

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06082

研究課題名(和文) ウイルスに随伴するモバイルエレメント：宿主-ウイルスの動態への影響解明

研究課題名(英文) Mobile elements associated with an entomopoxvirus

研究代表者

高務 淳 (Takatsuka, jun)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等

研究者番号：80399378

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫ボックスウイルスと昆虫ボックスウイルスに随伴するアディントウイルス様のエレメント(エレメントと称す)は、宿主であるチャノココクモンハマキ個体群において関連を持って分布していた。また、ほとんどの昆虫ボックスウイルスはエレメントを保持していると考えられた。モデルによる解析では、エレメントが昆虫ボックスウイルスに与える影響の種類によって、宿主個体群の大発生を冗長したり、抑制したりする可能性が示された。本研究の実験条件では、エレメントの存否による昆虫ボックスウイルスや宿主昆虫への影響は検出できなかった。今後、エレメントが昆虫ボックスウイルスに与える効果について、より詳細な検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アディントウイルスに由来するモバイルエレメントは、原生生物の大型DNAウイルスに随伴するものが知られており、ウイルス 原生生物の生態や進化に重要な働きがある。本研究のエレメントは、多細胞生物の大型DNAウイルスに随伴するアディントウイルス由来のモバイルエレメントとして特筆すべきものである。また、ボックスウイルス科から見つかった初のモバイルエレメントである。多細胞生物とウイルスの生態や進化にもアディントウイルス由来のモバイルエレメントが役割を持つ可能性を示すものである。昆虫の動態に与える影響を解明することにより、エレメントを活用した効率的な害虫制御法を開発できる可能性も秘めている。

研究成果の概要(英文)：Adxophyes honmai entomopoxvirus (AHEV) and adintovirus-like elements (elements) associated with AHEV showed non-random distribution in Adxophyes honmai populations; we could exclusively detect elements from the AHEV-infected insects. Almost all AHEV-infected insects harbor elements. Model simulations showed various outcomes regarding host-virus population dynamics depending on the effects of elements on entomopoxvirus; elements can increase host population density and cause frequent host outbreaks in case elements decrease virus yields, but regulate host population at low density in some other scenarios. Presence/absence of elements in an AHEV strain did not affect the virus virulence, time to death of the host insects, and weight at death when bioassays were carried out against neonate *A. honmai*. Further detailed examinations of the effects of elements on entomopoxvirus biology must be done to estimate effects of elements on host-virus population dynamics.

研究分野：昆虫病理学

キーワード：ウイルス 昆虫ボックスウイルス モバイルエレメント

### 1. 研究開始当初の背景

ウイルスやトランスポゾン等のモバイルエレメントは、生物の多様性や進化・生態に大きな役割を持っていると考えられている。モバイルエレメントであるウイルスに随伴もしくはウイルスゲノムに内在するモバイルエレメントも知られており、これらもまたウイルスの進化や生態に役割を持っていると考えられている。生物の多様性創出、進化・生態 に関して言えば、モバイルエレメントは、生物そのものとかかわることによる直接的な効果および、ウイルスを通じた間接的な効果を持っていると言える。

ポリントンと呼ばれる DNA トランスポゾンは、広く生物のゲノムに内在していることが知られている。ポリントンは、ウイルスの証であるカプシドを持っていることから、国際ウイルス命名委員会の定義ではウイルスであり、最近、アディントウイルスと命名された。ヴィロファージ、ポリントン様ウイルス、トランスポバイロンは、アディントウイルスから派生したモバイルエレメントであり、原生生物を宿主とする大型 DNA ウィルスに随伴している(図1)。とくに、ヴィロファージは、DNA ウィルスの複製を著しく妨げる効果がある。そのため、DNA ウィルスの宿主である原生生物が DNA ウィルスに感染した場合の生存確率を高める働きがある。個体群レベルでは、ヴィロファージの存在は、原生生物の密度を高め、原生生物の大発生を誘発することが理論的に導かれている。

我々は、昆虫のウイルスである昆虫ポックスウイルスの複数種からアディントウイルス様のエレメント(以下、エレメントと称す)を発見している(図1)。これらエレメントは、多細胞生物のウイルスから見つかった特異希なアディントウイルス由来のエレメントであると同時に、ポックスウイルス科のウイルスから見つかった初のモバイルエレメントである。これらは、アディントウイルスと分類上は分けることができない。しかし、アディントウイルスは生物のゲノムに内在し、著しく複製することがないのに対し、本エレメントは昆虫ポックスウイルスのゲノムとは独立に存在している。また、昆虫ポックスウイルスの宿主昆虫のゲノムからも検出できない。さらに、昆虫ポックスウイルスとともに著しく複製する。これらの点で、アディントウイルスとは大きな相違点がある(挑戦的研究 課題番号: 17K19432 代表者 高務淳 期間: 2017~2018)。

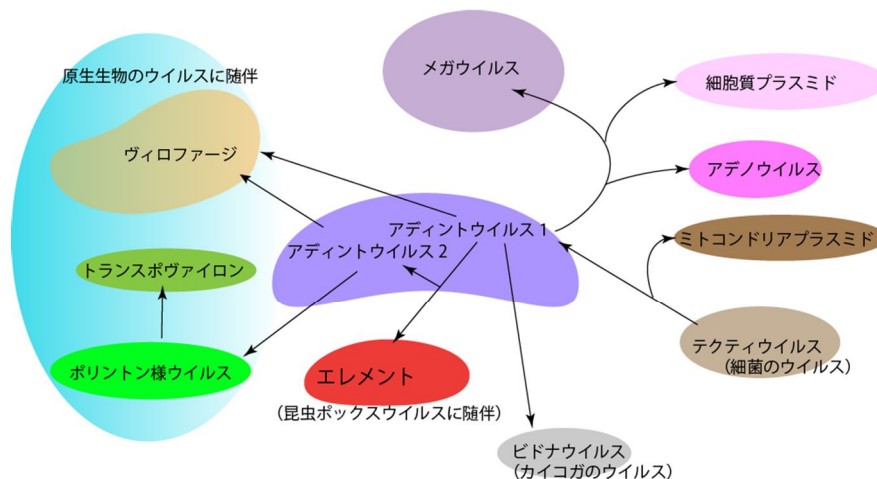


図1 アディントウイルスに由来するモバイルエレメントの進化の軌跡。  
(挑戦的研究 課題番号: 17K19432 代表者 高務淳 期間: 2017~2018より)

### 2. 研究の目的

本エレメントが昆虫ポックスウイルスに与える影響やそれを通じて昆虫ポックスウイルスの宿主昆虫に与える影響はほとんど解明されていない。本研究の目的は、宿主昆虫個体群でのエレメントの分布状況を明らかにすること、本エレメントが昆虫ポックスウイルスやその宿主昆虫に与える影響を解明すること、および、本エレメントがウイルス 昆虫の動態に与える影響の理論的類推を行うことである。

### 3. 研究の方法

(1) チャノコカクモンハマキ個体群におけるエレメントおよび昆虫ポックスウイルスの分布  
茶園からチャノコカクモンハマキ幼虫を採集し、エレメント(エレメント1と2がある)および昆虫ポックスウイルスの検出を行った。検出は診断的 PCR 法により行った。

(2) エレメント無し、エレメント有りの昆虫ポックスウイルスの作成  
野外から採集した昆虫ポックスウイルス感染虫からエレメントを保持していない昆虫ポックス

ウイルス株を得た。この株をチャノコカクモンハマキ幼虫に低濃度で感染させることを繰り返し、エレメントを保持しない株(エレメント(-)株)を純化した。ウイルスゲノムを制限酵素で処理して断片化し、その断片を電気泳動し(制限酵素断片長解析) フェイントバンドが見られなくなるまで行った。この株とエレメントを保持する株を重感染させ、エレメント(-)株にエレメントが付加された株を、同様に純化した。

(3) エレメント上の遺伝子の発現

培養細胞にエレメント1および2を保持する昆虫ボックスウイルス五日市株を接種し、経時的にPCR法により、遺伝子の発現を検出した。

(4) エレメント無し、エレメント有りの昆虫ボックスウイルスの生物検定

エレメント有り/無しの昆虫ボックスウイルスをチャノコカクモンハマキ幼虫で増やし、包埋体(注)を精製した((注): 昆虫ボックスウイルスは、宿主体内でウイルス粒子が含まれる包埋体を産生する。この包埋体が次の宿主への感染源となる。宿主幼虫が経口的に包埋体を取り込み、感染が成立する。)包埋体溶液をチャノコカクモンハマキのふ化幼虫に接種し、病原力、死亡までの日数、死亡時の体重を測定した。供試虫は死亡もしくは羽化まで観察した。

(5) モデルによるウイルス 宿主の動態の解析

昆虫ボックスウイルスは、宿主幼虫に感染し増殖後、一度環境中にウイルスが放出され、そのウイルスに汚染した寄主植物を宿主幼虫が摂食することで伝染する。この過程を取り入れたウイルス宿主の動態を表す数理モデルを解析した。

4. 研究成果

(1) チャノコカクモンハマキ個体群におけるエレメントおよび昆虫ボックスウイルスの分布

茨城県つくば市の茶園Aにおける結果を図2に示す。エレメントは、昆虫ボックスウイルス感染虫からのみ検出された。エレメント1と昆虫ボックスウイルスに感染している個体が多く、エレメント2と昆虫ボックスウイルス

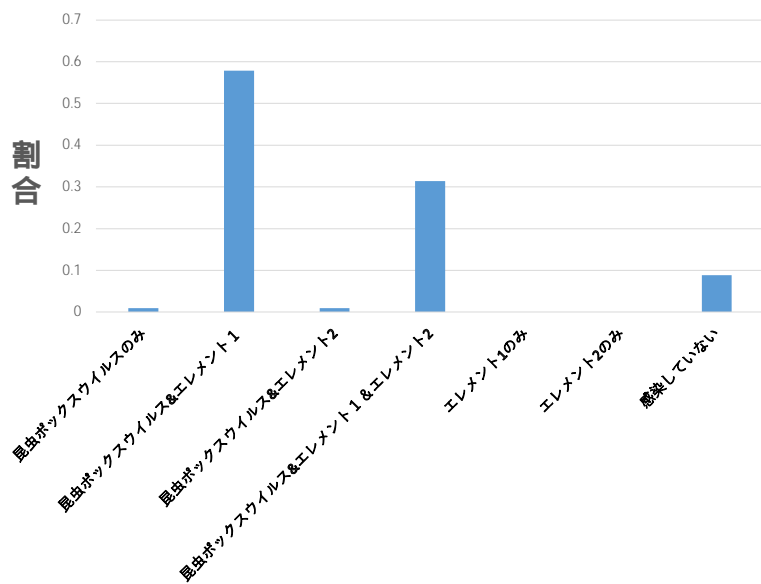


図2 つくば市茶園のチャノコカクモンハマキ個体群における昆虫ボックスウイルスおよびエレメントの分布

に感染している個体は少なかった。エレメント1および2と昆虫ボックスウイルスに感染している個体も多かった。この結果は、以前に実施した結果と同様であった。つくば市の別の茶園Bおよび茨城県竜ヶ崎市の茶園においても同様の結果が得られた。また、チャハマキにおいても、解析できた個体数が著しく少なかったものの、同様の傾向が見てとれた。昆虫ボックスウイルスとエレメント1、エレメント2は、それぞれ独立して検出されるのではなく、エレメントと昆虫ボックスウイルスが関連を持っていることが強調された。茨城県水海道、東京都瑞穂、四国、広島県世羅から分離された昆虫ボックスウイルス株を解析した結果、これら株にも、やはりエレメント1もしくはエレメント1と2両方を持つ株が多かった。

(2) エレメント無し、エレメント有りの昆虫ボックスウイルス

昆虫ボックスウイルス野外株のエレメントを保持しない株を純化したエレメント(-)株のゲノムの電気泳動像を図4に示す。エレメント(-)株では、エレメントのバンドが見られない。また、エレメント(-)株のゲノムの断片配列を次世代シーケンサーで取得し、組み立てたところ、エレメントに相当するものは得られなかった。また、断片配列をエレメント配列に対して照合したが、エレメントに相当する配列はなかった。この株にエレメント1を付加したエレメント(1+)株および、エレメント1とエレメント2を付加したエレメント(1&2+)株を作成した。エレメント2のみを付加した株は純化に時間がかかり、現在作成中であり、生物検定には供すことができなかった。

また、エレメントを保持し、純化済みの昆虫ボックスウイルス五日市株から、エレメントを欠くウイルスを得る目的で、同様にチャノコカクモンハマキを用いてウイルスの純化を行ったが、



エレメントを欠く昆虫ボックスウイルスは得られなかった。このことは、エレメントが昆虫ボックスウイルスに付加されると、脱落率が極めて小さいことを示唆している。エレメントが昆虫ボックスウイルス個体群の中で広く分布している要因の一つは、エレメントの脱落率が小さいことかもしれない。

### (3) エレメント上の遺伝子の発現

図4に昆虫ボックスウイルスおよびエレメントの経時的な遺伝子発現を示す。エレメント1上の遺伝子には、ゲノムの複製のキーとなるDNA複製酵素遺伝子を含む。それら遺伝子の発現は概して早く、昆虫ボックスウイルスの初期遺伝子の発現時期に相当する。エレメント2の遺伝子発現は、後期遺伝子に相当する。

ウイルスの複製は、初期遺伝子の発現産物が中期遺伝子を、中期遺伝子の発現産物が後期遺伝子を動かして成立する。エレメント1が昆虫ボックスウイルスと共に細胞に入ればエレメント1自身の持つ初期遺伝子のDNAポリメラーゼを複製に使用すると考えられる。一方、エレメント2上の遺伝子は後期遺伝子であり、エレメント2のみを持つ昆虫ボックスウイルスが細胞に入った場合、エレメント2は、昆虫ボックスウイルスの遺伝子産物に複製過程の多くを依存すると考えられる。このため、エレメント2は、エレメント1に比較して昆虫ボックスウイルスの複製に対してコストがかかると推定される。エレメント1と2がともに存在する場合は、エレメント2の及ぼすコストが補完されるかもしれない。先に示したように、野外において、エレメント1のみを持つ昆虫ボックスウイルスやエレメント1および2を持つ昆虫ボックスウイルスが多く、エレメント2のみを持つ昆虫ボックスウイルスが少ない。エレメント上の遺伝子の種類や発現パターンが野外での分布パターンを形作る要因の一つかもしれない。

### (5) モデルによるウイルス 宿主の動態の解析

エレメントの昆虫ボックスウイルス個体群中での分布について、エレメントが昆虫ボックスウイルスに付加される率と付加されたエレメントが脱落する率を考えると、1)エレメントが昆虫ボックスウイルスに対してコストがない場合、2)コストがあってもそれを上回るウイルス側のメリットがある場合、先の実験結果から推定されるように脱落率が付加率に対して小さい場合、エレメントは昆虫ボックスウイルス個体群中に広がりやすい。

野外でエレメントが広く昆虫ボックスウイルス個体群に分布している状況を考慮し、ウイルス 宿主 エレメントの動態をシミュレーションしたところ、エレメントが昆虫ボックスウイルスの宿主におけるウイルス生産数を減らす場合、宿主の平均密度の上昇と頻繁な大発生を誘発する可能性があることが分かった。逆に、エレメントがウイルス生産数を高める場合には、宿主密度を減少させ、場合によっては低密度に安定化させる可能性がある(図4)。このように、エレメントの影響によって宿主密度を抑制する効果は、エレメントがウイルスの感染力を上昇

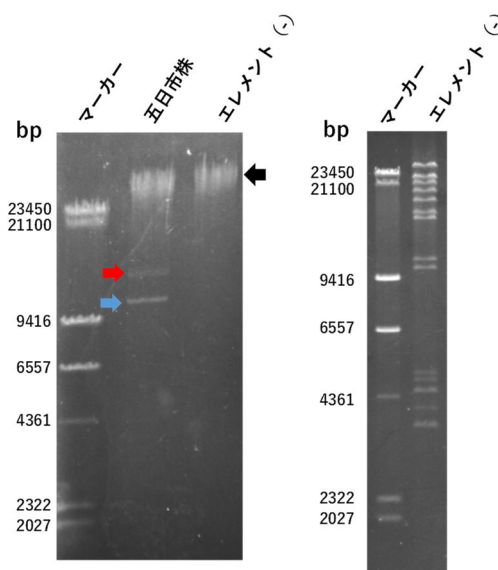


図3 エレメントを保持しない昆虫ボックスウイルス株左パネル：ゲノムの電気泳動像。エレメント1とエレメント2を持つ五日市株と共に泳動した。黒矢印は昆虫ボックスウイルスゲノム、赤矢印はエレメント1、青矢印はエレメント2のバンド。右パネル：エレメントを保持しない昆虫ボックスウイルス株ゲノムの制限酵素断片長解析。

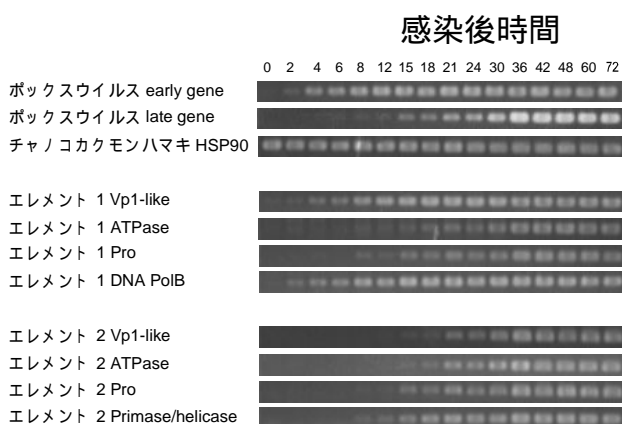


図4 昆虫ボックスウイルス初期遺伝子、後期遺伝子およびエレメントの遺伝子発現。

させる、環境中でのウイルスの失活率を減少させる場合等にも見られた。

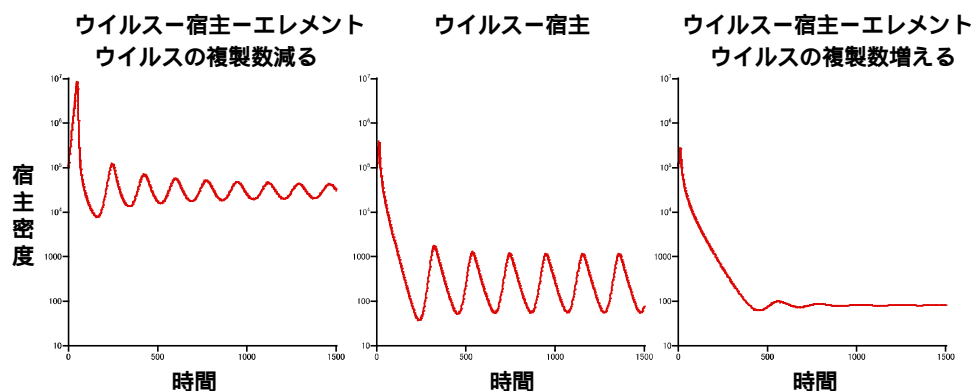


図5 ウイルス-宿主-エレメントのモデルによるシミュレーションの例

#### (4) エレメント無し、エレメント有りの昆虫ボックスウイルスの生物検定

エレメント(-)、エレメント(1+)、エレメント(1&2+)株のチャノコカクモンハマキ孵化幼虫に対する病原性に差は検出されず、半数致死濃度は $6 \times 10^6$ 包埋体/mlと算出された。感染虫が死ぬまでの時間にも差はなかった。死亡時の体重(ウイルス生産量)は、エレメントを付加した株の方が重い(多い)傾向にあったが、統計的な差は検出されなかった。

本研究の生物検定では、エレメントの昆虫ボックスウイルスへの影響について検出できなかったが、宿主昆虫の発育齢や温度の影響、異なる宿主昆虫への影響等、より詳細な検討が必要である。そのうえで、類推されるウイルス-宿主の動態への影響を再度検討する必要がある。また、エレメント2のみを持つ昆虫ボックスウイルスについても、今後、生物検定を実施する必要がある。野外においては、昆虫ボックスウイルスは、複数株が宿主個体に多重感染している場合が多い。そのため、宿主昆虫個体内での昆虫ボックスウイルス株(エレメント無し、エレメント有り)の競争等の動態や、多重感染した場合のエレメントの複製について検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	仲井 まどか  (Nakai Madoka)  (60302907)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授    (12605)	

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