

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380038

研究課題名（和文） 昆虫ウイルスによる宿主内分泌系操作の新規機構解明

研究課題名（英文） Research on a disturbance mechanism of endocrine system of host by an insect virus.

研究代表者

高務 淳 (TAKATSUKA JUN)

独立行政法人森林総合研究所・森林昆虫研究領域・主任研究員

研究者番号：80399378

研究成果の概要（和文）：昆虫ポックスウイルスの全ゲノムを解読し、宿主昆虫の発育を制御する遺伝子の候補を発見した。本ウイルスが感染可能な培養細胞系を発見し、その系を用いてこの遺伝子機能を欠損したウイルスを作成した。野生型ウイルスに感染した宿主は、幼若ホルモンの力価が高く維持され、蛹になれないが、遺伝子機能欠損ウイルスに感染したものは、健全な宿主と同様なホルモン動態を示し、蛹化する方向へ発育が進んだ。昆虫ウイルスが宿主の幼若ホルモンの力価を操作し、宿主の発育を制御していることを発見した。

研究成果の概要（英文）：Whole genome sequences of entomopoxviruses revealed the viruses had an important gene for manipulation of the host endocrine. Using cultured cell that was found to support an entomopoxvirus replication in present research, knock-out mutant lacking this gene function was constructed. Juvenile hormone (JH) titer of the hosts infected with wild type virus was maintained to be high, resulting in host's death in larval stage. On the other hand, JH titer of the hosts infected with the gene function-defective virus was similar to that of healthy hosts, which allowed infected hosts to develop toward pupation. These findings indicate that entomopoxviruses have a gene that disturbs JH titer to manipulate hosts' development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,600,000	2,580,000	11,180,000
2010年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2011年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

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：昆虫、ウイルス、内分泌

1. 研究開始当初の背景

自然界には、あたかも自身の繁栄に都合のいいように、宿主の発育を制御しているウイ

ルスが存在する。昆虫ポックスウイルス（EPV）は、宿主である昆虫の幼虫期間を著しく延長させる。EPVが進化の歴史の中で獲

得した、宿主の発育制御という形質がなぜ引き起こされるのか、そのメカニズム（至近的要因）と進化的な意義（究極的要因）の両方を明らかにすることを将来的な研究の全体構想としている。EPVによる宿主発育制御という形質が、如何にして発起し、どのような理由で進化したのかという、至近のおよび究極的要因の解明は、ウイルスを用いた害虫制御技術の高度化に繋がると考えられる。また、病原微生物が宿主の発育を制御する事例は、動物の病気でも知られ、その至近のおよび究極的要因の解明は、病気の制御法の施策にも貢献すると考えられる。我々の研究の全体構想はこの意味でも、一つのモデルになると考えられる。

2. 研究の目的

本課題においては、EPVによる宿主発育制御という形質の至近的要因を解明する。すなわち、

(1) EPV感染幼虫のホルモン動態等の生理的特徴を明らかにする。

(2) EPVがコードする昆虫の内分泌系操作にかかわる遺伝子とその機能を明らかにする。

これらにより、EPVによる宿主昆虫の内分泌系操作のメカニズム、ひいては、発育制御のメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 健全な宿主とEPVに感染した宿主の内分泌系をホルモン動態を中心に解析比較し、感染虫のないふんびの特性を明らかにする。

(2) EPVの全ゲノムを解読し、生物情報学のツールを用いて宿主の内分泌系に作用する候補遺伝子を探索する。

(3) EPVが複製可能な培養細胞系を探索し、発見した培養系における遺伝子組み換えEPVの作成法を開発する。

(4) 当該遺伝子をノックダウンした組み換えウイルスを作成し、野生型の親ウイルスとともに宿主昆虫を用いて生物検定を行うことで宿主昆虫の発育に対する影響を解析する。その際、感染虫の生理も調査し、当該遺伝子が内分泌系に及ぼす影響を明らかにする。

4. 研究成果

(1) EPV感染虫の生理的特徴

健全な宿主幼虫では、最終齢である6齢には幼若ホルモンの力価が消失する。これに対して、EPVに感染した宿主幼虫においては、幼若ホルモンの力価は消失することなく高いレベルで維持された（図1）。

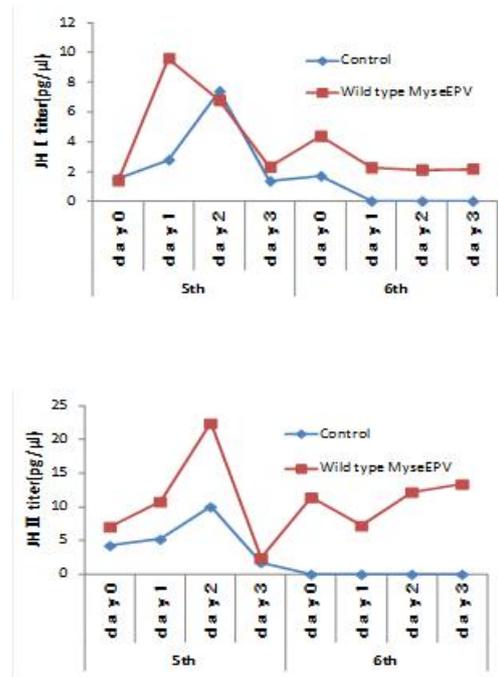


図1 幼若ホルモンの力価の推移。

(2) EPVのゲノム

2種のEPV、すなわち、ハマキガEPVおよびアワヨトウEPVのゲノムを解読した。ハマキガEPVは、全長230,58kbpでペプチドをコードしていると推定されるオープンリーディングフレーム(ORF)は、247個あると推定された(図2)。また、アワヨトウEPVのゲノムは、281,446kbpで306個のORFがあると推定された。検索の結果、EPV感染虫の生理的特徴を引き起こしそうな両EPVに共通のORFを見つけた。



図2 ハマキガEPVのゲノムの模式図。矢印がORFと向きを示す。

(3) 培養細胞系の探索と組み換え EPV

EPV が複製可能な培養細胞系を探索した結果、Sf9 や High Five、BmN、Se301 細胞など複数の培養細胞系において、アワヨトウ EPV の複製が認められた (図 3)。

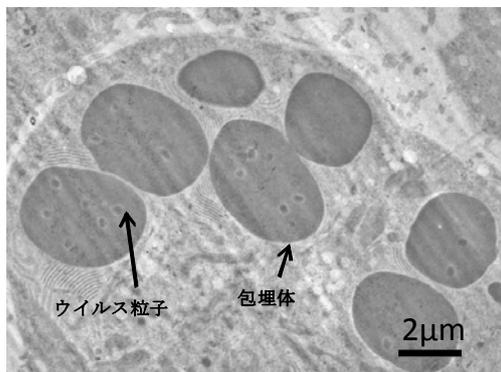


図 3 High Five 細胞で複製した EPV.

このうち、細胞変性が顕著であることや細胞外ウイルス力価が他の細胞系に比較して高い Sf9 と High Five 細胞系が本ウイルスの組み換えを行う場合に適当であると考えられた。また、ウイルスを純化するために必要なプラークアッセイ法も確立した。

次に、候補遺伝子の ORF に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を挿入したベクターを構築し、アワヨトウ EPV が感染した High Five 細胞にトランスフェクションし、プラーク純化することによって組み換え EPV を作成した (図 4)。

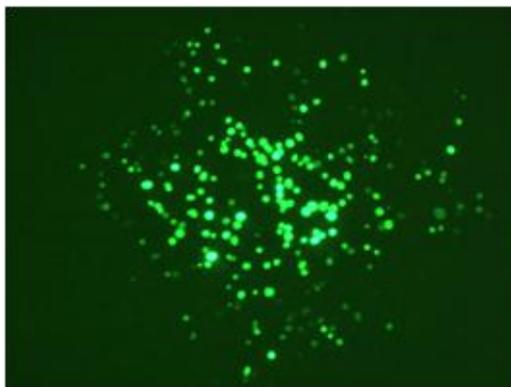


図 4 GFP 遺伝子を候補遺伝子中に挿入した組み換えアワヨトウ EPV のプラーク。

EPV を組み換えることができているのは世界でもまれである。現在、組み換えができているのは、ヒトリガの一種の *Amsacta moorei* の EPV においてのみである。アワヨトウ EPV の組み換えを可能にした本研究の成果は、今後、遺伝子の機能解明など EPV の生物学の解明にとって重要なものである。

(4) 野生型と組み換え EPV の表現型比較

野生型と組み換え EPV をアワヨトウ幼虫に感染させ、発育を調べると、野生型に感染したもののほとんどは、最終齢である 6 齢期間が延長し、そのまま幼虫で死亡した。一方、組み換え EPV に感染すると、幼虫期間の延長もなく、蛹と幼虫の中間体や蛹で死亡するものがほとんどであった (図 5)。



図 5 ウイルス感染虫。

幼若ホルモンの力価は、対照区で、最終齢の 6 齢において検出限界以下になったが、野生型に感染した区では高いレベルで維持された。組み換え EPV に感染した区では、対照区とほぼ同様の推移を示した。

幼若ホルモンは、昆虫の変態に重要な役割を持ち、幼虫の状態に維持させるホルモンである。EPV は、この幼若ホルモンの力価を攪乱し、高いレベルで維持させる遺伝子によって宿主昆虫の発育を変え、また、変態を阻止していることが明らかとなった。病原体が宿主の発育を制御している事例は、バキュロウイルスなどで知られていたが、それらは、脱皮や蛹化に導くホルモンである脱皮ホルモンを不活性化するものである。本研究で明らかとなった、EPV の宿主の発育制御は、幼若ホルモンの力価を変えるという機構であり、病原体による宿主制御機構として世界初の新たな発見である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Jun Takatsuka, Shohei Okuno, Takayoshi Ishii, Madoka Nakai, Yasuhisa kunimi, Fitness-related traits of entomopoxviruses isolated from *Adoxophyes honmai* (Lepidoptera: Tortricidae) at three localities in Japan, *Journal of Invertebrate Pathology*, 査読有、105 巻、2010、121-131

[学会発表] (計 3 件)

① 高務淳、アワヨトウ昆虫ボックスウイルス *Mythimna separata* entomopoxvirus の培養細胞への感染と組み換えウイルス作出、日本応用動物昆虫学会、2012年3月29日、

近畿大学(奈良県)

② Julien Thézé、Julie Gallais、Jun Takatsuka、Madoka Nakai、Elisabeth Herniou、The genome of *Adoxophyes honmai* entomopoxvirus revealed horizontal gene transfers between baculoviruses and entomopoxviruses、Society for Invertebrate pathology、2011年8月8日、Saint Mary's University (Halifax, Nova Scotia, Canada)

③ 高務淳、アワヨトウ昆虫ボックスウイルス *Mythimna separate* entomopoxvirus (MyseEV) の培養細胞への感染性、日本応用動物昆虫学会、2011年3月27日、九州大学箱崎キャンパス (福岡県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高務 淳 (TAKATSUKA JUN)

独立行政法人森林総合研究所・森林昆虫研究領域・主任研究員

研究者番号：80399378

(2) 研究分担者

仲井 まどか (NAKAI MADOKA)

東京農工大学・共生科学技術研究科 (研究院)・准教授

研究者番号：60302907

篠田 徹郎 (SHINODA TETSURO)

独立行政法人農業生物資源研究所・昆虫科学研究領域・制御剤標的遺伝子研究ユニット長

研究者番号：10355620

(3) 連携研究者

所 雅彦 (TOKORO MASAHIKO)

独立行政法人森林総合研究所・森林昆虫研究領域・室長

研究者番号：70343796