

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：82105

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657064

研究課題名(和文) 昆虫ポックスウイルスのゲノム外DNA断片はヴィロファージか

研究課題名(英文) On extra-genome DNA elements in Adoxophyes honmai entomopoxvirus.

研究代表者

高務 淳 (TAKATSUKA, JUN)

独立行政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：80399378

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：樹木に生息するハマキガの昆虫ポックスウイルス(AHEV)から、ゲノムには繋がらないDNA断片を発見した。この断片の構造や遺伝子の種類はvirophage(ウイルスに寄生するウイルス)に似ている。本DNA断片がウイルス粒子としては存在していないこと、AHEVのウイルス粒子内に存在すること、AHEVとともにほぼ同コピー数で複製すること、本DNA断片上の遺伝子と昆虫およびウイルスの持つ遺伝子が系統的にリンクしていることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Virophage-like DNA elements were found from Adoxophyes honmai entomopoxvirus (AHEV), belonging to the genus Betaentomopoxvirus of the family Poxviridae. They were not integrated into AHEV genome. It seemed likely that the elements did not form virus like structure and were probably packaged in to AHEV virions. AHEV genome and the elements were replicated in infected insects and their copy numbers reached the same level. The phylogeny of a capsid-like protein illustrated the link among the elements, insects and viruses.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類

キーワード：進化 ウイルス

### 1. 研究開始当初の背景

virophage は、近年、アメーバのウイルス mamavirus から発見されたウイルスに寄生するウイルスであり、水圏の原生生物に広く分布していると考えられている。virophage は、1) ウイルスの寄生者という新しいウイルス、2) ウイルス間の遺伝子の運び屋としてウイルスの多様性や進化に関与する、3) 生物の進化と多様性創出に多大な影響を持つと考えられる DNA トランスポゾン的一种の起源、4) 生態系で重要な役割を持つとして、ウイルス学的、進化学的、生態学的に注目されている。しかし、水圏の原生生物以外からは発見されていない。

### 2. 研究の目的

昆虫ボックスウイルス (EPV) は、昆虫のみに感染する DNA ウイルスである。EPV は、直鎖上の 2 本鎖 DNA 1 本をゲノムとして持つ。ところが、樹木に生息する昆虫であるハマキガを宿主とする EPV を解析したところ、ゲノムにはつながらないと考えられる直鎖状の DNA 断片を 2 本を発見した。発見した DNA 断片の配列が virophage に似ていることから、これら DNA 断片について、virophage としての特徴をもっているのか明らかにすることを目的とした。

virophage は、ウイルス粒子として存在するため、DNA 断片の存在様式について明らかにする。また、virophage の複製は、宿主であるウイルスに依存するため、DNA 断片の複製が、EPV に依存するのか明らかにしようとした。

### 3. 研究の方法

4 齢脱皮直後のチャノコカクモンハマキ幼虫に EPV 包埋体液を経口的に接種し感染させた。その後、EPV に感染したチャノコカクモンハマキ幼虫の組織を、経日的にサンプリングし、透過型電子顕微鏡で観察した。また、EPV は包埋体と呼ばれるカプセルを形成し、その中にウイルス粒子がパッケージされる構造をしている。DNA 断片は、この包埋体から抽出された核酸から発見されたため、包埋体を透過型電子顕微鏡で観察した。

EPV の包埋体を還元剤とアルカリ緩衝液によって溶かし、包埋されているウイルス粒子を遊離させた後、密度勾配遠心分離によって精製した EPV ウイルス粒子から DNA を抽出した。また、包埋体からも DNA を直接抽出した。これら DNA を、そのまま電気泳動したのち、メンブレンにトランスファーした。DNA 断片に特異的なプローブでハイブリダイゼーション法により DNA 断片の検出を行った。

EPV をチャノコカクモンハマキ幼虫に感染させ、その後の EPV のスフェロイジン遺伝子と DNA 断片の ORF004 の増幅を調べた。

DNA 断片上の遺伝子の系統樹を最尤法により作成した。

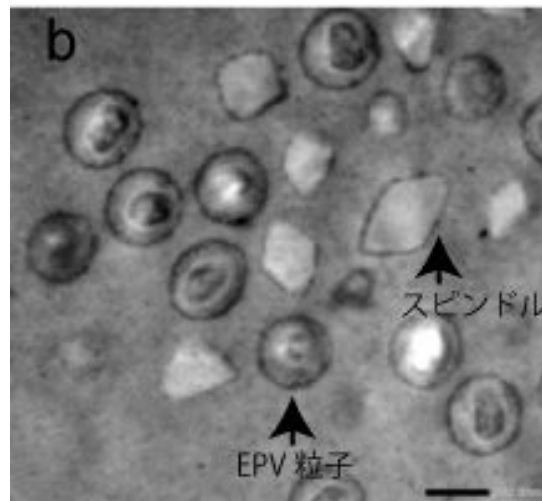
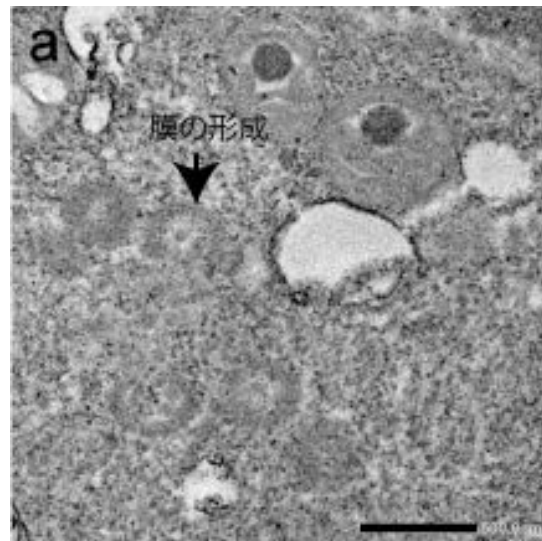


図 1. 感染組織 (a) および包埋体 (b) の透過型電子顕微鏡像。

### 4. 研究成果

透過型電子顕微鏡による観察の結果、EPV による感染組織には、EPV のコアが層状の膜につつまれ、ウイルス粒子が形成されている様子が観察されたが、EPV のウイルス粒子以外のウイルス様構造体は認められなかった (図 1a)。包埋体も観察したが、同様に EPV のウイルス粒子および EPV が形成するスピンドルと呼ばれるタンパク性の結晶体が観察されるのみであり、その他のウイルス様構造体は発見できなかった (図 1b)。これまで、知られている

virophage は、50nm 程度の正 20 面体の粒子であり、宿主であるウイルスが複製する場所で複製することが知られている。また、宿主ウイルスの粒子内にウイルス粒子として取り込まれることもあることが報告されている。本研究からは、そのようなことは発見できなかったことから、本 DNA 断片は、ウイルスとしての構造を持っていない可能性が強く示唆された。

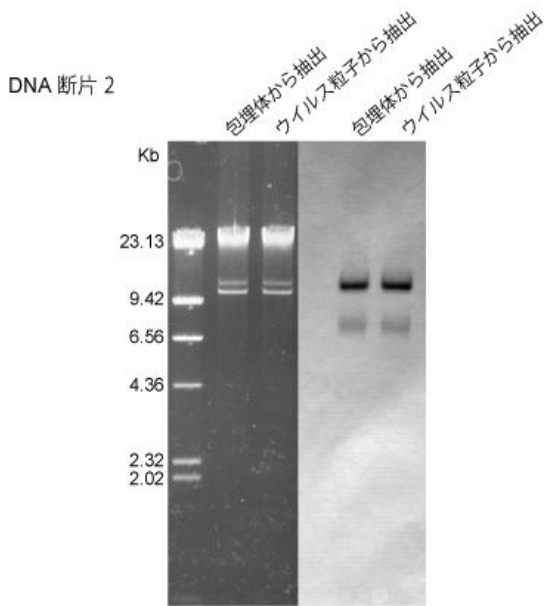
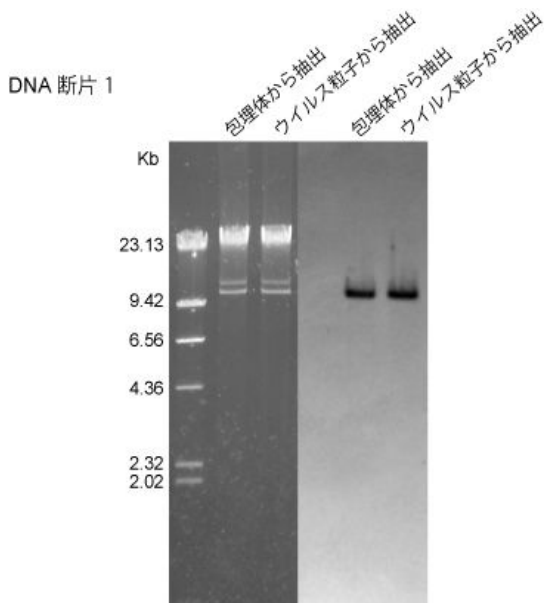


図2. DNA断片のEPVウイルス粒子からの検出.

EPVのウイルス粒子をきれいに精製し、DNAを抽出した場合も、包埋体から直接抽出した場合も、11Kb および 12Kb のバンドと、はるかに長鎖の EPV のゲノム DNA が検出された。サザンハイブリダイゼーションの結果、11Kb のバンドが DNA 断片 1、12Kb のバンドが DNA 断片 2 であることが予測される通り検出された。しかし、DNA 断片 2 は、7Kb 付近にもシグナルが検出された(図2)。これは、DNA 断片 2 の複製が、一部不完全に終わったものかもしれない。検出強度は、EPV ウイルス粒子から DNA を抽出した場合も、包埋体から抽出した場合も同様であった(図2)。これらのことから、DNA 断片が EPV ゲノムには繋がっていないことが確認され、また、DNA 断片は、EPV ウイルス粒子に存在することが強く示唆された。また、検出されたバンドの強度から考えて、DNA 断片は EPV ゲノムとほぼ同数の

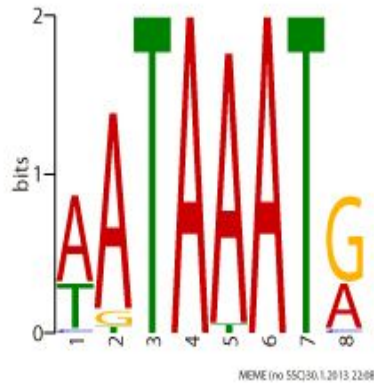


図3. DNA断片のプロモーター領域に存在するモチーフ.

レベルのコピー数であることが推定される。また、実験に使用した EPV は、ごく少量の EPV をチャノコカクモンハマキに感染させることによって増殖したものであるため、DNA 断片も EPV とともに増殖したことは明らかである。PCR 法により、EPV をチャノコカクモンハマキに感染させた後の増殖を調べた結果、EPV は急速に増殖したが、DNA 断片も同様に増殖した。DNA 断片上の遺伝子のプロモーター領域には、図3に示す配列モチーフが見出された。これらの多くは、ATG スタートコドンを含むかその近傍に存在した。TAAATG は、EPV の後期遺伝子のプロモーターモチーフとして知られ、その多くが同様に、ATG スタートコドンを含む。これらのことから、DNA 断片は、EPV のシステムを利用して複製していると推察される。しかし、本研究では、EPV の存否によって DNA 断片の複製がどのように影響を受けるのか、直接には明らかにできなかった。EPV を In Vivo クローニングし、DNA 断片を保持していない EPV を分離しようと試みたが、クローニングしたすべての EPV は本 DNA 断片特異的な PCR に反応した。本研究では DNA 断片を保持しない EPV の分離に成功しなかった。今後、さらに DNA 断片を保持しないクローニングを行い、DNA 断片を持っていない他の種類の EPV に本 DNA 断片をとりこませる等の試行も行い、本 DNA 断片の複製の EPV 依存性を調査すべきである。

DNA 断片上に存在するキャプシッド様遺伝子の系統解析を行ったところ、昆虫の同遺伝子と EPV および Bracovirus の同遺伝子が系統的にリンクしていることが分かった。DNA 断片は、昆虫とウイルス間における遺伝子の水平転移に積極的に関与しているのかもしれない。

本研究から、チャノコカクモンハマキを宿主とする EPV から発見した DNA 断片は、ウイルス粒子としての形態をもっていないことからウイルスである virophage ではないが、virophage が持つ特性をもった断片であることが強く示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1件)

高務淳・仲井まどか、昆虫ボックスウイルスから見つかったゲノム外 DNA 断片について、日本応用動物昆虫学会大会、2013 年 3 月 27 日～3 月 29 日、日本大学(神奈川県)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

高務 淳 (TAKATSUKA Jun)

独立行政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：80399378

### (2)研究分担者

仲井 まどか (NAKAI Madoka)

東京農工大学・農学研究科・准教授

研究者番号：60302907