第 77 回昆虫病理研究会プログラム

1 日時 2019 年 9 月 21 日(土) 13:00~ (12:30 より講義室前にて受付開始)

2 会場 東京大学農学部 1 号館 2 階 8 番講義室

〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

Tel. 03-5841-8994(昆虫遺伝研究室・勝間進)

当日は土曜日のため 1 号館の正面扉からのみ入館できるようになっております。

3 タイムテーブル

時間	タイトル (講演者)	担当者
13:00	開会挨拶	佐藤会長
13:15	若手の会紹介	勝間幹事
13:20-14:00	タンパク質構造から考える、 <i>Bacillus thuringiensis</i> Cry 毒素とその受容体の関係性 (阿出川さとみ)	座長 國生龍平
14:00-14:40	バキュロウイルスの多彩な移動戦略 (國生龍平)	座長 浜島りな
14:40-15:20	核多角体病ウイルスとカイコ細胞が繰り広げる攻防の分子機構 (浜島りな)	座長 阿出川さとみ
15:20-15:40	休憩	
15:40-16:00	カイコガ幼虫のノジュール形成反応における Spz-Toll 経路の関与の解析 (唐舒宜)	座長 神谷克巳
16:00-16:20	ネオニコチノイド系薬剤と昆虫病原性糸状菌の併用処理の効果 (神谷克巳)	座長 松田典子
16:20-16:40	NIAS-Bm-aff3 細胞におけるバキュロウイルス感染 (松田(今井) 典子)	座長 疋田弘之
16:40-17:00	BmNPV がコードする Bm96 タンパク質は感染時の徘徊行動を促進する (疋田弘之)	座長 浜島りな
17:00	閉会挨拶	池田幹事

若手の会 & 一般講演
要旨集

タンパク質構造から考える、*Bacillus thuringiensis* Cry 毒素とその受容体の関係性

○阿出川さとみ（農工大 院 BASE、JSPS 特別研究員 DC1）

Bacillus thuringiensis Cry 毒素はよく似た構造を持ちながらも、昆虫側の受容体と特異的に結合することで、ある範囲の昆虫種に特異的な毒性を発揮する。さらに、系統的に離れた Cry 毒素が異なる種類の ABC トランスポーターファミリー分子を受容体として広く利用していることが明らかになってきた。毒素上の受容体結合領域の違いが、特異性の違いを生み出しているとされているが、そのうちのどこがどう違うのか、Cry 毒素がどのような分子進化を重ねてこの特異的な結合を実現してきたのかは不明なままであった。今回の発表では、筆者が取り組んできた Cry 毒素上の受容体結合領域に関する研究、および受容体研究をベースにし、Cry 毒素およびその受容体のアミノ酸配列およびタンパク質構造を眺めてみたい。そして Cry 毒素がどのようにして受容体との特異的な結合を実現しているのか、また、どのように ABC トランスポーターへ結合し、また利用できる範囲を広げてきたのかについて推察、考察したい。最後に BT コーンに代表されるように、害虫抵抗性遺伝子組換え作物の遺伝資源としてすでに広く利用されている Cry 毒素の今後の利用価値に触れながら、Cry 毒素研究の今後の展望について議論したいと思う。

バキュロウイルスの多彩な移動戦略

○國生龍平（金沢大理工、東大農）

多くの病原体にとって、宿主の体内でより広範囲の細胞や組織に感染を拡大する、あるいはより増殖に適した場所に移動することは、宿主体内における自身の増殖量を最大化するために重要である。また、感染宿主の体内で増殖した子孫を環境中のより広範囲に拡散することで、新たな宿主個体へと感染する確率を向上させることができる。昆虫病原体であるバキュロウイルスも例に漏れず、自身の移動・拡散効率を高めるために、細胞レベルから組織レベル、そして個体レベルに至るまで、多岐に渡る手段で宿主を利己的に利用することが知られている。私は、バキュロウイルスの多彩な移動戦略に興味を抱き、カイコ核多角体病ウイルス (*Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*; BmNPV) を材料として研究を行ってきた。本発表では、現在注力する以下の2つの研究テーマについて紹介する。

1.バキュロウイルスの宿主体内における感染拡大メカニズムの解明

昆虫の組織は緻密な細胞外マトリックスの層である基底膜に覆われており、ウイルス粒子のような大きい物体は通常基底膜を通過することができない。しかし、バキュロウイルスは基底膜を貫通する気管末端の細胞への感染を経由することで、基底膜を回避し全身の組織へと速やかに感染を広げることができると考えられている。私達は、BmNPVがこの定説では説明できない新規の感染ルートを持つことを新たに発見し、その鍵となるウイルスの膜タンパク質として ARIF-1 を同定した。さらに、ARIF-1 が宿主の血球細胞の機能を改変することにより、感染血球が組織表面に付着し、基底膜を突き破って組織内部に効率的に感染を拡大していることが明らかになった。

2.バキュロウイルスが宿主の行動を操作する分子・神経機構の解明

バキュロウイルスに感染した幼虫は、感染末期に異常な徘徊行動を示し、高所に登って致死する。この現象は「梢頭病」として古くから知られており、ウイルスが感染宿主の行動を利己的に操作することで、環境中における子孫ウイルスの拡散効率を高めていると考えられている。これまでに、行動操作に影響を及ぼすウイルス遺伝子はいくつか報告されているが、行動操作の詳細なメカニズムはよく分かっていない。本発表では、宿主行動操作の分子・神経機構の解明に向けた現在の取り組みについても紹介したい。

核多角体病ウイルスとカイコ細胞が繰り広げる攻防の分子機構

○浜島りな (阪大微研, 名大院生命農)

バキュロウイルス科に属する核多角体病ウイルス (nucleopolyhedrovirus, NPV) は、昆虫病原性の DNA ウイルスである。NPV は、宿主特異性が非常に高いという特徴を持ち、ウイルスが分離された昆虫種とそのわずかな近縁種においてのみ増殖感染となる。しかし、宿主特異性の決定を担う分子機構は明らかにされていない。宿主特異性は、ウイルスに対する昆虫の防御応答 (抗ウイルス応答) と、それを回避するウイルスの増殖戦略の攻防の結果であると考えられる。そのため、演者らは、NPV の宿主特異性決定機構の解明を目的として、カイコ細胞の抗ウイルス応答に着目した研究を進めてきた。

カイコ細胞において、カイコ核多角体病ウイルス (BmNPV) の感染は許容され、増殖感染となるが、*Autographa californica* MNPV (AcMNPV) や、アメリカシロヒトリ MNPV (HycuMNPV) など多くの NPV の感染は許容されず、不全感染となる。これまでに、NPV が不全感染となったカイコ細胞においてリボソーム RNA (rRNA) 分解が誘導されること、NPV の P143 が rRNA 分解の誘導に関与すること、rRNA 分解の誘導がカイコ細胞における NPV 増殖の可否に関与することを示した。本講演の前半では、上述のこれまでの研究成果を紹介するとともに、BmNPV, AcMNPV, HycuMNPV の感染に伴ってカイコ細胞が誘導する抗ウイルス応答に関する最近の研究成果について報告する。そして、後半では、NPV の宿主特異性決定機構に関する研究の今後の展開について、昆虫病理学から離れた分野での研究経験を踏まえて議論したい。

カイコガ幼虫のノジュール形成反応における Spz-Toll 経路の関与の解析

○唐舒宜、手塚萌子、佐藤令一（農工大院 BASE）

ノジュール形成反応とは昆虫の細胞性免疫の一つであり、昆虫血体腔内に侵入した病原体を血球が放出する凝固因子が絡めとり捕捉・殺菌を行う反応である。体液中の液性タンパク質である *Bombyx mori* Hemolymph protease 8 (BmHP8) の働きを阻害するとノジュール形成が抑制されることから、ノジュール形成反応の誘導には HP8 の下流で活性化される Spz-Toll 経路が関与する可能性が考えられた。

まずノジュール形成反応における Spz の関与を解析するため、BmSpz1 に対する抗血清を作製したところ、抗 BmSpz1 血清は *in vitro*、*in vivo* 双方においてノジュール形成を阻害した。さらに、BmSpz1 の組換え型タンパク質は *in vivo* においてノジュール様凝集の形成を誘導した。以上のことから、BmSpz1 はプラズマ中因子の中で最終的に血球に作用し、ノジュール形成を誘導する因子であることが示唆された。

一方、Toll 受容体については、遺伝子発現解析の結果、6 つの Toll ホモログが血球に発現しており、そのうちのいずれかがノジュール形成に関与する可能性が考えられた。現在、ノジュール形成に関与する Toll を同定するため、抗 Toll 血清や Toll ノックアウトカイコを用いた解析を試みている。

ネオニコチノイド系薬剤と昆虫病原性糸状菌の併用処理の効果

○神谷克巳（岐阜農技セン、名大院・生命農）

関 公貴、水口智江可、三浦 健（名大院・生命農）

非対象昆虫の生理への望ましくない影響が示唆されているネオニコチノイド系殺虫剤を用い、昆虫病原糸状菌の殺虫活性および宿主の免疫応答に対する影響を、モデル昆虫であるコクヌストモドキを用いて検討した。

作用機作の異なる 2 種類の薬剤の併用による相乗効果を評価する解析手法として、Chouら(1983)により提唱された、Combination Index (CI) 値を指標として、6 種類のネオニコチノイド系薬剤について、*Beauveria bassiana* (Bb) および *Metarhizium anisopliae* (Ma) の 2 種類の昆虫病原糸状菌を用いて、併用時の効果の解析を行った。コクヌストモドキ成虫に対して、各種ネオニコチノイド系薬剤原体の塗布および昆虫病原糸状菌の短菌糸の血体腔への微量注入を、それぞれ sub-lethal な濃度で行い、その後の死亡率から、CI 値を算出した。その結果、これらの薬剤と Bb との併用には相乗的な殺虫効果があることが明らかとなった。その効果は、ネオニコチノイド系薬剤によって差があり、イミダクロプリドおよびチアクロプリドで相乗効果が高かったが、アセタミプリドおよびニテンピラムでは弱く、相加的な効果に近かった。一方、Ma との併用では、相乗効果はほぼ認められず、アセタミプリドおよびニテンピラムでは、拮抗的な効果が示唆される結果が得られた。

そこで、併用が昆虫の免疫系へ与える影響を調査するためにまず、抗微生物ペプチド (AMP) 遺伝子の発現誘導レベルを指標としての検討を行った。Toll 経路依存的な AMP・Cec3 および IMD 経路依存的な AMP・Col1 について、遺伝子の発現量を測定したところ、Bb との同時処理により相乗効果が認められたイミダクロプリドについて、他の薬剤に比べ *Cec3* 遺伝子の発現が抑制されていることが分かった。一方、Ma との同時処理では、イミダクロプリドに関しては *Cec3* 遺伝子の発現に差がなく、*Col1* 遺伝子の発現がわずかに抑制される傾向が認められた。また、微量注入時の創傷による AMP の誘導を確認したところ、いずれの AMP 遺伝子についても短菌糸注入時より早期の誘導の終息が確認された。これらの結果から、ネオニコチノイド系薬剤は、コクヌストモドキの、少なくとも液性免疫系へ影響を与える可能性があり、一部の薬剤は、Bb との同時処理により相乗的な殺虫効果が得られるが、それには宿主の免疫応答の抑制が関わっていることが示唆された。

NIAS-Bm-aff3 細胞におけるバキュロウイルス感染

○松田(今井) 典子・勝間 進 (東大農)

チョウ目昆虫のモデルであるカイコでは、卵巣由来の BmN-4 をはじめ、様々な培養細胞が樹立されている。本研究では、カイコ脂肪体細胞由来の NIAS-Bm-aff3 (以下 aff3) のバキュロウイルス感染時の性状について解析を行った。

バキュロウイルスの一種である *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* (BmNPV) はカイコを宿主とするウイルスである。BmNPV は、個体への感染においては組織特異性を示し、脂肪体が主な増殖の場となることが知られている。そこで、脂肪体細胞由来である aff3 に BmNPV を感染させたところ、多角体形成が確認された。よって、ウイルスの遺伝子発現プロセスは最終期まで滞りなく進行しており、BmNPV の宿主となり得ることが明らかになった。しかし、多角体の形状は BmN-4 に BmNPV を感染させた際に形成される多面体の多角体とは異なり、ポリヘドリン遺伝子変異体で産生されるような立方体となった。カイコ幼虫に BmNPV を感染させた際、脂肪体で形成される多角体は多面体の形状となる。したがって、多角体が立方体となるこの形質は、aff3 の培養細胞化の過程で多角体形成に関わる宿主因子に変化が起きたためと考えられる。

一方、BmNPV 感染の際、aff3 は細胞同士が接着し、シート状の構造をとった。BmNPV に近縁の *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) を感染させた場合にも、同様にシート状構造をとったが、多角体は形成されなかった。AcMNPV はカイコを宿主としないウイルスであるが、BmNPV との相同性が非常に高い。このことから、aff3 における感染時の細胞接着は AcMNPV と BmNPV の間で保存された因子で惹起される現象であると考えられる。さらに、UV 照射によって感染性がほぼ失われたウイルス上清を aff3 に接種した場合にもシート状構造の形成が見られたことから、この現象はウイルスの遺伝子発現によるものではないことが示唆された。

BmNPV がコードする Bm96 タンパク質は感染時の徘徊行動を促進する

○疋田弘之¹・國生龍平^{1,2}・松田（今井）典子¹・勝間進¹（¹東大農、²金沢大理工）

バキュロウイルスに感染した鱗翅目昆虫の幼虫は感染末期に行動活性が上昇し、徘徊行動を示すことが知られている。徘徊行動はウイルスの効率的な感染拡大に寄与していると考えられている。しかし、その具体的なメカニズムには不明な点が多い。近年、バキュロウイルスがコードする複数の非必須遺伝子が徘徊行動の惹起に関わることが示されている（Kamita et al., *PNAS*, 2005; Katsuma et al., *J. Virol.*, 2012; Kokusho et al., *J. Gen. Virol.*, 2015）。本研究では、カイコ核多角体病ウイルス（*Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* : BmNPV）とカイコを用いて、BmNPV がコードする *Bm96* 遺伝子の機能解析を行い、Bm96 タンパク質が徘徊行動に関わる新規因子であることを見出した。

Bm96 欠損株 (Bm96D)、および *Bm96* の 5' 側に stop コドンを挿入することでタンパク質の機能を欠失させた株 (Bm96stop) を作製し、カイコ幼虫における表現型を調査した。その結果、Bm96D、および Bm96stop に感染した幼虫では野生株感染幼虫と比べ、体液中の多角体量が多いほか、生存時間が短いことが分かった。また、タイムラプスカメラを用いて感染幼虫の徘徊行動中における移動距離を計測した結果、Bm96D、および Bm96stop に感染した幼虫では野生株感染幼虫と比べ、移動距離が短いことが明らかになった。以上の結果から、Bm96 タンパク質はウイルス感染を負の方向に制御するとともに、徘徊行動を促進する因子であることが示された。