

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22308

研究課題名(和文)ピコルナ様ウイルスがミカンハダニの食性と繁殖に及ぼす影響とその制御要因の解明

研究課題名(英文) Effects of picorna-like virus on the feeding habits and reproduction of the citrus red mite and its control factor

研究代表者

刑部 正博(Osakabe, Masahiro)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：50346037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：ミカンハダニから検出された一本鎖のRNAウイルスの塩基配列を決定し、その増減に対するハダニの寄主植物並びに紫外線の影響を調べた。塩基配列からこのウイルスは中国で報告されたピコルナ様ウイルスの一系統(Hubei picorna-like virus 79 strain)と同一もしくは近縁種であることが分かった。また、このウイルスはハダニがカンキツを摂食することによりハダニ体内で増殖し、一方紫外線UV-Bの照射により顕著に減少することが分かった。しかし、ウイルスの増加によるハダニの生存・繁殖へのコストは検出されず、共生的であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昆虫では30種以上のピコルナ様ウイルスが報告されているが、生態的役割は多くが未解明である。一方、毒性を持つ植物と植食者の関係は、植物の化学的防御と植食者の適応を通じた共進化の文脈で考えられる。しかし、昆虫ウイルスの中には宿主の行動を制御するものも知られており、共生的ウイルスが宿主の食性に影響することが分かれば食性分化の新たなメカニズムが提案できる。また、ウイルスが宿主の繁殖に影響を及ぼし、太陽光紫外線がその増殖の抑制を通じて宿主の繁殖を助ける場合、紫外線の新たな生態的役割を提示できる。したがって、今後さらなる研究の進展が望まれる。

研究成果の概要(英文)：Genome sequence of a single strand RNA virus detected from the citrus red mite (*Panonychus citri*) was determined, and the effects of host plant of mite and ultraviolet radiation on increase / decrease of the virus were tested. The genome sequencing indicates that this virus is the same species as or closely related to Hubei picorna-like virus 79 strain. This virus increased inside the spider mite when the mites fed on citrus leaves while it was significantly decreased by UV-B irradiation on the mites. However, cost for survival and reproduction of spider mites due to increase of the virus was not detected, so that this virus was likely symbiotic.

研究分野：応用昆虫学

キーワード：ピコルナ様ウイルス ミカンハダニ 紫外線 寄主植物

1. 研究開始当初の背景

Panonychus 属の多くは果樹害虫であるが、カンキツで発育するのはミカンハダニだけである。カンキツで発育した個体ではエステラーゼ活性が高く(刑部 1984, 応動昆 28: 1-4) 一方シトクロム P450 を阻害すると発育できなくなる (Takeyama et al. 2006, Appl. Entomol. Zool. 41: 487-491) ことから解毒能力の重要性が示唆される。一方、カンキツからナシへの寄主転換により 2 世代に渡ってエピジェネティックにエステラーゼ活性が低下する(図 1)。解毒酵素の誘導は、新たな寄主植物に侵入した個体の生存のために速やかに起こるのが通常である。しかし、ナシからカンキツへ移動した場合にもエピジェネティックな変化が認められ、そのメカニズムは不明である。

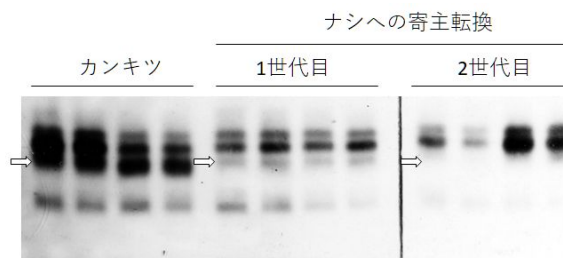


図1 カンキツからナシへの寄主転換によりエピジェネティックに活性が減少するエステラーゼ(矢印)のアガロースゲル電気泳動像。(刑部1984, 応動昆28: 1-4より改変)

そこで、カンキツとナシで飼育したミカンハダニの cDNA 断片のサブトラクションを行い、カンキツ特異的に発現する全長約 10 kb の遺伝子を得て、5.7 kb の塩基配列を決定した。しかし、得られた配列は Hubei picorna-like virus 79 (Shi et al. 2016, Nature 540: 539-543) と相動性の高いピコルナ様ウイルスの部分配列であった。ピコルナウイルスは動植物に広く分布する正二十面体のカプシドに包まれた一本鎖 RNA ウイルスである。ミカンハダニでも直径 30 nm と 37 nm の正二十面体の共生的ウイルス顆粒が報告されており、それぞれピコルナおよびカリシウイルスの直径と符合する (Reed and Desjardins 1978, J. Inver. Pathol. 31: 188-193)。

サブトラクションにより得られたウイルスの増減とミカンハダニの生理的变化を直接関連付けるには飛躍がある。しかし、ウイルス粒子の増加に 2 世代程度を要する (Reed and Desjardins 1978) ことから時間的な共通性が見られる。そこで、ウイルスによる宿主への影響とウイルスの増減要因の両面からこの課題に挑戦したいと考えた。

ナミハダニとカブリダニでは同様のウイルス顆粒が中腸や上皮細胞の細胞質で確認されており (Poinar and Poinar 1998, Annu. Rev. Entomol. 43: 449-469) ダニ体内で増殖していると考えられる。そこで申請者は、「ピコルナ様ウイルスがミカンハダニのカンキツ上での発育を促進する」との仮説を立てた。その根底には「多くのハダニが発育できないカンキツ葉上でミカンハダニが発育できるのはなぜか?」という長年の疑問がある。

Reed and Desjardins (1978) によれば、温室栽培のレモンで飼育した個体でのみウイルス顆粒が検出され、野外の個体では検出されない。これは前述の仮説と相反するが、野外では太陽光紫外線によってウイルスの増殖が抑制されている可能性がある。野外採集のミカンハダニでは室内飼育系統に比べて産卵数が多い場合があり、また多くのハダニが発育可能なナシ葉上ではカンキツに比べて産卵数が多い。産卵数の変化は栄養条件の違いと安易に考えがちである。しかし、ピコルナ様ウイルスの増殖がミカンハダニに負荷を与えている可能性があり、植物成分や紫外線がウイルス密度のバランスを調整する役割を果たしているかも知れない。そこで、「植物成分や紫外線によってピコルナ様ウイルスが抑制されることによりミカンハダニへの負荷が軽減される」というもう一つの仮説を設定した。

昆虫では 30 種以上のピコルナ様ウイルスが報告されている。宿主に病徴を発症するものもあるが共生的な種も多く、生態的役割は多くが未解明である。一方、毒性を持つ植物と植食者の関係は、植物の化学的防御と植食者の適応を通じた共進化の文脈で考えられる。しかし、昆虫ウイルスの中には宿主の行動を制御するものも知られており、共生的ウイルスが寄主の食性に影響することが分かれば食性分化の新たなメカニズムが提案できる。また、ウイルスが宿主の繁殖に影響を及ぼし、太陽光紫外線がその増殖の抑制を通じて宿主の繁殖を助ける場合、紫外線の新たな生態的役割を提示できる。

Panonychus 属は食性分化に加え、紫外線耐性の獲得により競争や捕食者を避けており (Osakabe et al. 2006, Oecologia 150: 496-505; Fukaya et al. 2013, Photochem. Photobiol. 89: 424-431) 本課題の研究に適した材料である。

2. 研究の目的

「ピコルナ様ウイルスがミカンハダニのカンキツ上での発育を促進する」および「植物成分や紫外線によってピコルナ様ウイルスが抑制されることによりミカンハダニへの負荷が軽減される」との相反する仮説を検証するため、本研究では以下の 4 つの作業仮説を設定し、それらの評

価を目的として研究を進めた。

- 1) ミカンハダニのピコルナ様ウイルスは野外個体群に広く存在する
- 2) カンキツ成分がウイルスを増加させ、ナシ成分が減少させる
- 3) 紫外線によりハダニ内のウイルス増殖が抑制される
- 4) ウイルスの増殖はハダニの増殖のコストになる

これらにより、ピコルナ様ウイルスの動態に対する物理的・生物的要因の影響と、それらの動態が宿主であるハダニの適応度に及ぼす影響の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 塩基配列

始めに、予め解析されていた部分配列 5.7 kb を基に、検出されたピコルナ様ウイルスの全ゲノムの解析を行った。実験では、長崎県南高来郡口之津町のカンキツ園から採集したミカンハダニから全 RNA を抽出して 5'および 3'RACE を行い、サンガー法により塩基配列を分析した。5'RACE では特異的プライマーを順次設計しながら分析を進め、最後に全長のほぼ 75% に相当する 6,707 塩基の断片を PCR により増幅し、増幅産物の塩基配列を決定することで、単一ウイルスの配列であることを確認した。

得られた塩基配列の protein 1 と protein 2 領域（研究成果参照）のそれぞれについて、リアルタイム PCR 用のプライマーを設計して、ハダニの寄主植物および紫外線がウイルス量に及ぼす影響の評価に用いた。ウイルス量の評価の際には、ミカンハダニの 2 種類の housekeeping gene（GAPDH および ELF1A）を内部リファレンスとして用いた。

(2) ウイルス量に対する寄主植物の影響

ハダニの寄主植物としてのカンキツおよびナシがウイルス量に及ぼす影響について調査するため、インゲンマメ葉で飼育したミカンハダニ雌成虫にカンキツ、ナシおよびインゲンマメ葉上で産卵させ、25°C（16L:8D）で発育した 1 世代目および 2 世代目の雌成虫を採集し、total RNA を抽出した。その後、Oligo(dT)₂₀ プライマーを用いて cDNA を合成し、前述の protein 1 と protein 2 用のプライマーを用いて、リアルタイム PCR による定量 PCR を行った。得られたウイルスの protein 1 と protein 2 の Cq 値から前述の housekeeping gene の Cq 値を用いて ΔCq 値を算出し、さらにインゲンマメでの ΔCq 値をキャリブレーションとして倍率変化（log₂ fold change; Log₂FC）を算出した（ $\Delta\Delta Cq$ 法）。

(3) ウイルス量に対する紫外線の影響

UV-A と UV-B の同時照射

25°C（14L:10D）の恒温器内に UV-A および UV-B ランプを設置し、明期（9:00～15:00）に毎日 UV ランプを点灯した。この条件下で UV 透過フィルム（UV+）および UV カットフィルム（UV-）の下で、ミカンハダニ雌成虫にカンキツ葉片上で産卵させた（図 2）。その卵を同じ条件下で成虫まで飼育して total RNA を抽出し、(2)と同様の方法でウイルス量を計測した。

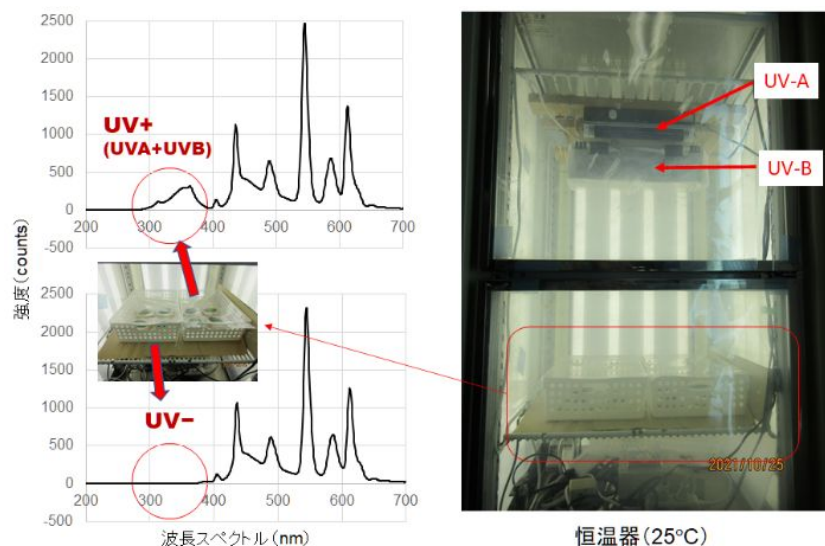


図2 紫外線（UVA+UVB）がミカンハダニのピコルナ様ウイルス量に及ぼす影響

UV-A 照射

と同じ恒温器内で同様にミカンハダニに産卵させて飼育し、発育した雌成虫から total RNA を抽出してウイルス量を定量した。このとき、ミカンハダニを飼育するカンキツ葉片は UVB カットフィルム（UVA は透過；UVA+/UVB-）と UV カットフィルム（UVA-/UVB-； の UV- と同じ）の下に置いた（図 3）。

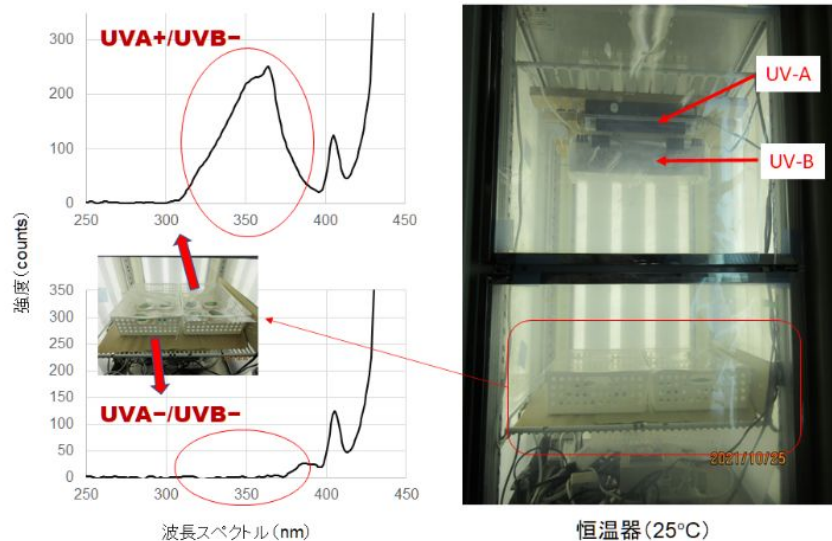


図3 UVAがミカンハダニのピコルナ様ウイルス量に及ぼす影響

(4) 生物的・非生物的環境がハダニのパフォーマンスに及ぼす影響

寄主植物の影響

カンキツ、ナシ、インゲンマメ葉片上で3世代以上飼育したミカンハダニの未交尾雌成虫の脱皮後日数と生存率、産卵数を25°C (16 L:8 D)の恒温室内で調査した(8月下旬~9月上旬)。

紫外線の影響

(3) と同一の条件(25°C, 14 L:10 D; UV+およびUV-)でカンキツ葉片上でのミカンハダニの未交尾雌成虫を飼育し、生存率と産卵数を調査した(11月末~12月中下旬)。

(5) カベアナタカラダニの色素成分

ミカンハダニは太陽光紫外線に暴露される葉の上面を利用する数少ないハダニである。このため、抗酸化活性が最も高いアスタキサンチンなどのケトカロテノイドを恒常的に蓄えることにより、太陽光による紫外線の生物影響や輻射熱から生体を防御していると考えられ、それが体内のウイルス量に影響を与える可能性がある。

カベアナタカラダニは太陽光紫外線の影響が強い4月下旬から5月中下旬にかけてコンクリート表面などに赤色の成虫が大量発生する。このため、ミカンハダニよりさらに太陽光紫外線の影響を受け易いと考えられる。また、その体色からカロテノイドの蓄積が推定される。

そこで、ミカンハダニにおけるカロテノイドの生体防御の可能性を補完する目的で、カベアナタカラダニの色素を抽出し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)における保持時間と波長スペクトルから同定を試みた。なお、ケトカロテノイドの多くはエステル体として蓄積されている可能性が高い。そのため、HPLC分析に先立って、抽出した色素を *Pseudomonas* 属菌由来のコレストロールエステラーゼにより加水分解した。

4. 研究成果

(1) 塩基配列

サンガー法により、最終的に8,977塩基のウイルスゲノム配列を得た。このRNA配列(全配列)のHubei picorna-like virus 79 strain WHCCII12350(KX884275.1; 9,186塩基; Shi et al. 2016, Nature 540: 539-543)との一致率は89.08%であった。また、blast X(NCBI)により二つのORF(protein 1とprotein 2)が検出され、これらのアミノ酸配列の一致率はprotein 1(YP_009337415.1; 2,054残基)とprotein 2(YP_009337416.1; 845残基)でそれぞれ96.4%および96.1%であった。また、protein 1にはRNAヘリカーゼとRNA依存性RNAポリメラーゼ(RdRP)が、protein 2ではカプシド蛋白質のドメインが検出された。これらの結果から、ミカンハダニから検出されたウイルスはHubei picorna-like virus 79 strainと同一もしくは近縁なピコルナ様ウイルスと考えられた。

(2) ウイルス量に対する寄主植物の影響

ミカンハダニの寄主植物を変化させた後、1世代目では、カンキツとナシで発育した雌成虫におけるprotein 1の発現量は、それぞれインゲンマメの4.4および0.3倍(カンキツ/ナシ=14.7倍) protein 2ではそれぞれ2.6および0.8倍(3.3倍)となった。2世代目では、カンキツとナシで発育した雌成虫におけるprotein 1の発現量は、それぞれインゲンマメの11.6および1.4倍(カンキツ/ナシ=8.3倍) protein 2ではそれぞれ10.6および2.9倍(3.7倍)となった。これらの結果から、ナシ食でインゲンマメ食に比べてウイルスが減少したとは言い難い一方で、カンキツ食ではミカンハダニ体内のウイルス量が増加することが示された。

(3) ウイルス量に対する紫外線の影響

UV-AとUV-Bの同時照射

UV+におけるprotein 1およびprotein 2のUV-に対するLog2FCはそれぞれ -11.3 ± 4.4 (平均 \pm SE; GAPDH -11.4 ± 4.4 , ELF1A -11.1 ± 4.3)および -9.9 ± 3.6 (GAPDH -10.0 ± 3.6 , ELF1A $-9.8 \pm$

3.5)であった。このことから、UV-A と UV-B の同時照射により、ウイルス量が 1/1000 以下に減少したことが示唆された。

UV-A 照射

UV-A+における protein 1 および protein 2 の UV-に対する Log2FC はそれぞれ -0.7 ± 1.9 (平均 \pm SE; GAPDH -0.9 ± 1.9 , ELF1A -0.5 ± 2.0) および -0.4 ± 1.8 (GAPDH -0.7 ± 1.7 , ELF1A -0.2 ± 1.9) であった。このことから、UV-A 単独照射では、ウイルス量が減少しないことが示唆された。したがって、で見られたウイルスの減少は UV-B の効果によるものと考えられる。

(4) 生物的・非生物的環境がハダニのパフォーマンスに及ぼす影響

寄主植物の影響

ナシやインゲンマメに比べて、カンキツ葉上では早く生存率が低下し、脱皮 10 日後には 36.4%、20 日後には 18.2% となった。ナシおよびインゲンマメにおける生存率は 10 日後でいずれも 100% であり、20 日後ではそれぞれ 52.9% および 30.8% であった。このため、20 日間の総産卵数 (死亡個体を含む) は、ナシとインゲンマメではそれぞれ 31.4 ± 3.9 および 30.2 ± 4.7 であったのに対して、カンキツで 15.4 ± 3.3 と少なかった。一方、生存個体の産卵数はカンキツ、ナシ、インゲンマメでそれぞれ 29.3 ± 3.3 、 33.9 ± 4.9 、 35.7 ± 9.5 となり、前述の総産卵数に比べてカンキツでの減少は小さい。したがって、寄主植物間の産卵数の違いにウイルスが関与したかは不明瞭である。

紫外線の影響

UV+でのカンキツ葉上での生存率は脱皮後 10 および 20 日後でそれぞれ 93.3% および 53.3% であり、UV- (それぞれ 95.2% および 57.1%) と大きな違いは無かった。20 日間の総産卵数についても、UV+と UV-でそれぞれ 41.1 ± 2.7 と 43.1 ± 2.9 であり、差がなかった。

(5) カベアナタカラダニの色素成分

カベアナタカラダニの色素は、主にケトカロテノイドであるアスタキサンチンと 3-ヒドロキシエキネノン (~90%) によって構成され、残りは僅かな β -カロテンとその他のカロテノイドによって構成されていた。

(6) 結論

以上の結果から、ミカンハダニのウイルスは Hubei picorna-like virus strain 79 と同一もしくは類似のピコルナ様ウイルスであり、ハダニの寄主植物がカンキツの時に増加し、UV-B 照射により減少する傾向があることが分かった。しかし、このピコルナ様ウイルスの増加によるミカンハダニのパフォーマンスへの影響 (コスト) は確認されなかった。このことから、共生的ウイルスであることが示唆され、「ピコルナ様ウイルスがミカンハダニのカンキツ上での発育を促進する」および「植物成分や紫外線によってピコルナ様ウイルスが抑制されることによりミカンハダニへの負荷が軽減される」のいずれの仮説に関しても支持される結果は得られなかった。

カベアナタカラダニの色素分析から、ミカンハダニが太陽光に暴露され易い葉の上面を利用する際に、蓄積されたケトカロテノイドが生体防御として働いている可能性が示唆された。したがって、ハダニの生体防御機構の効果が太陽光適応に影響し、その結果としての行動が体内のウイルスの動態に影響する可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 刑部正博
2. 発表標題 ミカンハダニから見つかったピコルナ様ウイルスについて
3. 学会等名 第28回日本ダニ学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 刑部正博
2. 発表標題 寄主植物がミカンハダニ体内のピコルナ様ウイルス量に及ぼす影響
3. 学会等名 第30回日本ダニ学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 刑部正博
2. 発表標題 ミカンハダニのピコルナ様ウイルスに対する寄主植物および紫外線の影響
3. 学会等名 第66回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------