

第 78 回昆虫病理研究会プログラム

1 日時 2021 年 11 月 14 日(日) 13:00~ (12:00 より Zoom で開催します)

2 会場 Zoom にてオンライン開催

事前に講演参加登録済みの方のみ入室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	仲井会長
13:05-14:00	特別講演1 多様な昆虫ウイルスと昆虫を水平伝播する寄生蜂致死遺伝子 (仲井まどか)	座長 岩永幹事
	一般講演1 昆虫病原ウイルス研究	
14:05-14:20	1) 土壌中におけるマイマイガ核多角体病ウイルスの持続性と遺伝的多様性 (佐藤就將)	座長 浜島幹事
14:20-14:35	2) BmNPV 感染カイコ細胞が ARIF-1 を介して形成する二種類の細胞内構造 (國生龍平)	座長 浜島幹事
14:35-14:50	3) BmNPV・BomaNPV 共通祖先型 gp64 を持つ BmNPV T3 のカイコでのウイルス増殖能 (市川綾乃)	座長 浜島幹事
14:50-15:05	4) 培養細胞に潜在感染する <i>Bombyx mori iflavivirus</i> バリエントの性状解析 (長谷川壯太)	座長 浜島幹事
15:05-15:20	5) 北方系ヤブカ類が保有するウイルスの分離 (藤田龍介)	座長 浜島幹事
15:20-15:30	休憩	

15:20-15:30	休憩	
15:30-16:20	特別講演2 ハスモンヨトウの寄主植物に含まれるポリフェノール化合物が <i>Bacillus thuringiensis</i> 製剤の殺虫活性に与える影響 (諫山真二)	座長 浅野幹事
	一般講演2 昆虫病原細菌研究	
16:25-16:40	1)カイコガ由来 BmABCB1 の Cry1Ia に対する受容体機能の解析 (岩渕可奈)	座長 浅野幹事
16:40-16:55	2)マメコガネ成虫における Cry8Da トキシンレセプター (富樫 功)	座長 佐藤前会長
16:55-17:10	3)ダイズシストセンチュウの 2 期幼虫に対する <i>Bacillus thuringiensis</i> 芽胞の作用 (林 裕樹)	座長 佐藤前会長
17:10-17:25	4)アワノメイガ類の近縁 2 種に感染するオス殺しボルバキアのゲノム解析 (室 智大)	座長 佐藤前会長
17:25-17:40	5)オス殺し <i>Wolbachia</i> 感染アワノメイガから生じたオスに関する報告 (福井崇弘)	座長 佐藤前会長
17:40	閉会挨拶	小池副会長

研究会後に、講演中に聞きそびれたことや研究交流をはかるために、談話室を開設しましたので、時間に余裕がある人はそこに集ってください。

<https://spatial.chat/s/Fujidemo>

**第 78 回昆虫病理研究会
特別講演 & 一般講演
要旨集**

特別講演1

多様な昆虫ウイルスと昆虫を水平伝播する寄生蜂致死遺伝子

○仲井まどか(東京農工大農; 著者を代表して)

チョウ目昆虫には、多様な昆虫ウイルスや寄生蜂が天敵として存在する。これらの天敵は、宿主昆虫(あるいは寄主)との進化的軍拡競走を経てそれぞれ天敵としての地位を獲得したと考えられている。しかし、これらの天敵間には、非常に緊密な競争排除のしくみが存在することを発見した。本講演では、その詳細を紹介する。ヤガ科昆虫の天敵であるエントモボックスウイルス(二本鎖DNA ウイルス、以下 EPV)に感染したアワヨトウ幼虫にカリヤコマユバチという寄生蜂が寄生するとその感染虫の体内で寄生蜂の幼虫が致死する。この現象を調べたところ、EPV のゲノムから、寄生蜂に致死活性をもつタンパク質(Parasitoid Killing Factor: PKF)がコードされていることを発見した。見つかった PKF のアミノ酸配列を検索したところ、この PKF のホモログは、EPV のみならず昆虫に感染するバキュロウイルスやアスコウイルスなど様々な DNA ウイルスやシロイチモジヨトウなどヤガ科昆虫のゲノムにも保存されていた。つまり、PKF 遺伝子は、ウイルスと昆虫との間や、異なるウイルスとの間で遺伝子水平伝播していることが推察された。寄生蜂は、種数が多いことでも知られており、チョウ目昆虫を寄主(宿主)として特化したスペシャリストとしての地位を確立したものも多い。寄生蜂は、宿主昆虫にとっては天敵であり、ウイルスにとっては共通の宿主資源(チョウ目宿主)を巡る競争相手である。そのため PKF 遺伝子は、さまざまな昆虫ウイルスと昆虫間で遺伝子水平伝播により移行し、宿主昆虫と昆虫ウイルスの共通の敵である寄生蜂を排除するため保存されてきた可能性がある。シロイチモジヨトウにコードされている PKF の発現を RNA 干渉で抑制すると寄生蜂の死亡率が減少した。今まで昆虫は、主に宿主の細胞性免疫機構によって寄生蜂に対抗しているとされていたが、PKF の発見により体液中に分泌されるエフェクターが寄生蜂への防御機構として働いていることが示された。PKF 遺伝子(*pkf*)の発見は、他にも幾つかのユニークな知見を含むと考えられる。その一つは、宿主以外の生物(寄生蜂)に作用する遺伝子がウイルスにコードされているという点である。一般に、ウイルスにコードされている遺伝子は、通常は宿主に作用する発現調節遺伝子やウイルスそのものの構造タンパク質をコードする構造遺伝子、そして宿主への感染を増進させる補助遺伝子に分けられる。本研究で発見した *pkf* は、補助遺伝子の一種ではあるが、宿主以外の生物、すなわち昆虫ウイルスの競争相手である寄生蜂に直接作用する分子であったという点が珍しい。また、天敵と昆虫の進化的軍拡競走を語る上でもユニークな知見を含んでいる。すなわち、天敵と宿主の軍拡競走は、これまで寄生者と宿主の一对一の関係において議論されてきた。しかし、PKF の発見により、ウイルスと宿主昆虫は、遺伝子水平伝播によって寄生蜂への対抗戦略を獲得したことが明らかになった。このことは、寄生者と宿主の一对一の関係だけでなく、より複雑な生物間相互作用の中での進化的軍拡競走を論じる必要性を物語っている。

一般講演1-1)

土壌中におけるマイマイガ核多角体病ウイルスの持続性と遺伝的多様性

○佐藤就將(農工大農)・Sergey Pavlushin(RAS・STU)・Vyacheslav Martemyanov(RAS)
・澤島拓夫(近大農)・山下恵(農工大農)・井上真紀(農工大農)

マイマイガ *Lymantria dispar* は重要な森林害虫として世界的に知られており、周期的に大発生し、壊滅的な被害をもたらす (Louwe *et al.*, 2004; Inoue *et al.*, 2019; Coleman *et al.*, 2020)。その大発生はマイマイガ核多角体病ウイルス LdMNPV の流行により終息するが (Doane, 1970; Elkinton and Liebhold, 1990; Kurenschikov *et al.*, 2020)、感染の始まりがどこから、どのようにして生じるのかは明らかではない。一般的に LdMNPV が属する Baculovirus は、土壌中で長期間持続することが可能であり (Jaques, 1967; Thompson *et al.*, 1981; Fuxa, 2004)、宿主昆虫はそのような土壌を摂食することで感染する可能性がある (Wesejoh and Andreadis, 1986; Infante-Rodríguez *et al.*, 2016; Hernández-Melchor *et al.*, 2020)。土壌中の LdMNPV がその流行を引き起こす接種源となり得るのか明らかにするために、2020 年に LdMNPV が流行した山梨県において、その流行前後に採集した土壌サンプルを用いた DNA 解析と生物検定を行った。

PCR による検出と土壌を摂食させた生物検定により、流行前の土壌中の LdMNPV が殺虫活性を維持していることが明らかになった。DNA シーケンスにより、流行を経て同一地点の LdMNPV の遺伝的多様性が増加していることが明らかになった。更に、流行前の土壌中の LdMNPV 優占株と、流行時の感染虫内の LdMNPV 優占株の遺伝子型が一致した。これらの結果からは、土壌中の LdMNPV が接種源の一つとして重要であることが示唆された。また、その遺伝的多様性は個体群外からの感染中の流入によって新しい株が導入され、維持されていることが示唆された。

一般講演1-2)

BmNPV 感染カイク細胞が ARIF-1 を介して形成する二種類の細胞内構造

○國生龍平(金沢大理工)・勝間進(東大院農)

一部の病原体は、宿主の細胞骨格システムを利用することで宿主細胞内を移動し、自身の増殖や感染拡大効率を高めている。近年、バキュロウイルスの 3 回膜貫通タンパク質である ARIF-1 (actin rearrangement-inducing factor 1) が宿主昆虫培養細胞において invadosome の形成を誘導することが報告された(Lauko et al., 2021, *Mol. Biol. Cell*)。invadosome は接着細胞が細胞外マトリクスとの境界面に形成する F-actin ベースの構造であり、細胞が隣接する細胞外マトリクスを分解・通過する際に形成される。これまで、我々はカイク核多角体病ウイルス (*Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*: BmNPV) に感染したカイク血球が多数の細胞突起を形成して宿主組織に絡みつくこと、この細胞突起の形成には ARIF-1 が必須であること、そしてこの細胞突起 (ARIF-1 突起) が宿主組織を覆う基底膜に穴を開けて組織内部にウイルス粒子を送り込むことで、感染宿主体内での感染拡大を大幅に促進することを明らかにした (Kokusho et al., 2015, *J. Gen. Virol.*; 國生, 2019, 第 77 回昆虫病理研究会)。一方、ARIF-1 突起は invadosome の定義から外れる特徴を持つため、その形成過程や機能が invadosome とは異なる可能性がある。そこで今回、カイク組織における ARIF-1 の細胞内局在を詳細に観察することで、ARIF-1 突起の特徴を調査した。

今回の実験では、GFP 融合 ARIF-1 を発現する組換え BmNPV をカイク幼虫に接種し、組織を摘出して蛍光免疫染色を行った。まず、気管に付着したウイルス感染血球が形成する ARIF-1 突起を観察したところ、ARIF-1 突起は血球の側方に気管表面に沿うように伸張しており、長さは数 μm ～十数 μm 、幅は 438 nm (中央値) であった。これは、BmNPV のヌクレオキャプシド (長さ約 250 nm、幅約 50 nm) が通過するのに十分な大きさであると考えられる。一方、免疫染色サンプルをスライドガラスで軽く押しつぶし、付着血球を圧碎して観察したところ、気管表面に ARIF-1 のドット状局在 (長径 2.08 μm 、短径 1.58 μm (中央値)) のクラスターが多数見られたことから、これは付着血球が細胞底面に形成した invadosome であると推測された。これらの観察結果から、ARIF-1 は ARIF-1 突起による組織表面への付着と、invadosome による組織内部への侵入という 2 つの異なる役割を持つ細胞構造を誘導できる可能性が示唆された。また、ARIF-1 の凝集はウイルス感染血球だけでなく、ウイルス感染した気管上皮細胞の基底膜側にも見られたことから、バキュロウイルスは ARIF-1 を介して血球から組織内部へとウイルス粒子を送り込むだけでなく、感染組織から血体腔側へ脱出する際にも ARIF-1 を介して invadosome を形成している可能性が考えられる。

一般講演1-3)

BmNPV・BomaNPV 共通祖先型 *gp64* を持つ BmNPV T3 のカイコでのウイルス増殖能

○市川綾乃・関口真理・浅野眞一郎・佐藤昌直(北海道大学農学部)

遺伝子情報格納のキャパシティの小さいウイルスにとって、複数の生物、特定の限られた生物のいずれを宿主とするかは進化における分岐点である。バキュロウイルス属には 85 種のウイルスが属し、それらが感染する 600 種の昆虫が報告されているが、本属のウイルスの多くは宿主範囲が狭く、特定の昆虫に高度に適応進化したと考えられている。様々な環境に対応できる「ジェネラリスト」、特定の環境に特化した「スペシャリスト」に区分すると、多くのバキュロウイルスはスペシャリストであり、*Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV)などの宿主範囲の広いウイルスはジェネラリストである。特定の宿主昆虫への高度な適応進化はその宿主へのフィットネスを高める一方、その宿主以外の昆虫への適応を難しくするため、ジェネラリスト・スペシャリストへの進化にはトレードオフがある。バキュロウイルスが経た適応進化の過程と、このトレードオフの分子生物学的実体は明らかではない。

アルファバキュロウイルスグループ I の膜タンパク質 GP64 は宿主細胞への侵入、子孫ウイルス増殖後の出芽に関与する、宿主との相互作用の鍵因子である。我々はカイコ核多角体病ウイルス (BmNPV) 標準株 T3 (Gomi *et al.* 1999) と北海道大学で分離された株 H4 (Sakai *et al.* 2021) では *gp64* について研究を進めている。両株間で異なる6アミノ酸残基を個別に置換した T3 を作成してウイルス増殖を測定し、このうち特に 172 番目のチロシンからヒスチジンへの置換がカイコ培養細胞での増殖能向上、カイコ個体内での増殖能低下を起こすことを明らかにした (Sekiguchi *et al.* 2020)。この 172 番目のアミノ酸残基はヒスチジンが祖先型であり、H4 以外の BmNPV 系統群では全てチロシンである。これらから、BmNPV に進化する過程でチロシンが獲得され、そして機能的にもカイコでのフィットネスを高めるためにチロシンへの置換が重要な役割を持つことが分かった。一方で、ゲノム配列全体としては T3 に近縁でありながら H4 の *gp64* が 172 番目にヒスチジンを持つこと、H4 がカイコ個体で増殖能が高いことは、H4 の *gp64* が水平伝播によって獲得された可能性と、カイコへの適応前の 172Y を持たない *gp64* が BmNPV でも機能するジェネラリストである可能性が推測された。これらの可能性から我々は *gp64* について進化過程を遡り、*gp64* とカイコへの適応の関係の実験的な解析を試みた。

BmNPV は、クワコ (*Bombyx mandarina*) から分離された核多角体病ウイルスである BomaNPV と近縁であり (Xu *et al.* 2010)、カイコ・クワコ以外の昆虫での感染が観察されていないスペシャリストである。本発表研究では、BmNPV と BomaNPV の共通祖先型 *gp64* 配列を推定し、T3 へ導入した組換え体 (以後、T3-A1*gp64*) で実験を行った。A1GP64 はカイコへの適応進化の前段階の配列であり、T3GP64 と異なるアミノ酸残基が 26 残基、これまでに分離されている BmNPV GP64 からは観察されないアミノ酸残基が 21 残基存在するほか、172 番目のアミノ酸残基がカイコでの増殖能を低下させるヒスチジンである。以上から T3-A1*gp64* は現存株よりカイコ個体内での増殖能が低いと予想された。

T3-A1*gp64* と T3、そして、カイコへの適応への鍵となった Y172H 置換を持つ T3-Y172H のカイコ個体での増殖を体液中のウイルスゲノム量で評価した。T3-A1*gp64* は T3-Y172H よりも個体内での増殖が速く、T3 に近い増殖能を示した。この結果より、A1*gp64* が持つ Y172H 以外の 25 アミノ酸残基の全てあるいは一部の置換がむしろ Y172H によるカイコ個体でのウイルス増殖量低下を緩衝すること、T3 型 *gp64* はカイコへの適応進化の過程で 172H とは親和性の低い独自の配列へと進化したことが推定された。

カイコへの適応進化前の配列である A1*gp64* が未来の宿主であるカイコでも増殖能を備えていることから A1*gp64* は T3 等の現存株よりもジェネラリスト寄りの性質を持ち、T3 の *gp64* はスペシャリスト化が進み、祖先型に戻りにくい状態にあることが推測される。以上の関係性を踏まえ、*gp64* はその配列によってスペシャリスト・ジェネラリストの性質を調整する進化的なトレードオフの鍵因子であると示唆される。

一般講演1-4)

培養細胞に潜在感染する*Bombyx mori iflavivirus*バリエントの性状解析

○長谷川壮太¹、松岡雄介¹、勝間進²、岩永将司¹ (¹宇大農、²東大院農)

イフラウイルスは、ピコルナウイルス目イフラウイルス科イフラウイルス属に属する+鎖 RNA ウィルスである。イフラウイルスのタイプ種はカイコ伝染性軟化病ウイルス(IFV)である。IFV はカイコの中腸皮膜を特異的に侵し、起縮症状や空頭症状を引き起こすことが知られている。近年、イフラウイルスはチョウ目、ハチ目、カメムシ目、またダニ等の幅広い節足動物から単離されており、カイコ蛹においても IFV とは異なる *Bombyx mori iflavivirus*(BMI1) の配列が報告されている。

我々はカイコ胚由来培養細胞(BmVF)のトランスクリプトーム解析(Katsuma et al., DNA Res., 2015)の結果、BMI1 に近縁な類縁性を有するバリエントウイルスを見出した。そこで、本ウイルスを *Bombyx mori iflavivirus variant1* (BmIV1) とし種々の解析を行った。まず、RACE によって BMI1 に 86.1% の相同性を有する全長 10,244 塩基からなる cDNA を得た。RT-PCR の結果、BmIV1 は数種のカイコ由来培養細胞に感染していることが明らかとなった。また、BmIV1 陰性細胞を用いた接種試験によって潜在感染が成立することが明らかとなった。カイコ幼虫への BmIV1 皮下接種では、病徴は認められないものの、血球、及び生殖巣からウイルス RNA が検出され、ウイルス接種個体を交配させた産下卵からウイルス RNA が検出された。更に、孵化幼虫においても、血球、及び生殖巣からウイルス RNA が検出され、BmIV1 はカイコにおいて垂直伝播するものと考えられた。そこで、より詳細に垂直伝播経路を調査するため、卵表面の洗浄試験とウイルスの経口接種試験を行った。その結果、BmIV1 は卵表面から容易に除去されること、そして、経口感染効率が著しく低いことが明らかとなり、本ウイルスは卵内にウイルス粒子が侵入する経卵伝播によって次世代へと感染することが示唆された。

一般講演1-5)

北方系ヤブカ類が保有するウイルスの分離

○藤田龍介 (九大農)・日野真人 (九大農)・永田康祐 (九大農)・浅野眞一郎 (北大農)

昆虫類は実に多様なウイルスを保有しており、その大半は病原性を示さないと考えられている。一方、中には宿主昆虫や他の生物種に対して病原性を示すものもあり、特に人獣に媒介されて感染症を引き起こすものはアルボウイルスと呼ばれている。デングウイルスなどのアルボウイルスは進化的には昆虫特異的なウイルスから派生してきたと考えられているが、そもそもどのような昆虫ウイルスがいるのかについてはほとんど明らかにされていない。特に感染症研究は熱帯・亜熱帯地域を中心に行われており、寒冷地域での知見は特に乏しい。そこで、寒冷地域に生息する蚊がどのようなウイルスを保有しているのかを調べるべく、北海道石狩市で北方系ヤブカ類の捕集と、捕集個体からのウイルス分離を行った。2018年の捕集調査ではアカンヤブカ、チシマヤブカ、トカチャブカ、スジアシエカが計23個体得られた。捕集蚊のRNAおよび培養細胞でウイルス培養を行ったサンプルのNGS解析の結果、24種のウイルス様配列が検出され、9種が培養系で分離された。また、これらのうち16種は新規ウイルスであった。得られたウイルスの中には既知ウイルス分類群と類縁性を示さないものや、植物ウイルスとの関連を示すものなど、他に見られない特徴が多く見られ、北方系ヤブカ類のもつウイルス多様性の一端が示された。

特別講演2

ハスモンヨトウの寄主植物に含まれるポリフェノール化合物が *Bacillus thuringiensis* 製剤の殺虫活性に与える影響

○諫山真二(住友化学(株))、鈴木岳、仲井まどか、国見裕久(東京農工大農)

Bacillus thuringiensis(Bt)はグラム陽性の芽胞形成細菌で、芽胞形成時に昆虫に特異的な殺虫性結晶タンパク質(Insecticidal Crystal Protein:ICP)を産生する。本研究では Bt 剤のチョウ目害虫に対する殺虫活性が寄主植物によって異なる要因とその作用機作を究明するとともに、殺虫活性が低下する寄主植物での Bt 剤の効果の増強法について検討した。

まず、広食性害虫であるハスモンヨトウ(ハスモン)を供試して、キャベツ、イチゴおよびチャを寄主植物とした場合の Bt 剤の殺虫活性を調査した結果、殺虫活性は、キャベツと比べてイチゴとチャで有意に低下した。先行研究では、寄主植物由来のタンニンが Bt 剤の殺虫活性の低下に関与している可能性が示唆されている。タンニンは植物由来のポリフェノール化合物のうち皮を鞣す性質を示す化合物群の総称であり、タンパク質と凝集する性質がある。そこで、タンニンの標準試薬であるタンニン酸と没食子酸を用いて、ハスモンに対する Bt 剤の殺虫活性に及ぼす影響を評価した。その結果、タンニン酸は濃度依存的に Bt 剤の殺虫活性を有意に低下させたが、没食子酸は Bt 剤の殺虫活性に影響を与えなかった。この結果から、タンニンの Bt 剤の殺虫活性に対する影響は、タンニンの種類によって異なることが示唆された。

イチゴとチャに含有されるポリフェノール化合物を 51 種類のポリフェノール化合物を標品としたマルチチャンネルクローアレイ法で分析した。その結果、イチゴでは 15 種類、チャでは 19 種類のポリフェノール化合物が同定された。これらのポリフェノール化合物が Bt 剤の殺虫活性に及ぼす影響をハスモンに対して調査したところ、(+)*Catechin*、(-)*Epi-Gallo-Catechin-Gallate* (EGCG)、(-)*Epi-Catechin-Gallate* (ECG)、(-)*Epi-Gallo-Catechin* (EGC)などのカテキン類が主に Bt 剤の殺虫活性を有意に低下させた。Bt 剤の殺虫活性の低下が認められたイチゴ由来の(+)*Catechin*、*p-Coumaric acid*、*Quercetin* のイチゴ葉での含有量は、殺虫活性の低下に必要なポリフェノール化合物量と比べて著しく少なかったことから、イチゴでは、これら 3 化合物以外の未同定のポリフェノール化合物が殺虫活性の低下に関与していることが推察された。一方、チャ葉には EGCG、ECG、EGC などのカテキン類が Bt 剤の殺虫活性を低下させるのに十分量が含まれていると推察された。

タンニン酸による Bt 剤の殺虫活性低下の作用機作についてハスモンを供試して調査した。ICP とタンニン酸の混合液をハスモン幼虫の中腸消化液で処理した後、SDS-PAGE で分析したところ、130kDa の ICP から 60kDa の活性化殺虫タンパク質(Active Insecticidal Protein: AIP)への消化が阻害された。また、AIP とタンニン酸の混合液を顕微鏡観察した結果、不溶性の凝集物が観察され、タンニン酸の濃度に依存して凝集物が肥大化した。さらに、ハスモンの中腸上皮細胞の刷子縁膜小胞(Brush Border Membrane Vesicle:BBMV)への AIP の結合性に与えるタンニン酸の影響をウェスタンブロット法で調査した結果、タンニン酸は濃度依存的に AIP の BBMV への結合を阻害し

た。以上のことから、タンニン酸が ICP の活性化を阻害すること、およびタンニン酸が AIP の BBMV への結合を阻害することが殺虫活性低下の原因であると判断された。

タンニンとの結合性が高いポリエチレングリコール(PEG)を Bt 剤に添加してイチゴでのハスモンに対する殺虫活性を葉浸漬試験で評価したところ、殺虫活性は Bt 剤単独処理に比べて有意に上昇した。また、Bt 剤、タンニン酸、PEG の混合順序を変えて作製した 3 種混合液のハスモンに対する殺虫活性について小滴飲下法を用いて調査したところ、殺虫活性は、Bt 剤とタンニン酸を先に混合した後に PEG を混合した区と比べて、タンニン酸と PEG を先に混合した後に Bt 剤を混合した区および Bt 剤と PEG を先に混合した後にタンニン酸を混合した区で有意に高かった。このことは、PEG がタンニン酸に優先的に結合することにより、タンニン酸による ICP の活性化阻害や AIP の BBMV への結合阻害を免れたことが原因であると考えられた。

本研究により、特定の寄主植物での Bt 剤のハスモンに対する殺虫活性が低下する要因は、寄主植物に含まれる一部のポリフェノール化合物が関与していることが明らかとなった。この殺虫活性低下は、ポリフェノール化合物が ICP あるいは AIP と凝集することにより、ICP の昆虫中腸内での活性化を阻害すること、および BBMV にある受容体と AIP との結合を阻害することが原因であると考えられた。さらに、これらの阻害活性はポリフェノール化合物と結合性の高い PEG を Bt 剤に混合することにより低減できることを解明した。

一般講演2-1)

カイコガ由来 BmABCB1 の Cry1Ia に対する受容体機能の解析

○岩渕可奈(農工大 BASE)・阿出川さとみ(農工大 BASE)・李校一(農工大 BASE)・田村春香(農工大 BASE)・渡部賢司(農研機構生物研)・宮本和久(農研機構生物研)・佐藤令一(農工大 BASE)

土壌細菌 *Bacillus thuringiensis* が産生する Cry 毒素は、宿主特異的な活性を持ち、微生物殺虫剤、遺伝子組み換え作物に幅広く利用されてきたタンパク質である。近年、一部の Cry 毒素と昆虫の関係において ABC トランスポーターが主要な受容体として機能することが示されるとともに、分子系統樹上の両端にある Cry 毒素がともに ABC トランスポーターを受容体として利用していることが明らかになった。このことから我々は「すべての Cry 毒素は ABC トランスポーターを受容体として利用する」という仮説を立てた。この仮説検証の一環として、受容体未解明の Cry 毒素への ABC トランスポーターの関与を調査することを目的に、ABC トランスポーターファミリー B1(BmABCB1)をノックアウトしたカイコガ幼虫を用い、いくつかの Cry 毒素に対する感受性の変化を確かめたところ、Cry1Ia に対する感受性が著しく低下することが明かとなった。そこで本研究では、BmABCB1 が Cry1Ia に対して受容体としての機能を持つか否かを検証することを目的とし、BmABCB1 を異種発現させた培養細胞 HEK293T 細胞を用いた感受性試験と、分子間の結合親和性解析を行った。

培養細胞 HEK293T を用いた感受性試験では、BmABCB1 を発現した HEK293T 細胞が 1nM の Cry1Ia 毒素に対して宿主昆虫の中腸円筒細胞が Cry 毒素に対して示すと同様の膨潤反応を示すことが明かとなった。また、結合親和性解析の結果、BmABCB1 分子と Cry1Ia 分子との結合親和性の指標となる解離定数(KD 値)は、 $7.46 \times 10^{-8} \text{M}$ であると求められた。以上の実験結果から、BmABCB1 は Cry1Ia の機能的な受容体であると結論付けた。

一般講演2-2)

マメコガネ成虫における Cry8Da トキシンレセプター

○富樫 功・佐藤昌直・浅野眞一郎(北海道大学大学院農学院)

マメコガネ (*popillia japonica* Newman) は農業害虫として農作物に大きな被害をもたらしている。現在昆虫に特異的で環境負荷の少ない生物防除資材として、*Bacillus thuringiensis* (BT) が広く利用されている。マメコガネに対する当研究室保存の BT 株のスクリーニングが行われ、幼虫ならびに成虫に殺虫活性を示す株として *galleriae* SDS-502 株が選抜された。この株由来の Cry8Da トキシンが幼虫ならびに成虫に対する殺虫活性を有することが明らかになった (Yamaguchi *et al.* 2008)。マメコガネ中腸における Cry8Da トキシンのレセプターが探索され、幼虫と成虫では同様に消化液でプロセッシングを受けるが、それぞれが中腸上皮組織上に存在する別のタンパク質と結合していることがわかった。成虫での Cry8Da トキシンとの結合タンパク質は β グルコシダーゼ (APjbGlu) であった (Yamaguchi *et al.* 2013)。Cry8Da の殺虫活性への APjbGlu の関与について、大腸菌で発現した APjbGlu と Cry8Da 活性断片が結合すること、AcMNPV ベクターを用いた APjbGlu 発現 Sf9 細胞に対して Cry8Da トキシンの細胞損傷が上昇することが認められた。しかし、APjbGlu が生体内で Cry8Da トキシンレセプターとして機能し、殺虫に関与しているかは明らかになっていない。そこで、成虫個体を用いた *apjbglu* 遺伝子のノックダウンと、その個体に対してトキシンアッセイを行った。

apjbglu 遺伝子の dsRNA をマメコガネ成虫個体体腔に注射し、中腸を摘出して得た mRNA を用いて qPCR によって転写量を確認した。その結果、体腔への注射で中腸での *apjbglu* 遺伝子転写量を低下させることができた。dsRNA 処理個体に対して、Cry8Da トキシンを含む飼料を作成して摂食させたのち、その摂食量を比較した。未処理個体に比べて処理個体では摂食量の増加が見られた。摂食量比較後の生存個体から中腸を摘出し、中腸由来の mRNA を用いて qPCR をした結果、未処理個体と比較して約 1000 倍程度 *apjbglu* 遺伝子の転写量が低下していた。これらの結果から、生体内でも Cry8Da トキシンのマメコガネ成虫におけるレセプターとして APjbGlu が機能し、その殺虫に直接関与していることが示唆された。今後、ノックダウン個体での中腸と Cry8Da 活性断片との結合を、Brush Border Membrane Vesicle を用いて検証する予定である。

一般講演2-3)

ダイズシストセンチュウの2期幼虫に対する *Bacillus thuringiensis* 芽胞の作用

○林裕樹¹・坪内春太¹・相内大吾¹・富田祐太郎²・浅野眞一郎³・小池正徳* (¹帯広畜産大・²カネコ種苗・³北大院農)

[はじめに]ダイズシストセンチュウ(Soybean cyst nematode 以下 SCN)はダイズの根に寄生する植物寄生性センチュウである。このSCNに有効な生物的防除法は未だ見つかっておらず、その探索が必要とされている。*Bacillus thuringiensis*(以下BT)は芽胞形成細菌であり、芽胞形成時に様々な害虫に殺虫効果を持つ結晶タンパク質を産生する。先行研究により、種子にBT芽胞を処理した緑肥作物は土壤中のSCN密度を低減させることが判明した。そこで本研究では、BT芽胞がSCN二期幼虫の生存率、もしくは移動性に影響を及ぼすという仮説を立て、その効果の検証を目的とした。

[方法]実験にはジャックポット顆粒水和剤、芽室町で分離したMe6-7の二系統のBTを供試した。菌体濃度を調整したBT芽胞懸濁液をSCN二期幼虫に48,96時間暴露し、生存率を検定した。また、芽胞懸濁液を0,45 μ m フィルターろ過し芽胞を除去した芽胞ろ液を作成し、同様の試験を行った。

[結果と考察]48,96時間BT芽胞懸濁液を暴露された二期幼虫は対照区と比較して有意に高い不活性率を示した。同様にBT芽胞ろ液を暴露した場合にも、SCNの二期幼虫の著しい移動性の低下が確認された。このBT芽胞ろ液を100℃で10分間加熱したところSCNに対する活性が消失した。これらのことから、BT芽胞の産生するタンパク質がダイズシストセンチュウの二期幼虫の運動性を低下させる効果を持つことが判明し、それが芽胞の産生した結晶タンパク質や酵素の作用によるものである可能性が示唆された。

一般講演2-4)

アワノメイガ類の近縁 2 種に感染するオス殺しボルバキアのゲノム解析

○室智大(東大院農)・疋田弘之(東大院農/京大化研)・藤井毅(摂南大農)・木内隆史(東大院農)・勝間進(東大院農)

チョウ目ツトガ科のアワノメイガ類においては、細胞内共生細菌ボルバキアの感染により、オス特異的致死現象(オス殺し)が引き起こされる。共生細菌による生殖操作メカニズムや宿主-共生細菌相互作用の進化を明らかにするためには、基礎的知見としてゲノム情報が必要である。本研究では、アワノメイガ *Ostrinia furnacalis* とアズキノメイガ *O. scapulalis*、それぞれに感染するオス殺しボルバキアのゲノム解析を行った。

上記2種の感染系統の卵巣から得たDNAを用いてlong readとshort readのシーケンシングを行い、オス殺しボルバキア2系統の完全ゲノムを決定した。得られたゲノムはアワノメイガ共生ボルバキアが1,321,828 bp、アズキノメイガ共生ボルバキアが1,320,340 bpであり、両者間には非常に高いホモロジーが観察された。一方、大域に及ぶ複数の逆位が確認され、頻繁にゲノム再編成が生じていると考えられた。また、各宿主のミトコンドリアゲノムの解析を行ったところ、これら2種の感染系統は健全(非感染)系統とは異なる特徴的なハプロタイプを共有していた。*Ostrinia*属各種のミトコンドリアゲノムと合わせた分子系統解析により、感染系統のミトコンドリアハプロタイプの起源は *Ostrinia*属の近縁種群の分岐前に遡ると推定された。以上の結果より、ボルバキア感染が近縁種群の分岐前に成立し、最近になってアワノメイガ-アズキノメイガ種間のintrogressionによる感染移動があったとする進化史モデルを提唱する。

一般講演2-5)

オス殺し *Wolbachia* 感染アワノメイガから生じたオスに関する報告

○福井崇弘¹・室智大¹・廣田加奈子¹・富原健太¹・藤井毅²・勝間進¹(1: 東大農・2: 摂南大)

チョウ目昆虫のアワノメイガ *Ostrinia furnacalis* およびその近縁種であるアズキノメイガ *O. scapularis* においては、細胞内共生細菌 *Wolbachia* の感染による「オス殺し」現象が知られている。オス殺しとは、感染母蛾から垂直伝播した病原体がオス子孫のみを殺すことにより、次世代としてメスのみが生じる現象のことである。我々はこれまでに、*Wolbachia* に感染したアワノメイガのメスを野外から採集し、その後代において、オス殺しが少なくとも 60 世代に渡って起こることを確認した。オスは稀に生じたが、ごく少数であった。今回、新たに野外から採集した感染アワノメイガのメスを飼育したところ、オス子孫が高い割合で生じたので、これに関して報告する。

野外採集により、*Wolbachia* に感染したアワノメイガのメスを得た。*Wolbachia* 感染の有無は *Wolbachia surface protein(wsp)* の PCR 増幅によって診断し、種同定はフェロモン腺のヘキサシロ抽出物の質量分析により行った。この感染メスの子孫(第一世代とする)は全てメスであった。さらに、*wsp* の部分配列が既報のオス殺し *Wolbachia* のものと同一であったことから、この系統においてはオス殺しが引き起こされていると結論した。第一世代のメスを非感染オスと交配させたところ、第二世代としてメス 57 匹とオス 30 匹が生じた。第二世代においてはメスのみが *Wolbachia* に感染しており、オスは全て非感染であったことから、第二世代においては一部のオスが *Wolbachia* 感染を免れ、オス殺しを回避したと考えられた。次に、第二世代の雌雄を兄妹交配し、1 母蛾ごとに第三世代の性比を調査したところ、雌雄両方が生じる場合と、メスのみが生じる場合が観察された。この現象は、第二世代のメスを別系統の非感染オスと交配させた場合にも再現されたことから、交配に用いたオスではなく、母蛾がその原因であると考えられた。

感染メスからオスが産まれるという現象は、人為的に *Wolbachia* の密度を低下させた場合にも観察される(Kageyama et al., 2003; Sugimoto et al., 2015)ことから、今回オスが生じたのは、母蛾の体内における *Wolbachia* 密度が低下し、それに伴って垂直伝播効率が低下したためであると考えられる。また、第三世代では、*Wolbachia* 密度の低い(雌雄両方を産む)母蛾から、密度の低い(雌雄両方を産む)子孫と、密度の高い(メスのみを産む)子孫の両方が生じたと解釈できる。今後、このような *Wolbachia* 密度の遷移を qPCR 法により定量的に確認することで、例えば *Wolbachia* が増殖フェーズに入るための密度域値の存在など、*Wolbachia* の伝播様式に関する考察ができるだろう。