

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：82112

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380044

研究課題名（和文） 昆虫ポックスウイルスのタンパク質：その網羅的探索とフゾリンの農業への利用技術開発

研究課題名（英文） Proteins of an entomopoxvirus: its proteomic analysis and a study for the development of technology for the use of its protein fusolin as a synergist of viral insecticides

研究代表者

三橋 渡 (MITSUHASHI WATARU)

独立行政法人農業生物資源研究所・昆虫微生物機能研究ユニット・上級研究員

研究者番号：00414946

研究成果の概要（和文）：ポックスウイルス科アルファエントモポックスウイルス属のドウガネブイブイ昆虫ポックスウイルス（AcEPV）の全ゲノム塩基配列（約 246kb）を解読した。この属のウイルスとしては初の全解読である。ゲノムの特徴としては、両末端の逆方向繰り返し配列が野生型のポックスウイルス中最長であり、この属のゲノムサイズの定説より小さい点等が挙げられる。ゲノム中タンパク質をコードする可能性のある配列（ORF）は約 250 個あり、その中には昆虫のウイルスでは初めてセルピン系の免疫系タンパク質を発現する可能性のある配列が見つかった。また、AcEPV の生産するウイルス農薬病原力強化タンパク質フゾリンの遺伝子を酵母発現系に組み込んだ。

研究成果の概要（英文）：The genome of an *alphaentomopoxvirus* virus was completely sequenced for the first time. The genome of the virus that infects a coleopteran, *Anomala cuprea* (AcEPV) is ca. 246 kb in length, which is smaller than those of *Alphaentomopoxvirus* previously considered, and consists of a central coding region bounded by inverted terminal repeats (ITR) that is the longest ITRs among wild type of poxviruses reported. The genome harbors ca. 250 open reading frames. An ORF which contains a serine protease inhibitor (serpins) domain sequence, which may harbor an immunological function in mammals not insects was detected. Fusolin gene, which expresses a viral enhancing factor, was introduced into an expression system of foreign genes in yeast for the purpose of large amount of the production of the protein for the development of a system for the enhancement of virus insecticides.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
2010 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

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：昆虫ボックスウイルス、核多角体病ウイルス、ゲノム解析、プロテオーム解析、酵母外来遺伝子発現系、代替宿主

1. 研究開始当初の背景

昆虫ボックスウイルス (EPV) については、基礎科学的には、その分子生物学的知見蓄積の遅滞やほ乳類のボックスウイルスとの関係の問題、応用的には害虫防除素材としての活用の課題等、重要な事項が未解決の状態である。

著者らの研究材料とする、コガネムシの一種ドウガネブイブイ幼虫を宿主とする EPV (AcEPV) が含まれる *Alphaentomopoxvirus* 属ではまだ全ゲノム解読のなされた種類がなく、その解明が期待されている。

昆虫ウイルスを成分としたウイルス農薬は、化学農薬に比較して一般に人畜、環境に対する安全性が高く、その普及が望まれているが、生産に人手を要する部分が多いため生産コストがきわめて高くなること等の理由から、一部の製品を除いて普及していない。しかし、圃場でのウイルス使用量を大幅に削減することができれば防除のコストを大きく押し下げることになるため、ウイルス農薬の使用が拡大していくことが期待される。これはウイルスの殺虫力強化による面積あたりのウイルス使用量を桁違いに減らすことによって可能となる。殺虫力強化のひとつの有力な方法として、ウイルスの感染を増進させる物質をウイルス農薬に加える等して施用する方法が挙げられるが、EPV が産生するスピンドルというタンパク質結晶体とその構成タンパク質であるフゾリンが昆虫ウイルスの感染力を大きく増強することが判明したため、これをウイルス農薬の殺虫力強化に利用することによりその普及を促進することが望まれており、そのための技術開発が必要である。

2. 研究の目的

これまで全ゲノムの解読例の無かった属 AcEPV の全ゲノムを解読し、これを基に EPV タンパク質の網羅的探索を行い、EPV タンパク質の総合的研究の基盤とする。また、EPV タンパク質中唯一研究の進んでいるフゾリンを利用して昆虫ウイルスからなる害虫用農薬（以下、ウイルス農薬と称する）の感染力の画期的強化のための技術開発を行うことにより、ウイルス農薬の一層の普及を目指す。

3. 研究の方法

(1) AcEPV ゲノム解読とアノテーション

AcEPVゲノムのショットガンライブラリーを作製し、クローンの塩基配列解読を行う。完全にコンティグが一続きにならない場合は、ギャップフィリングのPCRを行いその配列を解読することによって連結させる。シーケンスの低品質な箇所は、PCR・シーケンス、再シーケンス等により確定させる。ゲノム末端部のシーケンス確認は、末端部にアダプターを結合させアダプター配列を一方のプライマー配列としてPCRを行い、シーケンスする方法により行う。

また、リードの結合結果の正当性を確認するために、得られたシーケンス中の、*Bam*HI、*Hind*III、*Pst*Iの各認識配列をはさんだ数百bpのシーケンスとゲノムDNAをテンプレートにしたダイレクトシーケンスの結果を照合する。

さらに、アノテーション解析を行う。アノテーションの仕上げは、ボックスウイルス対応のSilva and Uptonの方法 (2005) で行う。

(2) ウイルス粒子のプロテオーム解析

精製 AcEPV スフェロイド中のタンパク質を電気泳動で網羅的に分離し MS 解析を行い、この結果とゲノム情報の対応化によって AcEPV 構造タンパク質の網羅的な同定を行う（所内の生体分子研究ユニットとの協同研究）。

（3）フゾリン、スピンドルの効率的な大量生産法の開発

①酵母外来遺伝子発現系の利用

低コストで大量にリコンビナントフゾリンを生産する方法を開発するために、酵母発現系利用における生産効率を解析する。

②代替宿主の探索

スピンドルについては、代替宿主の探索をコフキコガネ、ケブカアカチャコガネを始めとするコガネムシ科幼虫を対象に行う。

③スピンドルの立体構造の解析

フゾリンの活性は活性部位の構造によって大きく規定されていると考えられる。また、スピンドルがリコンビナントフゾリンより強い活性を持つことは、その結晶構造に由来する部分が多い可能性がある。これらの解析は、将来のより高活性のフゾリンの作製に結びつく可能性がある。そこで、研究協力者（ニュージーランド Auckland University の Dr. Metcalf）を中心に放射光照射解析等により立体構造の解析を行う。

（4）スピンドル・フゾリンの適用範囲の解明

野菜の大害虫であるオオタバコガの核多角体病ウイルス（NPV）および Bt 剤の活性に対するスピンドルの増進作用の有無を生物検定することによって、スピンドル・フゾリンの利用可能範囲を調査する。

4. 研究成果

（1）AcEPV ゲノム解読とアノテーション

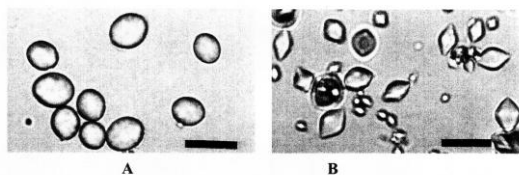
ゲノム解析のために、インサートサイズが約2kbのショットガンゲノムライブラリーを作製した。次に、約2000クローンについて、サンガー法によるシーケンス解析を行った。その結果、225kbの長いコンティグと数個の短いコンティグが形成された。この長いコンティグは、冗長度平均12で、ゲノム由来のものと考えられた。更に次世代シーケンサー 454FLX Titaniumを使用した解析も行い、222kbの大きなスキマホールド配列を得たが、これは別の手法によるシーケンス結果も参考にしてゲノムの最終決定を目指すためである。

得られた225kbシーケンスの遺伝子構造とアセンブルされたリードを解析したところ、本来3'側に存在すると考えられるターミナルインバーテドリピート（ITR）の大半が5'側の同様にミスアセンブルした可能性を発見した。そこで、3'側のITRの存在の確認とそのシーケンスの解読を試みた。プラグ内でウイルス粒子からのDNA抽出と制限酵素SacI処理を行い、パルスフィールド電気泳動で3'片（約37kb）を分離し、ショットガンライブラリーを作製後シーケンスを行った。その結果、末端部23kbはゲノム5'末端部と対をなすITRであることが判明した。従って、AcEPVのゲノムサイズは約246kbであることが判明した。5'側のITR配列についても、3'側と同様の手法で配列の確認作業を行った。その結果、数個のコンティグが得られたため、ギャップフィリングのPCRと続くシーケンスを行い、最終的に225Kbコンティグで示された配列と一致することを確認した。ゲノム末端部のシーケンス確認は、末端部にアダプターを結合させ、

アダプター配列を一方のプライマー配列としてPCRを行い、シーケンスすることにより行った。

また、得られたシーケンス中の、*Bam*HI、*Hind*III、*Pst*Iの各切断配列をはさんだ数百bpのシーケンスとダイレクトシーケンスの結果を照合した結果、両者は一致した。

また、ORF (CDS) 予測の精度を上げるために、Silva and Uptonの方法 (2005) を適用し、通常の方法によるアノテーション結果を改良した。結果として、約250個のORFを認めた。



AcEPV 封入体 A, スフェロイド(ウイルス粒子を包埋する)。B, スピンドル。バーは 10 μm。

AcEPVの全ゲノム解読は、この属のウイルスとしては初めての例である。これらの知見は、EPVの分子生物学を大きく発展させるとともに、ほ乳類のボックスウイルスや、他の昆虫ウイルスとの関係の理解に大きく貢献することが予想され、インパクトの大きい成果と考えられる。

(2) ウイルス粒子のプロテオーム解析

精製包埋体サンプルの2次元電気泳動で分離したタンパク質スポット53個をゲルから切り出し、MS解析を行った。ゲノムから想定されるORFと類似のものは少しあったが、ORF由来と確認できた配列はなかった。これは、包埋体の難溶解性によるコンタミタンパク質の相対的増加が主な原因と考えられる。対応策として、ウイルス粒子自体の精製を行いこれをサンプルとして、現在解析中である。

(3) フゾリン、スピンドルの効率的な大量生産法の開発

①酵母発現系の利用

定法に従い、フゾリン遺伝子 (3タイプ; フゾリン遺伝子全長+Hisタグ、フゾリン遺伝子全長のみ、フゾリン遺伝子の活性部位+Hisタグ) をプラスミドpPICZαにクローニング後大腸菌を形質転換し、組換えプラスミドを大量に精製した。次に、この組換えプラスミドを鎖状にし、エレクトロポレーションによって*Pichia pastoris* x-33に導入を図った。いずれのフゾリン遺伝子も酵母内への導入をPCRにより確認できた。うち、1クローンについて、SDS-PAGEにより発現を調査したが、確認できなかった。今後、フゾリン遺伝子の高コピークローンの選抜とウェスタン解析が必要と考えられる。

②代替宿主としては、アオドウガネは感染率がドウガネブイブイと同等であったことから、これに適していることが判明した。一方、ヒメコガネ、ケブカアカチャコガネ、コフキコガネ、オオコフキコガネ、マメコガネの幼虫では、感染が確認された種類はなかった。これらのことから、AcEPVはEPVとしては宿主範囲が狭いことが示唆された。また、今回は、これまでの甲虫類のEPVの宿主範囲の調査より幅広く対象種を選定した研究と言える。

③スピンドルの立体構造の解析

スピンドルの原子構造がフゾリンも含めて1.9オングストロームの解像度で世界で初めて解明された (主にニュージーランド Auckland University のDr. Metcalfの作業。具体的内容は論文発表の予定との関係でこの報告書では扱わないこととする)。成果は、

フゾリンの作用機作の詳細な解明と高効率なフゾリンの作出に貢献するものと考えられる。

(4) スピンドル・フゾリンの適用範囲の解明

スピンドルは、オオタバコガのNPV多角体の感染力を数倍増進することが判明した。また、カイコ幼虫に対するBT剤の殺虫力を強化することを発見した。詳細な解析では、BT剤中の毒素タンパク質、胞子双方の殺虫力を強化することが判明した。スピンドルによるこれらの殺虫力強化は世界初の知見である。これらの成果はより殺虫力の高い微生物農薬や害虫抵抗性作物の作出に貢献する可能性があると考ええる。

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)

① Mitsuhashi W、Recent advances in studies for the application of a protein produced by entomopoxviruses (Poxviridae) for insect-pest control. JARQ、査読有、Vol. 43、No. 4、2009、pp. 289-294.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三橋 渡 (MITSUHASHI WATARU)

独立行政法人農業生物資源研究所・昆虫

微生物機能研究ユニット・上級研究員

研究者番号：00414946