

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450474

研究課題名(和文) 囲食膜を標的とした害虫防除技術開発のためのタンパク質フゾリンの効率的利用法の研究

研究課題名(英文) Study on the development of the efficient use of the protein fusolin targeting the insect peritrophic matrix for pest control

研究代表者

三橋 渡 (MITSUHASHI, Wataru)

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 昆虫制御研究領域・主席研究員

研究者番号：00414946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：微生物の殺虫効果を増大させるタンパク質フゾリンの作用機作の一環として、フゾリンが昆虫中腸内の囲食膜に直接作用することを、虫体の免疫組織化学的手法により初めて明らかにした。さらに、プロテアーゼ阻害剤を食したカイコ囲食膜のフゾリンによる破壊程度が低下する現象を発見し、破壊プロセスの終盤に中腸内プロテアーゼが関与している可能性を発見した。更に、海外の研究者らとの共同研究によりフゾリンの立体構造解析等を行い、フゾリン類がキチンモノ酸化酵素であり、消化液の高アルカリによってその結晶体から遊離して初めて活性を発揮することを明らかにした。また、フゾリン添食後の囲食膜形態の定性的変化を詳細に明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We firstly elucidated that the protein fusolin directly act on the peritrophic matrix (PM) in an insect by using immunohistochemistry in the midgut of the insect. Furthermore considerably large tubular PM was obtained in the administration of protease inhibitor mixture with spindles, although the tube was very fragile compared with a intact tubular PM. This strongly suggested that some type(s) of midgut protease(s) is also involved in the disruption the PM but was inhibited by the mixed inhibitors. Our collaboration with foreign researchers to study atomic structure of fusolin revealed that it is a metal ion-dependent lytic chitin monooxygenase and that fusolin becomes active after it is released from its crystal, spindles, by a high alkaline pH in the midgut. In addition, we revealed that administration of fusolin crystal soon led to some changes in the PM and that detailed different statuses in morphology of the PM at different times after spindle administration.

研究分野：昆虫病理学

キーワード：害虫 フゾリン 囲食膜

1. 研究開始当初の背景

農林・衛生害虫防除のための化学農薬は不可欠なものであるが、人畜や環境への悪影響の可能性を有する。このため、化学農薬低減方策の一環として、人畜・環境への負荷の少ないウイルス等の微生物を原料とする微生物農薬の利用拡大が望まれてきたが、生産コスト高等に起因する高価格や対象害虫が限られる等の理由で普及はあまり進んでいない。ウイルス農薬でこの状況を打破するためには、核多角体病ウイルス (NPV) の殺虫力を強化して害虫防除に必要なウイルス使用量を低減することによる低コスト化を実現することが重要である。この低コスト化がウイルス農薬の普及を促進すると考えられるためである。NPV の殺虫力増強法としてウイルス感染を増強させる感染増強剤を併用する方法が考えられている。

研究代表者らは、コガネムシ類に寄生する昆虫ポックスウイルス (EV) が宿主内に大量に産生する封入体の一種であるスピンドルの構成タンパク質フゾリン (図1。スピンドル) が、EV を初め、NPV の感染力を大きく増強すること、さらには、BT 製剤やその結晶性毒素の殺虫活性も高めることを発見した。従って、EV やバキュロウイルスに広く見られるフゾリン (バキュロウイルスのものは GP37 と呼ばれる) は、感染増強のための強力なウイルス農薬補助剤や、Bt (*Bacillus thuringiensis*) 毒素を導入した GM 作物への導入による害虫への抵抗性の向上に利用される潜在性を有する。現在は、フゾリン・スピンドルの生産コストは高いが、生産・利用コストが、市場価格面で化学農薬と太刀打ちできるレベルになれば、ウイルス等を原料とした微生物農薬の普及促進に繋がる。これらの増強作用は、幼虫の中腸囷食膜をフゾリンが破壊することによって生じる。フゾリンが、囷食膜の主成分であるキチンに対して *in vitro* で高い結合能を持つことから、

中腸内でキチンに結合するものと考えられ、これが囷食膜破壊に強く関与する可能性があるが、破壊にいたるメカニズムは不明であった。更に、代表研究者のグループはスピンドルとフゾリンの立体構造を初めて解明したため、これによりフゾリンのキチン結合モチーフの立体構造も明らかになったが (当時未発表) キチン結合性をさらに高めた改変フゾリン作製のための重要データが得られた。

活性型フゾリンの *in vitro* 生産法は、これまでに大腸菌、代表者らによるバキュロウイルス発現系利用のものがあるが、さらに、代表者らは当時、酵母外来遺伝子発現系にフゾリン遺伝子を導入している。

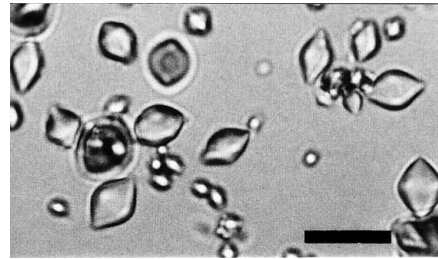


図1. スピンドル (フゾリンの結晶体)。バー: 10 μm

2. 研究の目的

近年、囷食膜が、害虫防除のための微生物農薬として利用されている微生物の中腸細胞への感染を物理的に抑制していることが広く認識されるようになってきている。一方、フゾリンには囷食膜破壊作用があるため、この作用を微生物農薬使用の際の障害である囷食膜機能の排除に活用することが考えられる。本研究では、フゾリンによる囷食膜破壊のメカニズム解明を通じた最適作用条件の検討と破壊作用モチーフ等の改変による高活性な改変フゾリンの開発・利用技術等を確立し、これによって、ウイルスや Bt 菌を原料とした微生物農薬の活性強化および低コスト化を図ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) フゾリンの囲食膜破壊メカニズムの解明

中腸のパラフィン切片に対するフゾリン抗体を使用した免疫組織学的手法により、フゾリンの局在部位を解明するとともに、消化酵素（数種のプロテアーゼ）の阻害物質をカイコに投与することにより、囲食膜崩壊における消化酵素の役割の有無等を解析した。

さらにスピンドル以外に消化酵素（数種のプロテアーゼ）阻害物質を食したカイコ幼虫から抽出した消化液中の中腸内プロテアーゼ活性を蛍光測定器で測定した。

(2) フゾリンの立体構造と機能との関連の解明

立体構造と機能との関連の解明のために、大腸菌にフゾリン遺伝子の機能部位（5'側。全長の2/3）を組み込み大量発現を試みた。

また、産生されたこのフゾリンの活性をカイコ・カイコ NPV の系での死亡率の変化の有無により評価を試みた。

(3) 酵母発現系の解析

3種のフゾリン（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）のいずれかを導入した3系統の酵母（*Pichia pastoris* x-33）でのフゾリンの発現の有無を、SDS-PAGE、ウェスタンブロッティングにより確認した。

さらに、酵母によるフゾリン生産量が増量させる培養条件（培養時間、培地等）を検討した。

最終年度は、研究機構外部と共同で、フゾリン配列を加工して酵母外来遺伝子発現系で発現させる実験に着手した。

(4) フゾリン結晶体（スピンドル）の害虫への投与量の節約法の開発

ドウガネブイブイ EV の非宿主昆虫（カイコ、ハスモンヨトウ）の消化管内でスピンドル

ルがフゾリンへと溶解せず排出される状況を解明するために、同幼虫の *in vitro* における消化液中や体内でのスピンドルの溶解性を光学顕微鏡で観察した。

更に、クワ葉または人工飼料育カイコの消化液による NPV 多角体の溶解実験を行い、餌の違いによる多角体等の溶解性の違いの有無を調査した。

4. 研究成果

(1) フゾリンの囲食膜破壊メカニズムの解明

フゾリンが囲食膜に直接結合することが *in vivo* で初めて示された。また、フゾリンは、囲食膜の前部から後部まで、また内部にも結合しており、全体的に結合することが明らかになった。

プロテアーゼ阻害剤カクテル投与の場合には囲食膜がほぼそのまま残っていたのに対して、EDTA 投与では逆に、スピンドル単独投与の場合以上に囲食膜崩壊が進行しており、完全消失していた。このことから、プロテアーゼが囲食膜崩壊プロセスの後半で崩壊に関与していることと、フゾリンがメタロプロテアーゼにより分解を受けその機能が低下していることが推察された。また、プロテアーゼ阻害剤カクテル投与の幼虫の中腸液のプロテアーゼ活性は、スピンドルのみを食した幼虫の同よりも活性が低い傾向が認められた。これらの事から、フゾリン投与による囲食膜崩壊は、以下の様な2段階のステップで生じる可能性が高いと考えられた。第一段階としては、フゾリンが囲食膜に結合・作用し、膜の立体構造が変化するとともに、膜のキチンの酸化分解を起こす。次に、膜立体構造の変化により消化管内のプロテアーゼが膜のタンパク質にアクセス可能となり、タンパク質を分解し、キチン膜の露出を起こし弱い弱化を進める。これにより、フゾリンのキチンへの結合とその分解が一層進み、大規模

な崩壊へといたる。

(2) フゾリンの立体構造と機能との関連の
解明

フゾリン遺伝子の機能部位のみのフゾリンをカイコ3齢幼虫に多量に(24 μ g/幼虫)食させた後、カイコNPV感染増進活性を調査したが、その活性はきわめて弱かったことから、糖鎖が付加されない場合は、活性にC末端が必要なことが示唆された。

(3) 酵母発現系の解析

作成済みの組換え酵母50クローンをLB培地やBMMY培地、初日LB培地で2日目がBMMY培地使用で培養し、菌体および培養上清でのフゾリン発現をSDS-PAGE、ウエスタンブロッティングにより解析した。現時点では、発現の確認に至っていない。

所外の研究者と共同で、フゾリン配列を酵母外来遺伝子発現系で発現し易いコドンに改変した。

(4) フゾリン結晶体(スピンドル)の害虫への投与量の節約法の開発

スピンドルはカイコ、ハスモンヨトウ消化液中いずれでもほとんど形態に変化が観察されず、きわめて難溶性であることが判明した。従って、溶解性を向上させることがスピンドル使用の効率化に重要であることが判明した。

NPV多角体の溶解実験では、クワ葉または人工飼料育いずれの幼虫の消化液でも良好な溶解の再現性が低かった。このことから、中腸内での比較的限られた条件下で高い溶解が生じる可能性を見出した。

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)

Kawakita H, Miyamoto K, Wada S, Mitsuhashi W (2016) Analysis of the

ultrastructure and formation pattern of the peritrophic membrane in the cupreous chafer, *Anomala cuprea* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Applied Entomology and Zoology* 51:133-142. (査読あり)

Chiu E, Hijnen M, Bunker R, Boudes M, Rajendran C, Aizel K, Olieric V, Schulze-Briese C, Mitsuhashi W, Young V, Ward VK, Bergoin M, Metcalf P, Coulibaly F (2015) Structural basis for the enhancement of virulence by viral spindles and their *in vivo* crystallization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112:3973-3978. (査読あり)

三橋渡 (2015) コガネムシの昆虫ポックスウイルス研究、最近の進展. **蚕糸・昆虫バイオテック** 84:51-63. (査読なし)

[学会発表](計 2 件)

大嶋雅夫・三橋渡・田部井豊 () 昆虫ポックスウイルス由来のフゾリタンパク質の利用による殺虫効果の増強. **日本育種学会第131回講演会要旨集**:246. 2017年3月30日、名古屋大学(愛知県・名古屋市).

三橋渡・志村幸子・上野千尋・宮本和久・和田早苗 (2015) 昆虫ポックスウイルススピンドルの昆虫消化管内での態様. **第59回日本応用動物昆虫学会大会 講演要旨**:131. 2015年3月27日、山形大学(山形県・山形市).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三橋 渡 (MITSUHASHI Wataru)

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 昆虫制御研究領域・主席研究員

研究者番号: 00414946

(2)研究分担者

山崎 俊正 (YAMAZAKI Toshimasa)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合

研究機構・高度解析センター・チーム長

研究者番号：40360458