

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380035

研究課題名(和文) 昆虫ウイルスにおける生物間相互作用に資する遺伝子の生態的機能の解明

研究課題名(英文) A study on ecological functions of insect virus genes in biological interactions

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：宿主の発育を操作する遺伝子について、当該遺伝子を GFP で破壊したノックアウトウイルス、ノックアウトウイルスに当該遺伝子を入れなおしたレスキューウイルス、GFP を遺伝子非コード領域に挿入したノックインウイルスと野生型ウイルスの表現型を比較した。野生型ウイルス、レスキューウイルス、ノックインウイルスに感染した幼虫は、終齢期間が延長して幼虫で死亡した。ノックアウトウイルスに感染した場合、蛹や蛹-幼虫中間体で死亡する傾向があった。また、当該遺伝子は、宿主が蛹化のために地下部に潜る行動を阻害し、ウイルスの伝播が実際に起こる地表や植物体上にとどまらせることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To analyze biological functions of the gene that is thought to be responsible for manipulation of host development, we constructed recombinant viruses, namely knock-in virus created by inserting the green fluorescent protein reporter under the control of spheroidin gene promoter (GFP cassette) into a non-coding region of virus genome, knock-out virus having the gene disrupted by a GFP cassette and rescue virus that is restored the complete gene in knock-out virus. Phenotypic comparison of wild-type and recombinant viruses-infected larvae of *Mythimna separata* indicated that the gene is truly responsible for manipulation of host development and metamorphosis of the infected hosts. Furthermore, the gene altered normal behavior of the host before pupation. Non-infected larvae moved from host plants to soil and formed cell for pupation. However, insects infected with viruses having the gene did not show such behavior and stayed on host plants.

研究分野：昆虫病理学

キーワード：昆虫ウイルス アワヨトウ 生物間相互作用

1. 研究開始当初の背景

ウイルスは、宿主を利用し複製するのであるが、その過程で、自身の複製を完了するために、宿主の生理や行動を制御している。この宿主制御のメカニズム(至近要因)やウイルスの適応度への役割(究極要因)が明らかになれば、ウイルスの複製や個体間の伝播を阻害もしくは助長する方法が見つかるかもしれない。すなわち、有用な生物をウイルス病から守るための防疫方法や、逆に、有害生物をウイルス病により制御する防除方法の開発に貢献できる。昆虫を宿主とするウイルス(昆虫ウイルス)は、害虫防除のための資材として注目されてきた。昆虫ウイルスの宿主制御については、おもにバキュロウイルスで研究されてきたが、まだ不明な点が多い。また、昆虫ウイルスは多様であり、その宿主制御法も未知な部分が多い。昆虫ポックスウイルスは、昆虫の幼虫に感染し、幼虫の発育を制御していることが明らかになっている。我々は、このメカニズムには、昆虫の発育ホルモンの制御が含まれることを明らかにしており、昆虫ポックスウイルスがコードする遺伝子の一つが発育ホルモンの力価を制御していることを強く示唆する結果を得ている。

2. 研究の目的

ウイルス遺伝子の機能解明は、主に細胞レベルの事象を対象に推進されており、複製や感染様式の分子基盤が明らかになるなど重要な知見が社会にもたらされているが、ウイルスの生態的事象に関する分子基盤の解明は遅れている。

昆虫ポックスウイルスは、宿主である昆虫の幼虫の蛹化を阻止し、感染幼虫を幼虫の状態に維持してしまう。昆虫ポックスウイルスの、この宿主の発育制御は、本ウイルスの生態に深くかかわっていると考えられるが、どのように関与しているのかは明らかではない。この現象に上記の遺伝子が関与していると示唆されているため、この遺伝子を昆虫ポックスウイルスが持っている究極要因を解明することによって、本ウイルスの生態的事象に関する分子基盤の一つを解明できると考えられる。

本研究では、当該遺伝子が、昆虫ポックスウイルスの生態、特に伝播(適応度)へ果たす役割を解明することによって、なぜ昆虫ポックスウイルスが当該遺伝子を持っているのかという進化的意義を解明する。

3. 研究の方法

1) まず、当該遺伝子が本当に、宿主である昆虫の幼虫の蛹化を阻止し、感染幼虫を幼虫の状態に維持する機能があるのかを確実化した。これまで、当該遺伝子をノックアウト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

響を解析した。また、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してきた。しかし、当該遺伝子をノックアウトするためにマーカー遺伝子である緑色蛍光タンパク質遺伝子(GFP)を昆虫ポックスウイルスのゲノムの当該遺伝子領域に組み込んだため、当該遺伝子のノックアウトの効果か、GFPの効果かを区別できなかった。また、組換えウイルスを作製する過程において、予想もしない変異がゲノム上に起こっている可能性も否定できなかった。そこで、GFPを本ウイルスのゲノムの遺伝子非コード領域に挿入したウイルス(ノックインウイルス)および、ノックアウトウイルスに当該遺伝子をもう一度入れなおしたウイルス(レスキューウイルス)を作製し、生物検定によって当該遺伝子が宿主幼虫の発育に与える影響を調査した。

2) 野生型ウイルスと組換えウイルスを宿主幼虫に感染させ、ウイルスの複製数を比較した。

3) 野生型ウイルスと組換えウイルスを宿主幼虫に感染させたのち、寄主植物に放し、その後の行動や、蛹化する場所、死亡する場所を調査した。

4. 研究成果

1) 当該遺伝子が宿主の発育や行動に与える影響

当該遺伝子をGFPで破壊したノックアウトウイルス、GFPを挿入したノックインウイルス、ノックアウトウイルスに当該遺伝

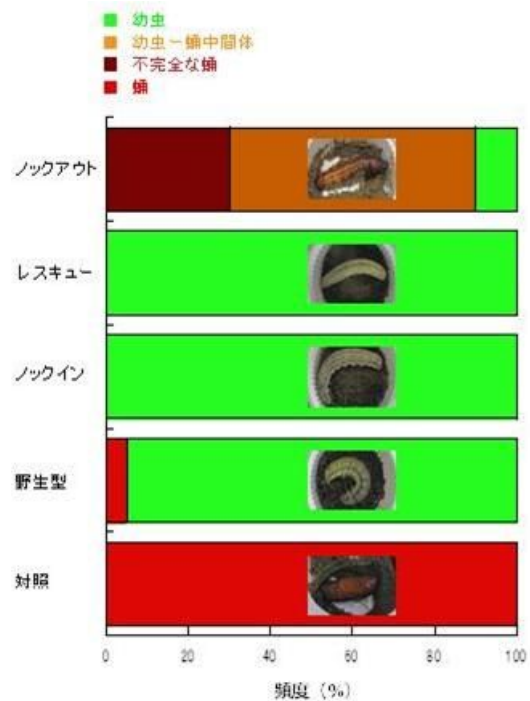


図1. 野生型および組換え昆虫ポックスウイルスを接種したアフトウ5齢幼虫の死亡ステージ。アフトウ5齢幼虫に100%致死量のウイルスを投与した。対照区は、全て蛹化した。

子を入れもどしたレスキューウイルスと野生型ウイルスをアワヨトウ幼虫に投与し、感染幼虫の発育と死亡を比較調査した。全てのウイルスは、培養細胞には同様に感染し増殖した。また、アワヨトウ幼虫に対する病原力にも差はなかった。しかし、感染した幼虫の発育には大きな差が認められ、野生型ウイルスに感染した幼虫は、終齢期間が延長して幼虫で死亡した。遺伝子ノックアウトウイルスに感染した場合、蛹や蛹 幼虫中間体で死亡する傾向があった。ノックインウイルスに感染した幼虫および、レスキューウイルスに感染した幼虫は、野生型ウイルスに感染した場合と同様に終齢期間が延長し幼虫で死亡した(図1)。これらのことから、当該遺伝子が真にアワヨトウ幼虫の蛹化を阻止し、感染虫を幼虫の状態に維持する機能があると結論付けた。

発育や蛹化に伴う行動(蛹室を作るためのスピニング)を観察したところ、ノックアウトウイルスに感染した幼虫は、対照区と同様に発育し、対照区の正常な幼虫が行うように、蛹になる前にスピニングを行い蛹室を作り蛹化の準備をしたのち、多くが蛹 幼虫中間体で死亡した(図2)。野生型ウイルスに感染したものは、そのような行動を行うことなく、幼虫のまま死亡した(図3)。すなわち、当該遺伝子は、蛹化に伴う宿主昆虫の行動にも影響することが明らかになった。このような行動は、発育ホルモン系によって制御されているが、当該遺伝子がコードするタンパク質は、発育ホルモン系に作用することが既に分かっており、形態変化のみならず、行動に影響を及ぼすことは納得のいく結果である。

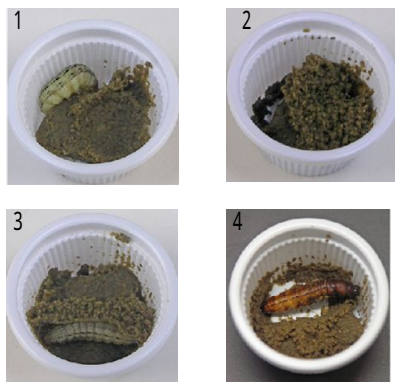


図2. ノックアウトウイルスを投与したアワヨトウの蛹化にともなう行動。

2) 当該遺伝子がウイルスの複製に与える影響

ウイルスの複製数を調査した。昆虫ボックスウイルスは、ウイルス粒子を封入したタンパク性の包埋体という結晶を産生する。この包埋体は、宿主個体間の伝播のために使われるものであり、包埋体産生量は、本ウイルスの適応度形質として重要なものである。ノックアウトウイルスに感染した場合には、包埋

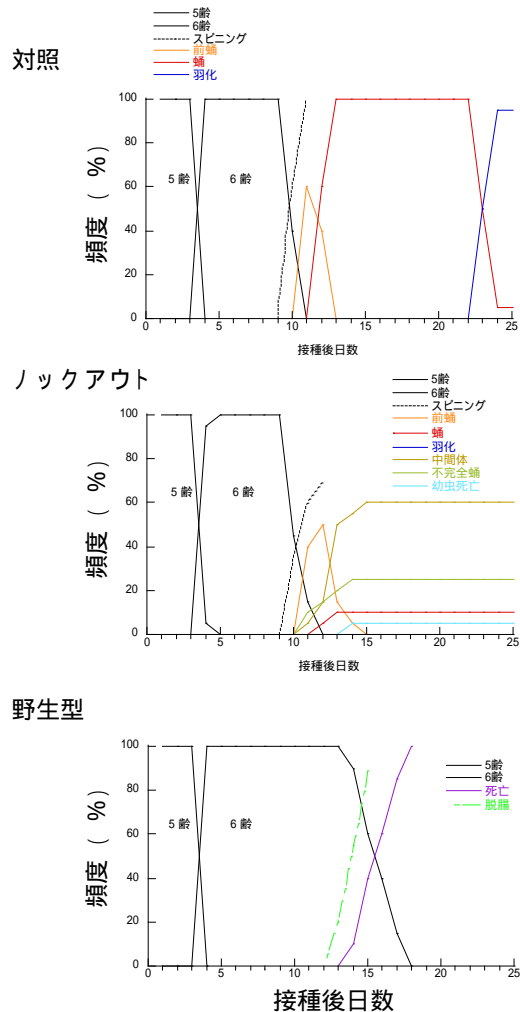


図3. 野生型および組換え昆虫ボックスウイルスを投与したアワヨトウの発育

体産生量が他のウイルスと比較して少ないことが分かった。これは、蛹や蛹 幼虫中間体で死亡した場合には、幼虫で死亡した場合よりも包埋体産生数が少ないためである。

3) 当該遺伝子が植物体に放飼した宿主の行動に与える影響

図3のように、アワヨトウ幼虫をケース内に用意した鉢植えトウモロコシ苗に放飼し、その後、幼虫の存在場所を観察した。

非感染幼虫は日中においては鉢植えに入れたもみ殻中にもぐっており、夜にトウモロコシ上に出て活動した。しかし、ウイルス感染幼虫は、野生型、組換えウイルスの如何に感染したにかかわらず、このような日周行動は示さず、絶えずトウモロコシ上にとどまっていた。非感染幼虫は、蛹化前にもみ殻中に潜りそこに蛹室を作って蛹化した。ノックアウトウイルスも、非感染虫と同様にもみ殻にもぐり、蛹室を作る傾向があった。すなわち、産生されたウイルスは、伝播の可能性の低い地下部に分布した。ところが、野生型ウイルスやその他の組換えウイルスを投与した幼虫では、幼虫のまま死亡し、もみ殻にもぐる行動はなかった。すなわち、当該遺伝子は、蛹化に伴う行動に影響を与え、感染幼虫

で産生したウイルス包埋体を実際に伝播が起こる植物体上に分布させることが明らかとなった。

当該遺伝子は、感染虫におけるウイルスの繁殖を増加させることと、感染虫の行動を変えることによって、ウイルスの適応度を上昇させていると考えられた。

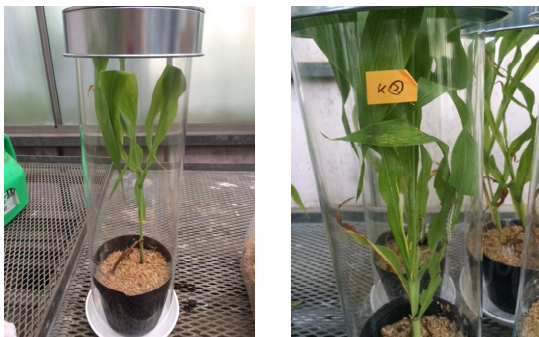


図4. 寄主植物に放飼したウイルス感染虫の行動観察に用いた実験ポット。

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3件)

Julien Thézé, Jun Takatsuka, Basil Arif, Madoka Nakai, Elisabeth A. Herniou, Gene acquisition convergence between entomopoxviruses and baculoviruses、Viruses、査読有、7巻、2015、1960-1974、doi: 10.3390/v7041960.

Jun Takatsuka, Madoka Nakai、Replication of *Mythimna separata* entomopoxvirus in High Five™ cells and the construction of a recombinant、Journal of Invertebrate Pathology、査読有、118巻、2014、12-17、doi: 10.1016/j.jip.2014.02.010.

Julien Thézé, Jun Takatsuka, Zhen Li, Julie Gallais, Daniel Doucet, Basil Arif, Madoka Nakai, Elisabeth A. Herniou, New Insights into the Evolution of *Entomopoxvirinae* from the Complete Genome Sequences of Four Entomopoxviruses Infecting *Adoxophyes honmai*, *Choristoneura biennis*, *Choristoneura rosaceana*, and *Mythimna separata*、Journal of Virology、査読有、87巻、2013、7992-8003、doi:10.1128/JVI.00453-13

[学会発表](計7件)

高務淳、昆虫ポックスウイルスの感染経路について、第59回日本応用動物昆虫学会、2015年3月27日、山形大学(山形県、山形市)

高務淳、昆虫ポックスウイルスの世界：ゲノム、おもしろ遺伝子、ゲノム外DNA、第11回昆虫病理研究会シンポジウム、2014年9月19日、富士CaIm(山梨県、富士吉田市)

高務淳、仲井まどか、アワヨトウ昆虫ポックスウイルスが持つシロモンヤガ顆粒病ウイルス遺伝子のホモログについて、第58回日本応用動物昆虫学会、2014年3月27日、高知大学(高知県、高知市)

高務淳、昆虫ポックスウイルスの戦略パート1：宿主や宿主を取り巻く生物との相互作用、第57回日本応用動物昆虫学会、2013年3月29日、日本大学(神奈川県、藤沢市)

金城寛俊、高務淳、塩月孝博、国見裕久、仲井まどか、昆虫ポックスウイルス jhamt ホモログ破壊株がアワヨトウ幼虫の変態に与える影響、第57回日本応用動物昆虫学会、2013年3月28日、日本大学(神奈川県、藤沢市)

Hirotooshi Kinjo, Jun Takatsuka, Takahiro Shiotsuki, Yasuhisa Kunimi, Madoka Nakai、Effect of entomopoxvirus infection on growth and metamorphosis of *Mythimna separata* larvae、2012 International Congress of Entomology、2012年8月20日、Daegu、Korea

Julien Thézé, Julie Gallais, Jun Takatsuka, Madoka Nakai, Elisabeth Herniou、Gene acquisition convergence drives adaptation in distant insect viruses、Society for Invertebrate pathology、2012年8月7日、Buenos Aires、Argentina

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・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60302907

国見 裕久(kunimi Yasuhisa)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：50195476