

### ***Bacillus thuringiensis*からの新規バクテリオシンの探索**

○高橋萌会・畠山吉則・三輪 哲・井村祐二・荒井怜奈・岩野秀俊（日大生物資源応昆研）

バクテリオシンは、細菌が類縁菌の生育を阻止するために産生する抗菌性のペプチドである。ペプチドは生体内でも容易に分解されることから、安全性が高く、抗生物質や化学合成された抗菌剤などの代替となり得る。しかし、既存のバクテリオシンは特定の微生物に由来するもので、種類も少なく、過剰使用による耐性菌の出現が懸念されている。したがって、新たなバクテリオシンの探索が必要である。微生物防除資材として利用されている *Bacillus thuringiensis* の中には、バクテリオシンを産生する株が複数発見されている。また、株ごとに異なる抗菌性を有することから、新規バクテリオシンの検出が期待される。そこで、*B. thuringiensis* を用いた抗菌性評価試験を試みた。本研究では、標準株 39 株および大学構内で分離した 195 株の計 234 株を用いた。抗菌性評価試験の結果、複数の株で指標菌に対する生育阻止円が検出された。また、生育阻止円の大きさや濃淡には株ごとに差異が存在した。そのため、株ごとに異なる種類の抗菌性物質を産生していることが示唆された。中でも、明瞭な阻止円が確認された株の産生物質を調査するために、SDS-PAGE による分画およびゲル活性試験を行った。分画により、産生された抗菌性物質は低分子ペプチドである可能性が示された。

### **乳化病菌 *Paenibacillus popilliae* が産生する殺虫性因子に関する研究**

○川原顕生<sup>1</sup>・飯山和弘<sup>2</sup>・浅野眞一郎<sup>3</sup>・青木智佐<sup>2</sup>（<sup>1</sup>九大院生資環・<sup>2</sup>九大院農・<sup>3</sup>北大院農）

日本在来種であるマメコガネは、欧米諸国等に侵入し、成虫・幼虫ともに害虫化している。マメコガネ幼虫の防除には、乳化病菌 *Paenibacillus popilliae* の芽胞製剤がしばしば利用される。本細菌の殺虫性因子についての詳細は不明だが、芽胞形成時に産生される副胞子小体中のタンパク質のアミノ酸配列をもとに *cry* 遺伝子の 1 つである *cry18Aa1* が確認され、マメコガネに対する殺虫活性への関与が示唆されている (Zhang *et al.*, 1997)。先行研究 (Iiyama *et al.*, 2013) において、*P. popilliae* ATCC14706 の全ゲノムが解読され、塩基配列情報が利用可能となったことから、本研究では、その全ゲノム情報をもとに更なる毒素タンパク質の探索を試みた。その結果、本細菌は *Cry* ホモログを 2 つ、*Vip* ホモログを 6 つ保有することが確認された。そこで、これらの毒素ホモログについて組換え大腸菌を作製し、組換えタンパク質を発現した。*Vip* は *Bacillus thuringiensis* の栄養増殖時に菌体外に分泌されるタンパク質で、チョウ目ならびにコウチュウ目への殺虫活性が知られている。今後は、発現した各種組換えタンパク質をマメコガネ幼虫を用いたバイオアッセイに供試し、殺虫活性を評価する予定である。

### ***Enterobacter* 属細菌が産生するカイコ軟化症状誘導物質の同定およびその利用法に関する研究**

○森下 舞<sup>1</sup>・飯山和弘<sup>2</sup>・増田亮津<sup>1</sup>・門宏明<sup>2</sup>・李在萬<sup>2</sup>・日下部宜宏<sup>2</sup>・青木智佐<sup>2</sup>（九大院生資環<sup>1</sup>・九大院農<sup>2</sup>）

細菌やその代謝産物を生物的防除に用いるためには経口感染することが必要だが、現在知られている種は少なく、経口感染することが可能な新たな昆虫病原性細菌の探索・研究が望まれている。1965年に軟化病罹病カイコから分離された細菌は本特性を有しており（小野ら，1967）、菌体内タンパク質が病原因子として作用していることが示唆された（加藤ら，1981）が、それ以上のことは解明されていない。そこで、本研究ではこの病原因子を同定し、生物的防除資材としての可能性について検討していくことを目的とした。*Enterobacter* sp. 532株の菌体内タンパク質を材料とし、硫酸分画、イオン交換クロマトグラフィーによる分画後、ポアサイズが1,000 kDaの透析膜を用い透析した。透析内液を非変性条件下で電気泳動し、殺虫活性を示すバンドを同定した。本バンドを回収し、SDS-PAGEにより解析した結果、複数のバンドが認められ、殺虫性タンパク質は複合体を形成していることが明らかになった。得られた1バンドをPMF解析したところ、Toxin complex (Tc) の構成タンパク質であることが示唆された。加えて、作出した遺伝子破壊株のカイコへの病原性は喪失した。これらの結果から、*Enterobacter* sp. 532 の病原性においてToxin complex が重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

### チャハマキに感染する3系統の *Wolbachia* が宿主の免疫および繁殖に与える影響

○上田雅俊・仲井まどか・井上真紀（農工大院農）

最も一般的な昆虫共生細菌である *Wolbachia* は細胞質に感染し宿主メスの卵を通して次世代に垂直伝播する。そのため、*Wolbachia* は自身の伝播拡大のために宿主の生殖を操作し感染個体を増加させる、あるいは宿主の適応度を増加させる戦略を採るとされる。後者においては特に応用的側面からハエ目昆虫で *Wolbachia* による宿主へのウイルス抵抗性付与が注目されている。その機構の仮説として *Wolbachia* による宿主免疫の強化が提唱されている。

日本産チャハマキには、分子系統学的に独立した3系統の *Wolbachia* (*wHm-a*, *-b*, *-c*) が共感染する。*Wolbachia* 3重感染、各単独感染、非感染の5系統の免疫形質を調査した結果、フェノールオキシダーゼ (PO) 活性が *Wolbachia* 感染系統のオスで非感染系統に比べて有意に低かったため、*Wolbachia* 感染による免疫の低下が示唆された。しかし、*Beauveria bassiana* と2種の昆虫病原ウイルスに対する感受性には系統間で有意差がなく、*Wolbachia* 感染に伴う PO 活性の低下は宿主の病原感受性に影響しなかった。その理由として、PO 活性が低下した *Wolbachia* 感染系統において、①他の免疫形質の強化・補填、あるいは②免疫コストの他形質への投資の可能性が考えられる。①では全血球数および抗グラム陰性菌活性の誘導能を、②では *Wolbachia* 感染オスが交尾の際にメスへ注入する精包中の精子数を調査したが、どれも系統間に有意差は見られなかった。以上より、繁殖への投資については可能性が低いですが、免疫補填については、さらに真菌やグラム陽性菌に対する免疫応答を調査する必要がある。

### 細菌感染防御反応におけるカイコセルピンの役割について

○芳野大輔<sup>1</sup>・飯山和弘<sup>2</sup>・李在萬<sup>2</sup>・日下部宜宏<sup>2</sup>・青木智佐<sup>2</sup>（<sup>1</sup>九大院生資環・<sup>2</sup>九大院農）

腸内細菌科に属するグラム陰性桿菌である *Serratia liquefaciens* はカイコ *Bombyx mori* に対し

て強い病原性があることが知られている。有用昆虫であるカイコを本菌の感染から防ぐ一方で、本菌の生物的防除資材としての利用可能性を探るためにも、昆虫に対する本菌の病原力因子を特定する必要があった。そこで、トランスポゾン変異株を作製し、病原力を観察したところ、リポ多糖 (LPS) 生合成遺伝子の変異株において病原力の低下がみられた。この変異株を用いてカイコ体液から菌体結合タンパク質を回収し、PMF 解析を行ったところ、野生株に比べ、変異株でのセルピン結合量が増加していた。これより、セルピンが宿主-病原体相互作用において何らかの役割を担っており、LPS が関与することが示唆された (Taira *et al.*, 2016)。

本研究では、細菌感染防御反応におけるカイコセルピンの役割を調べるため、カイコ脂肪体 RNA を用いてシーケンスを行った。その結果、スプライシング箇所の違いによる 3 つのバリエーションが存在することが明らかになった。カイコ-バキュロウイルス系で組換えタンパク質を生産・精製し、プロテアーゼ阻害活性を調べたところ、トリプシン、キモトリプシンに対する特異性が認められた。今後は、カイコ免疫系における 3 つのバリエーションの役割の解明が必要である。

### イチゴ灰色かび病に対する *Bacillus thuringiensis* を用いた防除効果の検証

○松岡拓<sup>1</sup> 山崎蔵亨<sup>1</sup> 林雪絵<sup>1</sup> 相内大吾<sup>2</sup> 浅野眞一郎<sup>3</sup> 小池正徳<sup>1</sup> (<sup>1</sup>帯畜大 環微研・<sup>2</sup>帯畜大アグロメディシンセンター・<sup>3</sup>北大 院農)

イチゴはビニールハウスでの栽培が日本各地で行われており、果実収穫期においてイチゴ灰色かび病 (病原菌 *Botrytis cinerea*) が問題となっている。現在この病気に対して化学農薬による防除が中心に行われているが、耐性菌や感受性低下菌が出現しているため、新たな防除資材が求められている。*Bacillus thuringiensis* (BT) は、昆虫病原性細菌である一方、植物病原菌等の糸状菌への抗菌活性が確認されている。また、本研究室では BT を処理することによりジャガイモ疫病 (病原菌 *Phytophthora infestans*) やトマト萎凋病 (病原菌 *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*) に対して防除効果がみられたため、本研究では BT を用いたイチゴ灰色かび病の防除効果の検証を行った。ビニールハウスで栽培しているイチゴの株に対して BT の懸濁液を株元へ注ぐ処理と、株の葉および果実への塗付処理の二通りの方法で 7 月 13 日から二週間に一度処理した。塗付処理における葉面及び果実の菌数は希釈平板法により決定した。また、ビニールハウス内におけるイチゴ灰色かび病の各処理区間の発病果率を一週間に一度算出した。その結果、株元処理の発病果率は BT 処理区においてコントロール区に対し低い値を示した。これらのことから、BT の *B. cinerea* に対する抗菌活性や BT が植物体の抵抗性を誘導する可能性が示唆された。今後は BT の抗菌活性効果や BT 処理による植物体への抵抗性の誘導など BT の有効性を解明していきたい。

### *Wolbachia* は “羊の皮を被った狼” か？：チャハマキにおけるオス殺しの可塑性と制御機構の探索

○新井大<sup>1</sup>・Shiou-Ruei Lin<sup>2</sup>・水谷哲也<sup>1</sup>・大松勉<sup>1</sup>・仲井まどか<sup>1</sup>・国見裕久<sup>1</sup>・井上真紀<sup>1</sup> (農工大院・農<sup>1</sup>, 台湾茶業改良所<sup>2</sup>)

チャハマキ *Homona magnanima* は東アジアに広く分布するチャ樹害虫であり、RNA ウイルス、*Spiroplasma* および *Wolbachia* (wHm-t) がオス殺しを引き起こす。このうち台湾産チャハマキ由来の

mHm-t は、日本産チャハマキ由来の非オス殺し株 mHm-c と遺伝的に近縁であるが、感染密度は両株間で著しい差異が認められる。そこで演者らは mHm-t のオス殺しに関わる要因を明らかにするため、オス殺しと mHm-t の感染密度との関係および感染が宿主の遺伝子発現に及ぼす影響を調査した。台湾での調査の結果、mHm-t は採集した 92% のチャハマキから検出されたが、オス殺しは mHm-t が高密度で感染していた 47% のチャハマキ系統でのみ生じ、低密度で感染していた 45% のチャハマキ系統では生じなかった。次に mHm-t が高密度感染していた系統のオス胚と mHm-t 非感染系統のオス胚を供試して宿主の遺伝子発現量を調査したところ、mHm-t 高密度感染系統のカイコ Z 染色体遺伝子ホモログの発現量は、非感染系統のその 2 倍であった。さらに両系統間では内分泌系、代謝・解毒に関わる遺伝子群で発現量の差が認められた。以上の結果から、mHm-t が引き起こすオス殺しは感染密度に依存して生じ、高密度感染オスでは遺伝子量補償が破綻していることが示唆された。

### ABC transporter への結合親和性向上をめざす Cry1Aa 変異体選抜系の構築

○横手翔太・王永浩・金承元・阿出川さとみ・佐藤令一（農工大院BASE）

Cry 毒素はある決まった虫を標的とした殺虫性タンパク質である。しかし、裏を返せば、狭い殺虫スペクトルを持つことから殺せる虫も限られている。この問題の解決法として、自在に殺虫スペクトルを操作して Cry 毒素の使用範囲を広げる系の確立が期待されている。Cry 毒素の作用機構の研究では、昆虫自身の持つ受容体への毒素の結合がトリガーとなって虫を殺すことが知られている。また本研究室では、チョウ目昆虫を殺す Cry1Aa においては、昆虫が持つ複数の受容体の中でも ABC トランスポーター C2 (ABCC2) という分子が重要な受容体であることを示してきた。そこで、本研究では ABCC2 に対して毒素の結合親和性を向上させられれば、殺虫活性も向上させられるという仮説の下、ABCC2 結合部位にランダムに変異を入れた Cry 毒素遺伝子群を T7 ファージに発現させ、発現させた毒素群を ABCC2 に作用させて、結合親和性の向上した変異体毒素を提示したファージを選抜する系の構築を目的とした。現在は、実際に毒素変異体を提示したファージ群を使って選抜を行う前に、変異体毒素提示ファージ群に見立てた Cry1Aa 提示ファージと毒素を提示していないファージを一定の割合で混ぜた混合ファージ群から Cry1Aa 提示ファージを、Cry1Aa に結合親和性の高い受容体である ABCC2 を対象にして選抜する「モデル選抜系の確立」を目指している。混合ファージ数における Cry1Aa 提示ファージ数の割合 (Cry1Aa ファージ率) がどれくらい上昇したかをモデル選抜系の評価法とし、現在 1 回の選抜で Cry1Aa ファージ率を 20~30 倍に上昇させることに成功している。

### *Bacillus thuringiensis* の植物病害抑制効果及び植物生長促進効果の検証

富田悠斗<sup>1</sup>・山崎蔵亨<sup>1</sup>・相内大吾<sup>2</sup>・浅野眞一郎<sup>3</sup>・小池正徳<sup>1</sup>（<sup>1</sup>帯畜大院 環微研・<sup>2</sup>帯畜大アグロメディシンセンター・<sup>3</sup>北大院農）

微生物殺虫剤として使用されている *Bacillus thuringiensis* (Bt) の中には植物病害に対して発病抑制効果のある系統や植物生長促進効果のある系統が報告されている。また、*B. thuringiensis* が植物体のトマトの根面にバイオフィルムを形成するほか、植物体に抵抗性を誘導することが報告

されている。そこで、本研究ではこの様な *B. thuringiensis* の複合的な機能に着目し、既存の系統及び既存の微生物資材における新利用法の開発を目的として、BT 処理種子を用いた生長促進効果の検証及びハウスにおける BT 灌注処理による発病抑制効果、生長促進効果の検証を行った。供試菌株にはポット試験において植物病害と植物寄生性線虫に対して被害抑制効果のある BT3 系統 (BT-17、BT-18、BT-20) とジャックポット顆粒水和剤® (アリスタライフサイエンス) を用いた。(実験 1) トマト種子を BT 懸濁液に 24 時間浸漬し、ロールタオルメソッドを用いて根を伸長させ測定した。(実験 2) ハウス栽培においてトマト苗の株元に定期的に BT 懸濁液を処理し、トマト疫病の発病調査及び草丈、果房重量、1 果房当たりの個数、果実 1 個当たりの重量を測定した。実験 1 において、BT 処理種子は対照区と比較して有意に根が伸長した。また、実験 2 では発病抑制、草丈、第 2 果房重量および第 2 果房における果実 1 個当たりの重量がジャックポット処理区において対照区と比較して高い数値を示した。

### **Determined a role of *Bombyx mori* ABC transporter A family member 2 in insect host susceptibility and function as a receptor to *Bacillus thuringiensis* Cry2A toxins.**

○Li Xiaoyi<sup>1</sup>, Kazuhisa Miyamoto<sup>2</sup>, Yoko Takasu<sup>2</sup>, Sanae Wada<sup>2</sup>, Tetsuya Iizuka<sup>2</sup>, Ritsuko Murakami<sup>2</sup>, Kenji Watanabe<sup>2</sup>, and Ryoichi Sato<sup>1</sup> (<sup>1</sup>BASE, Tokyo University of Agriculture and Technology, <sup>2</sup> Institute of Agrobiological Sciences, NARO)

Cry toxin is a kind of insecticidal protein which is produced by a bacterium, *Bacillus thuringiensis* (Bt). It has been used commercially to control insect pests since it is highly active to specific insects and harmless to the environment and human health. However, resistant insect strains have been generated in the field by selection of Cry toxin receptor deficient insects. To overcome this issue, combinational usage of several Cry toxins which use different receptors each other is a reasonable strategy. Cry2A toxins are candidates for the usage in combination with Cry1A toxins since Cry1A resistant strains do not indicate cross-resistance to Cry2A toxins. However, real receptor for Cry2A toxins is unclear. Also, ABCA2 was not sufficiently indicated that as a causative gene to resistant Cry 2A toxins. Moreover, it was not shown function as a receptor to Cry 2A toxins. Thus, in this study, we tried with two methods, genome editing in the silkworm and transient gene expression in HEK293T cells. The genome of ABC transporter A family member 2 (BmABCA2) was edited with Transcription Activator-like Effector-Nucleases (TALENs) to introduce mutation in the loop between Transmembrane VII and VIII, which is the same position mutation sites of the r1 resistance allele of a field-derived Cry2Ab-resistant strain from Australia (Tay et al., 2015), and successfully generated a BmABCA2 truncated strain, A2T14. The results indicated that the susceptibilities of A2T14 are at the same level as that of wild-type (Ringetsu) to Cry1Aa, 1Ca, 1Da, and 9Aa. In contrast, A2T14 showed high levels of resistance to both Cry2Aa and Cry2Ab toxins. On the other hands, in swelling assay with Cry toxins, the HEK293T cells transiently expressing the BmABCA2 showed swelling, a

conferred susceptibility, when they were exposed to 200 nM Cry2Ab. On the contrary, susceptibility to Cry1Aa was not shown in the cells expressing BmABCA2. These results demonstrated that BmABCA2 plays a crucial role in the mechanism of action of Cry2A toxins.

Tay W. T., Mahon R. J., Heckel D. G., Walsh T. K., Downes S., James W. J., ... Gordon K. H. (2015). Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry2Ab is conferred by mutations in an ABC transporter subfamily A protein. PLoS

## マメコガネ幼虫におけるCry8Daトキシンの殺虫活性機構について

○山口真・伴戸久徳・佐藤昌直・浅野真一郎 (北大院農)

*Bacillus thuringiensis galleriae* SDS-502株が有するCry8Daトキシンは、マメコガネ (*Popillia japonica*) 幼虫と成虫に対して、殺虫活性を持つCryトキシンである。マメコガネ幼虫は、芝生や農作物の根を食食し、多大な被害を与える害虫である。Cry8Daトキシンのマメコガネ幼虫殺虫活性機構を明らかにすることで、効果的な防除につながると考えられる。Cryタンパク質の殺虫活性機構において、Cryトキシンと昆虫中腸内に存在する受容体との結合が重要である。マメコガネ幼虫中腸においてアミノペプチダーゼN(以下APN)とCry8Daトキシンが結合する事が判明し、受容体候補分子であると推測した。本研究では、マメコガネ幼虫の*apn*遺伝子(以下*Pjapn*遺伝子)をノックダウンするためのdsRNAを作製し、マメコガネ幼虫に注射し、qPCRにて*Pjapn*遺伝子がノックダウンされるかを調査した。注射4日後に生き残った個体と非注射個体の*Pjapn*遺伝子の発現量をqPCRにて確認したが、明確な差は認められず、今回作成したdsRNAの配列では、ノックダウンが起こりにくいと考えた。現在は、別の配列を標的としたdsRNAを作成し、*Pjapn*遺伝子をノックダウンさせることで、受容体としての機能解析を進めている。

---

### 〈Fungi Poster〉

---

## タバココナジラミ卵の成熟度合が昆虫寄生菌 *Lecanicillium* spp. の感染に与える影響

○石倉鈴風・松崎優・小池正徳・相内大吾(帯畜大 環微研)

演者らはこれまで、*Lecanicillium* spp. がオンシツコナジラミおよびタバココナジラミに対し殺卵効果や早期の殺孵化幼虫効果を示すこと、*Lecanicillium* spp. の菌体自体が卵内に侵入可能であることを明らかにした。しかし、*Lecanicillium* spp. は両コナジラミ卵に対し異なる感染性を示し、その差異は2種間の卵の成熟速度の違いに起因するものと考えられた。そこで本研究ではタバココナジラミ卵の成熟度合が *L. longisporum* および *L. muscarium* の卵への感染性に与える影響を評価することを目的とした。産卵4時間後の未黒色化卵と産卵4日後の完全黒色化卵に *Lecanicillium* spp. 4菌株を接種し、それぞれの孵化率と孵化幼虫の致死率、未孵化卵への菌侵入率を評価した。*Lecanicillium* spp. 接種区において、未黒色化卵の孵化率は対照区に比べ2-15%低下したのに対し、完全黒色化卵では1-4%の低下に留まった。また、未黒色化卵においてのみ孵化遅延効果が確認された。さらに低下した孵化率と同程度の卵内への菌の侵入率が確認された。

*Lecanicillium* spp. はタバココナジラミの孵化幼虫に対し卵の成熟度合に関わらず 90%以上の高い致死率を示したが、未黒色化卵では完全黒色化卵と比較して約1日程度早い半数致死日数を示した。以上の結果からタバココナジラミ卵の成熟度合は *Lecanicillium* spp. の卵および孵化幼虫への感染性に影響を与えることが明らかになった。

## 昆虫寄生菌感染ワタアブラムシの EPG による吸汁行動解析

○細矢千佳・松崎優・小池正徳・相内大吾(帯畜大 環微研)

昆虫寄生菌に感染した昆虫において、熱行動やクライミング行動、移動行動の増加など様々な行動変化を起こすことが知られており、行動変化を利用した防除研究も行われている。感染症媒介昆虫であるハマダラカでは、菌感染により熱や二酸化炭素、色の認識ができなくなり、宿主探索行動が阻害されることから病原体の伝播を抑制することが可能となる。一方、農業害虫の中にも植物の病原体、特に植物ウイルスを媒介する昆虫が存在する。その中でもアブラムシは、半数以上のウイルスを吸汁行動により伝播することから、最重要害虫とされている。そこで、本研究では、ウイルス伝播で重要となるワタアブラムシの吸汁行動が、昆虫寄生菌の感染によりどのように変化するかを調査した。

本研究では微生物防除資材として使用されている Vertalec (*Lecanicillium longisporum*) を用い、菌接種後 0~4 日目ワタアブラムシのバレイショにおける吸汁行動を評価した。吸汁行動の詳細は Electric Penetration Graph システムを用いて各日 1 時間、各吸汁行動の持続時間・回数を計測した。その結果、Vertalec 接種個体では対照区と比較し、探り挿入回数が減少し、吸汁困難および吸汁をしていない時間が接種後日数経過とともに増加することが明らかとなった。これらは、昆虫寄生菌によりアブラムシの吸汁行動を阻害していることを示唆しており、植物ウイルスの伝播効率低下に寄与している可能性が示された。

## 病原力の異なる *Beauveria bassiana* 2 系統を用いたハマダラカ体内での感染動態の比較

○畑中良太<sup>1</sup>・松崎優<sup>1</sup>・小池正徳<sup>1</sup>・嘉糠洋陸<sup>2</sup>・相内大吾<sup>1</sup>(<sup>1</sup>帯畜大・環微研、<sup>2</sup>東京慈恵・熱帯医学)

これまで、昆虫寄生菌の病原性を考える際、多くの研究では病原性を有する系統を用いてその現象を捉えてきた。それらを通じて、宿主体表での分生子発芽の有無などが宿主特異性に関与していることなどが明らかになっているが、低病原性系統がなぜ低病原性なのかについては、着目されてこなかった。そこで、本研究ではハマダラカに対して高い病原力を示す *B. bassiana* 60-2 と、感染力は有するものの病原力が低い *B. bassiana* 2112 の 2 系統を用いて、両系統のハマダラカ体内での感染動態を比較した。*B. bassiana* 2 系統を附節局所的に接種したハマダラカからパラフィン切片を作成し、グロコット染色によって昆虫組織(青)と菌体(黒)を染め分けた。*B. bassiana* 60-2 接種個体では接種後 3 日目からハマダラカ体内において急激な菌体の増殖が見られたが、*B. bassiana* 2112 接種個体では接種後 7 日目において菌体がスポット状でのみに検出された。また、*B. bassiana* 2112 は 血体腔に侵入後、短菌糸状の菌体が凝集しているような構造を作っており、*B. bassiana* 60-2 のような菌糸の伸長は見られない。これまでに、*B. bassiana* の短菌糸はヤブカの血

体腔内において、宿主の免疫機構により一旦静菌化されるものの、菌糸の身長によりそれを打破し、病原性を発揮することが知られている。本研究で見られた高病原力の *B. bassiana* 60-2 の旺盛な菌糸の伸長は宿主免疫に抑制されることなく増殖しており、一方で低病原力の *B. bassiana* 2112 はメラニン化をはじめとする宿主免疫によって封じ込められることで増殖が抑制されている可能性が考えられる。以上の結果から、寄生者側の宿主免疫を打破できるかどうかという要因が、病原性の有無に大きく関係している可能性が示された。

## クロゴキブリに対して高い病原性を示す糸状菌のスクリーニング

○小関晴斗<sup>1</sup>・柳川綾<sup>2</sup>・青木智佐<sup>3</sup> (<sup>1</sup>九大院生資環・<sup>2</sup>京都大生存圏研・<sup>3</sup>九大院農)

クロゴキブリ *Periplaneta fuliginosa* は代表的な家屋害虫で、その防除には主に化学殺虫剤が用いられてきた。しかし、それらによる人への健康被害や標的害虫での抵抗性の発達が懸念されており、新たな防除法の確立が急務とされている。その一つとして、ゴキブリ類に対する昆虫病原性糸状菌の利用が試みられているが、クロゴキブリに対して高い病原性を示す有望な菌株は未だ得られていない。そこで本研究では、まず、クロゴキブリに対して高い病原性を示す糸状菌の探索を試みた。クロゴキブリを野外から採取した土壌上で飼育することによって、本害虫種に病原性を示す菌株を分離した。分離した3菌株のうちの1菌株は、形態学的な特徴から *Metarhizium* sp. であると推察された。本分離菌株を用いてクロゴキブリ成虫に対する病原性試験を行ったところ、菌液濃度  $1.6 \times 10^{10}$  および  $1.6 \times 10^9$  conidia/ml 接種区における接種20日後の累積死亡率は60%となり、糸状菌の本害虫種に対する唯一の病原性試験 (Gutierrez et al., 2014) の結果よりも高い病原性が確認された。今後は、本分離菌株の同定を進めるとともに、分生子の付着および発芽に対する宿主表皮の反応や表皮上の分泌物の影響を調べる予定である。

## *Beauveria bassiana* s. l. 二次代謝産物の致死性因子の性状

○松崎優<sup>1</sup>・陳馨玥<sup>2</sup>・畑中良太<sup>1</sup>・小池正徳<sup>1</sup>・嘉糠洋陸<sup>2</sup>・相内大吾<sup>3</sup> (帯畜大院 環微研<sup>1</sup>・慈恵医科大<sup>2</sup>・帯畜大アグロメディシンセンター<sup>3</sup>)

昆虫寄生菌による宿主の致死要因は、菌体の宿主組織への侵入と二次代謝産物の産生に大きく分けられる。演者らはこれまで、高病原性を示す *Beauveria bassiana* s. l. 60-2 は *Anopheles stephensi* の頭部における菌体の増殖と脳への侵入により早期致死を引き起こすことを明らかにした。一方、二次代謝産物の致死要因としての寄与は明らかになっていない。そこで、本研究では *B. bassiana* s. l. 60-2 の二次代謝産物が *A. stephensi* の生存へ与える影響とその性状を明らかにすることを目的とした。*B. bassiana* s. l. 60-2 培養濾液を *A. stephensi* 血体腔内へインジェクションし、生存率を評価した。様々な菌培養条件の検討の結果、ツァペックドックス液体培地へのイースト抽出物の添加により、致死性を示したことから、イースト抽出物の含有成分が *B. bassiana* s. l. 60-2 での致死因子となる二次代謝産物の産生の引き金となることが示された。さらに、菌培養濾液の熱処理により濾液の致死性が喪失したことから、致死因子の一部はタンパク質由来である可能性が示唆された。また、3kDa の限外濾過処理した培養濾液のインジェクションでは、3kDa 以上の画分

でより大きな半数致死日数の短縮が見られたことから、培養濾液中に含まれる 3kDa 以上の化合物が主要な致死因子であると考えられた。次に、異なる菌株間で培養濾液の SDS-PAGE による出現バンドの比較を実施したところ、19kDa と 22kDa において *B. bassiana* s. l. 60-2 特異的なバンドが見られた。今後、両タンパク質の *A. stephensi* に対する致死性を明らかにすることで、*B. bassiana* s. l. 60-2 二次代謝産物中の致死因子の特定につながることを期待される。

---

## <Virus>

---

### カイコ核多角体病ウイルス膜タンパク質 GP64 の機能構造解析

○関口真理・伴戸久徳・佐藤昌直・浅野眞一郎（北大院農）

本研究室で *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus (BmNPV) の標準株 T3 株と異なるユニークな増殖特性をもつ BmNPV H4 株 (H4) が分離された (角谷、2006)。BmN 細胞において、H4 は BmNPV の標準株 T3 株 (T3) よりウイルス増殖能が低く、ポリヘドリン生産量も少ない。一方、カイコ個体においては H4 は T3 と比較してウイルス増殖、ポリヘドリン蓄積がはやく、幼虫が死亡し体液採取が困難になる前に T3 の 1.6~3 倍の組換えタンパク質を体液から回収することが可能であるという利点をもつ。H4 と T3 の増殖特性の違いを決定する遺伝的要因を特定できれば培養細胞や個体での増殖特性を制御する技術の確立に繋がり、ウイルスベクターの改良に利用できる。

H4 は T3 と比較してプラークの大きさが顕著に小さいことから、細胞間感染にかかわる因子として BV の主要な膜タンパク質であり、レセプターとの結合や膜融合に必須のタンパク質である GP64 に注目して研究が進められてきた。先行研究において H4 と T3 の GP64 を入れ替えたキメラウイルスが作製され、BmN 細胞とカイコ個体における増殖能の変化が調査された。その結果、T3 の GP64 をもつ H4 は培養細胞で増殖能が高い T3 型の増殖を示し、H4 の GP64 をもつ T3 はカイコ個体で増殖能が高い H4 型の増殖を示すことが判明した (石川、2016)。また、H4 と T3 の GP64 のアミノ酸配列を比較すると、6 か所が異なっていた (酒井、2012)。これらのうちどのアミノ酸が H4 と T3 の増殖特性の違いを及ぼしているのかを明らかにすることを目的に、GP64 の構造予測結果をもとに v6 (6 番目のバリエーション) を T3 型から H4 型に変化させた T3 を作製し、BmN 細胞での増殖の変化を調査したので報告する。

### マイマイガ細胞における *p53* 相同体の同定と機能解析

○下山敦志・今泉明敏・浜島りな・小林迪弘・山田早人・池田素子 (名大生命農)

これまでに、転写因子 *p53* のカイコ相同体 *Bm-p53* とヨトウガ相同体 *Sf-p53* が同定され、一過性発現によりカスパーゼの活性化を伴うアポトーシスを誘導することが示された。また、核多角体病ウイルス (nucleopolyhedrovirus: NPV) 感染によるアポトーシス誘導に *Bm-p53* は関わるが、*Sf-p53* は関与しないことが示された。本研究では、種々の NPV 感染に対してカスパーゼの活性化を伴うアポトーシスを誘導するマイマイガ細胞に着目し、そのアポトーシス誘導機構の解明を目的として、*p53* のマイマイガ相同体 *Ld-p53* の同定と機能解析を行った。

*Ld-p53* は 345 アミノ酸残基からなるタンパク質であり、*p53* 相同体のコアドメインである DNA 結合

ドメインが見出された。他の目を含む昆虫の p53 相同体を用いた系統樹解析の結果、Ld-p53 はチョウ目昆虫の p53 相同体とともに独立したクレードを形成した。また、マイマイガ細胞における Ld-p53 の一過性発現により、カスパーゼの活性化を伴うアポトーシスが誘導された。一方、*Ld-p53* をノックダウンしたマイマイガ細胞に *p35* 欠損 AcMNPV を感染させた結果、コントロール群と同様にアポトーシスが誘導され、カスパーゼ活性に差はなかった。以上ことから、Ld-p53 はアポトーシス誘導能を示すものの、NPV 感染マイマイガ細胞におけるアポトーシス誘導には関わらないことが示唆された。

### カイコ *fasciclin1* は、カイコマキュラウイルス感染における宿主細胞集塊の形成を促進する。

○酒井大吉<sup>1</sup>・相澤昂洋<sup>1</sup>・長谷川智士<sup>2</sup>・庄司佳佑<sup>1,3</sup>・早崎芳夫<sup>4</sup>・川崎秀樹<sup>1</sup>・勝間進<sup>5</sup>・岩永将司<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>宇大院農・<sup>2</sup>宇大工・<sup>3</sup>学振PD・<sup>4</sup>宇大オプト・<sup>5</sup>東大院農)

カイコマキュラウイルス (BmMLV) は、チモウイルス科マキュラウイルス属に属するプラス鎖 RNA ウイルスであり、ほぼ全てのカイコ由来培養細胞に持続感染している。我々は BmMLV 感染細胞のトランスクリプトーム解析によって、ウイルス感染継時的に宿主の細胞接着因子である *Bombyx mori fasciclin 1* (*BmFAS1*) の転写量が増加すること、また、BmMLV 感染細胞では多数の細胞集塊が形成されることを明らかにした (Katsuma *et al.*, DNA Res., 2018)。

そこで本研究では、BmFAS1 が細胞集塊の形成に関与するのかどうかを明らかにするため、BmFAS1 の機能解析を行った。その結果、BmVF 細胞における細胞集塊数は、*BmFAS1* の過剰発現で 65.2%増加し、siRNA によるノックダウンで 26.8%減少することが明らかとなった。

現在、細胞集塊の形成が BmMLV の増殖にどの様に影響するか明らかにするため、これら *BmFAS1* の過剰発現、及びノックダウン細胞における BmMLV の増殖量を調査している。また、その際に形成された細胞集塊の細胞接着強度を評価するため、フェムト秒レーザーを用いた解析を進めており、これらの結果を併せて報告する。

### NPV 感染カイコ細胞のアポトーシス誘導における Bm-p53 の機能解析

○牧野静花<sup>1</sup>・浜島りな<sup>1,2</sup>・富崎萌<sup>1</sup>・小林迪弘<sup>1</sup>・池田素子<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>名大院生命農・<sup>2</sup>京大ウイルス再生研)

カイコ細胞は、BmNPV 感染時にアポトーシスを誘導しないが、カスパーゼ抑制遺伝子 *p35* 欠損 BmNPV (vBmΔp35) 感染時にアポトーシスを誘導することから、BmNPV 感染カイコ細胞はカスパーゼの活性化を介したアポトーシスを誘導することが示された。本研究では、BmNPV 感染カイコ細胞におけるカスパーゼの活性化までの分子機構の解明を目的として、アポトーシス誘導因子 p53 のカイコ相同体 (Bm-p53) に着目し、機能解析を行った。

カイコ細胞における一過性発現解析およびvBmΔp35感染カイコ細胞におけるノックダウン解析より、Bm-p53はBmNPV感染時のカスパーゼの活性化を介したアポトーシス誘導を主に担うことが示された。また、BmNPV感染時の発現変動解析より、Bm-p53 mRNAおよびタンパク質レベルは一定であることから、BmNPV感染時のアポトーシス誘導にはBm-p53の翻訳後修飾が必要であると予想された。そこで、p53を修飾するキナーゼのカイコ相同体に着目した。現在、vBmΔp35感染カイコ細胞におけるキナーゼのノックダウン解析およびキナーゼ阻害剤による解析を進めている。

## マイマイガ核多角体病ウイルスの異なる宿主系統に対する病理学的特性の比較

○芳賀友里・仲井まどか・国見裕久・井上真紀（農工大院・農）

マイマイガ核多角体病ウイルス *Lymantria dispar* multiple nucleopolyhedrovirus (LdMNPV) は、森林害虫であるマイマイガ *Lymantria dispar* を宿主とするバキュロウイルスであり、高い宿主特異性を有する。LdMNPV が宿主とするマイマイガには、ヨーロッパ、アジア、北海道の3亜種が存在し、日本では本州から北海道南西部にアジア亜種、北海道の北東部に北海道亜種が分布する。一方、LdMNPV は分離された地域により遺伝的・病理学的特性に著しい差異があることが報告されている。このように、複数のマイマイガ亜種およびマイマイガの近縁種が分布する日本においては、宿主に加えて LdMNPV の遺伝的多様性も高く、それに伴い病理学的特性の多様性も高いことが予想される。そこで本研究では、北海道亜種、北海道産アジア亜種、本州産アジア亜種より分離された LdMNPV 各分離株をマイマイガアジア亜種と北海道亜種の幼虫に小滴飲下法により接種し、致死率および致死時間を調査し、各宿主系統に対する LdMNPV 各分離株の病理学的特性を比較した。その結果、北海道亜種より分離されたウイルス株は、北海道産のアジア亜種および北海道亜種の幼虫に対し強い病原性を示し、北海道産および本州産アジア亜種より分離されたウイルス株は、産地にかかわらずアジア亜種の幼虫に対し強い病原性を示すことが判明した。

## HycuMNPV 感染カイコ細胞における抗ウイルス応答誘導遺伝子 *p143* と *ep32* の機能解析

○奥野文人<sup>1</sup>・浜島りな<sup>1,2</sup>・橘亜美<sup>1</sup>・小林迪弘<sup>1</sup>・池田素子<sup>1</sup>（<sup>1</sup>名大院生命農・<sup>2</sup>京大ウイルス再生研）

カイコ細胞において、アメリカシロヒトリ核多角体病ウイルス (HycuMNPV) の感染は許容されず、ウイルスは不全感染となる。これまでに、HycuMNPV 感染カイコ細胞が抗ウイルス応答として rRNA 分解、全タンパク質合成停止を誘導すること、2つの応答にはそれぞれ *hycu-p143*、*hycu-ep32* が関与することを示した。本研究では、2つの応答の関連性を明らかにするため、*hycu-p143* と *hycu-ep32* を欠損させた HycuMNPV バクミド (HycuBac) を用いてカイコ細胞における感染性を調査した。

*hycu-ep32* 欠損 HycuMNPV (vHycuΔep32) をカイコ細胞に感染させた結果、カイコ細胞は rRNA 分解を誘導した。このことから、*hycu-p143* を *bm-p143* に組換えることで、vHycuΔep32 がカイコ細胞で増殖感染となると考えた。そこで、HycuBac を用いて、*hycu-ep32* と *hycu-p143* を欠損し、かつ *bm-p143* を保有する HycuBac を作出して、カイコ細胞における感染性を調査した。その結果、多角体形成は認められず、増殖感染とはならなかった。AcMNPV において P143 は、LEF-3 により核内へと輸送され、ウイルス DNA 複製に機能することが報告されている。そこで、Bm-P143 と Bm-LEF-3 あるいは Hycu-LEF-3 の共発現解析により、Bm-P143 の核内輸送について調査した。その結果、Bm-P143 の核内輸送には Bm-LEF-3 が必要であることが示された。現在は、今回作出した組換え HycuBac の *hycu-lef-3* を *bm-lef-3* に組換えた HycuBac の作出を進めている。

## BmNPV La 株の全ゲノム、及びトランスクリプトーム解析

○藤本正太<sup>1,3</sup>、川本宗孝<sup>2</sup>、庄司佳祐<sup>3</sup>、鈴木穰<sup>4</sup>、川崎秀樹<sup>3</sup>、勝間進<sup>2</sup>、岩永将司<sup>1,3</sup>（<sup>1</sup>農工大院・

連合農、<sup>2</sup>東大院農、<sup>3</sup>宇大農、<sup>4</sup>東大院新領域)

カイコ核多角体病ウイルスラオス株 (BmNPV La) は、1992 年にラオスで単離された BmNPV であり、標準株 T3 と比べ多角体遺伝子の転写・翻訳量が高いほか、早期致死やマルチキャプシド型 ODV 構築などの特徴的な表現型を有する (Fujimoto *et al.*, JIBS, 2017)。本研究では、これら表現型の責任領域を明らかにするために BmN 細胞へ La 株と T3 株を接種し、感染継時的なトランスクリプトーム解析を行った。その結果、La 株の全ゲノムは 127,618 塩基であり、T3 株と 98.3% の高い相同性を示すこと、一方、*bro-b* 遺伝子や *hr2L* を始めとして多くの領域に変異が存在することが明らかとなった。また、La 株感染細胞では T3 株よりも多くの *v-cath* 遺伝子や *ie-1* 遺伝子が転写されていることが明らかとなり、La 株の有する表現型との関連が示唆された。更に、宿主遺伝子の一部の転写量が T3 株よりも減少しており、これらの宿主遺伝子産物の働きが La 株の表現型に関与する可能性が示されたと考えられた。現在、RT-qPCR によるトランスクリプトーム解析の検証を行っており、これらの知見を併せて報告する。

### バキュロウイルス感染細胞におけるシャットオフを逃れる遺伝子の網羅的解析

○疋田弘之<sup>1</sup>、庄司佳祐<sup>2</sup>、川本宗孝<sup>1</sup>、鈴木穰<sup>3</sup>、嶋田透<sup>1</sup>、勝間進<sup>1</sup> (東大院農<sup>1</sup>・宇大院農<sup>2</sup>・東大院新領域<sup>3</sup>)

バキュロウイルス感染細胞では、感染後期に大部分の宿主遺伝子の発現が大きく低下するシャットオフと呼ばれる現象が知られている。このシャットオフにより、バキュロウイルスはウイルス増殖に利用できる細胞内リソースを最大化している。一方、タンパク質合成や代謝などに関わる一部の宿主遺伝子はウイルス増殖に必須であるため、シャットオフを回避する必要があると考えられている。しかし、シャットオフを回避する宿主遺伝子はほとんど同定されていない。本研究では、シャットオフを回避する遺伝子を網羅的に同定し、それらがウイルス感染時に果たす役割を解明するために、カイコ核多角体病ウイルスに感染した BmN-4 細胞を用いてトランスクリプトーム解析とメタボローム解析を行った。トランスクリプトーム解析の結果、感染後期における発現抑制の程度が弱い遺伝子群が同定された。この遺伝子群には *S*-アデノシルメチオニン (SAM) 合成酵素をコードする遺伝子が含まれていた。メタボローム解析から、感染細胞における SAM の量が非感染細胞に比べて多いことが示され、感染細胞で SAM 合成酵素の働きが維持されていることが示唆された。また、感染細胞では SAM からメチル基が転移した *S*-アデノシルホモシステインの量も多く、感染細胞においてメチル化経路が選択的に維持されている可能性が示された。

### 日本に生息するタイワンカブトムシのバイオタイプとウイルス有病率の調査

○田中俊祐<sup>1</sup>・新井大<sup>2</sup>・井上真紀<sup>2</sup>・仲井まどか<sup>2</sup> (農工大農<sup>1</sup>・農工大院農<sup>2</sup>)

タイワンカブトムシ (*Oryctes rhinoceros*) の成虫は、ヤシ、サトウキビ、パイナップルなどを食害する。1960~70 年代に太平洋州に侵入した本種は、ヤシ類に甚大な被害を及ぼしたが、*Oryctes rhinoceros nudivirus* (OrNV) を用いた生物的防除が実施され、その個体群の抑制に成功した。しか

し、2007年以降グアムを中心に新たなバイオタイプのタイワンカブトムシの侵入が確認された。この個体群は従来の生物的防除での制御が困難であり、COI 遺伝子の特定の部位に1塩基置換を決まって持つことが報告された。この個体群はグアムで発見されたことからバイオタイプ G とされている。本種は、日本国内では沖縄県と鹿児島県に生息しているが、詳しいバイオタイプや OrNV 有病率などの調査は行われていない。そこで本研究では、石垣島、奄美大島、与那国島など日本国内に生息するタイワンカブトムシを採集し、そのバイオタイプと OrNV 有病率を PCR 法により調査した。その結果、日本にはバイオタイプ G の個体群が分布していることが明らかになった。また石垣島と与那国島の個体群はバイオタイプ G の中でも遺伝子型に多様性があることが明らかになった。さらに調査したうちの44%の個体より OrNV の DNA が検出された。

### バキュロウイルスの複数の非必須遺伝子がウイルスに与える影響について

○齋藤諒・佐藤昌直・浅野眞一郎・伴戸久徳（北大院農）

カイコ核多角体病ウイルス (BmNPV) は 141 遺伝子のうち 86 遺伝子はウイルス増殖に必須でない非必須遺伝子であった (Ono *et al.*, 2012)。それら非必須遺伝子の生物学的意義を検討するため、非必須遺伝子が連続する領域を標的とした複数遺伝子ノックアウトウイルスについて研究が行われた。その結果、非必須遺伝子間には相加的あるいは補償的などの遺伝子間相互作用が存在し、ウイルス増殖に大きく影響する可能性があることが明らかとなった (Taka *et al.*, 2013)。本研究では非必須遺伝子の bm36、37、38 の 3 遺伝子に注目し、それらの遺伝子間相互作用について検討した。

bm36-38 ノックアウトバクミドを BmN 細胞にトランスフェクションしたところ、バクミドをトランスフェクションしていない実験区と同程度まで蛍光量が減少した。そこで、bm36、37、38 遺伝子をそれぞれ 1 つずつ、2 つずつの組合せでノックアウトしたバクミドを作製し、BmN 細胞へトランスフェクションを行った。その結果、bm36 単独、もしくは bm36 を含んだノックアウトバクミドをトランスフェクションした場合、コントロールに比べ蛍光量とプラークの大きさが減少することが分かった。一方、bm36&37 ノックアウトバクミドは bm36 単独ノックアウトと比べ蛍光量の回復が認められ、両遺伝子間に genetic suppression interaction (Jolanda *et al.*, 2016) が存在している可能性が示唆された。

### 顆粒病ウイルス-卵幼虫寄生蜂 *Chelonus inanitus*-ハスモンヨトウの3者関係：顆粒病ウイルス感染が寄生蜂の生存に及ぼす影響

○占部真理子・井上真紀・仲井まどか（農工大農）

寄生蜂とバキュロウイルスは、共にチョウ目昆虫の重要な天敵である。両者は、同一宿主（寄主）体内で同じ資源を取り合う競争関係にある。顆粒病ウイルス (GV)、コマユバチ科の卵幼虫寄生蜂 *Chelonus inanitus*、寄主ハスモンヨトウの3者間の相互作用を調べたところ、寄主の GV 感染によりハチの生存率は負の影響を受けた。先行研究によると、*C. inanitus* の寄生により GV の複製量は、増進する。コマユバチ科の寄生蜂は、ポリドナウイルス (PDV) という共生ウイルスにより寄主の生体防御を免れて成長する。一般的に、PDV は寄主の生体防御機構を低下させる。そのため、*C. inanitus*

被寄生寄主体内で GV が感染増進するしくみに *C. inanitus* の PDV (CiBV) の発現が関わっている可能性があるが、直接的な証拠は得られていない。GV の感染増進における CiBV の影響を調査するため、 $\gamma$ 線の照射により雌バチを不妊化した。 $\gamma$ 線照射によりハチ卵は致死するが、CiBV は不活化されずに寄主体内に入り偽寄生という状態になる。ハチ卵が排除された偽寄生寄主に GV を接種し、GV 増殖に対する CiBV の直接的な影響を明らかにする。

## 殺虫スピードの異なる核多角体病ウイルス 2 株における感染組織の比較

○辻野悠陽・井上真紀・仲井まどか(農工大院農)

バキュロウイルスは、ウイルス防除資材として用いられているが、その殺虫スピードを決める要因は未だ明らかになっていない。先行研究によると、チャノコカクモンハマキ 2 齢幼虫に *Adoxophyes honmai* nucleopolyhedrovirus (AdhoNPV) を接種すると 15 日後に感染致死させるが、AdhoNPV に近縁な *Adoxophyes orana* nucleopolyhedrovirus (AdorNPV) は 7 日後に致死させる。本研究ではこの 2 株の核多角体病ウイルスの組織特異性の違いが殺虫スピードに影響するという仮説をたて、その感染組織を比較した。それぞれのウイルスをチャノコカクモンハマキ 2 齢幼虫に接種し、感染虫を光学顕微鏡と電子顕微鏡で観察し比較した。その結果両ウイルスとも気管皮膜細胞と脂肪体でウイルス粒子とウイルスの包埋体が観察された。AdhoNPV 感染虫では、接種 6 日後に脂肪体でウイルス粒子が観察され、7 日後には包埋体が生産された。これに対し AdorNPV 感染虫では、接種 3 日後にすでに脂肪体でウイルス粒子が観察され、4 日後には包埋体が生産された。このことから、2 株には組織特異性に差はないが、ウイルス粒子と包埋体形成のはじまる時期が異なることが示唆された。

## 核多角体病ウイルスにより選抜したチャノコカクモンハマキ個体群の顆粒病ウイルスへの交差抵抗性とその遺伝様式

○嶋倉直也・井上真紀・仲井まどか(農工大院農)

化学合成農薬を用いた害虫防除には抵抗性の発達というリスクがつきまとう。一方、バキュロウイルスをはじめとする生物防除資材は抵抗性が発達しにくいと考えられてきた。しかし近年、バキュロウイルスに対する抵抗性を獲得した野外個体群の存在が欧州を中心に報告されており、その抵抗性管理は急務となっている。当研究室では、茶樹の害虫であるチャノコカクモンハマキに対し、70%致死濃度のチャノコカクモンハマキ核多角体病ウイルス (AdhoNPV) を接種して選抜を行い、非選抜の感受性系統である S 系統に対して 100,000 倍以上の抵抗性比を示す抵抗性系統の R 系統を作出した。この R 系統は、鹿児島県で製剤として本種の防除に用いられているリンゴコカクモンハマキ顆粒病ウイルス (AdorGV) に対しても S 系統と比較して約 100 倍の交差抵抗性を示す。R 系統の AdhoNPV に対する抵抗性の遺伝様式を調査した先行研究によると、常染色体上のポリジーンが関与していることが示唆された。そこで本研究では、AdorGV に対する交差抵抗性の遺伝様式を、S 系統と R 系統の交雑実験により調査した。その結果、AdorGV に対する交差抵抗性には正逆交雑間で有意差があり、伴性遺伝の可能性が示された。また、これらの結果から AdorGV に対する交差抵抗性に関与する遺伝子が、W 染色体上に存在する可能性がある。

## アスコウイルスとコマユバチ科寄生蜂のアワヨトウ幼虫宿主体内における競争関係

○川畑美桜・井上真紀・仲井まどか（農工大農）

バキュロウイルスや昆虫ポックスウイルスに感染したヤガ科宿主幼虫の体内でコマユバチ科の寄生蜂が致死するという現象が国内外で報告されている。この現象を引き起こしていると考えられているのが、寄生蜂致死タンパク質(Parasitoid Killer Toxin: PKT)である。

データベースを用いた解析により、PKT のホモログが、アスコウイルスのゲノムにもコードされていることが分かった。アスコウイルスは、主にチョウ目昆虫を宿主とする二本鎖 DNA ウイルスであり、チョウ目昆虫の天敵である寄生蜂の産卵管を介して伝播する。本研究では、アスコウイルスのゲノムにコードされている *pkt* が実際に寄生蜂の致死活性に関わっているのか。また、寄生蜂の殺虫メカニズムを明らかにすることを試みる。本研究では、日本で分離されたアスコウイルス (HvAV-3j) とそのベクター寄生蜂であるギンケハラボソコマユバチとベクター以外の寄生蜂であるカリヤコマユバチを用いて生物検定を行い、アワヨトウ感染虫からの寄生蜂の脱出率、繭形成率、羽化率を調査した。今後は、HvAV-3j 由来の *pkt* を発現ベクターにクローニングし、強制的に発現させた PKT の寄生蜂に対する寄生蜂致死活性を調査する計画である。

## BmNPV 必須遺伝子のリファクタリング

○石川聡子・伴戸久徳・佐藤昌直・浅野眞一郎（北大院農）

核多角体病ウイルス (NPV) は爆発的にポリヘドリンを高発現するが、その遺伝子発現カスケードはまだ明らかになっていない。遺伝子ノックアウトウイルスを用いた解析が行われているが、BmNPV 遺伝子はゲノム上に密に隣接しており、1 遺伝子ノックアウトウイルスの表現型がノックアウトした遺伝子だけの機能喪失によるものとは断定できない。そこで、遺伝子の機能・役割を同定するためには、各遺伝子の機能発揮に必要な領域を他の遺伝情報と独立させて特定する必要がある。コンピュータープログラミングにおける、機能単位を独立させる再設計 (リファクタリング) に着想を得て、我々は BmNPV の遺伝子機能単位の独立化作業をリファクタリングと呼んでいる。先行研究では、BmNPV の 10 遺伝子は単独でもノックアウトするとポリヘドリンプロモーター下流の GFP の発現が喪失し、一次感染細胞でのポリヘドリン発現に必須な遺伝子であることが示された。今回、機能単位候補でのリファクタリングの結果が GFP 蛍光の有無で定性的に評価可能なそれら必須遺伝子群でリファクタリングを試み、ポリヘドリン遺伝子座上流に ORF 上流 500bp と下流 500bp を含む遺伝子領域を導入したウイルスの解析を行った。これらの遺伝子のリファクタリングウイルスでは GFP 蛍光の回復が確認され、これらの遺伝子のリファクタリング可能性を支持する結果が得られた。

## 昆虫ポックスウイルスが産生する寄生蜂致死タンパク質は寄生蜂培養細胞にアポトーシスを引き起こす

○太田理絵<sup>1</sup>・Leila Gasmi<sup>2</sup>・井上真紀<sup>1</sup>・國見裕久<sup>1</sup>・仲井まどか<sup>1</sup> (<sup>1</sup>農工大院農・<sup>2</sup>全北大学)

アワヨトウ昆虫ポックスウイルス (*Mythimna separata* entomopoxvirus: MySEV)は、感染宿主の体内で寄生蜂致死タンパク質 (Parasitoid Killer Toxin: PKT) を発現する。そのため、MySEVに感染したアワヨトウ *Mythimna separata* に寄生したコマユバチ科の寄生蜂カリヤコマユバチ *Cotesia kariyai* は脱出することなく宿主体内で致死する。しかし、同じコマユバチ科のギンケハラボソコマユバチ *Meteorus pulchricornis* は MySEV 感染宿主から脱出や羽化することができる。また、MySEV に感染したアワヨトウの体液から遠心分離により血球やウイルス粒子を除いた PKT を含む上清 (Virion Free Plasma: VFP) は、カリヤコマユバチに致死活性を持つが、ギンケハラボソコマユバチには持たない。

本研究では、PKT の寄生蜂に対する細胞レベルの影響を調べるため、カリヤコマユバチとギンケハラボソコマユバチ由来の培養細胞に VFP を曝露した。カリヤコマユバチ培養細胞は、PKT を含む VFP の曝露の 12 時間後にアポトーシスが検出され、細胞増殖が抑えられた。一方、ギンケハラボソコマユバチ培養細胞ではほとんど影響が見られず正常に増殖を続けた。以上の結果から、PKT は、感受性の種であるカリヤコマユバチに対し、細胞レベルでアポトーシスを引き起こすことが示された。

### バキュロウイルス抵抗性チャノコカクモンハマキ系統の抵抗性発達過程の調査

○立澤杜泰・仲井まどか・井上真紀・(農工大院農)

バキュロウイルスは生物的防除資材として世界的に用いられている。しかし、近年、ウイルス製剤に対する抵抗性を獲得した野外害虫個体群が報告され、昆虫の抵抗性機構の解明が急務になっている。抵抗性害虫の管理のためには、その発達様式を解明する事が重要である。当研究室では、茶樹の害虫であるチャノコカクモンハマキ個体群に対する *Adoxophyes honmai* nucleopolyhedrovirus (AdhoNPV) を用いた選抜により、非選抜系統(S 系統)にくらべて 1 万倍以上の抵抗性を保持した抵抗性系統(R 系統)を作出した。R 系統の AdhoNPV 抵抗性は、ウイルス粒子の中腸細胞への結合量と融合量が低下することにより生じることが判明している。また、R 系統の選抜を 21 世代目で停止した RN-21 系統は選抜停止時から現在まで 400 倍の抵抗性を維持している。本研究では、R 系統の抵抗性発達様式を明らかにすることを目的として、RN21 系統の AdhoNPV 抵抗性機構を調査した。その結果、S 系統と RN21 系統の間で、中腸細胞に対するウイルス粒子の結合-融合量に有意差は無い一方、RN21 系統では、中腸においてウイルス遺伝子発現が抑制されていることが判明した。このことにより、R 系統は中腸で複数の抵抗性機構を異なる速度で発達させた可能性が示された。

---

### <Other Poster>

#### 果樹カメムシ類に寄生するシヘンチュウの調査

○渡部就<sup>1</sup>・綱島彩香<sup>1</sup>・糸山享<sup>1</sup>・新屋良治<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>明治大学農学部・<sup>2</sup>JST さきがけ)

果樹カメムシ類は果樹の果実を吸汁するため、果樹生産において大きな被害をもたらしている。日本国内において主要な果樹カメムシ種はチャバネアオカメムシ *Plautia stali*、クサギカメムシ *Halyomorpha halys*、ツヤアオカメムシ *Glaucias subpunctatus* の 3 種であるが、近年温暖化の影響によりツヤアオカメムシの個体数の増加や分布の拡大が起こり、被害が深刻化している。演者ら

は近年日本国内各地から主要果樹カメムシ類 3 種を採集しており、その中に昆虫寄生性線虫であるシヘンチュウにより寄生されているカメムシ個体を確認した。そこで本研究では日本国内の異なる 4 地域（三重、徳島、佐賀、静岡）から果樹カメムシを採集し、地域毎のシヘンチュウの寄生率を調査した。その結果、三重で採集されたカメムシでその他の 3 地域よりシヘンチュウが多く得られ、その寄生率には地域差が存在すると推察された。次に、得られたシヘンチュウ個体の DNA を抽出後、サンガーシーケンス法を用いて塩基配列を取得し、データベースを参照することで種の推定を行った。その結果、今回得られたシヘンチュウはいずれも *Hexameris* 属に属する未記載種であることが明らかになった。

### 山口産ハスモンヨトウより分離された *Vavraia* 属微胞子虫株の発育環の解明

○荒井怜奈・畠山吉則・中村春花・井村祐二・生駒樹央・高橋萌会・岩野秀俊（日大生物資源応昆研）

微胞子虫は、偏性細胞内寄生性の単細胞真核生物である。昆虫類や魚類、哺乳類など多様な宿主範囲を持ち、現在までに約 1,500 種が報告されている。中でも昆虫感染性の微胞子虫は、微生物防除資材として期待されており、有用株の検索が行われている。2015 年 11 月 6～8 日に山口県山口市で捕獲されたハスモンヨトウ成虫より微胞子虫が分離された。本分離株の胞子サイズ ( $5.00 \times 2.60 \mu\text{m}$ ) は、既知報告されている *Nosema* 属と *Vairimorpha* 属より大型であり、*Vavraia oncoeperae* に近似していた。また、SSU rRNA 遺伝子配列解析により、供試株は *Vavraia* 属と推定された。微胞子虫の属の決定は、遺伝子解析による分子生物学的特徴と発育環などの生物学的特徴を照合させることが必要である。そこで、今回は山口で検出された微胞子虫株の発育環を明らかにするため、昆虫培養細胞である Sf9 細胞への接種実験を行った。その結果、全ての発育ステージを確認し、*Vavraia* 属と同様の特徴である単核性のスポロプラズム、スポロブラスト、胞子を観察した。また胞子形成期ではパンスポロブラスト膜内に 16 個以上の胞子の形成を観察した。しかし、既知で報告されている胞子形成様式と異なる 2 核性のスポロントも確認したことから本株は、*Vavraia* 属の近縁である可能性や別の分裂形態を有することが示唆された。

### 微胞子虫を用いた新規アプローチによるハスモンヨトウの飛来源推定

○井村祐二・畠山吉則・荒井怜奈・高橋萌会・岩野秀俊（日大生物資源応昆研）

微胞子虫 (Microsporidia) は、特殊化した寄生菌類の 1 種であり、昆虫を主として多様な生物に感染する。宿主昆虫の例には、農業害虫であるハスモンヨトウ (*Spodoptera litura*) が挙げられる。ハスモンヨトウは耐寒性の低さから、日本本土において通年発生することが困難とされている。そのため、通年発生地域から毎年、日本本土へ飛来することが指摘されている。そこで、本研究ではハスモンヨトウの飛来源を推定するため、国内外 7 地域由来のハスモンヨトウより分離された微胞子虫 20 株を用い、胞子サイズ測定および遺伝子解析を実施した。胞子サイズ測定の結果、分離微胞子虫株は 3 グループに収束した。また、遺伝子解析の結果、これらの微胞子虫は 5 属に分類された。中でも、*Vavraia* 属が日本国内のチョウ目昆虫より初めて検出された。本研究では検出された 5 属のうち、台湾および国内の複数ヶ所で分離されている 2 系統を指標に、飛来源を推定した。2 系統の微

胞子虫株は、それぞれ中国南部や小笠原由来の既知株と高い遺伝的相同性を示した。このことから、先行研究と同様にハスモンヨトウは中国南部や小笠原を起点に、日本本土へ飛来していることが示唆された。したがって、微胞子虫を用いたハスモンヨトウの飛来源推定手法は有用であることが示された。

## カイコガ幼虫のノジュール形成反応を誘導する液性因子の解析

○唐舒宜・手塚萌子・徳永琴美・佐藤令一（農工大院 BASE）

ノジュール形成反応は昆虫の細胞性免疫反応の一つである。ノジュールとは血体腔内に侵入した微生物と血球細胞からなる凝集体のことであり、血球の一種である顆粒細胞の脱顆粒反応により放出される凝固因子 Hemocytin が微生物の菌体と血球を絡めとることにより形成されると考えられている。

本研究ではカイコガ幼虫を用い、ノジュール形成反応において脱顆粒反応を誘導する因子の同定を試みた。*In vitro*における実験より、菌体に結合する体液中の液性タンパク質が脱顆粒反応の誘導に重要であることが示唆された。脱顆粒反応の誘導に関与する分子を同定するため、体液中に存在し、昆虫の様々な免疫反応への関与が示唆されているタンパク質に対する抗血清を作製した。抗血清を用いた阻害実験により *Bombyx mori* Hemolymph protease 8 (BmHP8) と BmSpätzle1 (BmSpz1) がノジュール形成反応の誘導に関与していることが明らかになった。さらに、これらの分子は菌体に結合することが示唆された。これらの結果より、微生物の侵入に応答して BmHP8、BmSpz1 を含む体液タンパク質が菌体に結合し、脱顆粒反応を誘導するというノジュール形成反応誘導機構の仮説が立てられた。

## 異なる生息環境下におけるマイマイガの発生・天敵相・色彩変異

○樋口直生<sup>1</sup>・山下恵<sup>2</sup>・仲井まどか<sup>2</sup>・井上真紀<sup>2</sup>（<sup>1</sup>農工大農・<sup>2</sup>農工大院農）

マイマイガ *Lymantria dispar* は、チョウ目ドクガ科に属し、広食性であることから、さまざまな樹木や果樹を食害、森林生態系に甚大な被害をもたらす重要害虫である。約 10 年周期で大発生を繰り返し、大発生が数年続いた後に病原体の蔓延によって終息する。大発生時にはマイマイガの幼虫や成虫が市街地でも多く目撃され高密度になる一方、間期には非常に低密度になる。このことから高密度期と低密度期ではマイマイガの分布パターンが異なる可能性がある。北海道中部では 2017 年から個体数が増加しており、今後数年で大発生が起きると予測される。密度依存的なマイマイガの分布の変化とそれに伴う病気の発生動態を明らかにすることは、マイマイガの効率的な防除方法の確立に役立つ。そこで本研究では、個体数が増加しつつあるマイマイガの分布パターンを調査するとともに天敵相およびマイマイガの色彩変異が密度依存的に変動するかを明らかにすることを目的とした。調査は北海道美瑛町で行った。美瑛町には約 25 km の道路に沿って市街地から山間部へと移行しており、2018 年は 2 km から 6.7 km ごとに調査地点を設定し、異なる環境要素を含む計 6 地点で調査を行った。その結果、市街地に比べ山間部でマイマイガが多く発生する傾向があった。一方、天敵相はほとんどの地点で寄生蜂と寄生バエであった。

## LAMP 法を用いた *Nosema bombi* 孢子の直接的検出

○加藤優斗<sup>1</sup>・柳澤太洋<sup>2</sup>・仲井まどか<sup>2</sup>・小松健<sup>2</sup>・井上真紀<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>農工大農・<sup>2</sup>農工大院農)

*Nosema bombi* は微孢子虫の一種であり、マルハナバチに感染する偏性細胞内寄生菌である。消化管をはじめさまざまな組織への感染が確認されており、ワーカーの死亡率を上昇させたり、オス蜂の精子量の減少を引き起こすなど宿主の適応度を低下させることが知られている。本研究ではこれまで *N. bombi* の感染の診断に利用されてきた検鏡と PCR 法に変わる手段として、Loop-Mediated Isothermal Amplification ( LAMP )法を用いた感染診断法を検討した。LAMP 法とは等温遺伝子増幅法であり、PCR よりも特異的に、簡便に、そして素早く DNA を増幅できる方法である。使用する DNA 合成酵素が比較的共雑物に強いため、DNA を抽出することなく直接サンプルを反応液に添加するだけで菌やウイルスを検出することができる。その特性を利用して中腸磨砕液から *N. bombi* の孢子を検出する方法の確立を試みた。反応条件を 63℃、40 分と決定した後、PCR 法と LAMP 法の検出感度を比較したところ、抽出 DNA を用いた場合には PCR 法の方が感度が良かったものの、中腸磨砕液を用いると LAMP 法の方が良い感度を示した。一方、糞からの検出は条件検討がさらに必要である。