

第 80 回昆虫病理研究会プログラム

会 期：2023 年 12 月 2 日(土) 13:00~16:05

場 所：オンライン (Teams)

タイムテーブル：

開始時間	講演 番号	講演題目と演者	担当者
13:00		開会挨拶	会長 仲井まどか
13:05	O-1	シロイチモジヨトウ PKF 遺伝子の機能解析 ○右田 陽・伊藤克彦・仲井まどか (農工大院農)	座長 池田素子
13:20	O-2	AcMNPV 感染カイコ細胞におけるリボソーム RNA 分解断片の 配列解析 ○原屋正龍・池田素子・浜島りな (名大院生命農)	座長 右田 陽
13:35	O-3	BmNPV の増殖抑制に関与するカイコ DHX9 の下流因子の探索 久土目奈央・池田素子・○浜島りな (名大院生命農)	座長 原屋正龍
13:50	O-4	コード領域に隠された <i>polh</i> mRNA 量を規定する配列の同定 ○勝間 進・松田 (今井) 典子 (東大院農)	座長 浜島りな
14:05	O-5	カイコ濃核病ウイルス 1 型のカイコへの病原性と抵抗性遺伝子 <i>Nid-1</i> の抵抗性機構の調査 ○伊藤克彦・横山 岳 (農工大院農)	座長 勝間 進
14:20		休 憩	
14:30		【特別講演】 私の Cry 毒素受容体研究史 佐藤令一 (東京農工大学名誉教授)	座長 池田素子
15:30	O-6	Cry タンパク質の毒性を説明する数理モデルの提案 ○遠藤 悠 (理研 CBS)	座長 伊藤克彦
15:45	O-7	The insect pathology and genomics lab: toward to insect pathogen genomics ○Yu-Shin Nai (National Chung Hsing University, Taiwan)	座長 仲井まどか
16:00		閉会挨拶	副会長 浅野眞一郎

特別講演及び一般講演要旨集

特別講演

「私の Cry 毒素受容体研究史」

佐藤令一（東京農工大学名誉教授）

私の Bt 研究は 1990 年代に始まり、その一つが Cry 毒素受容体研究であった。漠然としていたが、受容体研究が「Cry 毒素に限られた範囲の昆虫だけを殺す仕組みや Cry 毒素の進化の仕組みの理解」に最も重要であり、その結論にはきっと応用価値があるだろうと思ったからである。当時の段階は、まずは Cry 毒素が結合する対象分子をカイコ中腸の微絨毛から探し出すことであった。様々なグループが条件を工夫して結合対象分子の単離を目指したが、当初とれてきたものは主に 2 種類であった。あるグループはアミノペプチダーゼ N (APN) を精製し、あるグループはカドヘリン様タンパク質 (カドヘリン) を単離し、我々も遅ればせながらカイコから APN を捕まえた。やがて広島大学の永松先生が培養細胞を用いた異種発現系を使って Cry 毒素の毒性発現を誘導する機能 (受容体機能) がカドヘリンにあることを明らかにした。同じ方法では進歩を打ち出せないで、我々は APN とカドヘリンの、どちらの抗体が実際にカイコの中腸円筒細胞の膨張を阻害するかを調べた。しかし、残念なことに結果はカドヘリンだった。そうこうしているうちに、2000 年代に入り、広がりだした Cry1 毒素抵抗性害虫の抵抗性支配遺伝子の解析が始まり、最初にとれてきたのはまたもカドヘリンだった。しかし、結果は単純ではなく、2010 年には同じ抵抗性個体群から ATP-binding cassette transporter subfamily C2 (ABCC2) が捕まった。このことは、カドヘリンと ABCC2 の両方が感受性を決めている分子である事を意味しているが、その意味と理由に気づくには我々の研究成果を待つ必要があった。貧乏研究室だったので遅れたが、その後我々もようやく異種発現系を使えるようになり、ABCC2 の受容体機能を調べたところ、カドヘリンの 1000 倍も高いことが明らかにあった。しかし同時に、ABCC2 とカドヘリンの両者が存在すると、それらは相乗的に働き、受容体機能は更に 10 倍近く上がることが明らかになった。すなわち、昆虫個体においては両者は相乗的に機能して感受性決定に関わっており、それゆえに ABCC2 とカドヘリンの両方が抵抗性の原因になったのである。また、アフリカツメガエルを使った異種発現系で、ABCC2 が Cry1Aa にイオンチャンネル形成誘導することが明らかになり、これまで示されてきた Cry 毒素の作用機構が分子のレベルで再確認された。その後、世界の興味は「どの Cry 毒素サブファミリーも ABC 分子を受容体として使っているか」に移り、Cry3 が ABCA2 を、また Cry2 が ABCB1 を使っていることが報告された。我々は農研機構の渡部さんと組みすぐに後を追ひ、結合親和性評価系、異種発現系、ノックアウトカイコのアッセイをセットにして解析し、2020 年から、Cry1Ba、Cry1Ia、Cry9Aa と Cry2Aa に対してそれぞれ ABCB1 と ABCA2 が高い結合親和性を基にして受容体として機能し、感受性を決定する役割を果たし

ていることを明らかにした。また、Cry1 毒素が様々に ABCC2、ABCC3 とカドヘリンを組み合わせて感受性決定因子にしていることを明らかにした。こうして、多くの Cry 毒素が ABC を主要な受容体になっているのだろうと想像されるにいたった。そこでさらに、異種発現系を使って、6 種類の BmABCC のサブファミリーの中に Cry 毒素が使える受容体を探してみた。その結果、一つの毒素は 1 から 3 種類の BmABCC を、感受性決定因子としては使えないながらも、弱い受容体機能を発揮する分子（低機能受容体）として使えることが示唆された。一方、Cry1Aa のドメイン II ループ領域が作る受容体結合部位は、BmABCC2 ばかりかカドヘリンにも結合した。よって、Cry 毒素が多様な ABC やカドヘリンさえも受容体にするようになった背景は、この結合部位の様々な分子に結合できる広い結合能力にあると考えられた。カイコの中腸には 45 種類の ABC が発現している。これらのことから、「カイコを殺す Cry 毒素のそれぞれは、広い結合能力を基にして、中腸で 7 から 20 種類にも及ぶ ABC を低機能受容体として使っており、その中で特に結合親和性が高いものを、いわゆる本物の受容体（感受性決定因子）として使うように進化した」という構図が考えられた。この仮説は、Cry 毒素を自在に進化させ、抵抗性問題の解決や作用範囲創生拡大にものをいう楽しみな応用性につながっている。たとえば、進化分子工学により低機能受容体に対する結合親和性を向上させたならば Cry 毒素に新たな殺虫性を作り出すことができるはずである。以上のように、道半ばとは言え、私の Cry 毒素受容体研究は、当初の目的をある程度は達成したようである。

0-1 シロイチモジヨトウ PKF 遺伝子の機能解析

○右田陽・伊藤克彦・仲井まどか（農工大・農）

チョウ目に感染するいくつかのウイルスのゲノムには *PKF* (*Parasitoid Killing Factor*) と呼ばれるタンパク質がコードされており、昆虫ポックスウイルス由来の *PKF* は寄生蜂の幼虫を致死させることが知られている。一部のチョウ目昆虫にも *PKF* がコードされており、チョウ目とウイルスの間で *PKF* の水平伝播が起きたと推測されている。ヤガ科のシロイチモジヨトウ *Spodoptera exigua* のゲノムには *PKF* がコードされており、シロイチモジヨトウの体液はアワヨトウを宿主とするカリヤコマユバチ *Cotesia kariyai* の幼虫に対して致死活性を有する。*RNAi* による *PKF* の発現抑制を行った幼虫の体液では寄生蜂に対する致死活性が低下することから、シロイチモジヨトウの *PKF* がカリヤコマユバチの幼虫の致死に関与している可能性が示唆されていた。しかし幼虫の体液中に *PKF* 以外の寄生蜂致死因子が存在するかは不明であった。

本研究ではこの疑問を明らかにするために、ゲノム編集により *PKF* をノックアウトしたシロイチモジヨトウを作出した。また、その体液のカリヤコマユバチ幼虫、寄生蜂培養細胞 (*CK1*) に対する毒性を調べた。その結果、*PKF1* ノックアウト系統は野生型と比較して、カリヤコマユバチ幼虫に対する体液の毒性が大きく低下した。また、*PKF* のノックアウトにより体液の寄生蜂培養細胞 (*CK1*) に対するアポトーシス誘導活性が失われ、体液中の寄生蜂に対して強い毒性を有する因子は *PKF* のみであることが明らかになった。

O-2 AcMNPV 感染カイコ細胞におけるリボソーム RNA 分解断片の配列解析

○原屋正龍・池田素子・浜島りな (名大院生命農)

核多角体病ウイルス (Nucleopolyhedrovirus, NPV) は、一般に高い宿主特異性を持つ。カイコにおいては、カイコ NPV の感染は許容されるが、*Autographa californica* MNPV (AcMNPV) の感染は許容されない。先行研究により、カイコ細胞は AcMNPV の感染に対して、自身のリボソーム RNA (rRNA) を分解すること、rRNA 分解の誘導には AcMNPV の持つ P143 タンパク質 (Ac-P143) が関与することが明らかになっている。しかし、その分子機構はほとんど明らかとなっていない。本研究では、rRNA 分解の誘導を担う分子機構の解明を目的として、AcMNPV 感染カイコ細胞における rRNA の配列解析を行った。

カイコ細胞から抽出した RNA の電気泳動解析を行うと、18S rRNA と、hidden break により切断された 28S rRNA (28Sa, 28Sβ) が、3 本の主要なバンドとして観察される。一方で、AcMNPV 感染カイコ細胞では、主要なバンドが減少し、新たに約 1400 nt の rRNA の分解断片が検出される。これは、rRNA が常に特定の分解を受けていることを示唆している。そこで、分解を受ける rRNA の種類と、その分解断片の配列を同定するため、AcMNPV 感染後 0 時間と 24 時間のカイコ細胞から抽出した total RNA をテンプレートに 5' RACE、3' RACE を行い、それぞれの RACE 産物のアガロースゲル電気泳動解析により、18S、28Sa、28Sβ rRNA の 5' 末端領域、3' 末端領域をそれぞれ調査した。その結果、AcMNPV 感染後 24 時間の 28Sβ rRNA の 5' RACE において、感染後 0 時間と比較して、切断されていない 28Sβ の推定サイズのバンドの減少と、推定サイズよりも約 700 bp 小さい、分解断片と推定されるバンドの出現が認められた。一方で、AcMNPV 感染後 24 時間の 18S、28Sa rRNA の 5' RACE では、感染後 0 時間と比較して、バンドのパターンに差は見られなかった。また、3' RACE では、18S、28Sa、28Sβ rRNA のいずれにおいても、感染後 0 時間と比較して、感染後 24 時間のバンドのパターンに差は見られなかった。さらに、28Sβ rRNA の 5' RACE で認められた、分解断片由来と推定される RACE 産物をクローニングし、シーケンス解析を行った結果、28Sβ rRNA の 5' 末端から 715 塩基が欠失した配列であることが確認された。これらの結果から、AcMNPV 感染後 24 時間のカイコ細胞では、28Sβ rRNA の 5' 末端から 715 塩基が分解されていること、18S、28Sa rRNA の 5' 末端領域、18S、28Sa、28Sβ rRNA の 3' 末端領域は分解されていないことが示唆された。今後は、分解を受けている 28Sβ rRNA の 5' 末端領域付近に存在するリボソームタンパク質を解析し、rRNA 分解とリボソームタンパク質の関係を調査しようと考えている。

O-3 BmNPV の増殖抑制に関与するカイコ DHX9 の下流因子の探索

久土目奈央・池田素子・○浜島りな (名大院生命農)

核多角体病ウイルス (nucleopolyhedrovirus, NPV) は、バキュロウイルス科に属する昆虫病原性の DNA ウイルスである。NPV の感染に対して、昆虫細胞は、様々な抗ウイルス応答を誘導する。一般に、抗ウイルス応答の誘導は、ウイルス由来の核酸が宿主のパターン認識受容体 (PRR) によって認識されることで開始するが、昆虫において、ウイルス感染の認識から抗ウイルス応答誘導までの一連の分子機構はほとんど明らかにされていない。我々は、これまでに、ヒトにおいてウイルス由来 DNA の認識に機能することが報告されている PRR のカイコ相同体の機能解析を行い、ヒト DHX9 のカイコ相同体 (Bm-DHX9) がカイコ NPV (BmNPV) の増殖抑制に関与することを見出した。本研究では、Bm-DHX9 による BmNPV 増殖抑制の分子機構を明らかにすることを目的として、Bm-DHX9 の下流で機能する因子の探索を行った。

ヒトにおいて、DHX9 は、ウイルス由来 DNA 認識後、アダプター因子 MyD88 と相互作用し、NF- κ B ファミリー転写因子の活性化を引き起こすことで抗ウイルス応答を誘導する。そこで、Bm-DHX9 の下流因子の候補として、MyD88 のカイコ相同体 (Bm-MyD88) とカイコにおける NF- κ B ファミリー転写因子 (Bm-RelA/B、Bm-Relish1/2) に着目し、これらの因子が BmNPV の増殖抑制に関与するかどうかを調査した。まず、*Bm-MyD88*、*Bm-RelA/B*、*Bm-Relish1/2*、コントロールとして *egfp* または *Bm-DHX9* に対する dsRNA を soaking RNAi 法によってカイコ細胞に導入することで、それぞれの因子をノックダウンした。dsRNA 導入後 96 時間に、*dsRed* をレポーター遺伝子として保有する BmNPV (*dsRed*-BmNPV) を感染多重度 0.01 で感染させ、0、24、48、72、96、120 時間において蛍光顕微鏡観察を行った。その結果、*Bm-MyD88*、*Bm-RelA/B* および *Bm-Relish1/2* のノックダウンは、*dsRed*-BmNPV の増殖に影響を与えないことが示された。これらの結果から、Bm-DHX9 の下流で機能する経路は、ヒト DHX9 の場合とは異なる可能性が示された。

0-4 コード領域に隠された *polh* mRNA 量を規定する配列の同定

○勝間進・松田（今井）典子（東大院農）

アルファバキュロウイルスは、感染末期にチョウ目昆虫の細胞核内に大量の多角体を形成する。多角体はポリヘドリン (POLH) と呼ばれるタンパク質で構成されているため、多角体の大量産生には POLH が大量に発現・蓄積する必要がある。これまでの研究で、*polh* 上流のプロモーターや爆発的転写に必要なバースト配列は同定されているが、*polh* 配列自体がその転写や翻訳にどのように関与しているのかはほとんど未解明である。本研究では、*polh* のコドンに宿主であるカイコに合わせたカイコ核多角体病ウイルス (T3-CO) を作成し、野生型ウイルス (T3-WT) と性状比較を行った。T3-CO は T3-WT とほぼ同数の多角体を産生したが、多角体の大きさは小さくなっていた。これは POLH 蓄積量の減少によるものであったが、その減少は意外にも翻訳レベルではなく、*polh* mRNA の低下によるものであった。そこで、T3-CO と T3-WT のキメラウイルスを作成し、それぞれのウイルスの性状解析を行ったところ、*polh* mRNA 量に関与する *polh* 領域を 30 塩基に絞り込むことに成功した。レポーターアッセイの結果からも、この 30 塩基が *polh* プロモーター依存的な *polh* 超発現を維持するのに必要であることが示された。今後はこの領域と相互作用する転写マシナリを解明していく予定である。

0-5 カイコ濃核病ウイルス 1 型のカイコへの病原性と抵抗性遺伝子 *Nid-1* の抵抗性機構の調査

○伊藤克彦・横山 岳（農工大院農）

カイコ濃核病ウイルス 1 型は、パルボウイルス科デンソウイルス亜科に所属するウイルスで、カイコの中腸に特異的に感染した後、中腸を破壊しカイコを致死させる。このウイルスの感染の成否は、宿主カイコがもつ遺伝子により決定されており、優性の抵抗性遺伝子 *Nid-1* または劣性の *nsd-1* をもつカイコは、ウイルスの接種量や接種回数をどれだけ増やしても全く感染しない。我々はこれまで両遺伝子の単離・同定に取り組み、*nsd-1* の原因遺伝子がウイルスの感染組織である中腸の内腔側で発現している膜タンパク質であることを突き止めている (Ito et al. 2018)。本発表では、もう一つの *Nid-1* について抵抗性機構の調査と候補領域ならびに候補遺伝子の特定を行ったので報告する。

抵抗性機構の調査にあたっては、*Nid-1* 抵抗性系統にウイルスを接種した後、感染組織である中腸を経時的にサンプリングし、その中からウイルス由来の DNA、転写産物そしてタンパク質が検出されるかどうかを調査した。その結果、ウイルス由来の DNA と転写産物は感染直後には検出されるものの、時間の経過に伴い減少していくことが明らかになった。一方、ウイルス由来のタンパク質は、感染初期から末期まで全く検出されなかった。このことから、*Nid-1* はウイルスが細胞に侵入し、さらにそのゲノムが核内に侵入した後の段階で作用している可能性が強く示唆された (Ito et al. 2022)。

続いて *Nid-1* の原因遺伝子を特定には、ポジショナルクローニングによる候補領域ならびに候補遺伝子の特定を行った。その結果、*Nid-1* の候補領域をカイコゲノム上の約 250 kb 内に絞り込み、その中には 10 個の遺伝子が存在していることを突き止めた。さらにウイルス接種および非接種の *Nid-1* 系統の中腸より mRNA を精製し、RNA-seq による発現遺伝子の比較解析を行った。その結果、両処理区で発現量に優位な差が認められた遺伝子が数多く検出されたものの、10 個の候補遺伝子に該当するものはなかった。現在、ゲノム編集で各候補遺伝子をノックアウトした個体を作成し、それらのウイルス感染性の変化を調査している。

引用文献

Ito K et al (2018) A single amino acid substitution in the *Bombyx*-specific mucin-like membrane protein causes resistance to *Bombyx mori* densovirus. *Sci. Rep.* 8, 7430.

Ito K et al (2022) Resistance mechanism of *Nid-1*, a dominant non-susceptibility gene, against *Bombyx mori* densovirus 1 infection. *Virus Res.* 318, 198849.

0-6 Cryタンパク質の毒性を説明する数理モデルの提案

○遠藤 悠 (理研CBS)

昆虫に対するCryタンパク質の毒性は、中腸上皮細胞上の受容体との相互作用の有無や強弱によって決定されると考えられてきた。これは中腸刷子縁膜小胞 (BBMV) を用いた古典的な結合実験を根拠とするが、個別の受容体との結合親和性から毒性が説明されることはなかった。Cry1Aタンパク質の毒性がABCトランスポーター (ABC) と12-カドヘリンドメインタンパク質 (Cad) の2つの受容体との相互作用により決定されることが明らかになってきた今、Cry1A毒性の定量的な説明が可能はずである。

本発表では、Cryタンパク質の毒性を説明する数理モデルを提案したい。佐藤令一研究室から発表された結合親和性と毒性の全データを解析したところ、「ABC発現細胞に対するCry毒性」と「ABCとCry間の結合親和性」の間に正の強い相関 ($r = 0.89$) を認めた。これはCry毒性がABCに対する結合親和性に強く依存することを示唆する。一方、結合親和性非依存的に毒性に影響する成分も存在し、それは受容体結合後の孔形成効率であると考えられた。そこで、ABCを介したCry毒性は結合親和性と孔形成効率の積をもって表現できるのではないかと考えた。この仮定をもとに、ABCとCadの2分子を介した相乗的毒性のレベルを予測する数理モデルを構築したところ、それはこれまでのin vitroデータと高い相関を示し、決定係数 $R^2 = 0.90$ はモデルの妥当性を裏付けた。これらの結果はCry毒性レベルが物理化学的パラメータで極めて正確に表現できることを示唆しており、他の受容体を介して毒性発揮するCryタンパク質にも拡張可能と考えられる。このモデルのさらなる検証と改良を通じて、Cryタンパク質の作用機構の理解を深め、合理的設計を実現したい。

O-7 The Insect Pathology and Genomics Lab: Toward to Insect Pathogen Genomics

○ Yu-Shin Nai (Department of Entomology, National Chung Hsing University, Taiwan)

Abstract

My laboratory "Insect Pathology and Genomics Lab, IPG", is located at National Chung Hsing University (NCHU), in Taichung City, Taiwan, focuses on three key research dimensions: pathogen diversity, surveillance of beneficial insect pathogen prevalence, and in-depth investigation of host-pathogen interactions through a genomic approach. In terms of pathogen diversity, numerous unidentified insect pathogens are presumed to exist among agricultural pests and other insects in Taiwan. Collaborating with researchers, we actively collect samples of diseased insects in Taiwan for identification and subject to whole genomic sequencing. Additionally, we isolate and select entomopathogenic fungi (EPF) from natural environments' soil to establish the Taiwan Insect Microorganism Resource Database (TIMR-DB). Furthermore, we conduct monitoring of honey bee pathogen dynamics using RNA metagenomics to reveal the honey bee virome in Taiwan. Lastly, the in-depth investigation of host-pathogen interactions involves transcriptomic analysis, 16S metagenomics, and Nanopore sequencing to enhance our understanding of the interaction network between insect pathogens and their hosts, providing insights into pathogen genomics. We welcome researchers and students interested in these research directions for long-term collaboration. Let's together explore the fascinating field of insect pathology!