調査した。

① 各 NPV 分離株のチャノコカクモンハマキ幼虫に対する病理学的性状解析

チャノコカクモンハマキ (以下宿主) にウイルスを接種し、感染虫からウイルス包埋体を遠心分離法により精製した。各ウイルス株を接種した宿主幼虫の致死時間、包埋体生産量を測定した。

② Tissue Tropism の解明

宿主幼虫にウイルスを接種し、経時的に接種虫を解剖し、その組織を光学顕微鏡で観察した。

③ EGT の活性と発現

AdhoNPV と AcMNPV を宿主幼虫それぞれ 1 齢と 3 齢に接種し、感染虫から体液を抽出しその体液中の EGT の活性を測定した。すなわち、トリチウムでラベルした 20H-エクダイソンを基質として反応させ薄層クロマトグラフィーで検出した。また、感染虫から RNA を抽出し RT-PCR により *egt* 遺伝子の発現を検出した。

(2) AdhoNPV とリンゴコカクモンハマキ NPV との比較

チャノコカクモンハマキの近縁種であるリンゴコカクモンハマキから分離された *Adoxophyes orana* NPV (AdorNPV) が、分与された。また、日本でも東京で新たな AdhoNPV が分離されたので、これらの分離株の病理学的性状 (殺虫スピード、致死ステージ等) を解析した。それぞれのウイルスの DNA を抽出し制限酵素切断片解析 (REN) を行い、ウイルスの遺伝子型が異なるかどうか確認した。また、さらに殺虫スピードの異なるウイルス株を得るために京都府で H18 年と H19 年にチャノコカクモンハマキの野外採集を行ったが、新たなウイルス分離株は得られなかった。

(3) 宮崎株の特性解明と全塩基配列の決定

宮崎県から分離された宮崎株の病理学的特性すなわち殺虫スピードと半数致死濃度を

決定した。さらに、宮崎株包埋体からタンパク質を抽出し主要な構造タンパク質のアミノ酸配列を決定した。また、宮崎株感染虫の組織から超薄切片を作製し電子顕微鏡で観察した。また、宮崎株ゲノム DNA の全塩基配列を決定した。

(4) 殺虫スピード関連遺伝子組換えウイルスの作製

① AdhoNPV 感受性細胞の探索

AdhoNPV に感受性のある培養細胞を得るために、チャノコカクモンハマキの胚細胞より初期培養を行った。

② *in vivo* recombination 技術の開発

通常は、培養細胞を使って行う相同組換えを培養細胞ではなく昆虫の体腔内で行う技術の開発を行った。ウイルス DNA をリポフェクチンと共に幼虫体内に注射接種し、感染の有無を確認した。

4. 研究成果

(1) 各 NPV 分離株のチャノコカクモンハマキ幼虫に対する病理学的性状解析

① AdhoNPV と AcMNPV との比較：宿主幼虫にウイルスを接種し、感染虫からウイルス包埋体を遠心分離法により精製した。各ウイルス株を接種した宿主幼虫の致死時間、包埋体生産量を表 1 および図 1 に示す。

表 1. AcMNPV および AdhoNPV を接種したチャノコカクモンハマキ幼虫の致死までの日数

	Inoculated stage	Days from inoculation to death	Stage of death
AcMNPV	1 st instar	7.09 ± 0.10	1 st instar
	5 th instar	14.23 ± 0.52	5 th instar
AdhoNPV	1 st instar	17.3 ± 0.27	5 th instar
	5 th instar	8.4 ± 0.14	5 th instar

接種濃度は、90%致死濃度。

幼虫 1 頭あたりのウイルス包埋体生産量の実測値から、Gomperz の近似式（以下式を参照）を用いて下のパラメータを推測した。

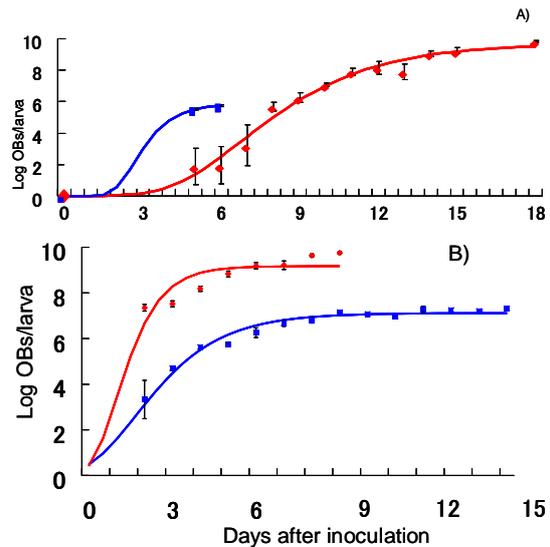


図 2 チャノコカクモンハマキ幼虫における包埋体生産量. A) 1 齢幼虫に AcMNPV (ダイヤ: 青) と AdhoNPV (ダイヤ: 赤) を接種した. B) 5 齢幼虫に AcMNPV (四角: 青) と AdhoNPV (四角: 赤) を接種した. OBs = 包埋体個数

$$y = A \exp \left\{ -\exp \left[\frac{\mu_m \cdot e}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$$

A: maximum population size
 μ : maximum rate of increase
 λ : duration of the lag phase

その結果、1 齢に接種した場合には、AcMNPV の方が AdhoNPV に比べて有意に増殖の立ち上がり早く (λ)、また増殖速度も速かった (μ)。一方、5 齢接種では、AdhoNPV の方が AcMNPV 有意に増殖速度 (μ) が速くなったが、増殖までのラグタイムはほとんどなく有意差はなかった (λ)。5 齢の場合、致死までの時間も AdhoNPV の方が AcMNPV よりも短い (表 1)。これらのことからウイルスの増殖速度が早いほど致死時間が短い。

② 各分離株の Tissue Tropism の解明

宿主幼虫にウイルスを接種し、経時的に接種虫を解剖し、その組織を光学顕微鏡で観察した。

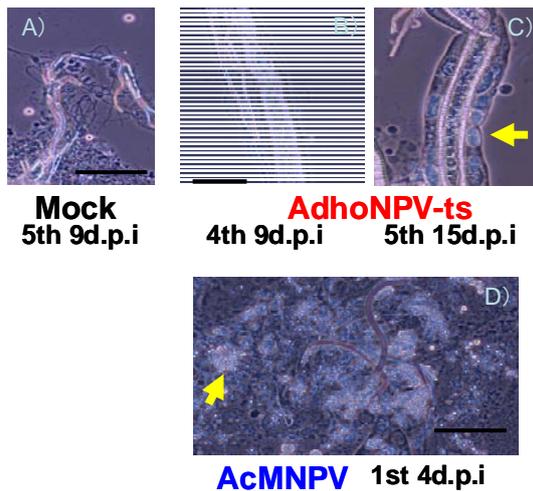


図2 チャノコカクモンハマキの気管の光学顕微鏡像。A) 非接種虫, B)AdhoNPV つくば株接種後 9 日目(4 齢幼虫), C)AdhoNPV つくば株接種後 15 日目(5 齢幼虫), D)AcMNPV 接種後 4 日目(1 齢幼虫). Bar は、50 μ m. 感染細胞を矢印で示す.

これらの結果から、AcMNPV は、AdhoNPV に較べて殺虫スピードが速い原因としては、増殖のスピードが速いということ、さらに、気管皮膜細胞での増殖が早く起こることによると考えられた。AdhoNPV で、気管皮膜細胞での増殖が遅れる原因は明らかにできなかったが、5 齢に接種した場合には、AdhoNPV の方が、AcMNPV よりも増殖スピードが速く致死時間も早いことから、AdhoNPV は 5 齢になるまで気管皮膜細胞などでの増殖が何らかの要因により抑制されていることが示唆された。

③ EGT の活性と発現

AdhoNPV と AcMNPV 感染虫から RNA を抽出し RT-PCR により *egt* の発現を検出したところ、AdhoNPV も AcMNPV もウイルス接種 1 日目から増幅が確認された。次に、感染虫の体液中の EGT 活性を測定した(図 3)。その結果、AcMNPV では、接種後 1 日めから EGT 活性が認められるに対して、AdhoNPV では、5 齢にまるまで(約 12 日)EGT 活性が認められず、宿主が 5

齢になってから初めて活性が認められた。

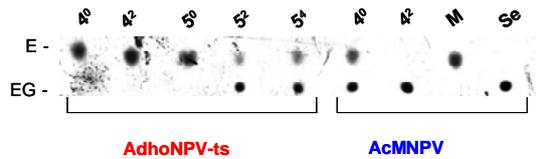


図3 ウイルス感染チャノコカクモンハマキ幼虫の体液中の EGT 活性. E:20H-ecdysone, EG-glucosylated 20H-ecdysone. 4 齢でウイルス接種し体液を採取した(大きな数字が幼虫齢、右肩の小さい数字が脱皮後日数). M:非接種虫、Se:シロイチモジヨトウ.

(2) AdhoNPV と AdorNPV との比較:

REN での解析の結果、AdhoNPV つくば株と AdhoNPV 東京株、AdorNPV イギリス株、オランダ株の遺伝子型は異なっていた。さらに、1 齢の宿主幼虫に接種して半数致死時間を調べたところ、東京株は、15 日でつくば株(19 日)同様長いのに対し、イギリス株は、6 日、オランダ株は 13 日であった。また、その致死ステージ(図 4)を見ると、東京株ではつくば株同様に宿主が終齢になってから致死させるのに対し、イギリス株は、主に 2 齢で致死させた。また、オランダ株は、様々な齢で致死させるが、このウイルス懸濁液を希釈して宿主に接種することにより *in vivo* cloning を行った結果、このオランダ株は、つくば株に似た slow-killing のウイルスと fast-killing のウイルスが混ざっていたということが分かった。イギリス株を分離したグループの研究によりイギリス株の全塩基配列が発表された(Hilton and Winstanley, 2008)。これによるとつくば株とイギリス株は非常に近縁なウイルスであるが、イギリス株では、*egt* 遺伝子の機能ドメインの欠損が認められた。このことから、イギリス株とつくば株の殺虫スピードの違いに *egt* 遺伝子が関与している可能性が示唆される。

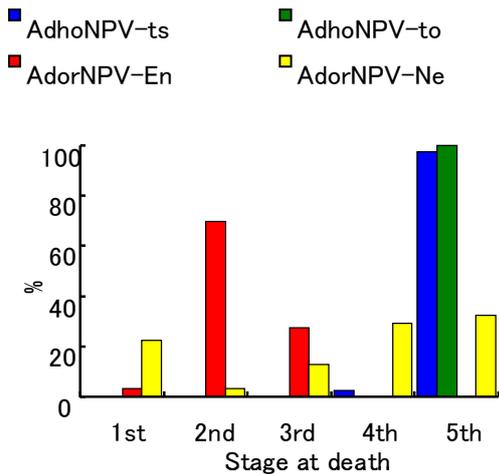


図4 AdhoNPV(つくば株;ts 青、東京株;to 緑) および AdorNPV(イギリス株;UK 赤、オランダ株;Ducth黄色)を1齢のチャノコカクモンハマキ幼虫に接種した場合の致死ステージ。

*Hilton and Winstanley (2008) J Gen Virol, 89, 2898-2908.

(3) 殺虫スピード関連遺伝子の探索

宮崎株の特性解明と全塩基配列の決定

当初、殺虫速度のさらに遅い NPV(宿主幼虫 1 齢接種の場合致死までに 40 日間)として特性解明をした宮崎分離株は、電子顕微鏡観察および包埋体の主要なタンパク質のアミノ酸シーケンスや一部のゲノム DNA の塩基配列からリンゴコカクモンハマキから分離された *Adoxophyes orana*GV (AdorGV) と極めて近縁のウイルスであることがわかった。ウイルス包埋体の透過型電子顕微鏡(図 3)を比較すると AdorGV(A)に較べて包埋体の大きさや形が著しく異なるが、包埋体中に見られるウイ

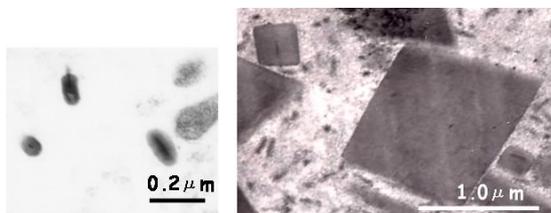


図3 リンゴコカクモンハマキGV (A)と宮崎株(B)の包埋体。

ルス粒子の数は、通常の GV と同様に約 1 個(或いは切片の位置により 0 個)であった。

宮崎株のゲノム DNA の全塩基配列を決定したところ、AdorGV のもつすべての推定 ORF が認められ、またこれらのすべての ORF が 95% から 100%一致した。さらに宮崎株の性状解析を進めることにより包埋体の形成に関与する遺伝子も特定できると期待される。

(4) 殺虫スピード関連遺伝子組換えウイルスの作製

① AdhoNPV 感受性細胞の探索

AdhoNPV に感受性のある培養細胞を得るために、チャノコカクモンハマキの胚細胞より初期培養を行ったが、AdhoNPV に感染可能な細胞は得られなかった。

② *in vivo* 組換え技術の開発

ウイルス DNA をリポフェクチンと共に幼虫体内に注射接種したところ、ウイルス感染が確認された。今後は、トランスファーベクターを構築し、ウイルスゲノム DNA と同時に幼虫体腔に注射接種することにより組換えウイルスの構築を目指す (H22 年~H24 年において計画中、基盤研究 C)。

(5) まとめ

本研究により、AdhoNPV つくば株は、殺虫スピードが早い AcMNPV に較べて 5 齢(終齢)になるまで気管皮膜細胞などでのウイルスの増殖や抑えられることが示唆された。また、AdhoNPV は、AcMNPV に較べて EGT 活性の上昇が遅く、これも 5 齢になるまで活性が認められなかった。一方、fast-killing の AdorNPV イギリス株では、*egt* 遺伝子の欠損が確認されている。今後は、AdhoNPV におけるウイルス増殖の抑制と EGT 活性との関係を明らかにする必要がある。AdhoNPV に増殖可能な培養細胞がないが、*in vivo* 組換え技術を開発することにより、*egt* 遺伝子とバキュロウイルスの殺虫スピードとの関係を証明することができると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

1. Takahashi, M, Nakai, M, Nakanishi, K, Sato, T, Hilton, S, Winstanley, D, Kunimi, Y. Genetic and Biological comparisons of four nucleopolyhedrovirus isolates that are infectious to *Adoxophyes honmai* (Lepidoptera: Tortricidae), *Biological Control*, 2008, 46:542-546. 査読有
2. Nakai, M, *Biological Control of Tortricidae in Tea Fields in Japan Using Insect Viruses and Parasitoids*, *Virologica Sinica*, 2009 (印刷中). 査読無

〔学会発表〕 (計 9 件)

1. 高橋真秀, 仲井まどか, 中西和子, 国見裕久, 佐藤威 リンゴコカクモンハマキ核多角体病ウイルスオランダ株のin vivoクローニングと得られたクローンの性状解析, 第 51 回日本応用動物昆虫学会大会, 2007/03/28, 広島大学.
2. 宇久田理恵, 鈴木みく, 仲井まどか, 中西和子, 国見裕久. 宮崎県においてチャノコカクモンハマキより分離されたバキュロウイルスの性状解析, 第 51 回日本応用動物昆虫学会大会, 2007/03/27, 広島大学.
3. Ukuda, R., Suzuki, M, Nakanishi, N, Nakai, M, Kunimi, Y., Characterization of a baculovirus isolated from a disease larva of *Adoxophyes honmai* in Japan, 40th Annual meeting of the Society for Invertebrate Pathology, 2007/08/13, Canada.
4. Takahashi, M, Nakai, M, Nakanishi, K, Sato, T, Kunimi, Y. Fast- and slow-killing genotypic variants in a Dutch isolate of *Adoxophyes orana* nucleopolyhedrovirus, 40th Annual meeting of the Society for Invertebrate Pathology, 2007/08/13, Canada.
5. 高橋真秀, 仲井まどか, 国見裕久. 致死時間が異なる 2 種核多角体病ウイルスがチャノコカ

クモンハマキ個体群に及ぼす影響, 第 52 回日本応用動物昆虫学会, 2008/03/26, 宇都宮大学.

6. 宇久田理恵, 仲井まどか, 国見裕久. チャノコカクモンハマキ幼虫から分離された顆粒病ウイルス変異株の性状解析, 第 52 回日本応用動物昆虫学会, 2008/03/27, 宇都宮大学.
7. Fujita, D., Ishii, T., Kunimi, Y., Nakai, M., Comparative pathology of the slow-killing *Adoxophyes honmai* NPV and *Autographa californica* MNPV in *A. honmai*, 41st Annual meeting of the Society for Invertebrate Pathology, 2008/08/06, UK.
8. 高橋真秀, 仲井まどか, 国見裕久. 殺虫速度の異なる 2 種核多角体病ウイルスのチャノコカクモンハマキ防除資材としての特性比較, 第 8 回昆虫病理研究会シンポジウム第 14 回 B T 研究会合同大会, 2008/09/12, 富士吉田.
9. 車地健太郎, 後藤千枝, 国見裕久, 仲井まどか. シロモンヤガ顆粒病ウイルスによる宿主発育制御機構の解明, 第 53 回日本応用動物昆虫学会大会, 2009/03/29, 北海道大学.

〔図書〕 (計 2 件)

1. 仲井まどか, 大野和朗, 田中利治, 朝倉書店, バイオロジカル・コントロール, 2009, 1-3, 15-20, 65-76, 134-143.
2. Burand, J.P., Nakai, M., Smith I., Cabi, *Insect Pathogens: Molecular Approaches and Techniques* (S.P. Stock, J. Vandenberg, I. Glazer, N. Bormare Eds.), 2009, 195-222.

〔その他〕 ホームページ

www.tuat.ac.jp/insect~

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲井 まどか (Nakai Madoka)

東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・准教授

研究者番号 : 60302907