

学 位 論 文 題 名

数種ヤガ科害虫の顆粒病ウイルス感染病理と遺伝子解析

学位論文内容の要旨

本論文は、総ページ数141ページ、表26、図30からなる和文論文で、他に参考論文10編が添えられている。

農産物の安全性向上ならびに環境保全に対する関心が高まり、主に化学合成農薬に依存している現在の病虫害防除体系は、改善を求められている。新しい防除体系の確立には、化学合成農薬の使用に代わる防除技術の開発が必要であり、昆虫に特異的な病原性を示すバキュロウイルスは、安全性の高い防除素材としてその実用化が期待されている。

北海道では、これまで、*Bacillus thuringiensis* 以外の昆虫病原微生物に関する研究は、ほとんど行われていない。本研究は、北海道の畑作地帯である十勝地方ではじめて分離されたバキュロウイルス属、中でも顆粒病ウイルス（GV）を利用した防除技術開発のための基礎的研究である。その内容は、各種害虫由来のGVのDNA解析による同定、GVのゲノムDNAのクローニングと顆粒体タンパク質遺伝子の塩基配列の決定、GVの病理学的特性の解明、GVの核多角体病ウイルス感染力増強作用の解明等を中心とし、以下の4項目について述べる。

1. ヤガ科畑作害虫の死亡原因調査と昆虫病原性ウイルスの分離

畑作物害虫13種を対象に昆虫病原微生物の探索を行った。その方法は、採集幼虫を室内で個別飼育し、発病した幼虫からウイルスと糸状菌を主体に多数の病原微生物を分離した。ヨーロッパでも重要な害虫であるガンマキンウワバをはじめ、GVがこれまで未発見であった4種を含む8種の宿主から新たにGVを分離した。また、テンサイや蔬菜類の害虫であるシロモンヤガ、ガンマキンウワバ等、数種害虫の原因別死亡率を調査し、GVが死亡要因として重要な位置を占めることを明らかにした。

2. 数種ヤガ科害虫から分離されたGVのDNA解析による同定と制限酵素切断地図の作成並びに顆粒体タンパク質遺伝子の塩基配列決定

GVが複数種の害虫に交差感染している可能性が示唆されたため、ウイ

ルスゲノムDNAの制限酵素切断片アガロースゲル電気泳動パターンを基にした分類法（REN法）を導入し、各宿主から分離したGVの同定を試みた。シロモンヤガ、ガンマキンウワバ、アワヨトウ、タンポキヨトウ、フキヨトウ、ショウブオオヨトウの6種から得られたGVは、若干の差異はあるがほぼ同一のパターンを示し、異なる宿主昆虫から分離された各GVは基本的にはほとんど同一のウイルスゲノムを有することが判明した。シロモンヤガGVの制限酵素切断片クローンをプローブにしたサザンハイブリダイゼーションの結果、GV間のRENパターンの差異は、制限酵素切断部位の付加や欠失、DNAの小断片のデリーションや挿入によって生じていることが明らかになった。また、シロモンヤガの個体別分離GVのパターン比較の結果、同一種宿主由来のGV間で認められた変異の程度は、異種宿主由来のGV間に認められた変異の程度とほぼ同等であり、分離GV間の変異は、宿主の違いと関係なく生じているものと考えられた。これらの結果から、上記6種害虫から分離されたGVを単一ウイルスの遺伝的変異株として位置づけ、このウイルスをシロモンヤガ顆粒病ウイルス、*Xestia c-nigrum* GV（XcGV）として取り扱うことにした。また、XcGVのゲノムライブラリーをもとに、制限酵素切断地図を作成し、地図のゼロ点の基準である顆粒体タンパク質遺伝子の塩基配列を決定した。過去に報告された2種GVとXcGVの同遺伝子の塩基配列並びにアミノ酸配列とは、非常に高い相同性を示し、このタンパク質はGVにとって重要な機能を持つものと考えられた。

### 3. XcGVの感染特性

経口接種実験により、XcGVは、供試したヤガ科14種のうち7種に感染することが明らかにされた。このうち、シロモンヤガ、ガンマキンウワバ、アワヨトウに対するXcGVの病原性を比較すると、前2種に対する病原性はほぼ同等であったが、アワヨトウに対する病原性はそれよりも弱いことが明らかにされた。また、XcGV接種後のシロモンヤガ幼虫について、感染経過の詳しい観察が行われ、2、3齢期にGVを接種すると、5齢期以降に病徴が認められること、ほとんどの個体は6齢まで生存して健全虫を超える大きさに達した後に死亡すること、また、接種個体の約半数が過剰脱皮し7齢または8齢に達することが明らかにされた。

### 4. XcGVの核多角体病ウイルス感染力増強作用と感染力増強物質の単離・精製

2種ウイルスの混合接種実験によって、XcGVが核多角体病ウイルス（NPV）の感染率を上昇させる作用を持つことを発見した。生物検定により、この感染力増強作用がXcGVの顆粒体のアルカリ可溶性画分に存在すること、XcGVの宿主であるシロモンヤガ、アワヨトウ、ガンマキンウワバの他に、XcGVに感受性を示さないヨトウガ、タバコガでもN

PVの感染力増強が起こること、また、本増強作用は、複数のNPVに対して認められることが明らかにされた。ゲル濾過とイオン交換クロマトグラフィーによって、顆粒体から分子量約108 kDaの活性成分が単離された。

本研究では、北海道の畑作地帯において複数の害虫からはじめてGVを分離し、RENパターンの解析並びに制限酵素切断地図の作成からウイルスを同定可能とした。また、シロモンヤガからの分離GV (XcGV) を用いて、ゲノムDNAのクローニングと顆粒体タンパク質遺伝子の特定並びに塩基配列の決定を併せて行った。さらに感染特性の解明に加え、XcGVがNPV感染力増強作用を有することを明らかにし、その活性成分の単離精製と性状の解析を行った。このことは、単離された、XcGVのNPV感染力増強物質が、今後NPVを利用した生物的害虫防除添加剤としての利用が期待される成果であり、学術面においても実用面でも多大の貢献を行った。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 飯 塚 敏 彦

副 査 教 授 高 木 貞 夫

副 査 教 授 木 村 郁 夫

### 学 位 論 文 題 名

## 数種ヤガ科害虫の顆粒病ウイルス感染病理と遺伝子解析

本論文は、総ページ数141ページ、表26、図30からなる和文論文で、他に参考論文10編が添えられている。

農産物の安全性向上ならびに環境保全に対する関心が高まり、主に化学合成農薬に依存している現在の病虫害防除体系は、改善を求められている。

本研究は、北海道の畑作地帯である十勝地方ではじめて分離されたバキュロウイルス属、中でも顆粒病ウイルス（GV）を利用した生物的防除技術開発のための基礎的研究である。その内容は、以下の4項目にまとめることができる。

### 1. ヤガ科畑作害虫の死亡原因調査と昆虫病原性ウイルスの分離

十勝地方の畑作物害虫13種を対象に昆虫病原微生物の探索を行った。その方法は、採集幼虫を室内で個別飼育し、発病した幼虫からウイルスと糸状菌を主体に多数の病原微生物を分離した。ヨーロッパでも重要な害虫であるガンマキンウワバをはじめ、GVがこれまで未発見であった4種を含む8種の宿主から新たにGVを分離した。また、テンサイや蔬菜類の害虫であるシロモンヤガ、ガンマキンウワバ等、数種害虫の原因別死亡率を調査し、GVが死亡要因として重要な位置を占めることを明らかにした。

### 2. 数種ヤガ科害虫から分離されたGVのDNA解析による同定と制限酵素切断地図の作成並びに顆粒体タンパク質遺伝子の塩基配列決定

GVが複数種の害虫に交差感染している可能性が示唆されたため、ウイルスゲノムDNAの制限酵素切断片アガロースゲル電気泳動パターンを基にした分類法（REN法）を導入し、各宿主から分離したGVの同定を試みた。シロモンヤガ、ガンマキンウワバ、アワヨトウ、タンポキヨトウ、フキヨトウ、ショウブオオヨトウの6種から得られたGVは、基本的にはほとんど同一のウイルスゲノムを有することが判明した。また、シロモン

ヤガGV (XcGV) のゲノムライブラリーをもとに、制限酵素切断地図を作成し、地図のゼロ点の基準である顆粒体タンパク質遺伝子の塩基配列を決定した。

### 3. XcGVの感染特性

経口接種実験により、XcGVは、供試したヤガ科14種のうち7種に感染することが明らかにされた。このうち、シロモンヤガ、ガンマキンウワバ、アワヨトウに対するXcGVの病原性を比較すると、前2種に対する病原性はほぼ同等であったが、アワヨトウに対する病原性はそれよりも弱いことが明らかにされた。また、XcGV接種後のシロモンヤガ幼虫について、感染経過の詳しい観察が行われ、2、3齢期にGVを接種すると、5齢期以降に病徴が認められること、ほとんどの個体は6齢まで生存して死亡すること等が明らかにされた。

### 4. XcGVの核多角体病ウイルス感染力増強作用と感染力増強物質の単離・精製

2種ウイルスの混合接種実験によって、XcGVが核多角体病ウイルス(NPV)の感染率を上昇させる作用を持つことを発見した。生物検定により、この感染力増強作用がXcGVの顆粒体のアルカリ可溶性画分に存在すること、XcGVの宿主であるシロモンヤガ、アワヨトウ、ガンマキンウワバの他に、XcGVに感受性を示さないヨトウガ、タバコガでもNPVの感染力増強が起こることが明らかにされた。また、活性成分は分子量約108kDaのタンパク質とされた。

本研究は、北海道の畑作地帯において複数の害虫からはじめてGVを分離し、RENパターンの解析並びに制限酵素切断地図の作成からウイルスを同定できることを明らかにした。また、シロモンヤガからの分離GV(XcGV)を用いて、ゲノムDNAのクローニングと顆粒体タンパク質遺伝子の構造解析を併せて行った。さらに感染特性の解明に加え、XcGVがNPV感染力増強作用を有することの発見並びにその活性成分の単離精製を行った。このことは、単離されたNPV感染力増強物質が、今後NPVを利用した生物的害虫防除添加剤として利用可能であることを示している。

以上のように、本研究は、学術上の新発見を行うとともに実用面でも今後の生物的害虫防除に対し多大の貢献が期待される。

よって審査員一同は、別に行った学力確認試験の結果と合わせて、本論文の提出者後藤千枝は博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。