

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14894

研究課題名(和文) アスコウイルスによる寄生蜂ベクター利用戦略の解明

研究課題名(英文) Adaptation strategy of ascoviruses to their vector parasitoids

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：1)日本で見つかったアスコウイルス分離株には寄生蜂致死タンパク質(PKT)のホモログが複数存在していた。

2)日本産アスコウイルスのベクター(伝播者)は、ギンケハラボソコマユバチであることが明らかになった。
3)日本産アスコウイルス感染虫よりギンケハラボソコマユバチは、脱出できたので、このウイルスのゲノムにPKTがコードされている理由は、「ベクター自身の排除ではなく、ベクターの競争相手となる寄生蜂を排除することによりウイルスの適応度を上げるため」という仮説が考えられた。

研究成果の概要(英文)：1)Ascovirus isolate found in Japan encoded plural parasitoid killer toxin (pkt) homologue were encoded in the genome.

2) Meteorus pulchricornis was a vector of Japanese isolate of ascovirus.

3) Progeny of M. pulchricornis was successfully emerged from the ascovirus infected host. It suggests that the hypothetical reason for ascovirus Japanese isolate encoding PKT is due to eliminate the competitor(s) of vectors' progeny but not vectors' progeny themselves.

研究分野：昆虫病理学

キーワード：アスコウイルス 伝播 寄生蜂致死タンパク質

1. 研究開始当初の背景

昆虫ボックスウイルス(ボックスウイルス科、二本鎖 DNA ウイルス)感染虫の体内でカリヤコマユバチの幼虫や卵が致死する現象が報告されている (Kyei Poku et al., 1998; Okuno et al., 1999)。感染虫の体液をゲルろ過等で分離し、約400アミノ酸残基のシステインを多く含む分泌タンパク質の遺伝子がボックスウイルスのゲノムにコードされていることを発見した。このタンパク質(寄生蜂致死タンパク質 Parasitoid Killer Toxin:PKTとする)のホモログ検索をしたところ、アスコウイルスに PKT 遺伝子(*pkt*)のホモログが複数見つかった。一方、申請者は、2012年に埼玉県の大塚においてハスモンヨトウ(チョウ目ヤガ科)幼虫より日本で初めてアスコウイルスを単離した。この新規分離株にも*pkt*ホモログがコードされていた。申請者は、これまでの知見から、アスコウイルスのコードする *pkt* ホモログが寄生蜂による伝播戦略に関係しているという着想を得た。本課題は、「寄生蜂を介した伝播に有利であるため、アスコウイルスのゲノムに*pkt*が保存されている」という仮説を検証することを目的としている。

本課題では、まず野外調査と室内伝播実験により、アスコウイルス新規分離株のベクターとなる寄生蜂種を特定する。次に、このウイルス感染虫体液を超遠心してウイルス粒子を取り除いた上清 (Virion Free Plasma) に寄生蜂致死活性があるかどうか検証する。また、アスコウイルス感染虫からのベクター寄生蜂の生存率を調査し、PKT の適応的意義を解明する。

2. 研究の目的

動物や植物を宿主とするウイルスは、しばしば蚊やウンカなどの昆虫をベクター(媒介者)として伝播する。しかし、昆虫に感染する昆虫ウイルスで、昆虫ベクターを介して媒介されるのはアスコウイルス(アスコウイルス科、二本鎖DNAウイルス)のみである。アスコウイルスは、寄生蜂の雌成虫の産卵管の表面に付着してチョウ目昆虫の宿主に伝播され

る。ところが、アスコウイルスは寄生蜂の産卵行動を通して伝播するため宿主の体内で必ずベクターの子(寄生蜂幼虫)とウイルスの競争が起きてしまう。本研究は、寄生蜂という特殊なベクターを利用するアスコウイルスがどのような進化戦略を獲得することにより伝播を可能にしているのかを解明することを目的としている。

3. 研究の方法

(1)日本産アスコウイルスの生物学的特徴の解明:日本産アスコウイルスをハスモンヨトウ幼虫に接種して増殖させ、感染虫の体液を採集して遠心分離によりウイルス粒子を精製した。ウイルス粒子懸濁液に浸した虫ピンをハスモンヨトウ幼虫に突き刺すことでウイルス接種を行った。日本産アスコウイルスを接種したハスモンヨトウ幼虫の感受性、致死時間、感染虫の体重の推移、宿主範囲を調査する。宿主範囲は、上記の手法で、シロイチモジヨトウ、アワヨトウ、マイマイガ、チャノコカクモンハマキ幼虫にウイルスを接種して飼育し、感染致死率を調査した。

(2)ベクター寄生蜂種の特定:日本産アスコウイルスのベクターとなる寄生蜂を特定するため、野外調査と室内実験を行った。野外調査では、東京農工大FSセンターのサトイモ圃場でハスモンヨトウ若齢幼虫を採集した。採集した幼虫は、人工飼料を与えて個別飼育した。

室内実験では、ギンケハラボソコマユバチをアスコウイルス感染虫の入ったケージに放飼し、非感染幼虫の入ったケージに移し替えて伝播させ、非感染幼虫を個別飼育してアスコウイルス感染を観察してウイルス伝播率を調査した。

(3)宿主のアスコウイルス感染が、ベクター寄生蜂の子孫(幼虫)に及ぼす影響:アスコウイルス感染虫に産卵された寄生蜂幼虫の脱出率、繭形成率、羽化率を調査した。

4. 研究成果

(1)日本産アスコウイルスの生物学的特徴の解明:日本で分離したアスコウイルスの生物学的特徴を明らかにした。すなわち、宿主に対する病原力、致死時間、感染虫の体重の推移、宿主範囲を解明し、全塩基配列の決定を行った。その結果、日本産アスコウイルスに

は寄生蜂致死タンパク質 (PKT) のホモログが複数存在することがわかった。

(2)ベクター寄生蜂種の特定: 日本で分離したアスコウイルスのベクターとなる寄生蜂を特定するため、野外調査と室内実験を行った。野外調査では、東京農工大FSセンターのサトイモ圃場でハスモンヨトウ若齢幼虫174頭を採集した。そのうち、52%がギンケハラボソコマユバチの寄生により致死した。その他 *Microplitis* 属の寄生蜂による寄生が1頭 (0.6%) 認められた。日本産アスコウイルスが発見された埼玉県のパラダイム圃場においても同様にギンケハラボソコマユバチが多く、ハスモンヨトウ幼虫の重要な寄生性天敵としてギンケハラボソコマユバチが重要であると考えられた。室内実験では、ギンケハラボソコマユバチをアスコウイルス感染虫の入ったケージに放飼し、非感染幼虫の入ったケージに移し替えたところ、アスコウイルスの感染が認められたことから、ギンケハラボソコマユバチによるアスコウイルスの伝播が可能であることが明らかになった。

(3)宿主のアスコウイルス感染が、ベクター寄生蜂の子孫 (幼虫) に及ぼす影響: アスコウイルス感染虫に産卵された寄生蜂幼虫の脱出率、繭形成率、羽化率を調査したところ、本種の幼虫は、感染虫体内で致死することなく脱出し羽化できなかつた。そのため、アスコウイルスにコードされているPKTは、ベクター種を致死させないことがわかった。すなわち、PKTが日本産アスコウイルスのゲノムにコードされている理由は、「ベクター個体の子を致死させることにより宿主を長期間生存させウイルスを効率よく伝播する」という「仮説1」ではなく、「ベクターの競争相手である寄生蜂を排除する事が適応的であるため、*pkt* が保存されている」という「仮説2」の可能性が高まった。

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 5件 査読付 2件)

Nakai, M., Kinjo, H., Takatsuka, J., Shiotsuki, T., Kamita, S.G., Kunimi, Y. (2016) Entomopoxvirus infection induces changes in both JH and ecdysteroid levels in larval *Mythimna separata*. *Journal of General Virology*, 97, 225-232. (査読有)

Azam, A., Kunimi, Y., Inoue, N.M., Nakai, M. (2016) Effect of granulovirus infection of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae)

larvae on development of the endoparasitoid *Chelonus inanitus* (Hymenoptera: Braconidae). *Applied Entomology and Zoology*, 51, 479-488. (査読有)

仲井まどか・井上真紀・国見裕久(2016)昆虫ウイルス, *昆虫と自然*, 51, 24-27. (査読無)

高務 淳(2016) 寄生蜂に対する毒素を生産する昆虫ウイルス, *昆虫と自然*, 51, 16-19. (査読無)

仲井まどか・高務淳(2015) 昆虫ボックスウイルス, *遺伝(特集 環境ウイルス)*, 290-298. (査読無)

[学会発表](計16件)

Nakai, M. (2017) Ecology of insect viruses: how viruses adapt to their insect host population, 50th Annual meeting of Society for Invertebrate Pathology, San Diego, USA. 8月25日(招待講演)(講演確定)

Nakai, M. (2017) Adaptation strategy of ascoviruses to their vector parasitoids, Symposium for insect virus molecular biology, Hunan Agriculture university, Changsha, China. 6月24日(招待講演)(講演確定)

石井宏貴, 国見裕久, 井上真紀, 仲井まどか (2017) 殺虫時間が異なる2種アスコウイルスを用いたタンパク質の比較, 第61回日本応用動物昆虫学会大会合同大会 東京農工大学(東京都小金井市), 3月28日.

太田理絵, 立石剣, 井上真紀, 国見裕久, 仲井まどか (2017) 昆虫ボックスウイルスが生産する寄生蜂致死タンパク質は細胞に作用する, 第61回日本応用動物昆虫学会大会合同大会 東京農工大学(東京都小金井市), 3月28日.

Nakai, M. (2016) *Drosophila suzukii* impact on fruits in Japan and its pathogens for pest management, 第25回国際昆虫学会(International Congress of Entomology), Orlando, USA, 8月24日. (招待講演)

Shusuke Koike, Jun Takatsuka, Julien Theze, Elisabeth Herniou, Madoka Nakai (2016) Extra genomic DNA elements found in an entomopoxvirus, 49th of Annual meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Tours, France, 7月28日.

Hiroto Ishii, Ikbal Agah Ince, Xiao-Wen Cheng, Dennis Bideshi, Maki N. Inoue, Yasuhisa Kunimi, Brian Federici, Madoka Nakai (2016) Comparison of genome replication rates of fast-killing versus slow-killing SfAV isolates, 49th of Annual meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Tours, France, 7月27日.

Nakai, M. (2016) Diagnosis of insect viruses, Summer school in insect pathology, Prevention

and control of diseases and contaminants in insectaries, Society for Invertebrate Pathology, Tours, France, 7月29日。(招待講演)

Asadullah Azam, Shizuo G. Kamita1, Yasuhisa Kunimi, Maki N. Inoue, Madoka Nakai (2016) Spodoptera litura granulovirus infection suppresses the juvenile hormone esterase activity in parasitized and non-parasitized S. litura larvae, 第12回 昆虫病理研究会シンポジウム, モンタナリゾート(宮城県岩沼市), 9月16日.

鶴田景子, 内田春明, 井上真紀, 国見裕久, 仲井まどか (2016) 包埋体形態の異なる2種の顆粒病ウイルスの比較病理学, 第12回 昆虫病理研究会シンポジウム, モンタナリゾート(宮城県岩沼市), 9月16日.

太田理絵, 飯田直記, 立石剣, 井上真紀, 国見裕久, 仲井まどか (2016) 昆虫ボックスウイルスが産生する寄生蜂致死タンパク質の寄生蜂培養細胞に対する影響, 第12回 昆虫病理研究会シンポジウム, モンタナリゾート(宮城県岩沼市), 9月16日.

蒔山奈緒, 佐川菜, 新井詠子, 井上真紀, 国見裕久, 仲井まどか (2016) 寄主のアスコウイルス感染がギンケハラボソコマユバチに及ぼす影響の調査, 第12回 昆虫病理研究会シンポジウム, モンタナリゾート(宮城県岩沼市), 9月16日.

鶴田景子, 国見裕久, 井上真紀, 仲井まどか (2016) リンゴコカクモンハマキ顆粒病ウイルス包埋体形態異常変異株の包埋体形成過程, 日本昆虫学会第76回大会・第60回日本応用動物昆虫学会大会合同大会 大阪府立大学(大阪府堺市), 3月27日.

石井宏貴・国見裕久・井上真紀・仲井まどか(2016)殺虫速度の異なる近縁な2種のアスコウイルスの増殖速度の比較, 日本昆虫学会第76回大会・第60回日本応用動物昆虫学会大会合同大会 大阪府立大学(大阪府堺市), 3月27日.

Azam Asadullah, Kunimi Yasuhisa, Inoue Maki, Nakai Madoka (2016) Chelonus inanitus accelerated the Spodoptera litura granulovirus replication, 日本昆虫学会第76回大会・第60回日本応用動物昆虫学会大会合同大会 大阪府立大学(大阪府堺市), 3月27日.

小池周佑, 高務淳, 国見裕久, 井上真紀, 仲井まどか (2016) チャノコカクモンハマキ昆虫ボックスウイルスにおけるゲノム外DNA断片の複製と遺伝子発現, 日本昆虫学会第76回大会・第60回日本応用動物昆虫学会大会合同大会 大阪府立大学(大阪府堺市), 3月27日.

〔図書〕(計2件)

Nakai, M., Lacey, L. (2016) Microbial control of Mite and Insect Pests in Tea and Coffee. In: Microbial Control of Insect and Mite Pests From Theory to Practice, L. Lacey, ed., CAB International, Wallingford, Oxon. pp.223-236. ISBN 978-1 84593-478-1.

後藤千枝・仲井まどか (2016) 土着天敵-昆虫病原“天敵活用大事典”(農文協), 農山漁村文化協会. Pp283-287. ISBN-10: 4540151592.

〔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

<http://www.tuat.ac.jp/~insect/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲井まどか(NAKAI MADOKA)
東京農工大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号: 60302907

(2) 研究分担者

高務淳(TAKATSUKA JUN)
国立研究開発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: 60302907