

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2013～2016

課題番号：25304047

研究課題名(和文) 東～南アジアの野蚕NPVの防除と利用に役立つ比較ゲノム解析

研究課題名(英文) Comparative genome analysis useful for protecting and utilizing NPVs infecting wild silkworms from East to South Asian countries

研究代表者

小林 淳 (Kobayashi, Jun)

山口大学・創成科学研究科・教授

研究者番号：70242930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：東～南アジア諸国においてシルク生産に利用されるさまざまなヤママユガ科絹糸昆虫(野蚕)から核多角体病ウイルス(NPV)を分離し、それらの全ゲノムDNA配列を次世代シーケンサーにより比較解析した。その結果、各NPVを高感度かつ特異的に検出可能なマルチプレックスPCR診断技術の開発に成功し、優れた有用タンパク質生産特性を有するバキュロウイルスベクター系の構築ならびに野蚕NPVの遺伝的多様性および進化の考察に役立つ知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Nucleopolyhedroviruses (NPVs) have been isolated from various saturniid silkworms (wild silkworms) utilized for silk production from East to South Asian countries, and their whole genome DNA sequences have been analyzed and compared using Next-Generation sequencer. As a result, a multiplex-PCR diagnostic protocol, which enables to detect each NPV with high sensitivity and specificity, has been successfully developed and useful knowledge in construction of baculovirus expression vector system with advantageous properties for valuable protein production and in consideration of genetic variation and evolution of NPVs infecting wild silkworms have been obtained.

研究分野：分子昆虫学

キーワード：核多角体病ウイルス 野蚕 ウイルスゲノム 昆虫病理 昆虫機能利用

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ヤママユガ科野蚕 NPV の防除技術開発における比較ゲノム解析の必要性: ヤママユガ科絹糸昆虫(野蚕)は、カイコとともに古くから絹糸生産に用いられており、生産量の点ではカイコにおよばないものの、テンサン *Antheraea yamamai* (日本)、サクサン *An. pernyi* (中国)、エリサン *Samia ricini* (中国、ベトナム、インド)、タサールサン *An. mylitta* (インド)、ムガサン *An. assamensis* (インド)、クリキュラ *Cricula trifenestrata* (インドネシア)などは、東～南アジア諸国における地域の重要な特産品となっている。高度に家畜化され、飼育技術が洗練されたカイコとは異なり、多くの野蚕は野外飼育されており、室内飼育されるエリサンの場合でも飼育室は野外から隔離されておらず、洗浄や消毒だけで病気を予防することは困難である。したがって、病害の防除あるいは軽減には、病気の発生を初期に見出し、感染個体の除去や発生場所の消毒など適切な措置を迅速に実施することが必要不可欠である。このような野蚕の重要病原の一つであるバキュロウイルス(核多角体病ウイルス; NPV)に関しては、ポリヘドリン、*lef-8* および *lef-9* 遺伝子の配列に基づいた系統解析の結果、中国のサクサン、エリサンおよび *Actias selene* (オナガミズアオの仲間) から分離された NPV が極めて近縁なグループに分類されている。したがって、中国を含む東～南アジア各地の野蚕 NPV のゲノム配列を比較解析することにより、近縁な野蚕 NPV の分布が明らかになるとともに、それらを特異的かつ高感度に検出可能な実用的 PCR 技術の開発が可能になると期待された。

(2) ヤママユガ科野蚕 NPV の収集と利用技術開発の実績: 研究代表者の小林は、中国の研究協力者(王学英博士)と共同でサクサン由来の NPV を用いてバキュロウイルス遺伝子発現ベクター系を構築し、シンジュサン *S. cynthia* の休眠蛹における高効率なタンパク質生産、サクサン培養細胞株における複合型の N 型糖鎖付加タンパク質生産、エリサンにおける安定同位体標識タンパク質生産など、既存の系にない優れた特性を有する生産システムを開発してきた。したがって、本研究課題において新たな野蚕 NPV の感染・増殖特性やタンパク質生産効率を詳細に比較検討することにより、さらに優れた生産特性のベクター系を新たに構築できる可能性が期待された。すでに、サクサン NPV に加え、中国のエリサンならびに日本のテンサン由来の NPV を研究協力者(黄元姣博士と梶浦善太博士)より入手済みであり、また、東南アジアとインドの野蚕飼育地域における病害発生の状況に関する情報が研究協力者(清水治氏)と研究分担者(門野敬子博士)から集まり、十分に本研究課題遂行の準備が整っていた。

## 2. 研究の目的

日本からインドにかけて分布する多種多様なヤママユガ科絹糸昆虫(野蚕)類による絹糸生産の安定化と増産ならびに優れたタンパク質生産系構築に資するため野蚕6種(テンサン、サクサン、エリサン、タサールサン、ムガサン、クリキュラ、アタカス)に病害をもたらすバキュロウイルス(核多角体病ウイルス)を主要生産国において調査・採取し、次世代シーケンサーを用いて各ウイルスの全ゲノム配列とそれらの系統関係を明らかにし、各ウイルスを識別して検出可能なマルチプレックス PCR プライマーセットを設計することにより、ウイルス感染個体およびウイルス媒介野生昆虫の早期発見と迅速な防除対策の実施に役立てるとともに、各ウイルスの感染増殖特性や多角体生産効率などを比較し、タンパク質生産に有効利用可能なウイルスの選定を試みる。

## 3. 研究の方法

(1) 野蚕 NPV のサンプリングとゲノム DNA の解析: 東～南アジアにおける主要野蚕飼育地域で NPV をサンプリングし、ゲノム配列を次世代シーケンサーにより解読し、系統関係を推定する。

(2) 野蚕 NPV 検出用 PCR 技術の開発: 解読したゲノム配列に基づいて、各野蚕 NPV (あるいは分離株)を識別可能なマルチプレックス PCR 用のプライマーセットを設計し、迅速かつ高感度にウイルス検出するための反応条件の最適化を行い、実用性を検証する。

(3) 野蚕 NPV のタンパク質生産特性検定: 各野蚕 NPV の宿主および昆虫培養細胞株における感染・増殖特性を、特に多角体タンパク質生産効率との関連に注目して比較解析し、新規遺伝子発現ベクター系構築の可能性を評価する。

## 4. 研究成果

(1) 野蚕 NPV のサンプリングとゲノム DNA の解析: 本研究期間中に、新たにベトナムおよびカンボジアのエリサン、インドのタサールサンおよび日本(長野県)のシンジュサンから NPV を分離することに成功し、すでに入手済みのサクサン(中国)、エリサン(中国)およびテンサン(日本)の NPV 分離株(一部クローンを含む)とともに次世代シーケンサーによるゲノム DNA 配列解析を完了後、繰り返し配列など確認が必要な部分配列を補正し、各分離株のコンセンサスゲノムを完成した。さらに、株内変異を検出するとともに近縁の NPV のゲノム配列と比較することにより、東～南アジアに分布するヤママユガ科野蚕 NPV のゲノム進化と多様化の過程を考察した。

(2) 野蚕 NPV 検出用 PCR 技術の開発: 各種野蚕 NPV 分離株間で比較的大きな挿入欠失変異が見られるゲノム上の3領域を標的とした PCR プライマーを設計し、分離株を識別可能なマルチプレックス PCR 法を確立した。各種

野蚕 NPV 分離株をエリサンに経口感染させ、継時的に体液を回収して上記のマルチプレックス PCR を実施した結果、病徴が現れる数日前には明瞭な分離株特有のバンドパターンを検出できたことから、実用性が確認された。

(3)野蚕 NPV のタンパク質生産特性検定：サクサン培養細胞に各種 NPV 分離株のゲノム DNA をトランスフェクションし、ウイルスの増殖性を比較したところ、サクサン NPV、タサルサン NPV およびエリサン NPV (中国) がほぼ同等な最も良好な増殖性を示し、テンサン NPV およびシンジュサン NPV の増殖性はそれらよりもやや劣る傾向が認められた。一方、エリサン NPV (ベトナムおよびカンボジア) の増殖性は極めて低いことが判明し、宿主特異的増殖機構に関わる遺伝子の同定に役立つ可能性が示唆された。また、これらの野蚕 NPV のうち、タンパク質生産量を高める *egt* 遺伝子を保持し、タンパク質の分解を促進する *v-cath* および *chiA* 遺伝子を欠損しているエリサン NPV (中国) クローン F がタンパク質生産に最も適していると判断された。

#### 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 10 件)

Sasaki, K., Kajiura, Z., Kobayashi, J.: Comparative analyses of deletion mutations and their pathological effects of nucleopolyhedroviruses isolated from saturniid wild silkworms, *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, 2017, 査読あり (印刷中)

Hamajima, R., Yasunaga-Aoki, C., Iwanaga, M., Imanishi, S., Kobayashi, J., Sasaki, K., Kusakabe, T., Lee, J. M., Mon, H., Kobayashi, M., Lkeda, M. rDNA degradation in *Bombyx mori* and *Bombyx mandarina* cells infected with heterologous nucleopolyhedroviruses, *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, 85, 73-77, 2016, 査読あり, [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jibs/85/3/85\\_3\\_073/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jibs/85/3/85_3_073/_article)

Ito, K., Shimura, G., Katsuma, S., Tsuda, Y., Kobayashi, J., Tabunoki, H., Yokoyama, T., Shimada, T., Kadono-Okuda, K., Gene expression and localization analysis of *Bombyx mori* bidensovirus and its putative receptor in *B. mori* midgut, *Journal of Invertebrate Pathology*, 136, 50-56, 2016, 査読あり, DOI: 10.1016/j.jip.2016.03.005

佐々木邦, 谷崎加奈, 小林 淳, 東~南アジアの野蚕核多角体病ウイルスの防除と利用に役立つ比較ゲノム解析, *昆虫と自然*, 51(9), 37-38, 2016, 査読なし

Yagi, H., Nakamura, M., Yokoyama, J., Zhang, Y., Yamaguchi, T., Kondo, S., Kobayashi, J., Kato, T., Park, E. Y., Nakazawa, S., Hashii, N., Kawasaki, N., Kato, K., Stable isotope labeling of glycoprotein expressed in silkworms using immunoglobulin G as a test molecule, *Journal of Biomolecular NMR*, 62, 157-167, 2015, 査読あり, DOI: 10.1007/s10858-015-9930-y

Takeda, M., Kobayashi, J., Kamimura, M., Jaya Prakash, P., Introduction of diapause trait into the Muga silkworm, *Antheraea assamensis*: A scientific collaboration over the Himalayas, *International Journal of Wild Silkworm and Silk*, 18, 39-54, 2014, 査読あり

小林 淳: バキュロウイルスと昆虫培養細胞の新規利用技術開発, *生化学*, 78, 222-230, 2014, 査読あり, <http://www.jbsoc.or.jp/seika/wp-content/uploads/2015/06/86-05-03.pdf>

Akond, M., Matsuda, Y., Ishimaru, K., Iwai, K., Saito, A., Kato, A., Tanaka, S., Kobayashi, J., Koga, D., Characterization of a yam class IV chitinase produced by recombinant *Pichia pastoris* X-33, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 78, 222-230, 2014, 査読あり, DOI: 10.1080/09168451.2014.885825

Nagata, S., Kobayashi, J., Kataoka, H., Suzuki, A., Structural determination of N-glycan moiety attached to the prothoracicotropic hormone from the silkworm *Bombyx mori*, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 78, 1381-1383, 2014, 査読あり, DOI: 10.1080/09168451.2014.925777

Hamajima, R., Ito, Y., Uchikawa, H., Mitsutake, H., Kobayashi, J., Kobayashi, M., Lkeda, M. Degradation of rDNA in BM-N cells from the silk worm *Bombyx mori* during abortive infection with heterologous nucleopolyhedroviruses, *Journal of General Virology*, 94, 2102-2111, 2013, 査読あり, DOI: 10.1099/vir.o.053645-0

[学会発表](計 17 件)

佐々木邦, 梶浦善太, 小林 淳, 全ゲノム配列比較に基づく日本のヤマモユガ科野蚕核多角体病ウイルスの系統関係, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 11 月 30 日~12 月 2 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

Kobayashi, J., Sasaki, K., Z. Kajiura, Kadono-Okuda, K., Comparative whole genome analysis of nucleopolyhedroviruses infecting

saturniid silkworms by next-generation sequencing, XXV International Congress of Entomology, 2016年9月25日～9月30日, Orange County Convention Center (米国・オーランド市)

佐々木邦, 梶浦善太, 小林 淳, ヤママユガ科野蚕を宿主とする核多角体病ウイルスのゲノム, 第31回中国四国ウイルス研究会, 2016年7月9日～7月10日, 鳥取大学 (鳥取県・鳥取市)

佐々木邦, 梶浦善太, 小林 淳, テンサン核多角体病ウイルスのコンセンサスゲノムの再検討, 日本蚕糸学会第86回大会, 2016年3月17日～3月18日, 京都工芸繊維大学 (京都府・京都市)

佐々木邦, 梶浦善太, 小林 淳, テンサン由来バキュロウイルス分離株の次世代シーケンサー分析で高頻度に検出された欠陥鑑賞粒子配列, 2015年12月1日～12月4日, 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

谷崎加奈, 佐々木邦, 梶浦善太, 門野敬子, 清水治, 小林 淳, 東～南アジアの野蚕核多角体病ウイルスのゲノム配列比較, 日本野蚕学会第21回大会, 2015年11月28日～11月29日, 東京農業大学 (東京都・世田谷区)

佐々木邦, 梶浦善太, 小林 淳, テンサン核多角体病ウイルスの網羅的比較ゲノム解析, 日本蚕糸学会第85回大会, 2015年9月26日～9月27日, 北海道大学 (北海道・札幌市)

佐々木邦, 梶浦善太, 小林 淳, 次世代シーケンサーを用いたテンサン核多角体病ウイルスのゲノム配列解析 (第2報), 第30回中国四国ウイルス研究会, 2015年6月27日～6月28日, くらしき山陽ハイツ (岡山県・倉敷市)

Sasaki, K., Kajiura, Z., Kobayashi, J., Comparative whole genome analysis of nucleopolyhedroviruses infecting saturniid silkworms by next-generation sequencing, The 4th Asia-Pacific Congress of Sericulture and Insect Biotechnology, 2015年4月23日～4月25日, Haeundae Grand Hotel (韓国・釜山市)

Kobayashi, J., Development of new technologies for utilizing baculoviruses and insect cells, The 4th Asia-Pacific Congress of Sericulture of Sericulture and Insect Biotechnology, 2015年4月23日～4月25日, Haeundae Grand Hotel (韓国・釜山市)

Sasaki, K., Kajiura, Z., Kobayashi, J., Whole genome sequence analysis of *Antheraea yamamai* nucleopolyhedroviruses with next-generation sequencer, 第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月25日～

11月27日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

佐々木邦, 梶浦善太, 小林 淳, テンサンおよびサクサン核多角体病ウイルスのゲノム配列比較, 日本野蚕学会第20回大会, 2014年11月14日～11月15日, 岡谷商工会議所 (長野県・岡谷市)

Sasaki, K., Huang, Y., Shi, M., Wang, X., Kajiura, Z., Kobayashi, J., Disadvantageous deletion mutants retained in nucleopolyhedroviruses isolated from several saturniid silkworms, XVIth International Congress of Virology, 2014年7月27日～8月1日, Palais des Congres (カナダ・モントリオール市)

佐々木邦, 梶浦善太, 小林 淳, 次世代シーケンサーを用いたテンサン核多角体病ウイルスのゲノム配列解析, 第29回中国四国ウイルス研究会, 2014年6月28日～6月29日, 山口大学 (山口県・山口市)

佐々木邦, 黄元姣, 石美宁, 王学英, 梶浦善太, 小林 淳, ヤママユガ科野蚕核多角体病ウイルスにおける遺伝子欠損変異と病徴解析, 日本蚕糸学会第84回大会, 2014年2月10日～2月11日, 日本大学生物資源科学部 (神奈川県・藤沢市)

佐々木邦, 黄元姣, 石美宁, 王学英, 梶浦善太, 小林 淳, ヤママユガ科野蚕を宿主とする核多角体病ウイルスにおける遺伝子欠損の地理的変異と病徴との関係, 昆虫病理研究会, 2013年9月24日, 東京大学農学部 (東京都・文京区)

佐々木邦, 黄元姣, 石美宁, 王学英, 梶浦善太, 小林 淳, ヤママユガ科野蚕を宿主とする核多角体病ウイルスにおける遺伝子欠損の地理的変異と病徴との関係, 第28回中国四国ウイルス研究会, 2013年6月22日～6月23日, 広島大学霞キャンパス (広島県・広島市)

#### 〔図書〕(計1件)

小林淳: 講談社 (東京) 最新昆虫病理学 (国見裕久・小林迪弘 / 編著) (10.2 バキュロウイルスの機能開発と利用), 2014, p. 223-230

#### 〔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

<http://www.agr.yamaguchi-u.ac.jp/member/kobayashi/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小林 淳 (KOBAYASHI, Jun)

山口大学・大学院創成科学研究科・教授

研究者番号：70242930

(2)研究分担者

門野 敬子 (KADONO, Keiko)

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・新産業研究開拓領域・領域長

研究者番号：40355722

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

清水 治 (SHIMIZU, Osamu)

元群馬県蚕糸技術センター

梶浦 善太 (KAJIURA, Zenta)

信州大学・繊維学部・教授

王 学英 (WANG Xueyin)

中国・瀋陽農業大学・教授

黄 元姣 (HUANG Yuanjiao)

中国・広西医科大学・教授

スサムト ソムウィハルヨ (SUSAMTO

Somwiharjo)

インドネシア・ガジャマダ大学・教授