

Isolation and characterization of a virus from *Setothosea asigna*,
a major pest insect of oil palm in South Sumatra, Indonesia

(インドネシア南スマトラにおけるアブラヤシの主要害虫 *Setothosea asigna* からのウイルス分離と性状解析)

学位論文内容の要旨

Setothosea asigna (Lepidoptera; Limacodidae) is a major defoliating pest of oil and coconuts palms, with outbreaks recorded in north-eastern Sumatra, Borneo and western Malaysia. In the outbreak, leaf surfaces are rapidly destroyed, resulting in more than a 78% loss of production in the first year and 40% in the second year. In Indonesia, epizootic outbreaks of *S. asigna* in oil palm plantations have been observed since 1996. Farmers collect the diseased larvae, store them in a freezer and, during outbreaks of *S. asigna*, spread them on oil palm leaflets. This has provided good control of the populations of pests in South Sumatra, though the causal agent in *S. asigna* has not been identified.

In this study, a *Thosea asigna* virus (TaV, a betatetravirus) was isolated from *S. asigna* suffering from epizootic disease in oil palm plantations in South Sumatra. Subsequently, the biological activities of the isolated TaV were examined. In addition, the information and structure of TaV genome were studied.

1. Isolation of a TaV from the epizootic *S. asigna* larvae collected in South Sumatra and its pathogenicity to *Limacodidae* larvae in Japan

In 2005, natural epizootics were observed during an outbreak of *S. asigna* larvae in an oil palm plantation in South Sumatra, Indonesia. The causative agent was filterable, which implied it was a virus. Since preliminary testing using reverse PCR gave a positive result for TaV, we experimented with the purification of the viral agent from the diseased larvae. Electron microscopy revealed nonenveloped virus-like particles that

were spherical in shape and about 40 nm in diameter. cDNA cloning followed by sequencing demonstrated that RNA purified from the particles contained two large open-reading-frames (ORFs) with a partly shared sequence and extensive homology (>98% identity at the nucleotide level) with ORFs of TaV encoding an RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) and the capsid protein, respectively. The pathogenicity of the purified particles against *Limacodidae* larvae in Japan was demonstrated to be very strong for *Monema flavescens* and *Austrapoda dentata*. These results indicated that the agent causing the epizootic disease among *S. asigna* larvae in the oil palm plantations was TaV which also has potential as a biological control agent for *Limacodidae* pests in Japan.

2. Functional and Structural Analyses of TaV Genome

Little is known about the function of RdRp encoded in the betatetravirus. TaV also codes for RdRp as other betatetraviruses but TaV RdRp resembles the birnavirus in the C-A-B motif arrangement in the palm subdomain. The motif C contains the highly conserved GDD sequence motif which has been postulated to be involved in the catalytic activity. On the other hand, the birnavirus RdRps lack the highly conserved GDD. The mutational analysis of the GDD sequence motif of TaV RdRp suggested the functional importance of GDD in the catalytic activity.

The RNA ligase-mediated amplification of 3' end (RLM-RACE) suggested that there was no poly(A) at the 3'-terminus of TaV genomic RNA (TaV RNA) as other members of *Tetraviridae*. The primer extension showed the incompleteness of the 5'-terminal sequence determined which was markedly shorter than those of other tetraviruses. The cap-dependent cDNA cloning suggested that the 5'-terminus of TaV RNA was not capped. On the other hand, SDS-PAGE analysis suggested tentative viral proteins (VPg) with a MW around 60 kDa, covalently linked to TaV RNA. These observations showed the uniqueness of TaV in the family *Tetraviridae*.

学位論文審査の要旨

主査	教授	伴戸久徳
副査	教授	増田 税
副査	准教授	浅野 眞一郎
副査	講師	佐原 健

学位論文題名

Isolation and characterization of a virus from *Setothosea asigna*,
a major pest insect of oil palm in South Sumatra, Indonesia

(インドネシア南スマトラにおけるアブラヤシの主要害虫 *Setothosea
asigna* からのウイルス分離と性状解析)

本論文は英文75頁、図9、2章からなり、参考論文1編が付されている。鱗翅目イラガ科に属する *Setothosea asigna* はアブラヤシやココナッツヤシを枯らせる主要害虫で有り、スマトラ島の北東部、ボルネオ、そしてマレーシア西部において大発生が報告されている。*S. asigna* が大発生するとヤシの葉の表面は短時間で食害され、大発生の1年目では生産物の損失は78%以上にのぼり、2年目においても損失は40%を超える。インドネシアにおいては、1996年以来、アブラヤシ農園において *S. asigna* に時々伝染病の流行が観察されている。近年、農民は病気にかかった *S. asigna* の幼虫を農園から集めて冷凍保存しておき、*S. asigna* の発生時にこれらの磨碎物を水で薄めて農園のアブラヤシの葉に噴霧している。この方法は、アブラヤシ害虫の個体数を減少させる手法として有効であるが、*S. asigna* 幼虫に病気を起こしている病原体については未だに解明されていなかった。

本研究内容は、南スマトラ地方のアブラヤシ農園において発生した伝染病に罹患した *S. asigna* 幼虫から、伝染病の原因ウイルスとして *Thosea asigna virus* (TaV) を分離するとともに、ウイルスの感染性などの生物活性およびゲノム構造について解析したものである。

1. 南スマトラ地方において発生した伝染病罹患 *S. asigna* 幼虫からのTaVの分離と日本に生息するイラガ類に対する病原性

2005年、インドネシアの南スマトラ地方において *S. asigna* に伝染病が自然発生した。病原体はウイルスではないかと疑い、PCRを用いて予備実験を行ったところ罹病幼虫に

RNAウイルスであるTaVが含まれている可能性が示唆された。そこで、罹病幼虫を材料として遠心分離を組合せた方法でウイルスの分離精製を試みた。その結果、膜を持たない直径約40nmのウイルス様球状粒子が精製されたことが電子顕微鏡観察によって明らかとなった。

精製粒子からRNAを抽出し、塩基配列を決定した結果、本RNAには大きなオープン・リーディング・フレーム(ORF)が2つ存在し、それらの塩基配列はTaVのRNA依存性RNA合成酵素遺伝子およびキャプシドタンパク質遺伝子とそれぞれ98%以上の類似性を示すことは判明した。また、日本に生息するイラガ類の幼虫に対する本ウイルスの病原性を調査した。その結果、本ウイルスはイラガやムラサキイラガに強い病原性を示し、感染幼虫は罹病 *S. asigna* と同様の病徴を示すことが判明した。これらのことから、アブラヤシ農園において *S. asigna* に伝染病を起こした原因因子はTaVであること、またTaVが *S. asigna* とは異なる属に分類される日本のイラガ類に強い病原性を示すことが判明した。

2. TaVゲノムの構造と機能に関する研究

TaVのRNA依存性RNA合成酵素(RdRp)は、RdRpで保存されているモチーフA、B、Cの配置が他のテトラウイルスとは異なり、ビルナウイルスと一致する。一方、TaVは他のテトラウイルスと同様に、RdRp活性に重要とされるGDD配列を含んでいるがビルナウイルスではGDD配列を欠いている。そこで、TaVのRdRpにおけるGDDに変異を導入し、RdRp活性への影響を解析した結果、ビルナウイルスとは異なりTaVのGDD配列はRdRp活性に必須であることが示唆された。

次にゲノム末端構造を解析した。まず、RACE法を用いてTaVゲノムの3'末端配列を解析したところ、他のテトラウイルスと同様にpoly(A)配列は付加されていないことが確認された。一方、TaVゲノムの5'末端には他のテトラウイルスとは異なりキャップ構造は存在せず、別の構造でブロックされている可能性が示唆された。そこで、ビルナウイルスと同様に、ゲノム5'末端にウイルスタンパク質(VPg)が共有結合している可能性について解析したところ、ゲノムに共有結合していると考えられる分子量約60kDのタンパク質が検出された。

以上、本研究はインドネシアのアブラヤシ害虫 *S. asigna* に自然発生する伝染病の原因はTaVであり、TaVは日本のイラガ類にも強い病原性を有することを明らかにした。また、RdRpの機能解析とゲノム末端構造の解析を通してTaVをテトラウイルスおよびビルナウイルスと比較しその特殊性を提示した。これらの成果は、TaVの害虫防除への利用およびTaVの分類上の位置づけを考える上で重要な知見を与えるものである。

よって審査員一同は、マリア スギハルティが博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。