

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 25 年 6 月 11 日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580062

研究課題名（和文） 植物病原ウイルス媒介昆虫のウイルス相互作用タンパク質の探索

研究課題名（英文） Screening of protein-protein interactions between viruses and the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*.

研究代表者

中島 信彦（NAKASHIMA NOBUHIKO）

農業生物資源研究所・昆虫科学研究領域・昆虫微生物機能研究ユニット長

研究者番号：00370669

研究成果の概要（和文）：作物のウイルス病の多くは植物吸汁性農業害虫によって媒介される。植物ウイルス媒介昆虫は世代時間が短く増殖率が高いため、農薬耐性を発達させやすく農業生産に甚大な被害を及ぼすことがある。吸汁性昆虫は微小で解析しづらいため、これまで媒介昆虫とウイルスの相互作用に関する知見はあまり得られていない。近年、遺伝子配列情報が整備されてきたトビイロウンカと、トビイロウンカ体内でも増殖する植物病原ウイルスを材料に用いて、酵母ツーハイブリッド法で各種ウイルスタンパク質と相互作用する昆虫側タンパク質の探索をおこなった。イネグラッシースタントウイルスの非構造タンパク質のなかに、トビイロウンカの細胞骨格関連タンパク質と相互作用すると思われるものがあることがわかった。さらに研究の過程でイフラウイルス科の新規ウイルスがトビイロウンカに感染していることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

Many viral diseases of plants are transmitted by hemipterans. These hemipteran insects are small in size (1-4 mm) but their reproductive capacity is very high. This characteristic allows insects to get tolerance for pesticides. Recently, planthoppers acquired resistance against some pesticides and virus diseases of rice plants became serious problem in Asia. To prevent virus transmission by these insects, we have to understand how viruses utilize molecules in vector insects to be transmitted by them. However, molecular interactions between insects and the transmitted viruses are not understood well. To reveal these interactions, we searched protein-protein interactions between the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, and viruses transmitted by the insect. Yeast two hybrid analyses detected many planthopper candidate proteins which may be interact in insect body.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総 計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：トビイロウンカ イネラギットスタントウイルス イネグラッシースタントウイルス ウイルス媒介

1. 研究開始当初の背景

半翅目昆虫が媒介する植物ウイルス病は数百種類に及ぶが、その防除研究は抵抗性品種作成など主に植物体での媒介昆虫への耐性付与や弱毒ウイルス作成などウイルス増殖を抑制する方法の開発を目指して行なわれてきた(1)。しかし、弱毒ウイルスの施用はほぼ花卉・野菜類に限られており、基幹穀物であるイネ・コムギ・トウモロコシなどには適用が困難である。また、媒介昆虫を駆除するための殺虫剤施用も主な防除手段であるが、ウイルス媒介昆虫の許容密度水準は極めて低く、特に施設栽培では生産コスト高の原因である。これらの克服には媒介昆虫のウイルス媒介能力を低下させる方法の開発が望まれる。しかし、ウイルスは宿主細胞の代謝系を利用するため、宿主に悪影響を与えないウイルス防除剤の開発はきわめて困難で農業分野での成功例はない。

イネの代表的な害虫の一種であるトビイロウンカはイネラギットスタント病を媒介し、東南アジアで近年大変な被害をもたらしている。日本へは1980年代にトビイロウンカが多発生した際に侵入した経歴があるが、その後トビイロウンカ発生数の減少に伴い沈静化していた。ところが、近年のトビイロウンカ多発生により再発が懸念される。遺伝子組換えイネによる抵抗性系統の作出(2)も試みられているが実用には至っていない。ラギットスタントウイルスはレオウイルス科に属し、イネ萎縮ウイルスやイネ黒すじ萎縮ウイルスも属する。これらはウンカ・ヨコバイ類が媒介し、媒介虫体内でも増殖することから動物ウイルス・植物ウイルスの両者の特徴を持つが、昆虫体内でのウイルス・宿主相互作用に関する研究は殆ど前例がないのが現状である。

2. 研究の目的

ウンカ・アブラムシ・コナジラミなどの半翅目の小型昆虫は増殖率が高く、これらが媒介するウイルス病により農業生産に被害をもたらす。農業害虫によるウイルス媒介の機構解析は、昆虫体内でのウイルス動態追跡にとどまり、ウイルス-媒介昆虫の分子間相互作用に関する知見は殆どない。それが明らかにできれば、相互作用を阻害する方法の考案に繋がり、ウイルス病害の新規防除技術開発に繋がる。遺伝子情報資源が近年蓄積され始めたトビイロウンカを材料に用い、トビイロウンカが媒介するウイルスと昆虫の相互作用分子の探索を行なうことを研究期間内の目的とする。

3. 研究の方法

(1) ウイルス遺伝子のクローニング

RRSVは10分節のdsRNA、RGSVは6分節のssRNAでゲノムが構成されている。各ウイルスを保毒したトビイロウンカからtotal RNAを抽出し、それを鋳型にRT-PCRにより各ウイルスタンパク質をコードするcDNAを増幅させ、pGEMプラスミドにクローニングした。

(2) 酵母ツーハイブリッド探索用トビイロウンカcDNAライブラリの作成

3～5令期のトビイロウンカ幼虫から抽出したpoly(A) RNAを鋳型にMake Your Own "Mate & Plate" Library Systemを使用してOligo d(T) primerとrandom primerでそれぞれ別個にライブラリー酵母株を作成した。各ウイルスタンパク質とのスクリーニングにはOligo d(T)とrandom primerで作成したライブラリーストックを混合して使用した。

(3) Match Maker Yeast Two Hybrid System (Clontech)を用いてベイト用各ウイルス遺伝子をpGBKT7にサブクローニングし、c-Mycエピトープタグに対する抗体によるウェスタンブロットでベイトタンパク質の発現を確認した後、ライブラリーとの接合を行った。尚、接合率を上げる目的で、メーカー推奨の方法ではなくメンブレンフィルター上で接合操作を行った。

(4) 陽性株が保持するトビイロウンカ遺伝子の同定

得られた二次陽性株が少ない場合にはキット推奨の常法にてプレイ株に保持されていたプラスミドを回収してトビイロウンカcDNAの塩基配列を解読した。陽性株が数十個を上回った場合は、2次選択培地上で生育した酵母株のコロニーから高効率PCR酵素KOD-FXを使用して、プレイ株に保持されていたトビイロウンカcDNAを増幅し、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定後、塩基配列アセンブルソフトウェア(ATGC, (株)ゼネティックス社)でcontig配列を形成させ、得られたcontig配列に対してBlast検索をかけることにより取得遺伝子の同定を行った。

(5) 取得遺伝子の同定を行うに当たり、公開されているトビイロウンカESTデータベースやNCBIには登録されていない配列が認められたため、別途、トビイロウンカのpoly(A) RNAを調製してRNA-seqを行い取得遺伝子同定の目的で使用した。

(6) 偽陽性株排除の目的で、インサートとしてウイルス遺伝子を保持しない空ベイトプラスミドをもつ酵母株を用いて同様の操作を行い、自律活性化能をもつトビイロウンカ遺伝子をリスト化した。

4. 研究成果

RRSV の P6 (65 kDa), P7 (68 kDa), P9 (38 kDa), P10 (32 kDa) タンパク質遺伝子をベイトにした場合は取得 2 次陽性株数が少なく、酵母ベイト株で発現させたタンパク質の核内移行やコドン使用頻度の違いから実験手法が適切でない可能性が示唆されたため、各タンパク質のサイズが比較的小さい RGSV を対象に探索を行うこととした。

RGSV の P1 (19 kDa), P2 (23 kDa), P3 (23 kDa), P4 (19 kDa), P5 (22 kDa), P6 (21 kDa), PC3 (31 kDa), PC5 (36 kDa) をそれぞれベイトタンパク質として探索を行った結果の概要を以下に示す。

RGSV の各タンパク質をベイトにした際の酵母ツーハイブリッド探索結果概要

ベイト	スクリーニングされた 2 倍体	2 次選抜陽性株数	取得したトビイロウンカ遺伝子の種類
P1	3.0×10^6	221	45
P2	4.0×10^6	31	9
P3	1.2×10^6	309	74
PC3	2.1×10^5	13	4
P4	2.4×10^5	123	11
P5	7.5×10^6	5	2
PC5	8.0×10^5	27	7
P6	7.8×10^6	1	1
なし	1.0×10^7	83	11

P1 と P3 をベイトにした場合には、それぞれ 200 個、300 個を上回る 2 次選抜陽性株が得られた。これら陽性株が保持していたトビイロウンカの cDNA にコードされていた遺伝子はそれぞれ 45 種類、74 種類に分けることができ、それらの中には細胞骨格の形成に関与すると考えられる遺伝子が多く含まれていた。

一方、ベイトであるウイルス遺伝子を挿入していない空ベクターを持つ酵母株と接合操作を行い得られた陽性株の中には以下に示す遺伝子配列が含まれていた。

陽性株数	遺伝子名
37	不明
28	ATP 合成酵素サブユニット 0
4	ナトリウムカリウム ATP アーゼ β サブユニット
2	ラミニン α サブユニット

2	不明
2	不明
2	不明
2	3-ヒドロキシブチリル CoA レダクターゼ
2	リポフォリン
1	リボソームタンパク質 rpS20e
1	チチン

11 種類のトビイロウンカ遺伝子が見出された。これらのうち、4 種の遺伝子配列はトビイロウンカの RNA-seq 配列の中には存在するものの NCBI データベースには相同配列が登録されておらず、機能推定ができなかった。上記 11 種類の遺伝子は、各ウイルス遺伝子をベイトとした場合にも検出されており、トビイロウンカタンパク質の自律活性化能による偽陽性と考えられた。

尚、トビイロウンカの RNA-seq で得られた配列なかに、プラス鎖 RNA ウイルスのゲノム配列が 3 種類含まれていた。これらはいずれもイフラウイルス科に属すると考えられたが、既報のイフラウイルスとのアミノ酸配列の相同性は低く、いずれも新種のウイルスと考えられた。そのうちの一種についてはサンガー法で全長配列を再確認し、感染虫の排泄物を介して水平伝搬することが判明したため、*Nilaparvata lugens* honeydew virus-1 と命名した。

これまで殆ど不明であったウイルスタンパク質と相互作用する可能性のあるトビイロウンカタンパク質のリストが得られた。

今後、候補タンパク質と各ウイルスタンパク質との結合様式などの解析を行えるようになる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

① Ritsuko Murakami, Yoshitaka Suetsugu, Tetsuya Kobayashi, Nobuhiko Nakashima (2013) The genome sequence and transmission of an iflavirus from the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. Virus Research, in press.

〔学会発表〕(計 4 件)

① 中島信彦、村上理都子、石橋純、梶原英之、一木珠樹、笹谷孝英、野田博明 (2011) トビイロウンカが媒介するイネラギットスタントウイルスのゲノムセグメント 6, 7, 9 がコードするタンパク質の性質、第 55 回日本応用動物昆虫学会大会要旨集 G101.

② 中島信彦、村上理都子 (2012) イネラギットスタントウイルスのタンパク質に結合す

るトビイロウンカタンパク質の探索、第 56 回日本応用動物昆虫学会大会、2012 年 3 月 29 日、近畿大学農学部

③中島信彦・村上理都子 (2013) イネグラッシースタントウイルス―トビイロウンカ間で相互作用するタンパク質の探索、第 57 回日本応用動物昆虫学会大会、2013 年 3 月 27―29 日、日本大学生物資源科学部

④村上理都子，末次克行，中島信彦 (2013) トビイロウンカ (*Nilaparvata lugens*) から検出されたイフラウイルスについて、日本蚕糸学会第 83 回大会、2013 年 3 月 19 日、農林水産技術会議事務局つくば事務所

〔その他〕

ホームページ等

http://www.nias.affrc.go.jp/insect_microbe/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 信彦 (NAKASHIMA NOBUHIKO)

農業生物資源研究所・昆虫科学研究領域・昆

虫微生物機能研究ユニット長

研究者番号：0037066