

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	クアシ グエサン ルシエン
題 目	宿主昆虫体内における核多角体病ウイルスの潜在感染 (Latency of Nucleopolyhedroviruses in homologous and heterologous hosts)
<p>アワヨトウ核多角体病ウイルス(以下アワヨトウ NPV)芸北株とハスモンヨトウ核多角体病ウイルス(以下ハスモンヨトウ NPV)薩摩株をそれぞれハスモンヨトウ幼虫とアワヨトウ幼虫に交差接種して、病原性を比較した。その結果、アワヨトウ NPV 芸北株は両種に病原性が認められ、アワヨトウに対する病原力がより強かった。一方、ハスモンヨトウ NPV 薩摩株はハスモンヨトウにのみ強い病原性が認められた。さらに両 NPV の DNA を解析し、ハスモンヨトウ NPV 薩摩株は既報のハスモンヨトウ NPV のグループに属し、アワヨトウ NPV はヨトウガ NPV のグループに属し、中国から分離されている既報のアワヨトウ NPV とは異なることを明らかにした。</p> <p>アワヨトウ NPV を 115 頭のハスモンヨトウに感染させた死亡個体から個別に回収した NPV を、アワヨトウおよびハスモンヨトウに再接種した結果、115 試料の中の 1 試料はアワヨトウに対する病原性が無く、ハスモンヨトウだけに病原性を示した。これらのことから、ハスモンヨトウの体内に潜在ウイルスが存在し、これが活性化されたことが示唆された。Nested PCR 法によって活性化したウイルスが、ハスモンヨトウの体内に潜在していたハスモンヨトウ NPV であることを確認した。</p> <p>次に、Nested PCR 法によってハスモンヨトウ核多角体病ウイルスの <i>lef-8</i> 遺伝子断片の増幅を行い、ハスモンヨトウの卵塊と幼虫体内から潜在ウイルスの検出を試みた。その結果、鹿児島大学累代飼育系統と鹿児島県内各地の野外個体群からそれぞれ 22.0%と 22.6%の割合で潜在ウイルスが検出された。PCR 産物の塩基配列は既報のハスモンヨトウ NPV の <i>lef-8</i> 遺伝子の配列と 99%の相同性を示した。これらのことから、核多角体病ウイルスを代替宿主で増殖させる際には潜在ウイルスの存在に留意する必要があると考えられた。</p> <p>さらに、アワヨトウ NPV をハスモンヨトウに接種して増殖した場合の病原性について検討した。アワヨトウ NPV をハスモンヨトウで増殖したものを原株として、アワヨトウでの増殖を 1 回、2 回および 8 回繰り返した試料をそれぞれアワヨトウおよびハスモンヨトウに再接種した。その結果、ハスモンヨトウに対する病原力が大きく低下したが、PCR 産物の中にはハスモンヨトウ NPV の <i>lef-8</i> 遺伝子領域は保存されていた。このことから、ハスモンヨトウ NPV はアワヨトウに感染することは可能であるが、潜在感染として存在していることが示唆された。</p>	

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	Kouassi N'Guessan Lucien
題 目	Latency of Nucleopolyhedroviruses in homologous and heterologous hosts (宿主昆虫体内における核多角体病ウイルスの潜在感染)
<p>The infectivity of two nucleopolyhedroviruses (NPVs), MyseNPV G isolated from <i>Mythimna separata</i> (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) and SpltNPV S isolated from <i>Spodoptera litura</i> (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) was compared. MyseNPV G was more pathogenic against <i>M. separata</i> than against <i>S. litura</i>. Although SpltNPV S was more pathogenic than MyseNPV G against <i>S. litura</i>, it did not infect <i>M. separata</i>. Restriction endonuclease (REN) analysis of viral genomic DNA revealed that the two NPVs have quite different REN profiles. Based on nucleotide sequences of the coding regions of <i>polyhedrin (polh)</i>, <i>lef-8</i> and <i>lef-9</i>, SpltNPV S was closely related to other SpltNPV isolates, whereas MyseNPV G appeared to belong to the <i>Mamestra</i> NPV group, and was distinct from a Chinese isolate of <i>Leucania (=Mythimna) separata</i> NPV.</p> <p>When each body fluid of 115 dead larvae of laboratory stock of <i>S. litura</i> infected with MyseNPV G was inoculated to <i>M. separata</i> larvae, one sample failed to kill <i>M. separata</i>. REN analysis and nucleotide sequences of genomic DNA extracted from occlusion bodies from that unique sample revealed that SpltNPV has been activated in the <i>S. litura</i> larva. Then, nested PCR amplification of a SpltNPV <i>lef-8</i> gene fragment was performed on egg masses and larvae of <i>S. litura</i>, and resulted in detection of a latent SpltNPV in 20.0% of "healthy" laboratory stock samples, and also in 22.6% of samples collected at different periods and in remote places in Kagoshima prefecture. The PCR product sequences showed 99% similarity to the published <i>lef-8</i> sequence of SpltNPV, confirming that the amplification products were derived from SpltNPV. Further, the activation of the latent virus by MyseNPV G provoked a change in the virulence of MyseNPV samples collected from cadavers of <i>S. litura</i>. These data suggest that caution should be taken when using <i>S. litura</i> as a host to produce heterologous NPVs.</p> <p>A strategy to recover the pathogenicity of MyseNPV samples collected from cadavers of <i>S. litura</i> was elaborated. The original isolate of MyseNPV G (MyseNPV G0) was propagated through <i>S. litura</i>. Collected virus from the dead <i>S. litura</i> was propagated once (MyseNPV-m1), twice (MyseNPV-m2), and eight times (MyseNPV-m8) through <i>M. separata</i>, and these samples were inoculated to both of the insects. Although the viral relative potency between the two hosts was gradually ascendant from 18 to 340 with a drastic decrease of the pathogenicity against <i>S. litura</i>, the PCR amplification proved that (MyseNPV-m8) still contains <i>S. litura</i> NPV <i>lef-8</i> gene fragment. These results suggest that <i>S. litura</i> NPV is able to infect <i>M. separata</i>, but the virus remain in a latent state, and also the serial passage might provoke a change in MyseNPV G that weakens its pathogenicity against <i>S. litura</i>.</p>	

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者氏名	Kouassi N'Guessan Lucien
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 津田 勝 男
	副査 鹿児島大学 准教授 坂 卷 祥 孝
	副査 宮 崎 大学 教授 植 松 秀 男
	副査 鹿児島大学 教授 曾 根 晃 一
	副査 佐 賀 大学 教授 早 川 洋 一
審査協力者	
題 目	Latency of Nucleopolyhedroviruses in homologous and heterologous hosts (宿主昆虫体内における核多角体病ウイルスの潜在感染)
<p>昆虫ウイルスの一種である核多角体病ウイルス(以下 NPV)は、害虫の微生物的防除素材として実用化が進んでいる。NPV は最初に分離された宿主昆虫名によって命名されるため、対象害虫が本来の宿主であるか偶発的に感染した代替宿主であるかを確認する必要がある。また、ウイルスは宿主昆虫の虫体を利用して増殖するが、潜在ウイルスが存在する可能性が指摘されている。本研究では NPV について、遺伝子解析による類縁関係を明かにするとともに潜在ウイルスの存在について検討し、以下の新知見を得ている。</p> <p>アワヨトウとハスモンヨトウからそれぞれ分離されたアワヨトウ NPV 芸北株とハスモンヨトウ NPV 薩摩株をそれぞれハスモンヨトウ幼虫とアワヨトウ幼虫に交差接種して、病原性を比較した結果、アワヨトウ NPV 芸北株は両種に病原性が認められ、アワヨトウに対する病原力がより強かった。一方、ハスモンヨトウ NPV 薩摩株はハスモンヨトウにのみ強い病原性が認められた。さらに両 NPV の DNA を解析し、ハスモンヨトウ NPV 薩摩株は既報のハスモンヨトウ NPV のグループに属し、アワヨトウ NPV はヨトウガ NPV のグループに属し、中国から分離されている既報の</p>	

アワヨトウ NPV とは異なることを明らかにした。

次に、アワヨトウ NPV を 115 頭のハスモンヨトウに感染させた死亡個体から個別に回収したウイルス試料を、アワヨトウおよびハスモンヨトウに再接種した結果、115 試料の中の 1 試料はアワヨトウに対する病原性が無く、ハスモンヨトウだけに病原性を示した。これらのことから、ハスモンヨトウの体内に潜在ウイルスが存在し、これが活性化したことが示唆された。Nested PCR 法によって活性化したウイルスが、ハスモンヨトウの体内に潜在していたハスモンヨトウ NPV であることを確認した。さらに、Nested PCR 法によってハスモンヨトウの卵塊と幼虫体内から潜在ウイルスの検出を試みた結果、鹿児島大学累代飼育系統と鹿児島県内各地の野外個体群からそれぞれ 22.0% と 22.6% の割合で潜在ウイルスが検出された。PCR 産物の塩基配列は既報のハスモンヨトウ NPV と 99% の相同性を示した。これらのことから、NPV を代替宿主で増殖させる際には潜在ウイルスの存在に留意する必要があることを指摘した。

さらに、アワヨトウ NPV を増殖する際の宿主昆虫の影響について検討した。アワヨトウ NPV をハスモンヨトウで増殖したものを原株とし、アワヨトウでの増殖を 1 回、2 回および 8 回繰り返した試料をそれぞれアワヨトウおよびハスモンヨトウに再接種して病原性の変化を検討した結果、増殖を繰り返すほどハスモンヨトウに対する病原力が大きく低下したが、PCR 産物の中にはハスモンヨトウ NPV の遺伝子領域は保存されていた。このことから、ハスモンヨトウ NPV はアワヨトウに感染することは可能であるが、潜在感染として存在していることが示唆された。

以上のように、本研究は害虫の生物的防除素材として有効な核多角体病ウイルスについて、遺伝子を解析することにより本来の所属を明かにするとともに、潜在ウイルスを検出する方法を確立した。特に昆虫体内に潜在ウイルスが存在するか否かについては、従来から賛否両論が存在し結論が出ていなかったが、本研究では潜在ウイルスを検出する方法を確立して、潜在ウイルスの存在を証明するとともに継代増殖における動態についても新知見を得た。本研究の成果は害虫の生物的防除に NPV を利用する際に大きな問題となるウイルスの同定と大量増殖するための宿主昆虫の選定に有効活用できるものであり、審査員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として十分な価値があるものと判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	Kouassi N'Guessan Lucien
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 津田勝男
	副査 鹿児島大学 准教授 坂巻祥孝
	副査 宮崎大学 教授 植松秀男
	副査 鹿児島大学 教授 曾根晃一
	副査 佐賀大学 教授 早川洋一
審査協力者	
実施年月日	平成21年1月13日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答・筆答	
<p>主査及び副査は、平成21年1月13日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士(農学)の学位を与えるに十分な学力ならびに見識を有すると認めた。</p>	

学位申請者
氏名

Kouassi N'Guessan Lucien

- [質問 1] 潜在ウイルスが活性化するメカニズムは分かっているのか。
[回答 1] 潜在ウイルスの存在については賛否両論があったが、DNA レベルでの研究によって存在が証明された。メカニズムは未だはっきりは分かっていない。
- [質問 2] Nested PCRでごく微量のDNAを検出しているが、どれくらいのレベルのDNAがあれば感染と言えるのか。
[回答 2] 昆虫ウイルスでは、DNAの量を感染の基準にしていない。虫が死亡すればもちろん感染で、DNAがあっても死亡しなければ潜在感染としている。
- [質問 3] 核多角体病ウイルスを代替宿主で増殖して、潜在ウイルスが活性化した例はあるのか。
[回答 3] カナダで 80%の割合で活性化した例が報告されている。
- [質問 4] 核多角体病ウイルスを代替宿主で増殖した時に、潜在ウイルスが活性化して病原力が低下したという例はあるのか。
[回答 4] *Spodoptera frugiperda*を代替宿主としてウイルスを増殖した時に病原力が低下したという報告があるが、その論文では潜在ウイルスとの関係は論じられていない。
- [質問 5] 潜在ウイルスには元々のホストが存在するということか。
[回答 5] 潜在ウイルスは経卵伝染するが、ウイルスフリーの個体が存在するということは、元々はウイルスを保持していなかったこと。どのようにして潜在感染するようになったかは、分からない。
- [質問 6] ハスモンヨトウに潜在感染していたハスモンヨトウ核多角体病ウイルスはハスモンヨトウ核多角体病ウイルス薩摩株なのか。
[回答 6] DNAを比べると、3箇所のアミノ酸が違っているので、薩摩株とは言えない。しかし、アワヨトウ体内から検出したウイルスは薩摩株だった。
- [質問 7] 場所によって潜在ウイルスの検出率に差があるのは何故か。
[回答 7] サンプル数が少ないので、はっきりとした傾向は言えない。
- [質問 8] 野外で潜在ウイルスを保持したハスモンヨトウが増えると、野外個体群のウイルス感受性は高くなるのか。
[回答 8] 潜在ウイルスが活性化するメカニズムは不明だが、高温条件で活性化しやすいと考えている。そうであれば潜在ウイルス保持個体群を放飼しておけば高温条件下ではより効果的に防除ができるかもしれない。
- [質問 9] DNAのシクエンスは全塩基を調べているのか。何%が一致すれば同じ種というように、同定についての基準はあるのか
[回答 9] *polh*と*lef8*と*lef9*の領域の配列を基にしているので部分的。昆虫ウイルスの同定についての基準は決まっていないが、キムラパラメーターという計算式を使って、違いが 0.15%以下であれば同種と判断するという案が提唱されている。

[質問 1 0] ハスモンヨトウ核多角体病をアワヨトウに接種した場合、病原性は変化するのか。

[回答 1 0] ハスモンヨトウ核多角体病はアワヨトウに感染しないので、実験できない。潜在感染しているハスモンヨトウ核多角体病ウイルスを活性化できれば、おもしろい実験ができると考えられる。

[質問 1 1] アワヨトウ核多角体病ウイルスが活性化の要因(刺激)となったが、ハスモンヨトウにおいて、ハスモンヨトウ核多角体病ウイルスも活性化の要因となっている可能性はあるか。

[回答 1 1] 可能性はあると思う。

[質問 1 2] 経歴が異なるアワヨトウ核多角体病ウイルスの病原性の差は、潜在ウイルスを活性化させる能力の違いである可能性は考えられるか。

[回答 1 2] どちらのタイプも活性化できると考えているので、能力の違いではないと考えている。

[質問 1 3] 潜在ウイルスを保持している割合は、アワヨトウの方がハスモンヨトウより高いのは何故か。

[回答 1 3] ハスモンヨトウ核多角体病ウイルスはハスモンヨトウを殺すが、アワヨトウは死なないので潜在的に保持することになる。その結果、保持している割合は高くなる。

[質問 1 4] ハスモンヨトウの体内にアワヨトウ核多角体病ウイルスが潜在感染している場合も考えられるか。

[回答 1 4] 考えられる。虫はいろいろなウイルスを摂取していると考えられるので、その時に死ななかった場合には、潜在感染として体内に保持される場合があると考えられる。

[質問 1 5] 核多角体病ウイルスでは、虫が多角体を摂食することによって感染が起こるのか。

[回答 1 5] 先ず、虫が多角体を摂食し、多角体外膜が壊れて、多角体タンパクが溶解し、中のウイルス粒子が中腸細胞に感染する。

[質問 1 6] 今回は多角体を摂食させる経口接種で実験を行っているが、接種方法を変えた場合に結果が違ってくことはないか。

[回答 1 6] ウイルス粒子を食べさせてもほとんど感染しないので、この場合は体腔内への経皮接種をすることになる。実際に実験してみないと分からないが、おそらく同じ結果になると考えられる。

[質問 1 7] アワヨトウ核多角体病ウイルスを接種して潜在感染していたハスモンヨトウ核多角体病ウイルスが活性化したということだが、これはハスモンヨトウ核多角体病ウイルスの DNA が recombination でアワヨトウ核多角体病ウイルスに取り込まれたと考えることはできないか。

[回答 1 7] それは考えられない。もしそうであれば両方のウイルスのプライマーで検出されるはずだが、実際にはハスモンヨトウ核多角体病ウイルスのプライマーでしか検出されない。

[質問 1 8] 115 サンプルの中の 1 サンプルは、活性化したハスモンヨトウ核多角体病ウイルスだけをひろったということか。

[回答 1 8] 他のサンプルも活性化したウイルスを含んでいるかもしれないが、接種したアワヨトウ核多角体病ウイルスが同時に存在するためにひろうことが出来なかったと考えている。