

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15855

研究課題名(和文) ウイルスによる宿主性操作の適応的意義の探求および分子機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of the adaptive significance and molecular mechanisms of sex manipulation by virus

研究代表者

長峯 啓佑 (Nagamine, Keisuke)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・JSPS 特別研究員

研究者番号：20817548

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫の細胞内には様々な共生細菌が存在し、いくつかの細菌は宿主である昆虫の性を操作して子孫をメスだけにすることが知られている(全メス化)。  
本課題ではハスモンヨトウで見つかった全メス現象を解析することで、全メス化の原因因子が共生細菌ではなくウイルス(全メスウイルス)であることを特定し、全メス化のメカニズムが宿主のオスだけを殺す「オス殺し」であることを明らかにした。また、全メスウイルスのゲノム解析の結果5つの分節からなるRNAウイルスであることが分かった。また、系統解析の結果から、全メスウイルスは主に植物ウイルスが属するTolivirales目に近縁であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルスゲノムは多様性に富むため、かつては新規ウイルスの発見・解析に多大な労力と専門性が要求された。近年、次世代シーケンス技術の発展に伴い、ウイルスの探索やゲノム解析が容易になり、昆虫の潜在ウイルスが無数に見つかるようになった。しかしながら、新規ウイルスの生物学的・ウイルス学的解析には依然として定石の解析は確立されておらず、ケースバイケースな対応が必要になってくる。今後、全メスウイルスのような性操作ウイルスも多く発見されることが予想される。本課題で築いたウイルスおよび宿主に関する研究基盤が、さまざまな新規宿主性操作ウイルスの発見、性操作の至近要因・究極要因の解明に貢献できると期待している。

研究成果の概要(英文)：Various symbiotic bacteria exist in insects, and some of them are known to manipulate the sex of their host to produce only female offspring (all-female trait).  
In this project, by analyzing the all-female trait found in *Spodoptera litura*, we identified a virus (all-female virus), not a symbiotic bacterium, as the causal factor of all-female trait, and identified that the mechanism of all-female trait is "male-killing" which kills only male host. Genome analysis revealed that all-female virus possesses RNA genome consisting of five segments. Furthermore, the phylogenetic analysis shows that all-female virus is close to the order Tolivirales, to which plant viruses mainly belong.

研究分野：昆虫学

キーワード：昆虫 共生微生物 ウイルス オス殺し ハスモンヨトウ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

昆虫では、細胞内共生細菌による性比がメスに強く偏る現象(全メス化)が多数報告されている。これら共生細菌は母から子へ垂直にのみ伝播するため、全メス化は宿主集団内での共生細菌の拡散に大きく貢献する。一方、ウイルス性の全メス化では、チャハマキの全メス系統からウイルス様 RNA 断片が発見され、RNA ウイルスが原因であると疑われているが、宿主性操作ウイルスの存在は確認されていない(課題進行中の 2021 年にチャハマキにオス殺しを引き起こす *Osugoroshi virus* が特定された)。我々は宮崎県で採集したチョウ目昆虫ハスモンヨトウ(以下、ハスモン)から母系伝播の全メス系統を発見した。予備的実験から、ハスモンの全メス化はオス殺しであることを示唆するデータが得られ、また、全メス化系統特異的なウイルス様 RNA 配列が得られ、全メス化ウイルス(仮称、*Spodoptera litura sex ratio virus*: SISRV)の存在が示唆された。宿主性操作ウイルスに関する研究例は極めて少ないため、全メス化に関わるウイルスの性状(ウイルス粒子の形状、エンベロープの有無、ゲノムの構成や全長配列など)や系統関係、全メス化の分子機構を解明することで、ウイルスによる宿主性操作の研究発展の基盤が確立される。また、宿主性操作ウイルスの伝播戦略を解明することで、ウイルスが全メス化を誘導することの適応的意義を考察することが可能になる。

### 2. 研究の目的

新奇宿主性操作ウイルス、SISRV の概要を把握すべく、本研究課題では以下 2 つの課題を計画した。

#### (1) 宿主性操作の適応的意義

ハスモンにおける全メス現象がどのようなメカニズム(オス殺し、遺伝的オスのメス化、単為生殖など)によって引き起こされているかを特定し、さらに全メス化がもたらす適応的意義を探索する。これまで、共生細菌による全メス化の適応的意義は、父性伝播できない共生細菌の利己的な振舞いとして考えられてきた。水平伝播が比較的容易なウイルスにとって、宿主性操作の適応的意義は水平伝播の機会が少ない共生細菌とは大きく異なる可能性がある。宿主集団内における SISRV の水平伝播の可能性を検証し、ウイルスにとっての宿主性操作の適応的意義を考察する。

#### (2) 宿主性操作の分子機構解明

SISRV による宿主性操作の分子機構解明に向けて、初めに性状解析として精製ウイルスの電子顕微鏡解析、ノーザンプロットングによるゲノム構成の解析、ORF の推定、RNA ポリメラーゼ(RNA-dependent RNA-polymerase: RdRp)のアミノ酸配列を用いた系統解析を行う。また、SISRV の解析基盤の確立を目的として、ハスモン由来の培養細胞を用いた SISRV 培養系を確立する。細胞培養系を用いて組換え SISRV を作出し、全メス化の原因となるウイルス遺伝子を特定する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 全メス化メカニズムの特定

初めに、全メス系統と通常性比系統を用いて genomic *in situ* hybridization (GISH)を行い、ハスモンにおける性染色体構成を特定する。性染色体構成が多くのチョウ目昆虫と同様にメスヘテロ(ZW/ZZ)であれば、高頻度で多型が見られる Z 染色体遺伝子である triosephosphate isomerase 遺伝子(*SlTpi*)を用いた Z 染色体のジェノタイプングを行い、メス化や単為生殖の可能性を検証する。また、チョウ目において、性決定カスケードの最下流に位置する doublesex 遺伝子(*Sl dsx*)は雌雄で異なる選択的スプライシングパターンを示す。この性質を利用して、ハスモンの胚期～幼虫期における性(表現型性)を判別し、オス殺しの可能性を検証する。

#### (1) 全メス化メカニズムがもたらす適応的意義の探索

ミトコンドリア配列(COI 領域、調節領域)の異なる SISRV 感染系統(全メス系統)と非感染系統(通常性比系統)の若齢幼虫を用意し、同所的に飼育して成虫まで育てる。ミトコンドリア配列で識別した非感染系統成虫の SISRV 感染状況を RT-PCR により確認し、SISRV の水平伝播の有無を確認する。

#### (2) SISRV の性状解析

全メス系統のハスモン蛹から、ショ糖密度勾配遠心法と硫酸セシウム密度勾配平衡遠心法によりウイルス粒子を精製し、電子顕微鏡でウイルス粒子の形状を特定する。また、ノーザンプロットングにより分節数とゲノムサイズを特定する。さらに SISRV ゲノムから ORF の推定を行い、

RdRp のアミノ酸配列を用いて系統解析を行う。

(2)- 培養細胞を用いた SISRV 培養系の確立

ハスモン由来の培養細胞 5 株に全メス系統成虫の磨砕液をソーキングした後、培養細胞内のウイルス RNA 量を経時的に qPCR で定量することで、培養細胞への感染および増殖を確認する。感染が確認できた場合、SISRV 感染培養細胞からハスモン非感染系統にトランスインフェクションするための実験系を確立する。

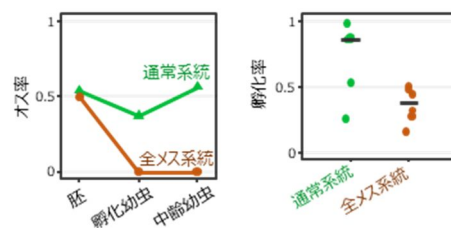
(2)- 全メス化遺伝子の特定

細胞培養系を用いて組換え SISRV を作出し、宿主に投与することで ORF の機能解析を行い、全メス化をもたらすウイルス遺伝子を特定する

#### 4. 研究成果

(1)- 全メス化メカニズムの特定

GISH の結果、ハスモンの正常系統における性染色体構成は ZW/ZZ 型であることが分かった。一方、全メス系統の幼虫からは ZW 型のみが観察されたことから、遺伝的オスのメス化は起きていないと考えられた。また、*SITpi* による Z 染色体のジェノタイピングを行った結果、全メス系統では単一ブリード内の幼虫は父親由来の Z 染色体のみを引き継ぐことが明らかになった。この結果は、単為生殖が全メス化のメカニズムではないことを示している。さらに、孵化前の胚では表現型性の雌雄比が 1:1 だったのに対し、孵化幼虫ではすべてメスであったこと、全メス系統の孵化率は通常系統の約半数であったことから、胚期のオスは孵化せずに死亡していると考えられた（右図）。これらの結果は、ハスモンの全メス化メカニズムが胚期のオス殺しであることを強く示唆している。



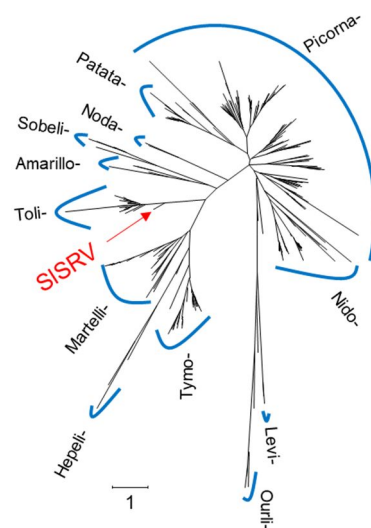
(1)- 全メス化がもたらす適応的意義の探索

初めに、ハスモンの野外メス成虫を採集し、全メス系統の個体とともに各個体の COI 領域および調節領域の塩基配列を決定した結果、ハスモンにおいては COI 領域のバリエーションが少ないが、調節領域には比較的多くのバリエーションが存在することが分かった。よって、調節領域の配列をマーカーとして利用することで、同所的に飼育したハスモンの中から感染系統と非感染系統を識別できることができるようになった。しかしながら、当初計画していたこれらの系統を利用した飼育実験は、期間内に完了できておらず、適応的意義の探索および考察には至っていない。

(2)- SISRV の性状解析

電子顕微鏡でウイルス粒子の形状を特定するため、超遠心分離によるウイルス粒子の精製を行った。ショ糖密度勾配遠心後にウイルス RNA を含む画分が得られたため、その画分を硫酸セシウムを用いた密度勾配平衡遠心で分離したものの、ウイルス RNA を多量に含む画分は得られず、精製には至らなかった。塩化セシウムを用いても、この結果は改善されなかった。こうしたウイルス粒子（ウイルス RNA）の消失はウイルスの不安定性による可能性が高い一方で、SISRV が虫体内でほとんど粒子を作らない可能性も考慮に入れる必要がある。

RNA-seq 解析の結果から、SISRV のゲノム配列として 5 つの contig が得られていた。これらの配列をもとにプローブを作製し、ノーザンプロットを行った結果、これら 5 つの contig は独立した RNA segment であり、各 contig は RNA segment のおよそ全長をカバーしていることが明らかになった。5 つの RNA segment から計 7 つの ORF が推定され、その中の 1 つは RdRp と推定されるタンパク質をコードしていた。SISRV の RdRp は Tombusvirus (Positive-sense single-stranded RNA virus: (+) ssRNA virus) のそれと近縁であったため、(+) ssRNA virus における SISRV の系統関係を推定した。その結果、SISRV は Tombusvirus を含む Tolivirales とクレードを形成するものの、既知の Tolivirales に属するウイルス (International Committee on Taxonomy of Viruses により分類された Tolivirales) とは系統的にやや離れていた (右図)。また、既知の Tolivirales のほとんどが植物を宿主とすること、分節ゲノムではないことを鑑みると、SISRV の系統的な位置づけを理解するにはより詳細な解析が必要である。

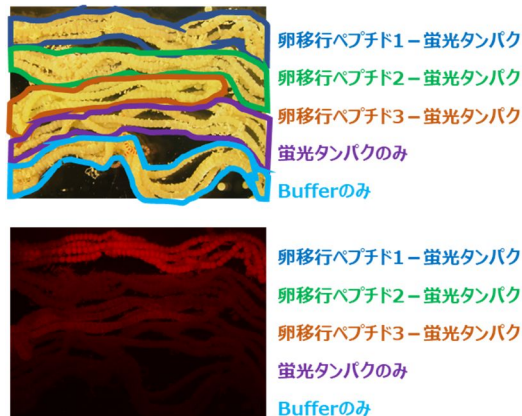


(2)- 培養細胞を用いた SISRV 培養系の確立

宿主であるハスモンヨトウ由来の培養細胞株 5 系統に, SISRV 感染個体の磨砕液をソーキングし, 経時的にウイルス RNA 量を qPCR により定量した結果, 全ての細胞株において SISRV の RNA 量の増加が確認された. この結果は, 培養細胞内における SISRV の感染・増殖を示唆している. しかしながら, この SISRV に感染した培養細胞の磨砕液をハスモンにインジェクションしたものの, 宿主個体内での増殖は確認できず, 培養細胞から虫体への感染は実現しておらず, さらなる条件検討が必要である.

## (2)- 全メス化遺伝子の特定

当初は培養細胞を用いて組換え SISRV を作出し, 虫体に戻して機能解析を行い, 全メス化遺伝子の特定を行う計画であったが, 上述のように虫体への感染系が確立できなかったため, 代替案として, ReMOT 法を応用してウイルスタンパクを卵巣へ輸送する実験系を確立した. ReMOT 法は卵巣タンパクに由来する卵移行ペプチドを利用して Cas9 RNP 複合体を成虫の卵巣に輸送し, ゲノム編集を行う手法であるが, 本課題では Cas9 RNP 複合体に代わって卵移行ペプチドにウイルスタンパク質を結合することで卵巣にウイルスタンパクを輸送し, 機能解析を行うことを計画した. 初めに, 卵移行ペプチドに蛍光タンパクを結合した組換えタンパク質を作製し, ハスモンメス成虫に注射投与した. その結果, 注射後の卵巣からは蛍光が観察され(右図), 蛍光は孵化後の幼虫まで持続したことから, 卵移行ペプチドを利用した目的タンパクの輸送が確認できた. 本課題期間中にウイルスタンパク質の機能解析までは至らなかったが, 今後, 卵移行ペプチドを付加した組換えウイルスタンパク質を精製し, 機能解析を実施する.



ウイルスゲノムは多様性に富むため, かつては新規ウイルスの発見・解析に多大な労力と専門性が要求された. 近年, 次世代シーケンス技術の発展に伴い, ウイルスの探索やゲノム解析が容易になり, 昆虫の潜在ウイルスが無数に見つかるようになった. しかしながら, 新規ウイルスの生物学的・ウイルス学的解析には依然として定石の解析は確立されておらず, ケースバイケースな対応が必要になってくる.

本課題では SISRV の水平伝播の検証, 性操作を起こす遺伝子の特定には至らなかったものの, SISRV による宿主性操作メカニズムの一端を明らかにし, SISRV の基礎的な性状を明らかにした. 今後, 無数に存在する昆虫潜在ウイルスの中から, 全メスウイルスのような性操作ウイルスも多く発見されることが予想される. 本課題で築いた研究基盤が, 今後, さまざまな新規宿主性操作ウイルスの発見や, 性操作の至近要因・究極要因の解明に貢献できることを期待している.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長峯 啓佑, 菅野 善明, 佐藤 嘉紀, 寺尾 美里, 陰山 大輔, 新谷 喜紀
2. 発表標題 ハスモンヨトウの性比異常を引き起こすRNAウイルスの探索と系統解析
3. 学会等名 第65回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 嘉紀, 長峯 啓佑, 新谷 喜紀, 菅野 善明, 足達 太郎
2. 発表標題 ハスモンヨトウから見つかったIflaviridaeウイルス様配列の系統解析および伝播性の解明
3. 学会等名 第65回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新谷 喜紀, 岡本 悠吾, 今村 菫華, 菅野 善明, 寺尾 美里, 佐藤 嘉紀, 長峯 啓佑, 陰山 大輔
2. 発表標題 ハスモンヨトウにおける性比異常現象の特性と原因ウイルスの野外分布
3. 学会等名 第65回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤嘉紀, 長峯啓佑, 新谷喜紀, 岡本悠吾, 足達太郎
2. 発表標題 ハスモンヨトウに性比異常をおこす因子は、近縁種にも感染するのか？
3. 学会等名 関東昆虫学研究会第3回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長峯 啓佑, 菅野 善明, 寺尾 美里, 新谷 喜紀, 陰山 大輔
2. 発表標題 ハスモンヨトウにおけるウイルス性オス殺しの発現時期に関する知見
3. 学会等名 第66回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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