

令和元年6月21日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08105

研究課題名(和文) ウイルス媒介性昆虫のウイルス増殖機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of plant viruses transmission in agricultural pests.

研究代表者

村上 理都子 (MURAKAMI, Ritsuko)

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・上級研究員

研究者番号：10414947

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)：農業現場では昆虫媒介性のウイルス病による農作物の被害が大問題となっているが、これまで決め手となる防除手段はなく新規の防除技術の開発が求められているのが現状である。このことから本研究ではイネの害虫であるトビイロウンカと本害虫が媒介するRice ragged stunt virus (RGSV)を対象に研究を行い、RRSV感染に反応してウンカ体内で発現量が增大する遺伝子を2種見出した。そして、これらのウンカ由来の2遺伝子のコードするタンパク質のなかで機能を有する部位を検出し、これらの機能を有する部位とRGSV由来のタンパク質の一部が相互作用することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

農業現場では微小害虫が媒介する植物ウイルスによる被害が問題となっている。媒介虫によるウイルスの媒介効率は極めて高いことから、現場における媒介虫の密度をかなり低い状況で保持しなくてはならない。一方で、殺虫剤の過剰散布により害虫の農薬に対する耐性も問題となっており、新たな植物ウイルスの媒介を阻止する方法が望まれている。本研究では虫の体内で増殖される植物ウイルスを阻止することを目的に研究を行い、植物ウイルスの増殖に関与する可能性のある虫側のタンパク質を探索した。

研究成果の概要(英文)：In agriculture, there are problems that the development of agroecosystems increase opportunities of plant virus transmissions by agricultural pest vectors. Therefore, control methods of transmission of plant viruses by agricultural vectors are requested. The brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) acquire Rice ragged stunt virus (RGSV) from rice infected with RGSV, and RGSV proliferates in body of *N. lugens*. Then *N. lugens* infected with RGSV inoculate with RGSV into healthy rice by sapping. In this study, interactions between two proteins from *N. lugens* and proteins from RGSV were examined as transmission models of agricultural pest vector and plant virus. As results, it is suggested that two proteins from *N. lugens* and several proteins from RGSV might interact.

研究分野：応用昆虫

キーワード：トビイロウンカ Rice ragged stunt virus

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

農業の現場では微小害虫が媒介する植物ウイルス病が問題となっており、植物ウイルスによる農作物の被害拡大が深刻な問題となっている。しかし、農作物のウイルス病に対する抗ウイルス農薬は現存しない。現在のところ、弱毒ウイルスをワクチンとして利用したウイルス病の防除が行われているが、利用できるウイルスや作物は限られている。また、ウイルス病抵抗性品種の導入も行われているが、これも対象となるウイルス病や作物が限定されている状況である。こうしたことから、殺虫剤によるウイルス媒介昆虫の駆除が作物ウイルス病の被害を食い止める主な手段となっている。しかし、植物病原性ウイルス媒介昆虫のほとんどを占める吸汁性の昆虫の作物へのウイルス感染効率は非常に高いことから、圃場で発生する害虫の密度が極めて低くてもウイルス病を発症・蔓延させる危険性が非常に高い。そのため現場ではかなりの量の殺虫剤散布が行われることがあり、その結果、殺虫剤が効かない害虫の出現・拡大・蔓延が深刻化している。こうした背景から媒介昆虫の段階においてウイルス伝搬を阻止する根本的な手法の開発が望まれている。このことから媒介昆虫の体内で植物ウイルスの増殖を阻止する手法の開発を目的に本研究を行うことにした。

2. 研究の目的

現在の虫媒性植物ウイルスに対する対抗技術として、宿主作物を標的とした抗ウイルス剤やワクチンの開発が考えられるが、抗ウイルス剤は宿主作物への副作用や人体への影響が懸念される。ワクチンは大量増殖や安定供給のための製剤技術等の課題があることからこれらの開発は困難度が高い。抵抗性育種の作成も重要な対抗技術であるが、多犯性の媒介昆虫やウイルスに対し、各栽培品種を網羅して抵抗性を付与することは困難である。一方、媒介昆虫で作用する抗ウイルス剤が開発できれば、昆虫を標的とするため作物への副作用を考慮する必要がなく、減農薬も期待できる。また殺虫剤を施用する現在の栽培体系に組み込みやすいことから、農業現場での使用に向けてのハードルは低いと考えられる。本研究で得られる知見に基づき、媒介昆虫の段階でウイルス感染・増殖・媒介を阻害することで宿主作物のウイルス病害を防ぐ画期的な抗ウイルス剤の開発への道が拓けると考えられる。

本研究で用いるトビイロウンカはイネを吸汁する害虫であり、Rice ragged stunt virus (RRSV) はイネに病害を引き起こす植物ウイルスである。トビイロウンカはRRSVに罹病したイネを吸汁することでRRSVを獲得する。獲得されたRRSVはウンカの体内で増殖し、ウンカがイネを吸汁することによってイネの篩管内に放出される。このようにしてトビイロウンカはRRSVを媒介する。トビイロウンカは微小害虫の中でも体サイズが大きく、大量飼育が容易であり、遺伝子情報が整っていることから、遺伝子の機能解析が比較的容易である。このことから、本研究ではトビイロウンカとRRSVをモデルに媒介虫体内でウイルスを阻止することを目的にRRSVと相互作用するウンカ側の遺伝子の探索を行った。

3. 研究の方法

ウイルスの感染・増殖に関わるタンパク質をコードする遺伝子はウイルス感染によってその発現量が変動する可能性が高いと考えられることから、まず体内でRRSVが高い効率で増殖されたトビイロウンカ個体とRRSVの増殖程度が低い個体の作出を行った。そして、ウイルスが効率よく増殖するとされる唾液腺を含む頭部をこれらから個体別に回収してRNAを抽出し、RNA-seq解析に供試した。RRSVの増殖程度が高い個体と少ない個体から得られたRNA-seqデータを用いてRRSVの感染によって発現量が変動する宿主側の遺伝子候補を抽出するために網羅的トランスクリプトーム解析を行い、発現量に差異が見られた遺伝子を抽出した。その中から他の昆虫や生物でウイルスの増殖に関与するとされる機能を有すると報告された遺伝子を選抜した。その後、選抜された遺伝子の定量RT-PCR解析を行い、トビイロウンカ個体内での発現量を定量した。これらの手法によってRRSVの増殖程度に依存して発現量が変動する遺伝子の同定を試みた結果得られた遺伝子について、全塩基配列を解読し、類似したタンパク質との配列を比較することによりドメイン部位を確定し、この部位と相互作用するRRSV由来タンパク質の探索をYeast-two-hybrid法で行うことによって得られたウンカ側の遺伝子とRRSVが相互作用するかどうかについて検討した。

4. 研究成果

(1) RRSVの増殖量に差異のあるトビイロウンカ個体の作出

トビイロウンカ2令幼虫をRRSVに罹病したイネと罹病していないイネに接種して、温室で飼育し、成虫になった時点で回収した。回収したウンカのメス個体から1頭ずつ頭部を回収して

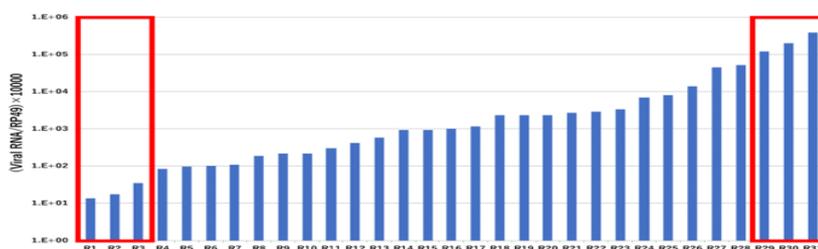


図1. トビイロウンカ個体ごとにおけるRRSVの定量

RNAを抽出し、その一部を定量PCR法にかけてRRSVの定量に用いた(図1)。その結果、得られたウンカは31個体あり、個体ごとにRRSVの増殖量に違いがみられ、RRSVの多い個体と少ない個体では10,000倍以上の増殖の差が認められた。

(2) ウイルスの増殖量と相関のある遺伝子の選抜

先の実験において最もRRSV量が多かった3個体(高保毒虫)と最も少なかった3個体(低保毒虫)について個体別にHi-seq 2,000でトランスクリプトーム解析を行った。その結果、高保毒虫3個体において全ての低保毒虫3個体よりも発現量が2倍以上ある遺伝子が250遺伝子あった(図2)。その中でCDS配列を有しているものは40遺伝子、BLAST解析で何らかの遺伝子が一致したものが36遺伝子あり、その中で何らかの機能を有する配列をもっていたのは24遺伝子だった。これらの中にはRASドメイン含有タンパク質、カルシウムチャンネルサブユニット、Argonaute-3等のタンパク質が含まれていた。一方で、高保毒虫での発現量が低保毒虫での発現量の半分以下だった遺伝子は169あった(図3)。この中にはRAS GAPドメイン含有タンパク質、カルシウムチャンネルサブユニットタンパク質、Argonaute-3等が含まれていた。このうち、CDS配列を有していたのは60遺伝子、BLAST解析で一致する遺伝子があったものは51遺伝子だった。また、何らかの機能を有する配列をもっていたのは38遺伝子だった。これらの中にはZinc finger protein、Down syndrome cell adhesion molecule-like protein、セルピン等の遺伝子がみられた。

この中から、これまでにウイルスの増殖に関連があると報告のあった遺伝子について高保毒虫と低保毒虫の結果を比較し、RRSVの増殖と比例して発現量が増加した遺伝子を選抜した。そして、高保毒虫、低保毒虫での選抜した遺伝子の発現量の定量を、定量RT-PCR法で行った結果、2種類のタンパク質においてRRSVの増殖量と発現量が比例して多くなることがわかった。それぞれ、DEAD-box RNAヘリカーゼファミリーに属するDEAD60タンパク質(DDX60)及び α 2マクログロブリンファミリーに属するチオエステル基を有するタンパク質(TEP2)であった(図4)。

(3) 得られた遺伝子の他の生物との比較

トビイロウンカ由来のDDX60とTEP2の配列についてはトランスクリプトーム解析により、部分配列は得られていたことから、これら部分配列をもとに、5'-RACE法や3'-RACE法を用いて全塩基配列の解析を試みた。その結果、DDX60については5,238 bp.あり、1,746のアミノ酸がコードされていることがわかった。この遺伝子については核酸配列でのBLAST検索ではhitしてくる遺伝子はみられなかったが、タンパク質の配列による検索においてネバダシロアリ由来のDDX60-like proteinとIdentitiesが32%、Positivesが50%でhitした。

一方、TEP2については4,422 bp.、1,474アミノ酸がコードされていることがわかった。この遺伝子はヒメトビイロウンカのHypothetical protein LSTR_LSTR001659タンパク質と高い相同性を有しており、Identitiesは84%、Positivesは92%であった。

(4) ドメイン配列の探索

トビイロウンカ由来のDDX60とTEP2について、それぞれのタンパク質の機能を有する配列を他の生物由来の各タンパク質と配列を比較することにより類推した。その結果、DDX60は2箇所のSuper familyの配列を有しており、それぞれDEAD領域(DEAD)とDob 10領域(Dob 10)が認められた。トビイロウンカのDEADとDob 10の大きさはそれぞれ、1899bp.、846 bp.であった。ウンカのDEADにはATP binding siteとPutative Mg^{2+} binding siteがそれぞれ1箇所ずつ含まれていた。

一方、TEP2も2箇所のSuper familyの配列を有しており、ISPPREN_2_like superfamily領域(A2M_comp)とA2M_recep領域(A2M_recep)があった。これらはそれぞれ、2610 bp.、783 bp.の長さであった。

(5) 相互作用

トビイロウンカ由来のDDX60とTEP2がRRSVの増殖に関与しているのであれば、DDX60とTEP2とRRSV由来のタンパク質について相互作用している可能性がある。このことから、これらのタ

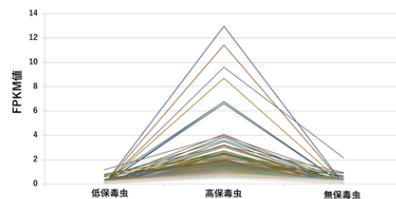


図2. 高保毒虫での発現量が低保毒虫及び無保毒虫の2倍以上ある遺伝子

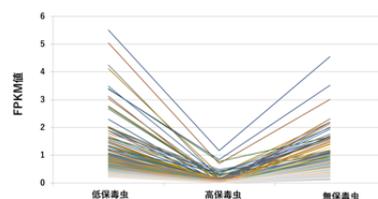


図3. 高保毒虫での発現量が低保毒虫及び無保毒虫の1/2倍以下の遺伝子

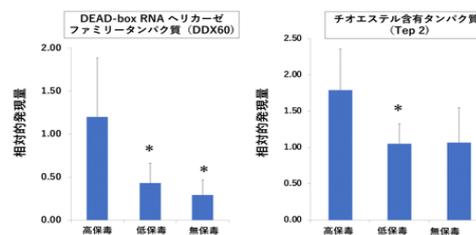


図4. RRSV増殖量と比例して発現量が増加したトビイロウンカの遺伝子

ンパク質について Yeast-two-hybrid (Y2H)法を用いてそれぞれのタンパク質と相互作用する RRSV 由来のタンパク質の探索を行った。

RRSV は 2 本鎖の RNA ウイルスであり、10 本のセグメントを有する。それぞれ、多少順序がちがうものがあるものの、基本的に塩基配列の大きい順にセグメント 1 からセグメント 10 までである。セグメント 1 は約 3.9 kbp. あり、コードされているタンパク質は約 138 kDa であり、ウイルス粒子の突起の基部を構成することがわかっている。セグメント 2 は約 3.8 kbp. あり、コードしているタンパク質は約 133 kDa の Inner core capsid に局在するタンパク質である。セグメント 3 は約 3.7 kbp. あり、Major core capsid に局在する約 131 kDa のタンパク質をコードしている。セグメント 4 は約 3.8 kbp. あり、約 141 kDa の RNA dependent RNA polymerase (RdRp) と約 36.9 kDa の機能不明なタンパク質の 2 つのタンパク質をコードしていることがわかっている。セグメント 5 は約 2.7 kbp. あり、約 91.4 kDa の Capping enzyme 機能を有するタンパク質をコードしている。セグメント 6 とセグメント 7 のタンパク質の機能は不明とされており、局在箇所も不明である。それぞれ、約 2.2 kbp. と 1.9 kbp. の大きさであり、それぞれ約 65.6 kDa と 68kDa のタンパク質をコードしている。セグメント 8 は約 1.8 kbp. あり、これには約 26.3 kDa のタンパク質と約 47 kDa の Major capsid に局在する Precursor protease 機能を有するタンパク質がコードされている。セグメント 9 は約 1.1 kbp. あり、ウイルス媒介に関与する約 38.6 kDa のタンパク質をコードしており、これもウイルス粒子の突起の先端部分を構成している。セグメント 10 は 1.2 kbp. あり、約 32.3 kDa の大きさの機能も局在場所も不明なタンパク質をコードしている。このようにそれぞれのセグメントは様々な機能を有するタンパク質をコードしており、1 つのセグメントで複数のタンパク質をコードしているものもある。Y2H 法の性質上、40 kDa 以上のタンパク質の解析は困難と考えられたことから、分子量が大きなタンパク質については立体構造に影響しないと考えられる部位で 40 kDa 未満の分子量になるよう設計した。すなわち、RRSV の核酸配列から各タンパク質の二次構造を予測し、 α -シート、 β -シートを形成しない部分を検索した。セグメント 1 がコードするタンパク質については 1 aa. - 300 aa.、301 aa. - 610 aa.、611 aa. - 920 aa.、920 aa. - 1237 aa. の 4 つの断片にして Y2H 用のベクターである pGADT7 (Prey) に分割して組み込んだ。セグメント 2 がコードするタンパク質については 1 aa. - 330 aa.、331 aa. - 650 aa.、651 aa. - 1192 aa. の 3 つの断片とした。セグメント 3 がコードするタンパク質は 1 aa. - 550 aa.、551 aa. - 940 aa.、941 aa. - 1173 aa. の 3 つの断片とした。セグメント 4 は 2 つのタンパク質をコードしており、RdRp は 1,255 aa. とサイズが大きいことから、1 aa. - 229 aa.、300 aa. - 600 aa.、661 aa. - 909 aa.、910 aa. - 1255 aa. の 4 つに分けた。もう一つの機能不明なタンパク質についてはタンパク質のサイズにして 36.9 kDa しかないので、そのままベクターに組み込んだ。セグメント 5 がコードするタンパク質は 1 aa. - 259 aa.、260 aa. - 538 aa.、539 aa. - 808 aa. の 3 つの断片とした。セグメント 6 は 1 aa. - 299 aa. と 300 aa. - 592 aa.、セグメント 7 は 1 aa. - 280 aa. と 281 aa. 608 aa.、セグメント 8 は 1aa. - 299 aa. と 300 aa. - 596 aa. と分けて組み込んだ。セグメント 9 とセグメント 10 のタンパク質についてはそれぞれ、サイズが 40 kDa 以下であることから、そのままの大きさにベクターに組み込んだ。そして、RRSV 由来の各タンパク質をプラスミドを Prey 用の酵母である Y187 株に導入した。

一方、トピロウシカ側の遺伝子である DDX60 と TEP2 の配列のうち、先の(4)の項で探索して得られた配列を Y2H 用のベクター pGBKT7 (Bait) に組み込んだ。すなわち、DDX60 の DEAD 配列と Dob 10 配列、TEP2 の A2M_comp 配列と A2M_recep である。これらのドメイン配列と推定される配列を Bait 用の酵母である Y2HGold 株に導入した。そして、先の RRSV 由来のタンパク質を組み込んだ Prey プラスミドを導入した Y187 株と Mating させて、形成されるコロニーの色を判別することにより、DDX60 と TEP2 の各機能を有する配列と相互作用する RRSV 由来のタンパク質を探索した。Prey 酵母と Bait 酵母を Mating させ、形成されるコロニーが青色を呈すればそれらの組み合わせは相互作用する可能性が高く、白色のコロニーが形成された場合はその可能性が低い仕組みとなっている。このことから、それぞれの酵母を Mating させて形成されるコロニーの色で判別した。

その結果、DDX60 の DEAD 配列を Y2HGold 株に組み込んだ bait 酵母は、RRSV のセグメント 1 の 1 aa. - 610 aa. と 920 aa. - 1237 aa. を組み込んだ Prey 酵母と mating させた結果、相互作用していることを示す青色のコロニーを形成した。また、セグメント 2 の 331 aa. - 1192 aa.、セグメント 4 の RdRp の 1 aa. - 600 aa. と機能が不明な 36.9 kDa のタンパク質の配列を組み込んだ Prey 酵母と Mating させても形成されたコロニーは青色を呈した。さらにセグメント 5 の 1 aa. - 259 aa. と 539 aa. - 808 aa.、セグメント 6 の 300 aa. - 592 aa. を組み込んだ Prey 酵母との Mating でも青色のコロニーが形成された。

DDX60 の Dob 10 配列を Bait 酵母に組み込んだものは、セグメント 1 の 1 aa. - 300 aa. と 920 aa. - 1237 aa.、セグメント 2 の 651 aa. - 1192 aa.、セグメント 5 の 1 aa. - 259 aa.、セグメント 6 の 300 aa. - 592 aa. の各部分配列を組み込んだ Prey 酵母と Mating したコロニーにおいて青色を呈した。

一方、TEP2 の A2M_comp 配列を Bait 酵母に組み込んだ場合、RRSV のセグメント 1 の 301 aa. - 610 aa. と 920 aa. - 1237 aa. の部分配列を組み込んだ Prey 酵母と Mating すると青い色のコロニーを形成した。セグメント 2 では 331 aa. - 1192 aa. の配列を組み込んだものについて同様のコロニーを形成した。セグメント 4 では RdRp の 1 aa. - 600 aa. の部分配列のものと同様に

明な 36.9 kDa のタンパク質の配列を組み込んだ Prey 酵母を Mating させても形成されたコロニーは青色を呈した。セグメント 5 では 1 aa. - 259 aa. と 539 aa. - 808 aa.、セグメント 6 では 300 aa. - 592 aa. の配列を組み込んだ Prey 酵母においても青いコロニーを形成した。

TEP2 の A2M_recep 配列を Bait 酵母に組み込んだ場合はセグメント 1 の 1 aa. - 610 aa. と 920 aa. - 1237 aa.、セグメント 2 の 331 aa. - 1192 aa. の配列を Prey 酵母に組み込んだコロニーにおいて青色のコロニーが形成された。さらにセグメント 4 では RdRp の 1 aa. - 600 aa. と 36.9 kDa の機能不明なタンパク質の配列を組み込んだ Prey 酵母においても青色のコロニーが形成された。また、セグメント 5 の 1 aa. - 259 aa. と 539 aa. - 808 aa.、セグメント 6 の 300 aa. - 592 aa. においても同様のコロニーが形成された。

以上の結果から、トビイロウンカの DDX60 と TEP2 のドメイン配列と RRSV が有する各タンパク質において部分配列ではあるが相互作用する可能性が示唆された。Y2H 法は偽陽性が出る可能性があることから、今後、別の方法においてもこれらについては検証する必要があるが、本研究によってトビイロウンカの DDX60 と TEP2 は RRSV と作用する可能性があることを示唆できることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 3 件)

- ① 村上理都子、勾坂 晶、田中博光、渡部賢司、Rice ragged stunt virus がコードするタンパク質と相互作用するトビイロウンカ由来タンパク質の探索 平成 31 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会、2019. 03. 23、東京農工大学 (東京都)
- ② 村上理都子、勾坂 晶、上樂明也、渡部賢司、田中博光、トビイロウンカにおける *Rice ragged stunt virus* 感染応答性遺伝子の探索・同定、平成 30 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会、2018. 03. 20、名古屋大学 (愛知県)
- ③ 村上理都子、勾坂 晶、上樂明也、田中博光、Rice ragged stunt virus を保毒したトビイロウンカ体内における遺伝子発現解析、2017. 03. 28、東京農工大学 (東京都)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者 該当なし

(2) 研究協力者 該当なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。